

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

SAMANTHA SANTOS SILVEIRA

**Avaliação ecotoxicogenética e
possibilidade de descontaminação de lodo
de esgoto para fins agrícola**



Rio Claro
2018

SAMANTHA SANTOS SILVEIRA

AVALIAÇÃO ECOTOXICOGENÉTICA E POSSIBILIDADE DE
DESCONTAMINAÇÃO DE LODO DE ESGOTO PARA FINS
AGRÍCOLA

Orientador: Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Co-orientador: Prof^a. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales

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

Rio Claro
2018

S587a

Silveira, Samantha Silveira

Avaliação ecotoxicogenética e possibilidade de descontaminação de lodo de esgoto para fins agrícola / Samantha Silveira Silveira. -- Rio Claro, 2018

32 p. : tabs., fotos + 1 CD-ROM

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) -
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales

Coorientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Lodo de esgoto. 2. Genotoxicidade. 3. Allium cepa. 4. Resíduo sólido. 5.
Bioestimulação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

Dedico este trabalho aos meus pais e a todos os professores que contribuíram para minha formação, tanto intelectual, quanto pessoal.

AGRADECIMENTOS

A realização desse Trabalho de Conclusão de Curso me proporcionou imensos aprendizados e representa a realização de um sonho, assim como o final de uma etapa de muito crescimento e de dificuldades que foram superadas. Nada disso se tornaria possível se não fosse pela ajuda de tantas pessoas especiais, por isso quero agradecer:

À Deus por todas as oportunidades que tive ao longo da vida, por concluir este trabalho com saúde, pela força que recebi em alguns momentos difíceis durante a realização do mesmo e por todas as pessoas que foram colocadas em meu caminho.

Aos meus pais, Silvana e Gilberto, por toda estrutura e apoio oferecidos, por priorizarem a educação e pelo enorme esforço que tiveram para me proporcionar a educação que tenho hoje. Não seria quem sou, se não fosse pela criação e pelo amor de vocês.

Aos meus irmãos, Dudu e Nayara, por tudo o que dividem comigo, pela convivência e pelo apoio e estímulo que sempre me deram.

Aos familiares que sempre torceram e acreditaram em mim, especialmente a minha família de Limeira: tia Tânia, tio Beto e minha irmã de coração, Muryel, por terem me acolhido com tanto amor e paciência na casa de vocês, pela preocupação, por sempre estarem presentes e principalmente pela grande ajuda e apoio na adaptação longe da casa dos meus pais e depois em morar sozinha.

Ao Otávio, pela força nos dias mais difíceis, pela imensa ajuda em todos os imprevistos que tive durante o curso de graduação e execução do trabalho, pela paciência nos muitos momentos estressantes, por ter confiado em mim e por sempre me alegrar, tornando tudo mais leve e alegre.

À minha amiga, irmã e afilhada, Bruna, pelo grande incentivo e pela força, por sempre me compreender, pelas conversas e desabafos diários e por todos os conselhos.

À minha orientadora Dânia, por ter me aceitado como sua aluna, pela paciência em ensinar e orientar. Aprendi coisas que não podem ser escritas, pois além de uma exemplar pesquisadora, sempre muito competente e organizada (me sinto honrada por ter aprendido a trabalhar com você) é também muito humana, generosa e atenciosa. Sempre compartilhou seus ensinamentos com muito cuidado, respeito e humildade. Além da inspiração como profissional, também a considero um exemplo como pessoa, e sei que este trabalho não teria sido executado sem a sua paciência, respeito e incentivo,

já que às vezes, confiou mais em mim do que eu confiava. Com certeza são ensinamentos e valores que levarei para toda a vida.

À minha co-orientadora, professora Marin, por ter me recebido com tanta simpatia em seu laboratório, pelos conhecimentos compartilhados, pelo convívio alegre e gentil no laboratório, pelos incentivos, por ter me ensinado que com competência, respeito, honestidade, dedicação e amor ao que se faz, tudo é possível. Também é um exemplo de pesquisadora, professora e pessoa que guardarei sempre em meu coração.

À todos os meus colegas de faculdade, especialmente à Ana, Melissa, Nayara, Pumba e Léo, pela grande ajuda nas disciplinas, por me ajudarem a entender todas as outras burocracias que a faculdade envolve, por estarem presentes e pelos incentivos. O curso e o desenvolvimento do projeto foi muito mais fácil com vocês.

Aos meus colegas do Laboratório de Mutagênese Ambiental: Laís, Letícia Gigeck, Letícia Gonçalves, Cleiton, Willian, Pati, Ana Paula, Letícia Rocha, Franco, Nádia, Adriana, Matheus, Márcia, Michele e Raquel, agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e pela ajuda ao longo do trabalho.

À Mileni, pela amizade, compreensão e pela imensurável ajuda em todos os setores citados acima: pelo auxílio nos experimentos do laboratório, na escrita dos relatórios e do TCC, nas disciplinas da faculdade, nas questões de casa e principalmente por sempre me ouvir, estar presente e enfrentar comigo as situações inesperadas que aconteceram durante o percurso. Você foi um dos anjinhos enviados para que eu conseguisse finalizar tanto o curso de graduação quanto este trabalho, e acho que nunca conseguirei retribuir tantos favores.

“Olhe para as estrelas e não para os seus
pés.”

(Stephen Hawking)

RESUMO

A introdução constante de resíduos no ambiente caracteriza-se em um sério problema ambiental, impulsionando a busca pelo reaproveitamento de resíduos. Dentre esses resíduos, encontra-se o lodo de esgoto (LE), o qual é produzido em grandes quantidades pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). O LE, por conter uma grande quantidade de matéria orgânica e nutrientes, apresenta alto potencial agrônômico. No entanto, a ocorrência de substâncias tóxicas pode impedir o seu uso agrícola. Uma das soluções para redução de seu potencial tóxico é a possível biodegradação dos seus contaminantes. Assim, o presente trabalho teve como objetivo propor uma tecnologia eficiente e de baixo custo para detoxificar lodo de esgoto (LE), a fim de reutilizá-lo como fertilizante agrícola. O LE anaeróbio estudado foi proveniente da ETE Carioba (Americana – SP), a qual trata esgoto doméstico e industrial por meio de filtro biológico. Como agentes bioestimulante e descompactante, foram utilizados borra de café e bagaço de cana-de-açúcar. Para realizar a biorremediação foram feitas misturas contendo LE e solo; LE, solo e bagaço; LE, solo e borra. As análises ocorreram no período inicial T0 e após dois (T1), quatro (T2) e seis (T3) meses de tratamento, sendo que no T0 também foram avaliados o LE e o solo puros. Como forma de avaliação da eficiência do processo, foi realizado um bioensaio ecotoxicogenético com *Allium cepa*, onde os parâmetros utilizados foram o índice de germinação, a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade. Os resultados obtidos indicaram que a borra de café foi o único agente estudado que foi capaz de diminuir significativamente os danos causados pelo LE em relação a toxicidade. Desse modo, a tecnologia aqui empregada, especificamente com o reaproveitamento da borra de café, se mostrou bastante satisfatória para a transformação de um resíduo potencialmente tóxico, como o LE, em aditivo agrícola.

Palavras-chaves: Bioestimulação. Resíduo sólido. Toxicidade. *Allium cepa*. Aproveitamento de resíduos.

Sumário

1 INTRODUÇÃO	8
2 OBJETIVOS	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 Descrição da ETE estudada	13
3.2 Coleta do LE e agentes bioestimulantes	13
3.3 Ensaio para detoxificação do LE	14
3.4 Avaliação da toxicidade do LE por meio do organismo teste <i>Allium cepa</i>	15
3.4.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	17
5 CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

O crescimento populacional dos centros urbanos tem proporcionado um equivalente aumento de diversos resíduos, os quais, muitas vezes, são lançados no ambiente sem tratamento adequado ou sem qualquer perspectiva de reciclagem. Dentre esses resíduos, encontra-se o lodo de esgoto (LE), o qual é resultante de processo de sedimentação realizado ao longo do tratamento primário e secundário de águas residuais nas Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) (ROIG et al., 2012). Após o tratamento, a parte líquida é descartada em um recurso hídrico e a parte sólida (LE), onde os resíduos presentes no esgoto se concentram (HELALEH et al., 2005), é coletada para posterior disposição.

