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

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

AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE DETOXICAÇÃO E UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA DE LODO DE ESGOTO, APÓS BIOESTIMULAÇÃO, POR MEIO DE DIFERENTES BIOENSAIOS

LAIS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO

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

Julho - 2016

LAIS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO

AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE DETOXICAÇÃO E UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA DE LODO DE ESGOTO, APÓS BIOESTIMULAÇÃO, POR MEIO DE DIFERENTES BIOENSAIOS

Orientadora: Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales
Co-orientadora: Dra. Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo

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

Rio Claro
2016

628.2 Sommaggio, Lais Roberta Deroldo
S697a Avaliação da possibilidade de detoxificação e utilização agrícola de lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de diferentes bioensaios / Lais Roberta Deroldo Sommaggio. - Rio Claro, 2016
112 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientadora: Maria Aparecida Marin-Morales
Coorientador: Dra. Dânia Elisa Christofoletti Mazzeo

1. Esgotos. 2. Biorremediação. 3. Ensaios ecotoxicológicos. 4. Resíduo sólido. 5. Casca de arroz. 6. Potencial agronômico. 7. Análise microbiológica. I. Título.

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

unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: **AVALIAÇÃO DA POSSIBILIDADE DE DETOXICAÇÃO E UTILIZAÇÃO AGRÍCOLA DO LODO DE ESGOTO, APÓS BIOESTIMULAÇÃO, POR MEIO DE DIFERENTES BIOENSAIOS**

AUTORA: LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO
ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro - UNESP

Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO
Fundação Hermínio Ometto, UNIARARAS

Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES
Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológica

Rio Claro, 29 de julho de 2016

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento e término deste trabalho só foi possível devido as parcerias estabelecidas ao longo dos anos e a colaboração de muitos amigos. Meus sinceros agradecimentos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização do mesmo. Dessa forma, expresso meus carinhosos agradecimentos:

Aos meus pais, pela estrutura familiar, por estarem sempre presentes e por me apoiarem nas minhas decisões. Gratidão pela vida que me proporcionaram e pelos momentos também dedicados a este trabalho.

Aos meus queridos irmãos, por estarem sempre presentes, pelos períodos de discussões e questionamentos. À Laila, por me ajudar na preparação das misturas do lodo, sei que não foi fácil (rs), nem tão pouco cheiroso. Ao Leonardo, pelas vezes que não queria ir sozinha tratar das tilápias. Sou extremamente grata por vocês serem meus irmãos e pelo nosso companheirismo.

Aos meus avós, mesmo sem entenderem bem o que eu fazia, sempre ficaram preocupados com o meu bem-estar. Especialmente à minha vó Eda, pelos mimos recebidos, pelo apoio nos estudos e pela torcida para a minha realização pessoal e profissional. Gratidão.

Ao João, pelas muitas idas ao laboratório de final de semana, pela companhia nas noites que foram necessárias ficar até mais tarde no laboratório, pela ajuda com os experimentos da alface, pelo carinho e cuidado que sempre teve comigo, mesmo em momentos de estresse. Gratidão por todo o afeto. Agradeço também a família do João que sempre me acolheu, e se tornou uma extensão da minha, Cecília, Vitor e Miguel.

Às minhas amigas da vida, Andrea, Rê, Gê, Ana e Marina, pelos momentos de afeto e conversas, por entenderem muitas vezes a minha ausência e pelo apoio. Sou extremamente grata pela nossa amizade.

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

À CAPES pela bolsa de mestrado concedida.

Ao Departamento de Água e Esgoto de Americana, pelo lodo concedido, principalmente ao Guilherme pela parceria e disponibilidade, e também pela ajuda com o lodo de esgoto.

À Profa Dra Maria Aparecida Marin-Morales, pelos ensinamentos, pelas sugestões para a melhora não só deste trabalho mas do grupo, pelo entusiasmo com as nossas pesquisas, por acreditar e confiar em mim. Agradeço pela paciência e por todo o tempo dedicado a esse trabalho e ao nosso grupo.

À Dânia, por estar comigo desde a minha iniciação, pelos experimentos conjuntos, pelos ensinamentos e sugestões, por sempre estar disposta a me ajudar. Sou muito grata

pela sua co-orientação e amizade.

À Profa Dejanira e ao seu laboratório, pelos experimentos que lá foram realizados, e pela ajuda com alguns materiais.

Ao Prof. Dr. Gustavo Habermann por toda infraestrutura disponibilizada para realização dos ensaios com a alface e por toda a ajuda. Gratidão por ter aceito essa parceria.

Ao Prof. Dra Carlos Emílio Levy pela grande colaboração prestada na identificação dos microrganismos.

Ao Sr. João, jardineiro da UNESP, pela extrema ajuda com a coleta do solo no Jardim experimental, seu auxílio foi muito importante para a execução deste estudo.

Ao Matheus pelas sugestões realizadas na banca de qualificação, pela parceria e amizade no grupo do laboratório e pela ajuda com gráficos e programas estatísticos.

À Mary e a Lê Gonçalves pelas parcerias na utilização da cultura, pelas horas de fluxo, lavagem de vidraria, confecção de meio. Gratidão pela ajuda nos experimentos e também pela amizade e companheirismo.

À Roberta, ex técnica do laboratório, pela ajuda com a preparação das soluções, lavagem de material, limpeza de lâminas, pela companhia e conversas.

À Márcia e Raquel pela grande amizade, pelas dúvidas tiradas, pelas sugestões e apoio no trabalho.

À Mi, por sempre me salvar com as traduções, pela amizade e ajuda quando necessário.

À Dânia, Lê Gonçalves, Mary, Michele, Nádia, Willian pela grande ajuda com alguns experimentos, pelas risadas e amizade.

A todos os meus amigos ainda não citados, mas que também foram muito importantes, pela convivência diária, amizade dentro e fora do lab., pelas fofocas (rs), Bairral, Camila, Cleiton, Franco, Lê Bulas e Pulga.

As minhas novas companheiras mutagênicas, pela convivência e disponibilidade em ajudar, Mileni e Samantha.

A todos os orientados Marin, pelo grupo que formamos e pelas trocas de experiências, Dânia, Franco, Jaque Pira, Letícia Bulas, Letícia Gonçalves, Letícia Gigeck, Márcia, Mary, Matheus, Michele, Nádia, Priscila, Raquel e Willian

Aos funcionários e professores do Departamento de Biologia pelo convívio e auxílios.

Enfim, gratidão a todos que participaram de alguma forma na realização deste trabalho.

"La ricerca intesa come strumento di conoscenza e non come oggetto di competizione e strumento di potere"

"A pesquisa científica se entende como um instrumento de conhecimento e não como um objeto de competição ou um instrumento de poder"

Rita Levi Montalcini
(Neurocientista Italiana, prêmio Nobel
de Medicina e Fisiologia, 1986

RESUMO

A destinação final dos resíduos sólidos urbanos, como a do lodo de esgoto (LE) é de extrema preocupação, tanto pela sua produção crescente como pela possibilidade de conterem substâncias tóxicas, que podem comprometer o meio ambiente e os organismos expostos a tais resíduos. A reciclagem de LE é uma questão muito importante, sob o ponto de vista ambiental, já que a destinação do mesmo, em sua maioria, é feita em aterros sanitários. O LE, por ser constituído, predominantemente, de matéria orgânica e nutrientes, tem um potencial para uso como recondicionante de solos agrícolas. No entanto, como este resíduo pode apresentar substâncias químicas indesejadas, como metais e substâncias orgânicas tóxicas, além de agentes patogênicos, podendo contaminar os solos. Neste contexto, a bioestimulação utiliza-se da adição de um agente que proporcione uma melhora das propriedades físico-químicas do sistema, para estimular o crescimento de microrganismos autóctones e, consequentemente, melhorar a degradação dos contaminantes. A casca de arroz é um bom agente estimulante porque promove, além de aumento de nutrientes, uma melhora na oxigenação do sistema, atuando como um eficiente descompactante de solo. A espécie *Allium cepa* e a cultura de células de hepatoma humano (HepG2) podem se caracterizar em interessantes sistemas testes a serem usados em avaliações ecotoxicológicas de compostos biorremediados. Devido à possível aplicação do LE como adubo orgânico, também é fundamental a avaliação do potencial agronômico deste resíduo, para um melhor entendimento do seu comportamento em solos agrícolas. Dessa forma, este trabalho visou avaliar a efetividade da bioestimulação, realizada com a adição de casca de arroz, na descontaminação do LE, por meio de ensaios ecotoxicológicos com *A. cepa* e células em cultura HepG2. Adicionalmente, foi avaliado o potencial agronômico do composto biorremediado, por análise química e por ensaios com o organismo teste *Lactuca sativa*. Amostras do LE, puras (LEP) e de suas misturas com solo (LE+S) e solo e casca de arroz (LE+S+CA) foram coletas antes (T0) e após serem biorremediadas por períodos de 3 (T1) e 6 (T2) meses. Os bioensaios com *A. cepa* e HepG2 foram realizados com os extratos aquosos das amostras. Os resultados obtidos para análise de fertilidade revelam que as amostras que continham os compostos biorremediados, possuíram um aumento do pH, da matéria orgânica e de macro e micronutrientes, quando comparado ao solo controle. As análises biométricas, realizadas com a