De acordo com Andreoli (1999), a quantidade de LE gerado por uma ETE corresponde a cerca de 2% do volume de esgoto tratado. No entanto, quanto mais moderna for a planta da ETE, mais eficiente será o tratamento realizado no efluente líquido e, conseqüentemente, maior será a quantidade de LE gerado (CORRÊA; FONSECA; CORRÊA, 2007). O Brasil produz, anualmente, cerca de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca de LE, derivada da produção diária de cerca de 80 a 200 litros/hab, que corresponde a produção aproximada de 150 g/dia de LE centrifugado (PEDROZA et al., 2010). Este valor, no entanto, refere-se ao esgoto coletado e tratado de apenas 40,8% da população urbana brasileira (SNIS, 2016). O Estado de São Paulo também apresenta uma previsão de crescimento na produção de LE, uma vez que dos 87% do lodo coletado, 62% recebem tratamento (CETESB, 2017). Atualmente, a maior parte do LE gerado é destinado para aterros sanitários terceirizados específicos para este resíduo, o que aumenta significativamente os custos das ETES.

Tais fatos alertam para a necessidade imediata de, além de ações políticas eficientes, estabelecer técnicas mais apropriadas que resultem em uma melhor disposição deste resíduo no ambiente, estimulando, não só práticas de minimização da produção de resíduos, mas também a priorização da reciclagem, como uma opção de destino final (OLIVEIRA et al., 2005). Neste contexto, uma série de alternativas vem sendo propostas para a destinação deste resíduo, como, por exemplo, sua disposição em aterros sanitários próprios, queima, disposição oceânica, na produção de cimento e tijolos, além de sua utilização como condicionante de solo e fertilizante agrícola (SILVÉRIO, 2004).

Porém, grande parte destes mecanismos acarretam sérias conseqüências em relação à contaminação e ao desequilíbrio ecológico. Neste sentido, a disposição oceânica que foi um dos métodos mais utilizados para o descarte do LE antigamente (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008) provocou alterações preocupantes no oceano. O descarte do LE no oceano na região de

Nova Iorque desequilibrou sua comunidade bentônica (BOTHNER et al, 1994). Já na região da Escócia, foi observado por Rodger, Davies e McHenery (1992) aumento na concentração de metais, carbono orgânico e nitrogênio, o que alterou o potencial redox dos sedimentos orgânicos. Devido a tais prejuízos, o descarte do LE em oceanos foi banido em vários países, incluindo os EUA (BOTHNER et al, 1994) e países da Europa (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008).

A disposição do LE em aterros sanitários ainda é um dos principais métodos utilizados no Brasil (CASTRO; SILVA; SCALIZE, 2015), mas também possui muitas desvantagens ambientais, como a geração de gases de efeito estufa, a poluição do ambiente com metais e outras substâncias tóxicas, além de introduzir organismos patogênicos no ambiente (GRAY, 2010). Tal alternativa também possui desvantagens por necessitar de grandes ambientes que sejam afastados da população, se tornando um processo bastante oneroso.

Contudo, a utilização do LE como condicionante de solos agrícolas parece ser a opção mais sustentável (GIANICO et al., 2013), já que o LE apresenta, além de uma quantidade expressiva de matéria orgânica, outros nutrientes como nitrogênio, fósforo e potássio, que favorece sua aplicação em solos agrícolas por promover uma melhora de características físicas, químicas e biológicas do solo (BOVI et al., 2007), como por exemplo a diminuição de sua densidade, correção de seu pH, aumento da condutividade e porosidade do solo, maior retenção de líquidos e teor de carbono e o aumento na capacidade de retenção de nutrientes essenciais às plantas (MELO; MARQUES; MELO; 2001; SINGH; AGRAWAL, 2008).

No entanto, em decorrência do próprio processo de sua geração, o LE pode conter inúmeros contaminantes, tanto orgânicos, como fenóis, benzenos, antracenos e alquilbenzenos (HOLMSTRUP et al., 2001; PARAIBA; SAITO, 2005) quanto inorgânicos como, por exemplo, metais tóxicos como níquel, chumbo, cádmio e mercúrio (LOPES et al., 2005), além de microrganismos patogênicos (LOPES et al., 2005; TSAKOU; ROULIA; CHRISTODOULAKIS, 2001), o que pode impedir seu uso agrícola, devido aos riscos de contaminação ambiental, da saúde humana e da biota associada (CESAR et al., 2008). Assim, frente ao alto potencial de uso do LE como fertilizante agrícola, vem sendo estimulada a busca de novas tecnologias que permitam detoxificar o LE com baixos custos operacionais, para que o mesmo possa ter um destino mais nobre (correção de solos desgastados) e mais seguro para o ambiente (TAS, 2010). Dentre essas tecnologias, podemos destacar a

biorremediação, por ser uma metodologia segura, eficaz e de baixo custo para diminuir a carga tóxica do LE (MAZZEO et al., 2015).

O processo de bioestimulação baseia-se na adição de agentes estimulantes em uma matriz com características orgânicas. Esse processo tem como intuito estimular o crescimento da microbiota, que por meio de várias vias enzimáticas pode metabolizar compostos tóxicos em substâncias atóxicas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Uma característica muito favorável desta tecnologia é sua fácil aplicabilidade em larga escala, visto que pode ser realizada em ambientes não estéreis (WATANABE, 2001).

Um bom agente bioestimulante é o bagaço de cana-de-açúcar, sendo um dos maiores resíduos produzidos no Brasil, especialmente no estado de São Paulo (TEIXEIRA; PIRES; NASCIMENTO, 2007). Dentre seus benefícios estão a descompactação do solo, maior aeração no sistema e o fornecimento de carboidratos, o que estimula o desenvolvimento de microrganismos biodegradadores (PANDEY et al., 2000; PEREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004).

Outro agente bioestimulante que tem propriedades interessantes para o crescimento de microrganismos é a borra de café, cuja produção mundial está na ordem de toneladas. Esse agente, que é resultante, do preparo da bebida em cafeterias, restaurantes ou residências (CRUZ et al., 2014), pode ser utilizado, segundo Murthy e Naidu (2012), como substrato para crescimento fúngico, que pode favorecer a biodegradação de substâncias tóxicas, pelo incremento da uma maior diversidade microbiana envolvida no processo.

Sendo assim, a utilização de resíduos industriais e domésticos como bioestimulantes possibilita um destino final mais nobre ao LE com uma tecnologia de simples aplicação e com baixos custos, além de aproveitar resíduos produzido em grande escala no país.

Tendo em conta a complexidade da composição do LE e a dificuldade para identificar todos os seus componentes é necessário avaliar seu potencial tóxico, bem como verificar a eficiência do processo de biorremediação para que este possa ser utilizado em solos sem apresentar riscos de contaminação. Para este fim vem sendo proposto o uso de bioensaios (MAILA; CLOETE, 2005). Em ensaios com solo, as plantas são consideradas ótimos bioindicadores, já que este substrato é o meio de crescimento para a grande maioria delas (WHITE; CLAXTON, 2004). Dentre os vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* destaca-se pelas suas características citogenéticas apropriadas e pela facilidade de cultivo e desenvolvimento do teste, o que a tornam um excelente organismo-teste (KURÁS et al., 2006; RANK; NIELSEN, 1998). Recentemente, essa espécie vem sendo indicada também como um

organismo-teste bastante sensível para avaliação da eficiência de processos de biorremediação (MAZZEO et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018).

Entre os ensaios mais recomendados para análises ecotoxicogenéticas encontram-se os testes de aberrações cromossômicas e o de micronúcleo. O teste de aberrações cromossômicas é muito utilizado para avaliar o potencial genotóxico do material estudado. Sua aplicação é simples e de baixo custo, sendo indicado para o monitoramento de poluição e para a avaliação de agentes tóxicos (GROVER; KAUR, 1999). Segundo Grover e Kaur. (1999) e Matsumoto e Marin-Morales. (2004), o teste de aberrações cromossômicas realizado em *A. cepa* é eficiente para analisar efeitos genotóxicos de esgotos industriais e domésticos, fornecendo uma rápida avaliação desses parâmetros. O teste do micronúcleo também é um método simples e de baixo custo de aplicação, indicando se houve danos no material genético devido à exposição do organismo à um agente mutagênico (HEDDLE et al., 1983).

Assim, este projeto propõe o desenvolvimento de uma metodologia eficiente e de baixo custo para a detoxificação de LE contaminado, o qual, pela legislação vigente, descrita no Artigo 11 da Resolução nº 375 do CONAMA, de 29 de agosto de 2006 (BRASIL, 2006), não pode ser destinado para fins agrícola. Pelo potencial orgânico do LE, esta detoxificação poderia transformar esse resíduo em um interessante fertilizante de solos agrícolas, que poderia ser aplicado em larga escala no país. Esse novo destino ao LE agregaria valores ao resíduo de ETEs pela sua possibilidade de uso como fertilizante agrícola, diminuição dos custos com a disposição em aterros sanitários e por possibilitar uma nova fonte de renda para a empresa, sem contar com os benefícios ambientais associados a este destino.

2 OBJETIVOS

Visando um melhor gerenciamento do LE, devido ao seu considerável potencial poluidor, ao alto custo de disposição deste resíduo e à sua produção crescente, em especial no Brasil, este projeto teve por objetivos:

- desenvolver uma tecnologia sustentável, que possibilite descontaminar um resíduo de origem urbana, altamente detrimental para o ambiente (LE), por meio de um processo de baixo custo, que associa outros resíduos (agroindustriais e doméstico) ao LE, cujo produto final possa ser utilizado como aditivo agrícola.

- testar a eficiência da incorporação dos resíduos borra de café e bagaço de cana-de-açúcar ao processo de detoxificação do LE, por um período de dois meses, e comparar a efetividade destes materiais como agentes bioestimulantes do processo;

- caracterizar o potencial ecotoxicogenético de amostras de LE anaeróbico, derivado de tratamento de efluente sanitário e industrial, antes e após 2, 4 e 6 meses de bioestimulação, por meio de ensaios com o organismo-teste *Allium cepa*;

- propor uma solução ecologicamente correta para a disposição e uso de um resíduo perigoso e de produção crescente e contínua no país.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Descrição da ETE estudada

As amostras de LE anaeróbio utilizadas na seguinte pesquisa foram obtidas na ETE Carioba, localizada no município de Americana-SP. Este município apresenta uma população urbana de 228.251 habitantes e pertence à Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHI 5, a qual compreende a bacia dos rios Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ).

A ETE Carioba é responsável pelo tratamento de efluentes de esgoto de origem doméstica e industrial, a partir do uso de filtros biológicos, atendendo cerca de 85% da população do município. Esta ETE possui vazão média de 420L/s, correspondente a aproximadamente 1.100.000 m³/mês, com eficiência média de 36%, sendo que o efluente líquido final é lançado no Rio Piracicaba. Quanto ao resíduo sólido gerado, são produzidos cerca de 420 ton/mês de lodo anaeróbio, com teor de sólidos entre 36-38% (DAE Americana – comunicação pessoal, 2016). Após estabilização em biodigestor, adição de polímero e centrifugação, o lodo é destinado para o aterro sanitário industrial ESTRE, sediado em Paulínia-SP, acarretando para a ETE um custo adicional considerável ao processo de tratamento realizado.

3.2 Coleta do LE e agentes bioestimulantes

Amostras de lodo anaeróbio foram coletadas em 3 dias distintos ao longo de uma semana, a partir da pilha de LE formada ao final do processo de tratamento na ETE Carioba, antes de seu encaminhamento para o aterro sanitário.

Outro resíduo empregado neste projeto foi o bagaço da cana-de-açúcar, obtido em indústrias sucroalcooleiras, após a moagem da cana. Este material foi triturado grosseiramente e utilizado neste estudo como agente descompactante e estimulante do processo de detoxificação do LE.

A borra de café também foi utilizada como material bioestimulante do processo, sendo adquirida em cafeterias locais, pela coleta do resíduo resultante de máquinas de café expresso, após o preparo da bebida.

O solo utilizado para o preparo das diferentes associações solo/LE foi coletado no Jardim Experimental da UNESP, Campus Rio Claro. Este solo foi escolhido pois já foi caracterizado previamente quanto à sua textura argilosa, condutividade elétrica de 146,7 $\mu\text{S}/\text{cm}$ e ausência de toxicidade.

3.3 Ensaio para detoxificação do LE

Para a biorremediação do LE, foi empregado o processo de bioestimulação, que consiste em aumentar a biomassa microbiana por meio da inserção de agentes estimulantes, que neste caso foram o bagaço-de-cana-de-açúcar e a borra de café.

As amostras foram acondicionadas em caixas de aço inox (24 cm de largura X 20cm de altura X 30 cm de comprimento), mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local coberto e sob temperatura ambiente. A primeira camada de cada cuba consistiu de esferas de vidro a fim de evitar o acúmulo de água e adensamento das amostras. O experimento foi desenvolvido em triplicata (Figura 1).



Figura 1. A. Cubas de inox acondicionadas no jardim experimental da UNESP – Campus de Rio Claro; B. Cuba de inox contendo a amostra; C. Cuba de inox contendo as esferas de vidro que ficaram por baixo das amostras.

A preparação das amostras foi realizada em proporções volumétricas, já pensando na facilidade de extrapolação destas medidas para aplicação em escala real (como por exemplo, 3 caçambas de LE + 3 caçambas de solo...), como segue:

- LE + solo (3:3 – v/v);
- LE + solo + bagaço de cana-de-açúcar (3:3:1 – v/v/v);
- LE + solo + borra de café (3:3:1 – v/v/v).

A umidade das amostras foi ajustada para 70% da capacidade de campo, garantindo uma condição ótima para o desenvolvimento dos microrganismos. Esta umidade foi reajustada a cada semana, para compensar as perdas por evaporação, por se tratar de um sistema aberto.

Os períodos de bioestimulação avaliados para este estudo foram de 0, 2, 4 e 6 meses. Decorrido cada período, uma parte das amostras foi coletada para a verificação do seu potencial tóxico pelo teste de *A. cepa*.

3.4 Avaliação da toxicidade do LE por meio do organismo teste *Allium cepa*

Em placas de Petri individuais contendo as amostras descritas anteriormente, foram adicionadas 50 sementes de *A. cepa*. Para os tratamentos controles (negativo e positivo) foram utilizadas água ultrapura e metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), respectivamente. Todos os testes com germinação de sementes foram realizados em triplicata, após cada período estipulado do processo de biorremediação (0, 2, 4 e 6 meses).

Após exposição por 5 dias, as sementes germinadas foram contabilizadas e as radículas fixadas em Carnoy, constituído de álcool e ácido acético (3:1 – v/v) por 6 a 8 h em temperatura ambiente. Decorrido este tempo, foi realizada a troca por fixador recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

Para o endpoint de toxicidade, foi considerado o índice de germinação das sementes, obtido pela razão entre o número de sementes germinadas e total de sementes distribuídas na placa.

3.4.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e de Micronúcleos

Este teste foi realizado seguindo o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes fixadas foram submetidas à coloração em reativo de Schiff. Para o preparo das lâminas, as regiões meristemáticas e F1 foram dispostas em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%), recobertas com lamínulas e suavemente

esmagadas. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas.

Para cada uma das triplicatas, foram confeccionadas 5 lâminas, totalizando 15 lâminas para cada tratamento, em cada um dos períodos estabelecidos para a bioestimulação.

Para a análise do potencial genotóxico do LE, foram considerados diferentes tipos de aberrações (perdas, pontes, atrasos e aderências cromossômicas, brotos, entre outros) nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). As presenças de MN e de quebras cromossômicas foram consideradas como outro parâmetro de avaliação (*endpoint* de mutagenicidade). O Índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu um outro parâmetro de avaliação, que caracterizou o *endpoint* de citotoxicidade das amostras. Foram analisadas e contabilizadas, em microscópio de luz, cerca de 7500 células por tratamento, para cada período de bioestimulação. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney a 0,05 de nível de significância, utilizando o programa BioEstat 5.3.