espécie *L. sativa,* mostraram aumento significativos do número folhas, para todas as amostras tratadas com os compostos biorremediados, nos tempos T1 e T2. Com relação ao aumento da biomassa de raiz, caule e folhas dessa espécie, houve um aumento significativo das plantas cultivadas com LE+S+CA (T1). Para a biomassa da raiz, houve aumento nas alfaces do tratamento LE+S+CA (T2) e para a biomassa caulinar e foliar, o aumento foi dado no tratamento com LEP (T2). Na área foliar, o aumento foi observado nas alfaces cultivadas com LE+S+CA (T1), e LEP (T2). Os bioensaios realizados com *A. cepa* mostraram que a amostra de LEP (T1 e T2) inibiu a germinação das sementes, sendo necessária, para a obtenção de radículas, sua diluição em água. Foram observados efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para as amostras diluídas do LEP (T1 e T2). Para a mutagenicidade em F1, nenhum dos tratamentos foi estatisticamente significativo. No parâmetro de genotoxicidade em HepG2, foram observados valores significativos para o total de MNs em LEP (T2); quantidade de brotos celulares em LEP (T0, T1 e T2) e para a anormalidade composta de MN e broto em LEP (T1 e T2), demonstrando genotoxicidade nas amostras de LEP. Dessa forma, esse estudo demonstrou que embora as amostras biorremediadas de LE apresentaram uma melhora nos parâmetros agronômicos da espécie *L.sativa*, os extratos aquosos das amostras de LEP apresentaram-se tóxicos aos sistemas testes empregados, mesmo após os períodos de remediação. No entanto, a amostra bioestimulada LE+S+CA não apresentou efeitos tóxicos significativos para nenhum dos bioensaios, indicando a importância do desenvolvimento de tratamentos prévios do LE com agentes descompactantes, como a casca de arroz, para a sua detoxificação e utilização segura em solos agrícolas. Neste trabalho, também foi observada a eficiência dos ensaios realizados com os organismos testes *Allium cepa* e células HepG2 em avaliar a detoxificação de LE, após o mesmo ser submetidos a processos de biorremediação.

PALAVRAS-CHAVE: ensaios ecotoxicológicos, *Allium cepa*, cultura de células de mamífero, teste do MN, resíduo sólido, potencial agronômico, casca de arroz.