A eficiência do processo de detoxificação foi avaliada pela comparação entre os efeitos induzidos por uma mesma amostra, após seus diferentes tempos de bioestimulação, em relação ao seu tempo 0, a fim de verificar a possível diminuição dos efeitos observados.

A figura 2 mostra a sequência de etapas para a realização do bioensaio com *A. cepa*.



Figura 2. Resumo dos procedimentos utilizados para realização do teste de *A. cepa*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados aqui apresentados são referentes aos estudos realizados com as amostras iniciais (pré-bioestimulação – T0) e com 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do tratamento de bioestimulação. O bioensaio foi realizado com *A. cepa* para avaliar a eficiência da detoxificação do LE tratado após os períodos estipulados, por meio da análise dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das amostras nos períodos determinados.

O ensaio de germinação de sementes é um teste muito utilizado para avaliação da toxicidade de diferentes resíduos, dentre estes, o LE (ITÄVAARA et al., 2010). No presente estudo, no T0, o LE bruto inibiu completamente a germinação de sementes de *A. cepa* (Figuras 3 e 4) indicando um efeito altamente prejudicial ao organismo teste.

Resultados semelhantes foram observados em outros estudos. Mazzeo (2013) observou completa inibição de sementes de *A. cepa* em amostra bruta e extratos aquosos de LE anaeróbio. Em ensaios a partir do biossólido de LE anaeróbio tratado com óxido de cálcio realizado por Martins, Souza e Souza. (2016), a germinação de sementes de *A. cepa* também foi inibida por completo. Os dados apresentados acima corroboram o potencial tóxico do LE, indicando que seu uso não é seguro sem tratamento de detoxificação prévio.

Assim, como o LE bruto inibiu completamente a germinação das sementes, não foi possível a obtenção de raízes para a avaliação dos demais parâmetros ecotoxicogenéticos propostos neste projeto para essa amostra, sendo essas análises realizadas com as misturas preparadas a partir da diluição do LE com os agentes bioestimulantes. Quanto aos ensaios realizados com as misturas, não houve inibição significativa da germinação em nenhum dos tratamentos (Figura 3), tanto para o tempo inicial – T0 (Figura 4) como após os períodos de bioestimulação (Figuras 5, 6 e 7). Tal efeito pode ser explicado pelo fato da adição de outros componentes ao LE ser suficiente para diminuir o seu potencial tóxico já no tempo inicial, por promover uma diluição dos contaminantes presente nesse resíduo. A diminuição da toxicidade do LE para a espécie *A. cepa* também foi observada por MAZZEO et al. (2015), onde amostras de LE inibiram a germinação das sementes, porém as associações de LE ao solo, proporcionaram germinação e crescimento das raízes semelhante ao do grupo controle.

Com isso, podemos verificar que os tratamentos empregados foram eficientes para a diminuição da carga tóxica do LE, visto que já a partir do período inicial (T0), as amostras não inibiram a germinação de sementes de *A. cepa*. Além disso, como esse resultado se manteve constante para os demais períodos testados, até o período de seis meses (T3), é

possível concluir que as substâncias tóxicas responsáveis pelo efeito do LE, em T0, foram completamente eliminados.

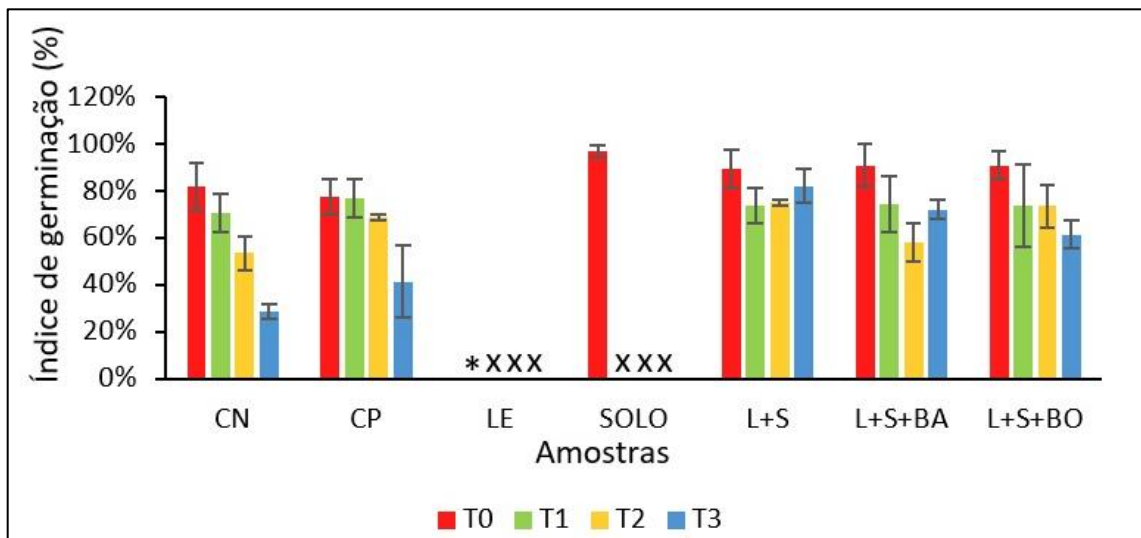


Figura 3. Índice de germinação (%) de sementes de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos de LE antes do processo de bioestimulação (T0) e após 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do processo. *Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). x Não avaliado.

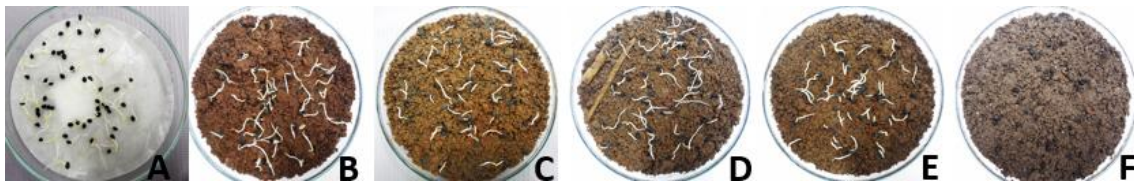


Figura 4. Raízes de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos do LE no período inicial (T0). **A.** Controle negativo com água ultra pura; **B.** Controle ambiental com solo; **C.** Tratamento com lodo de esgoto e solo; **D.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **E.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e borra de café; **F.** lodo de esgoto puro.

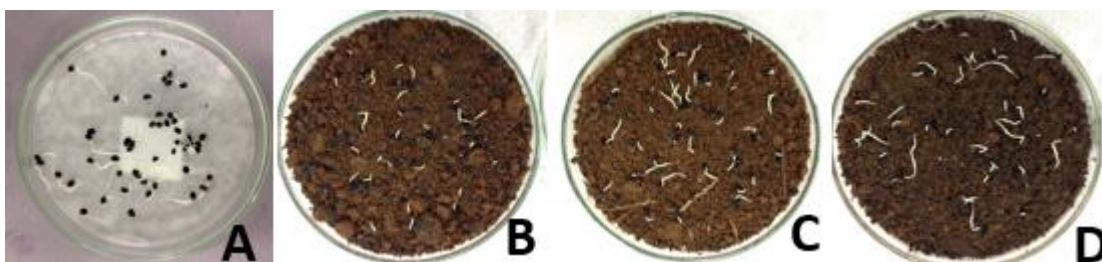


Figura 5. Raízes de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos do LE no período de dois meses (T1). **A.** Controle negativo com água ultra pura; **B.** Tratamento com lodo de esgoto e solo; **C.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e borra de café.

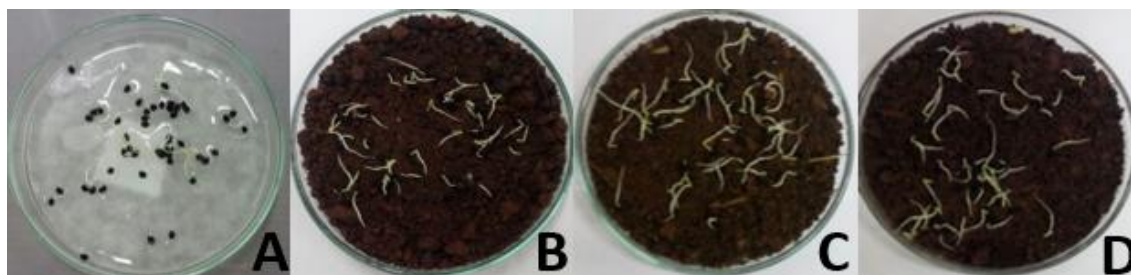


Figura 6. Raízes de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos do LE no período de quatro meses (T2). **A.** Controle negativo com água ultra pura; **B.** Tratamento com lodo de esgoto e solo; **C.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e borra de café.

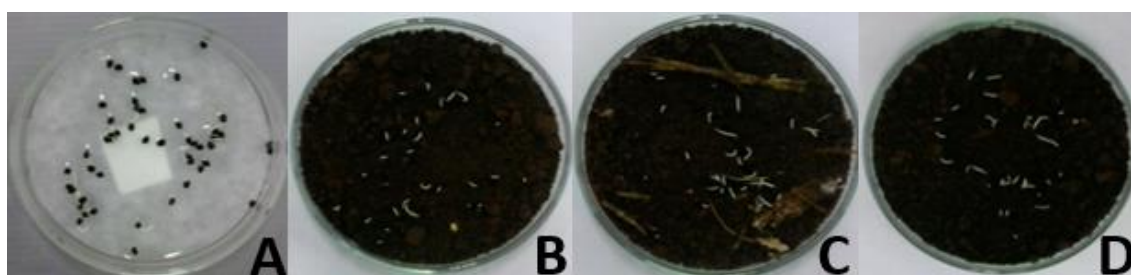


Figura 7. Raízes de *A. cepa* expostas aos diferentes tratamentos do LE no período de seis meses (T3). **A.** Controle negativo com água ultra pura; **B.** Tratamento com lodo de esgoto e solo; **C.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Tratamento com lodo de esgoto, solo e borra de café.

No teste com *A. cepa*, a citotoxicidade pode ser avaliada pelo aumento ou diminuição do índice mitótico, trazendo informações importantes sobre a ação de contaminantes em promover alterações no ciclo de divisão celular da espécie (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Para os tratamentos empregados ao LE, no período inicial (T0), apenas a amostra de lodo com solo (L+S) apresentou efeito significativo (Figura 8). Após dois meses (T1), nenhum tratamento apresentou resultado significativo para este parâmetro (Figura 8). Já no tempo de quatro meses (T2), o efeito citotóxico retornou para a amostra L+S e também foi observado para a amostra de lodo com solo e bagaço de cana-de-açúcar (L+S+BA) (Figura 8). Após seis meses (T3), o efeito permaneceu significativo para essas duas amostras (Figura 8).

Martins, Souza e Souza. (2016) também relataram que o LE causou alterações significativas no índice de divisão celular em *A. cepa*, induzindo um efeito citotóxico significativo. Quanto à citotoxicidade observada para as amostras L+S e L+S+BA no T2, acreditamos que a adição dos agentes, somado à ação microbiana estimulada por esses materiais, contribuíram para tornarem as substâncias tóxicas biodisponíveis. De acordo com a ISO 17402 (2008), a biodisponibilidade é o grau em que uma substância é absorvida pelo solo e que pode ser transferida pelas vias tróficas. Essa maior biodisponibilização de substâncias prejudiciais após algum tempo de biorremediação já foi relatada por outros autores em trabalhos de detoxificação de LE (MAZZEO et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018),

justificando a necessidade de períodos mais longos de monitoramento. Além disso, de acordo com Oleszczuk (2008), esse efeito observado para as amostras após alguns meses do início do processo de detoxificação também pode ser justificado pela formação de metabólitos intermediários tóxicos em decorrência da degradação microbiana de compostos orgânicos que constituíam a amostra inicial. No entanto, o processo de bioestimulação realizado com a adição de solo e/ou bagaço não foi satisfatório para a eliminação do potencial citotóxico do LE, mesmo após 6 meses do processo de detoxificação.

Considerando os resultados obtidos, podemos constatar que o único tratamento eficiente para a diminuição da citotoxicidade do LE em *A. cepa* foi com a borra de café, que não apresentou efeito citotóxico em nenhum dos períodos estudados.

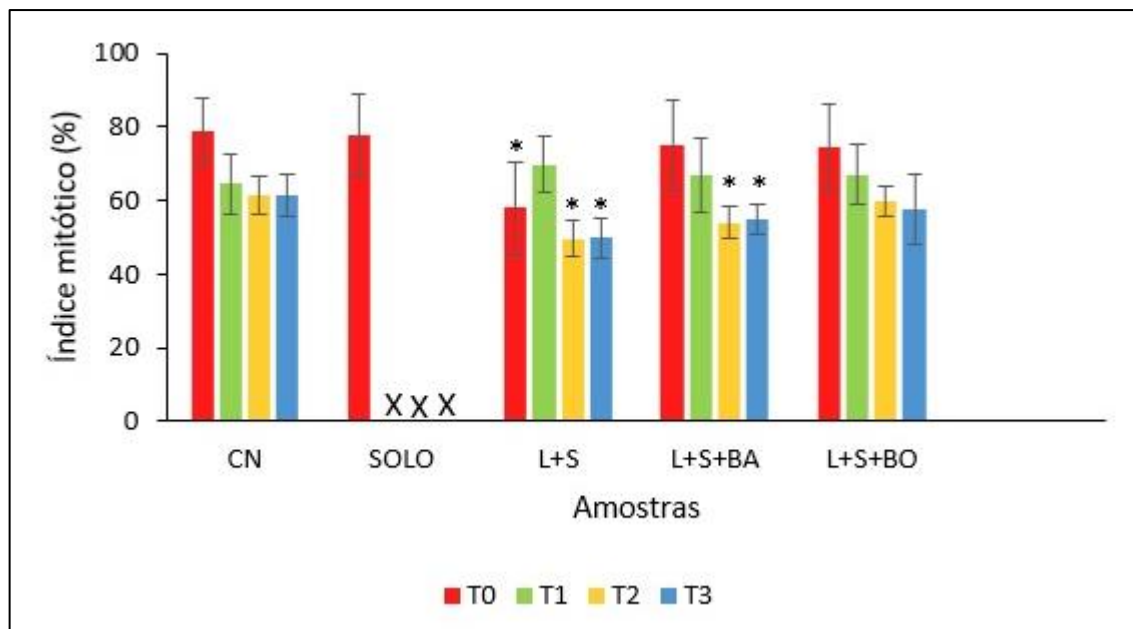


Figura 8. Índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa* nos diferentes tratamentos de LE, antes (T0) e após 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do processo de bioestimulação. *Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). x Não avaliado.

Para o parâmetro de genotoxicidade, foram avaliadas nas diferentes fases da divisão celular, a presença de anormalidades nucleares (p.e., brotos nucleares; núcleos lobulados) e aberrações cromossômicas (como aderência, pontes, perdas e poliploidia) (Figura 9). A anormalidade nuclear mais frequentemente encontrada nas amostras estudadas foi o broto nuclear (Figura 9G). De acordo com Salvadori, Ribeiro e Fenech. (2003), o broto nuclear assemelha-se a um micronúcleo por ser uma estrutura constituída por material genético, com forma esférica e de tamanho reduzido (1/3 a 1/16 do tamanho do núcleo principal), que se destaca do núcleo principal, porém permanece conectado ao núcleo principal por uma ponte nucleoplasmática. Sugere-se que essa anormalidade nuclear seja originada pela formação do

envoltório nuclear antes da completa incorporação de todos cromossomos no núcleo por um atraso na migração destes, como consequência da presença de quebras, pontes e rearranjos cromossômicos (SERRANO-GARCÍA; MONTEIRO-MONTOYA, 2001). Já dentre as aberrações cromossômicas, as mais observadas foram pontes (Figuras 9I e 9J) e perdas cromossômicas (Figura 9J), que resultam da ação de agentes clastogênicos (danos diretos nos DNA) e aneugênicos (capazes de alterar os componentes celulares), respectivamente (LEME; MARIN-MORALES, 2009). As pontes cromossômicas são formadas entre a massa de cromossomos que está se separando para os polos opostos durante a anáfase (LUO, 2004), onde as extremidades de um ou mais cromossomos se unem devido à aderência de suas regiões terminais que sofreram quebras ou deleções (HUMPHREY; BRINKLEY, 1969). Já as perdas cromossômicas originam-se da inativação dos fusos mitóticos durante a divisão celular (UHL et al., 2003).