ABSTRACT

The human solid residues final destination, as sewage sludge (SS), is extremely concerned, both as for its growing production and for the possibility to contain toxic substances, which can compromise the environment and the exposed organisms. The SS recycling is a very important question beneath the environmental point of view, once its destination, most, it is done at sanitary landfills. The SS, for being predominantly constituted by organic matter and nutrients, has the potential to the use as reconditioner of agricultural lands. However, as this residue can present unwanted chemical substances, like metals and toxic organic substances, besides pathogenic agents, it can also contaminate the soil. The biostimulation uses the addition of an agent which provides an improvement on the physical-chemical properties of the system, to stimulate the growth of the autochthonous microorganisms and, consequently, to improve the degradation of contaminants. Rice hull is a good stimulant agent because it can promote, besides an increase of nutrients, an improvement on the system oxygenation, acting then as an efficient soil decompression agent. The *Allium cepa* specie and human hepatoma cell culture (HepG2) can be characterized in interesting test-organisms to be used in ecotoxicological evaluations of bioremediated compounds. Due to the possibly application of SS as organic fertilizer, is also fundamental the evaluation of the agronomic potential of this residue for a better understanding of its behavior in agricultural soils. In this way, this study aimed to assess the effectivity of biostimulation, performed with the addiction of rice hulls, on the SS decontamination, by ecotoxicological assays with *A. cepa* and HepG2 cell culture. Additionaly, the agronomic potential of the bioremediated compound was evaluated by chemical analysis and by assays with the test-organism *Lactuca sativa*. Samples of the SS, pure (SSP) and mixtures with soil (SS+S) and soil with rice hulls (SS+S+RH) were collected before (T0) and after being bioremediated for 3 (T1) and 6 (T2) months period. All bioassays were performed with the aqueous extracts of the samples. The obtained results for the fertility analysis test reveal that the samples, which contained the bioremediated compounds, have an increase on the pH, organic matter and on macro and micronutrients, when compared with the soil control. The biometrical analysis performed with the *L. sativa* specie show a significant increase on the number of leaves for all the treated samples with the bioremediated compounds, on the T1 and T2 period. With regard to the root, stem and leaves biomass increase of this specie, there was a significant increase of the cultivated plants with SS+S+RH (T1). To the root biomass, there was an increase on the lettuce of the treatment SS+S+RH (T2) and to the stem and leaves

biomass, the increase was given on the treatment with SSP (T2). On the leaf area, the increase was observed on the SS+S+RH (T1) and SSP (T2) cultivated lettuces. The bioassays performed with *A. cepa* show that the SSP (T1 and T2) sample inhibited the seed germination, so it was necessary its dilution in water to obtain the roots. Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects were observed for the diluted SSP (T1 and T2) samples. For the mutagenicity in F1, none of the treatments was statistically significant. For the genotoxicity parameter in HepG2, significant values to the total of MNs in SSP were observed; an amount of nuclear buds in SSP (T0, T1 and T2) and to the abnormality composed by MN and nuclear buds in SSP (T1 and T2) show genotoxicity in SSP samples. Thus, this study showed that, although the SS bioremediated samples showed an improvement on the agronomic parameters of the *L. sativa* specie, the aqueous extracts of the SSP samples present toxic to the test-systems used, even after the bioremediation period. Though, the SS+S+RH biostimulated sample didn't show significant toxic effects for any bioassays, indicating the importance of the development of SS previous treatments with decompressing agents, as the rice hulls, to its detoxification and safety utilization in agricultural soils. In this study, the efficacy of the performed bioassays with the test-organisms *A. cepa* and HepG2 cells was also observed in evaluating the SS detoxification after being submitted to bioremediation processes.