No período inicial (T0), foi observado um efeito genotóxico significativo apenas para a amostra L+S (Figura 10). Já, no T1, além da manutenção da genotoxicidade observada para a amostra L+S, também houve um efeito significativo para a amostra L+S+BA (Figura 10). No período de quatro meses (T2), o efeito foi atenuado para L+S+BA, mas permaneceu significativo para L+S (Figura 10). No último tempo avaliado (T3), apenas a amostra de L+S apresentou efeito genotóxico significativo (Figura 10). Estes resultados indicam que apenas a diluição com solo não é suficiente para eliminar a genotoxicidade do LE, mesmo após 6 meses do processo de bioestimulação. O efeito observado na amostra L+S+BA também demonstra a complexidade da composição do LE, e os diferentes tipos de resposta que este pode ter aos tratamentos empregados, já que a amostra apresentou efeito significativo somente após dois meses de tratamento. Essa resposta provavelmente ocorreu também em decorrência dos diferentes graus de biodisponibilidade de substâncias genotóxicas presentes na mistura e dos diferentes metabólitos gerados pelos microrganismos degradadores atuantes em cada amostra, assim como observado para o parâmetro de citotoxicidade. Estudos realizados por Christofolletti, Francisco e Fontanetti. (2012) e Martins, Souza e Souza. (2016) com amostras de LE de diferentes origens também demonstraram que esse material pode induzir efeitos genotóxicos significativos para a espécie *A. cepa*.

Para este parâmetro, embora o efeito tenha sido atenuado após 4 meses para L+S+BA, o tratamento que se mostrou mais efetivo foi o realizado com a borra de café, uma vez que a amostra L+S+BO não apresentou efeito significativo em nenhum dos tempos avaliados.

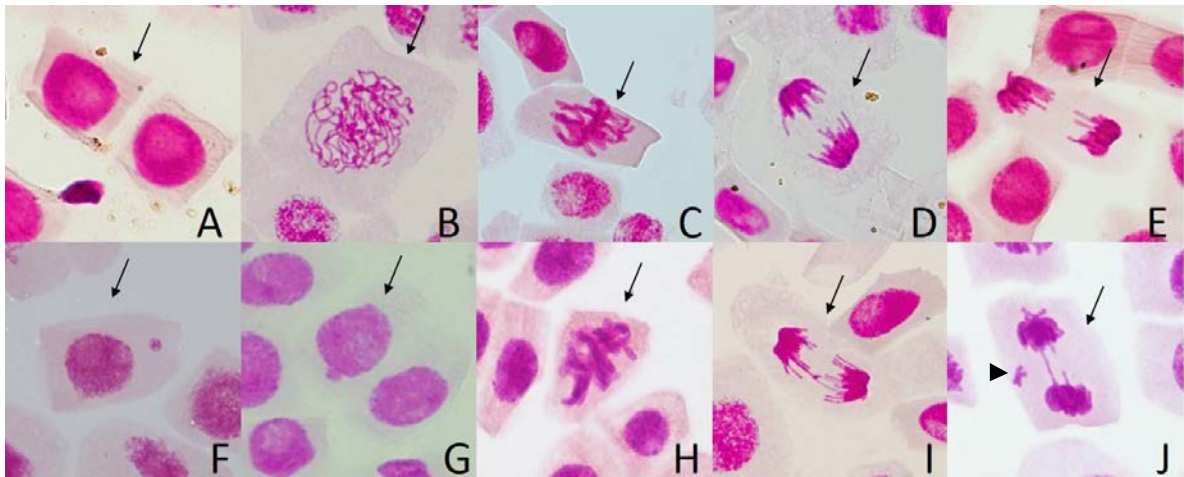


Figura 9. Principais aberrações cromossômicas observadas durante as análises em *A. cepa*. **A.** Interfase normal; **B.** Prófase normal; **C.** Metáfase normal; **D.** Anáfase normal; **E.** Telófase normal; **F.** Interfase com micronúcleo; **G.** Prófase com broto nuclear; **H.** Metáfase com aderência; **I.** Anáfase com ponte cromossômica; **J.** Telófase com ponte (seta) e perdas cromossômicas (cabeça de seta).

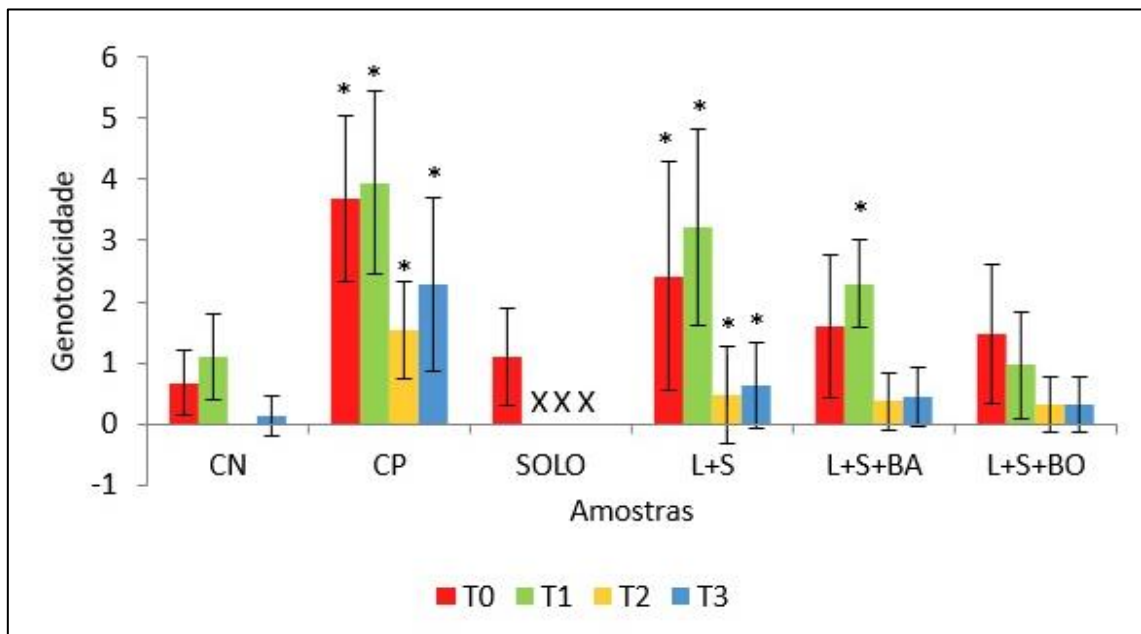


Figura 10. Presença de alterações genotóxicas em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação nas diferentes misturas de LE, antes (T0) e após 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do processo de bioestimulação. * Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). x Não avaliado.

Para o endpoint de mutagenicidade, os quesitos para a avaliação foram micronúcleos (Figura 9F) e quebras cromossômicas em células meristemáticas e micronúcleos em células F1 de *A. cepa* (Figura 12B).

Segundo Leme e Marin-Morales (2009), as quebras cromossômicas são resultado de efeitos clastogênicos, podendo levar à perda de material genético pela célula. Já os micronúcleos ocorrem quando danos celulares não são reparados da maneira correta, ou quando não são reparados (BONOMO, 2014). Sendo assim, os mesmos podem ser formados a

partir de uma quebra ou perda cromossômica, o que leva à formação de micronúcleos de menor ou maior tamanho, respectivamente (LEME;MARIN-MORALES, 2009), bem como também pode ser formado quando a célula tenta reparar uma poliploidia a fim de eliminar seu material excedente (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007).

Nas células meristemáticas de *A. cepa*, foi observado um efeito mutagênico significativo para este parâmetro na amostra L+S+BA no tempo inicial e para essa mesma amostra e para L+S no T1 (Figura 11). No T2 o efeito mutagênico de L+S+BA foi atenuado mas permaneceu para L+S. No T3 nenhuma das amostras apresentou efeito mutagênico significativo. Tais resultados se assemelham aos resultados de genotoxicidade, onde o tratamento mais efetivo, que contribuiu para a diminuição da toxicidade do LE, foi com a borra de café.