KEY WORDS: agronomic potential, *Allium cepa*, ecotoxicological assays, mammal cell culture, MN test, rice hulls, solid residues.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
CN	Controle negativo
cm	Centímetros
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CP	Controle positivo
CTC	Capacidade de troca catiônica
DMSO	Dimetilsulfóxido
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
HepG2	Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IM	Índice Mitótico
Km	Quilômetro
L	Litro
LE	Lodo de esgoto
LE+S	Lodo de esgoto misturado com solo
LE+S+CA	Lodo de esgoto misturado com solo e casca de arroz
M	Molar
M.O.	Matéria orgânica
m^3	Metros cúbicos
mg	Miligramas
mL	Milílitros
mm	Milímetros
MMS	Metilmetano Sulfonato
MN	Micronúcleo
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)
nm	Nanometro
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
pH	Potencial hidrogeniônico
UFC	Unidade Formadora de Colônia
v/v	Volume/volume
V%	Saturação por bases
µm	Micrômetro
SB	Soma de bases trocáveis
SNIS	Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11
2 OBJETIVOS 14
3 REVISÃO DA LITERATURA 15
3.1 Produção do Lodo de Esgoto 15
3.2 Alternativa para utilização do LE e Resolução CONAMA 375/06 17
3.3 Biorremediação 19
3.4 Bioensaios 21
3.5 Organismo teste *Allium cepa* 22
3.6 Cultura de células de mamíferos 23
3.7 Potencial agronômico 24
3.8 Caracterização e avaliação do uso de *Lactuca sativa* em testes de produtividade agrícola 25
4 MATERIAL E MÉTODOS 26
4.1 Material e preparo das amostras 26
4.2 Organização dos ensaios de bioestimulação 27
4.3 Obtenção dos extratos aquoso 27
4.3.1 Cálculo do peso seco 27
4.3.2 Obtenção dos Solubilizado 28
4.4 Bioensaio com sementes de *Allium cepa* *28*
4.5 Cultura de células de mamífero 29
4.5.1 Teste do MTT (brometo tiazoil azul tetrazólio) 29
4.5.2 Teste do micronúcleo em células mantidas em cultura (HepG2) 30
4.6 Análises microbiológicas 31
4.6.1 Diluição, semeadura e identificação de microrganismos das amostras 31
4.6.2 Contagem de bactérias presentes na amostra 32
4.7 Avaliação do potencial agronômico do LE e suas associações em *Lactuca sativa* *32*
4.7.1 Análises Biométricas de *L. sativa* 32
4.7.2 Análise de fertilidade das amostras 33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 34
Artigo 1. Avaliação da produtividade de *Lactuca sativa* tratada com amostras de lodo de esgoto biorremediado 35
Artigo 2. Avaliação dos efeitos fitotóxicos e toxicogenéticos do lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de ensaios com *Allium cepa* 50
Artigo 3. Avaliação da pontencialidade de uso agrícola de lodo de esgoto bioestimulado, por meio de ensaio com cultura de células de mamífero 81
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 100

1 INTRODUÇÃO

Os resíduos sólidos urbanos são, atualmente, uma das maiores preocupações ambientais, devido, principalmente, a problemas com a sua destinação, já que a produção desses resíduos é crescente (HARTMANN; AHRING, 2006). Esses resíduos são também conhecidos como portadores de nutrientes e matéria orgânica, o que o caracteriza como um possível agente a ser usado na fertilização de solos desgastados. Em países em desenvolvimento, grande parte destes resíduos são queimados ou permanecem inutilizados em aterros, havendo, com isso, a possibilidade de contaminação ambiental e o desperdício dos seus possíveis nutrientes (TAHIR et al., 2006).

O lodo de esgoto (LE) de acordo com a Norma Brasileira de Classificação de resíduos sólidos (NBR 10.004), é caracterizado como um resíduo sólido urbano, produzido em Estações de Tratamento de Esgoto (ETE). Este resíduo é resultado dos processos de sedimentação, realizados ao longo do tratamento primário e secundário das águas residuais (ROIG et al., 2012). A produção mundial do LE é de cerca de milhões de toneladas/ano (APARICIO; SANTOS; ALONSO, 2009), dando uma correlação de produção diária de 150 g por pessoa (SOBRINHO, 2001).

Devido à produção crescente do LE, inúmeras alternativas foram propostas para solucionar o problema de sua destinação final, como o descarte do LE em aterros sanitários, disposição oceânica, incineração, incorporação na fabricação de produtos cerâmicos ou reciclagem agrícola (ANDREOLI et al., 2006). Dessa forma, têm sido estimuladas, mundialmente, ações que possam priorizar a reciclagem deste resíduo e minimizar a sua produção (OLIVEIRA et al., 2005). Segundo Pegorini et al. (1999), o reaproveitamento do LE na agricultura pode se caracterizar em uma excelente opção de reuso do LE, já que reduz a exploração de recursos naturais para a produção de fertilizantes, bem como proporciona melhores resultados econômicos para a agricultura. Além disso, o LE tem sido indicado para uso agrícola, por conter uma alta concentração de matéria orgânica e nutrientes que podem promover uma melhora nas propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (BOVI et al., 2007; FARIA, 2007).