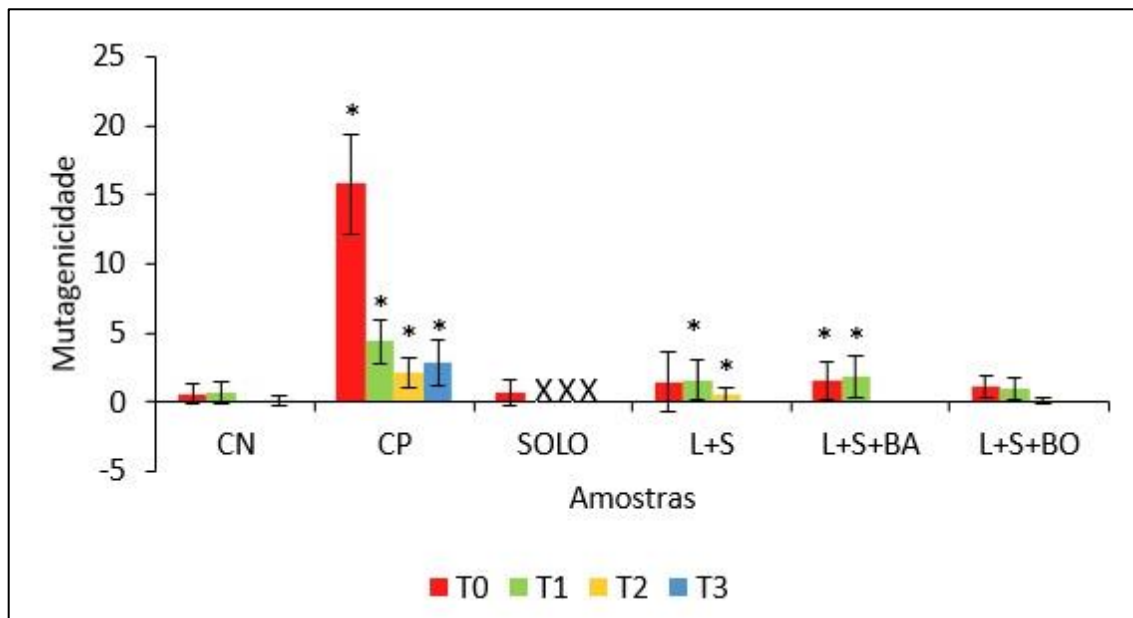


Figura 11. Presença de alterações mutagênicas em células meristemáticas de *A. cepa* nos diferentes tratamentos de LE, antes (T0) e após 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do processo bioestimulação.

* Estatisticamente significativo ($p < 0,05$). x Não avaliado.

A ocorrência de micronúcleos em células F1 de *A. cepa* (Figura 12) se dá quando os danos causados pelo LE às células meristemáticas não são corrigidos e, como consequência, esses danos são fixados nas células filhas. Dentre os tratamentos analisados para esse parâmetro, não foi observado nenhum resultado significativo (Figura 13), indicando que os danos genotóxicos e mutagênicos observados nas células meristemáticas para as amostras de L+S e L+S+BA não foram passados para a geração seguinte. No entanto, não foi possível realizar a análise do tratamento L+S nos tempos 0, 1 e 2 e nem de L+S+BAG no T1 devido à

inibição do crescimento das raízes, com consequente perda da região F1. Assim, tais amostras também induziram um efeito tóxico pronunciado no desenvolvimento das raízes de *A. cepa*.

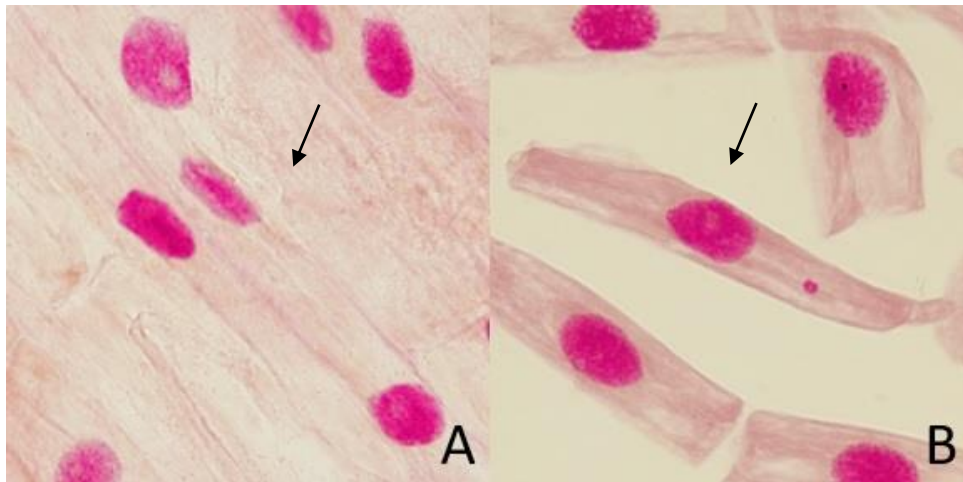


Figura 12. Micronúcleo em células F1 de *A. cepa*. **A.** F1 normal; **B.** F1 com micronúcleo.

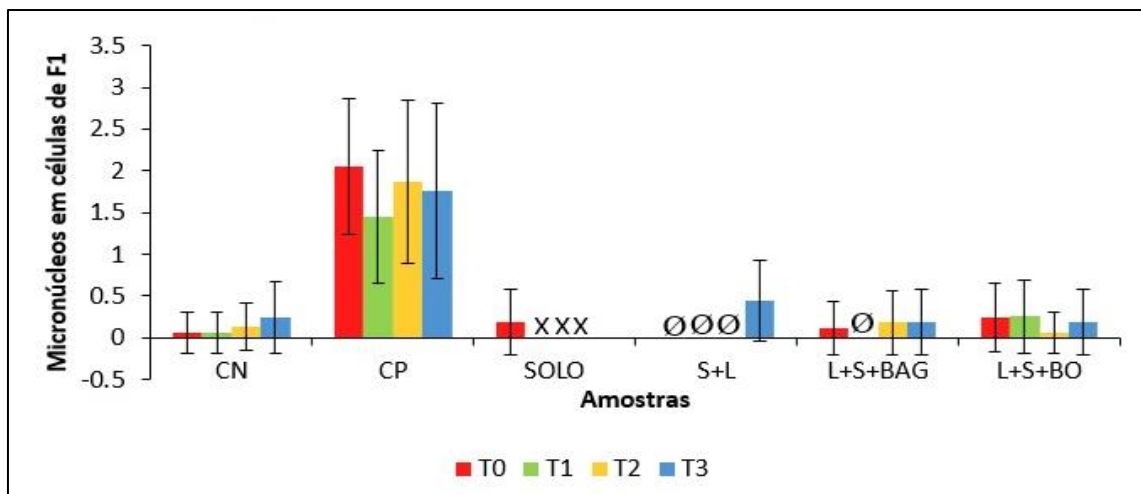


Figura 13. Presença de alterações mutagênicas em células F1 de *A. cepa* nos diferentes tratamentos de LE, antes (T0) e após 2 (T1), 4 (T2) e 6 (T3) meses do processo de bioestimulação. x Não avaliado. Ø Sem crescimento de região F1.

A partir desses resultados, podemos constatar que o LE puro é altamente tóxico, sendo contraindicado o seu uso na agricultura sem que haja algum processo visando sua detoxificação. Roig et al. (2012), ao estudar diferentes tipos de LE, concluíram que quando este era previamente tratado, ocorria alteração em sua toxicidade, sendo que em ensaios com diferentes organismos teste, o LE que foi tratado se apresentava de duas a três vezes menos tóxico do que o que não havia sido tratado.

Como o LE tem uma composição muito complexa em relação aos diferentes níveis de toxicidade, biodisponibilidade, e degradação de seus contaminantes (TELHADO, 2009), além do crescimento de diferentes espécies de microrganismos biodegradadores pelo agente bioestimulante empregado (MAZZEO et al., 2015; SOMMAGGIO et al., 2018), uma variação na efetividade dos tratamentos foi observada. Sendo assim, é possível que a genotoxicidade e mutagenicidade, bem como a citotoxicidade e a inibição do crescimento das raízes nos tratamentos S+L e L+S+BAG se devam a essa complexidade de compostos presentes no LE e aos diferentes tipos de respostas dos componentes à degradação. Com isso, o único tratamento efetivo para a detoxificação do LE aeróbio aqui estudado foi o realizado com a borra de café, já que essa amostra não induziu nenhum efeito significativo dentre todos os 5 diferentes parâmetros avaliados. A maior eficiência desse tratamento pode estar relacionado ao fato de que a borra de café é um ótimo substrato para o crescimento fúngico (Pandey et al., 2000), o que pode ter acelerado a mineralização dos contaminantes bioativos e potencialmente prejudiciais, eliminando os efeitos tóxicos do LE.

5 CONCLUSÕES

Com a análise dos resultados obtidos no presente trabalho, podemos concluir que o LE anaeróbio produzido na ETE Carioba, em Americana – SP, como resultado do tratamento de esgoto de origem doméstica e industrial é altamente tóxico e foi nocivo ao organismo teste *A. cepa*. Tal fato ressalta a necessidade da realização de um processo de detoxificação antes de sua utilização na agricultura.

O organismo teste *A. cepa* foi bastante sensível para detectar os potenciais tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico do LE, bem como do produto biorremediado.

O processo de biorremediação empregado neste estudo obteve resultados favoráveis na detoxificação do LE quando utilizou-se a borra de café como agente estimulante, apontando que este material é o mais efetivo para uso na biorremediação do lodo anaeróbio.

Tendo em vista os diferentes resultados apresentados, fica evidente a importância do processo de bioestimulação e os bioensaios para avaliar a toxicidade do LE anaeróbio tratado para que seja seguro utilizá-lo na agricultura.

Devido ao baixo custo e a facilidade na elaboração do processo, a tecnologia estudada é uma ótima maneira de reutilizar resíduos, detoxificar o LE e empregá-lo na indústria agrícola como condicionante de solo a um preço acessível.

REFERÊNCIAS

- ANDREOLI, C.V. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura e sua influência em características ambientais no agrossistema**. 1999. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999. 278p.
- BAMFORTH, S.M; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.80, p.723-736, 2005.
- BONOMO, M.M.; **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em caricapapaya I**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.
- BOTHNER, M.H.; TAKADA, H.; KNIGHT, I.T.; HILL, R.T.; BUTMAN, B.; FARRINGTON, J.W.; COLWELL, R.R.; GRASSLE, J.F. Sewage contamination in sediments beneath a deep-ocean dump site off New York. **Marine Environmental Research**, v.38, p.43-59, 1994.
- BOVI, M.L.A.; GODOY JÚNIOR, G.; COSTA, E.A.D.; BERTON, R.S.; SPIERING, S.H.; VEGA, F.V.A.; CEMBRANELLI, M.A.R.; MALDONADO, C.A.B. Lodo de esgoto e produção de palmito em pupunheira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p. 581-590, 2007.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006**. Brasília, 2006.
- CASTRO, A. L. F. G.; Silva, O. R.; SCALIZE, P. S. **Cenário da disposição do lodo de esgoto: uma revisão das publicações ocorridas no Brasil de 2004 a 2014**. Multi-Science Journal, v. 1, n. 2, p. 66-73, 2015.
- CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, Z.C.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAÚJO, P.A. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v. 31, n. 2, p. 33-41, 2008.
- CETESB (São Paulo). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo: CETESB, p. 19, 2017.
- CHRISTOFOLETTI, C.A., FRANCISCO, A., FONTANETTI, C.S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Appl Environ Soil Sci**, p. 01–09, 2012.
- CORRÊA, R.S.; FONSECA, Y.M.F.; CORRÊA, A.S. Produção de biossólido agrícola por meio da compostagem e vermicompostagem de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, p.420–426, 2007.
- CRUZ, R.; MORAIS, S.; MENDES, E.; PEREIRA, J.A.; BAPTISTA, P.; CASAL, S.

Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. **Food Chem**, v.148, p. 294- 299, 2014.

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

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

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C.M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrients and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environ Sci Pollut Res**, v.20, p.6256-6265, 2013.

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

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

GROVER, I.S.; KAUR, S. Genotoxicity of wastewater samples from sewage and industrial effluent detected by the *Allium* root anaphase aberration and micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.426, p.183-188, 1999.

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, v.107, p.211-221, 2006.

HEDDLE, J.A.; HITE, M.; JRKHART, B.; MACGREGOR, J.T.; SALAMONE, M.F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. **Mutation Research**, Amsterdam, v.123, p.61-118, 1983

HELALEH, M.I.H.; AL-OMAIR, A.; NISAR, A.; GEVAO, B. Validation of various extraction techniques for the quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges using gas chromatography-ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1083, p. 153-160, 2005.

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

HUMPHREY, R.M; BRINKLEY, B.R. Ultrastructural studies of radiations-induced chromosome damage. **Journal of Cell Biology**, New York, v.42, p.745-753, 1969.

ISO, 17402:2008. **Soil quality — Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials**. 2008.

ITÄVAARA, M.; VIKMAN, M.; LIISA, M.; VUORINEN, A. Maturity Tests for Composts — Verification Of a Test Scheme for Assessing Maturity. **Compost Science & Utilization**, v.18, n. 3, p.174 – 183, 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71-81, 2009.

LOPES, J.C.; RIBEIRO, L.G.; ARAÚJO, M.G.; BERALDO, M.R.B.S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.143-147, 2005.

LUO, L.Z. **Chromosome segregational defects: their origin, fate and contribution to genomic instability**. 2004. Dissertation (Mastering). School of Arts and Sciences, 2004.

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

MARTINS, M.N.C., SOUZA, V.V. and SOUZA, T.S. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, vol.148, pp. 481-486, 2016.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluents using the *Allium cepa* test system. **Cytologia, Tokyo**, v.69, n.4, p.399-408, 2004

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como recondicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios**. 2013. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular), IB, UNESP, 2013.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARIN-MORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic**, v.56, p. 60–69, 2015.

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

MURTHY, P.S.; NAIDU, M.M. Sustainable management of coffee industry by-products and mazzvalue addition – A review. **Resour Conserv Recy**, v.66, p.45-58, 2012.

OLESZCZUK, P. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physic-chemical properties, PHAs and heavy metals. **Ecotoxicol Environ Saf**, v.69, p.496–505, 2008.

OLIVEIRA, F.C., MELO, W.J.; PEREIRA, G.T.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P.H. Heavy metals in oxisoils omented with biosolids and cropped with maize in a long-term experiment.

Scientia Agricola, v.62, p.381-388, 2005.

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

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

PEDROZA, M.M.; VIEIRA, G. E. G.; SOUSA, J. F.; PICKLER, A. C.; LEAL, E. R. M.; MILHOMEN, C.C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v. 17, p. 89-188, 2010.

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

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

RODGER, G.K.; DAVIES, I.M.; MCHENERY, J.G. Effects of sewafe sludge disposal on the sediment at the Garroch Head dump site, Firth of Clyde, Scotland. **Science of the Total Environment**, v.199, p.133-156, 1992

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

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas *in vitro*. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: ULBRA, 2003. p.201-223.

SERRANO-GARCÍA, L.; MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. *Environ Mol Mutagen*, v. 38, p. 38-45, 2001.
SILVÉRIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, da matéria orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. *O Agrônomo*, v.56, p.5-8, 2004.

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

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgoto – 2014**. Ministério das Cidades, Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016.

SOMMAGGIO, L. R. D.; MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

TAS, D.O. **Respirometric assessment** of aerobic sludge stabilization. **Bioresour Technol**, v.101, p.2592–2599, 2010.

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

TELHADO, M.C.S.C.L. **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado**. 2009.134f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

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

UHL, M.; PLEWA, M.J.; MAJER, B.J.; KNASMÜLLER, S. Basic principles of genetic toxicology with an emphasis on plant bioassays. In: MALUSZYNSKA, J.; PLEWA, M. (Org.). **Bioassays in plant cells for improvement of ecosystem and human health**: a course manual. Katowice: 2003. p.11-30.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.237-241, 2001

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

Samantha Santos Silveira
Aluna

Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales
Orientadora

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales
Co-orientadora