O uso de resíduos sólidos como fertilizante ou como regenerador orgânico do solo, possibilita a reciclagem da matéria orgânica, nitrogênio, fósforo e outros nutrientes essenciais ao crescimento das plantas (HERNÀNDEZ et al., 1991; ZUFIAURRE et al., 1998; HARGREAVES et al., 2008; IQBAL et al., 2010). Apesar disso, esta prática pode representar uma ameaça ao ambiente, pois esses resíduos

podem conter uma alta quantidade de metais potencialmente tóxicos, cujo problema pode ser intensificado, se esses metais forem mobilizados por vegetais, ou transportados por águas de drenagem (MINGOT et al., 1995; ALONSO et al., 2002). O LE também pode conter contaminantes orgânicos como fenóis, benzenos, antracenos, alquilbenzenos linear sulfonados, dentre outros (PARAIBA; SAITO, 2005) e agentes patogênicos (TAS, 2010), o que pode afetar, diretamente, a biota deste ambiente e expor diferentes populações a riscos (DEPORTES et al., 1995).

A toxicidade e a contaminação biológica do LE podem conferir problemas para a sua utilização na agricultura. Esses problemas, no entanto, podem ser minimizados por metodologias de biorremediação (MENA et al., 2003). Na biorremediação, os compostos orgânicos podem ser utilizados pelos microrganismos como substratos e fonte de energia, resultando em uma degradação parcial ou total (mineralização) do poluente (MENA et al., 2003). Uma das estratégias de biorremediação altamente empregados para descontaminação do LE é a compostagem (HARGREAVES et al., 2008; OLESZCZUK, 2008; MENA et al., 2011; CESARO et al., 2015). No entanto, outras técnicas de remediação também podem ser aplicadas, na tentativa de minimizar e até mesmo eliminar esses riscos, como por exemplo, a bioestimulação. Na técnica de bioestimulação, há a incorporação de agentes que irão estimular o crescimento de microrganismos do local a ser remediado (MAZZEO et al., 2014) e, assim, biodegradar os compostos considerados perigosos.

Os ensaios biológicos são indicados para avaliação da estabilidade biológica dos processos de remediação (CESARO et al., 2015), pois permitem a investigação da possibilidade do uso desses resíduos para fins agrícolas e uma indicação mais precisa dos possíveis riscos relacionados à sua aplicação (OLESZCZUK; HOLLERT, 2011). Já que o LE possui uma natureza complexa (THORNTON et al., 2001) e os métodos de análises químicas são limitados para prever os reais perigos do LE, quando disposto no ambiente (CROUAU et al., 2002), torna-se necessário o uso de técnicas que sejam capazes de avaliar esses impactos, o que pode ser feito por meio de bioensaios. Segundo Domene et al. (2008), na Europa, há uma prioridade para o desenvolvimento de bioensaios que possam avaliar os efeitos dos resíduos orgânicos, incluindo a aplicação do LE na agricultura.

Dentre os bioensaios realizados com vegetais superiores, a espécie *Allium cepa* tem sido indicada como um eficiente organismo-teste para estudos básicos de ação de contaminantes (FISKEJÖ, 1985; BUSHRA ATEEQ; ABUL FARAH; NIAMAT

ALI, 2002; FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007; 2009). Assim como a cultura de células de mamíferos tem sido empregada em muitos ensaios de monitoramento ambiental, pela sua alta sensibilidade à contaminantes (LEME et al., 2011; LIU et al., 2012).

Dessa forma, é muito importante o aprimoramento de metodologias que visem uma descontaminação do LE e a estabilidade dos resíduos biorremediados, para que o mesmo possa ser aplicado aos solos. Além de métodos de análise que confirmem a possibilidade de aproveitamento dos nutrientes e material orgânico presentes no LE, como biofertilizante e condicionante. Assim, para a compreensão dos riscos ecotoxicológicos potenciais do LE biorremediado, torna-se necessário buscar bioindicadores adequados para serem utilizados em bioensaios, que possam responder melhor a este tipo de avaliação.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a possibilidade de reutilização do LE como fertilizante agrícola, há uma necessidade prioritária de se desenvolver novas tecnologias que permitam a sua descontaminação, para que este resíduo possa ter um destino mais nobre, sob o ponto de vista econômico e ambiental. Desse modo, esse projeto teve como objetivo:

- ✓ Promover a detoxificação do LE, por meio do processo de biorremediação, estimulada pela adição de agentes bioestimulantes como solo e casca de arroz;
- ✓ Avaliar a potencialidade do LE e de suas misturas biorremediadas servirem como insumo de solos agricultáveis, por meio de teste de produção de biomassa da espécie *Lactuca sativa;*
- ✓ Monitorar a efetividade da detoxificação do LE, com e sem adição de casca de arroz e/ou solo, em diferentes períodos, por meio de ensaios biológicos;
- ✓ Avaliar os potenciais fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos dos solubilizados LE puro ou em misturas com solo e casca de arroz, por meio de ensaios desenvolvidos com o organismo-teste *Allium cepa*;
- ✓ Avaliar o potencial genotóxico dos solubilizados de LE puro e em misturas com solo e casca de arroz, por meio do teste de micronúcleo em cultura de células de hepatoma humano (HEPG2);
- ✓ Caracterizar qualitativa e quantitativamente a população microbiana do LE puro ou em misturas com solo e casca de arroz, durante o processo de biorremediação;
- ✓ Estimar as possibilidades de utilização do lodo, associado ou não ao resíduo vegetal, como biofertilizante de solos agrícolas;
- ✓ Verificar a efetividade do uso da casca de arroz como acelerador de biodegradação e redutor de toxicidade do LE a ser destinado para uso agrícola;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Produção do Lodo de Esgoto

As atividades antrópicas geram muitos resíduos que podem impactar os ecossistemas, quer seja pela sua ação tóxica ou pela sua capacidade de se acumularem e descaracterizarem o ambiente. O gerenciamento desses resíduos deve ser feita com muita cautela e com conhecimento do tipo de resíduo a ser disponibilizado, pois qualquer erro pode desencadear problemas ambientais sérios e causar danos à saúde humana e aos outros organismos vivos.

Locais com alta densidade demográfica e industrial têm como principais agentes poluidores as águas residuais (MARIA et al., 2007; PEDROZA et al., 2010). As águas residuais são todas as águas descartadas que resultam da utilização humana para diversos processos, conhecidas popularmente como esgoto. As águas residuais domésticas são aquelas que serviram às instalações residenciais, por isso contém agentes provenientes do metabolismo humano e das atividades domésticas; as águas residuais industriais são aquelas que serviram às atividades industriais, por isso não são enquadradas na mesma categoria das águas residuais domésticas e das águas pluviais; e as águas residuais mistas são as derivadas da mistura das águas servidas para atividades, urbanas, industriais e/ou pluviais (BRASIL, 1997). O grau de impureza das águas residuais é variável, frente aos diversos compostos químicos dissolvidos ou em suspensão, matérias coloidais e matérias sólidas, além de compostos ou agentes biológicos impróprios à saúde que podem estar presentes.

As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) são responsáveis pela remoção de poluentes das águas residuais. Essa remoção se dá por meio de uma sequência de processos que tem como finalidade separar as frações sólidas das líquidas. Ao final do processo, como consequência do tratamento das águas residuais realizado nas ETEs, é gerado um resíduo final de característica pastosa, denominado de lodo de esgoto (LE) (ROIG et al., 2012). O tratamento de esgoto realizado nas ETEs tem como finalidade a diminuição da carga poluidora orgânica, inorgânica e microbiana do esgoto, para impedir que a disposição deste resíduo possa promover impactos aos recursos hídricos e, consequentemente, à saúde ambiental (CARVALHO; OLIVEIRA, 2010).

De modo geral, o tratamento das águas residuais consiste primeiramente na retirada do material sólido grosseiro (papel, plástico, alumínio, entre outros)

do efluente que chega na ETE, por meio de grades. Após isso, o efluente sofre desarenação, ou seja, a retirada da areia presente no mesmo por meio de decantação. Posteriormente, o efluente segue para o decantador primário, onde há a sedimentação das partículas mais pesadas (formação do lodo primário), seguido do direcionamento do efluente para o tanque de aeração, no qual há a multiplicação dos microrganismos ali presentes, havendo a formação de mais lodo (lodo secundário ou biológico) e diminuição da matéria orgânica. Em seguida, o efluente passa pelo decantador secundário, onde o lodo formado decanta e a parte líquida é lançada no corpo d´água receptor (SABESP, 2009). O lodo bruto que permanece na ETE segue para outros processos, no qual deve perder água, ser compactado e estabilizado, para ser encaminhado para disposição (GRAY, 2010) (Figura 1).

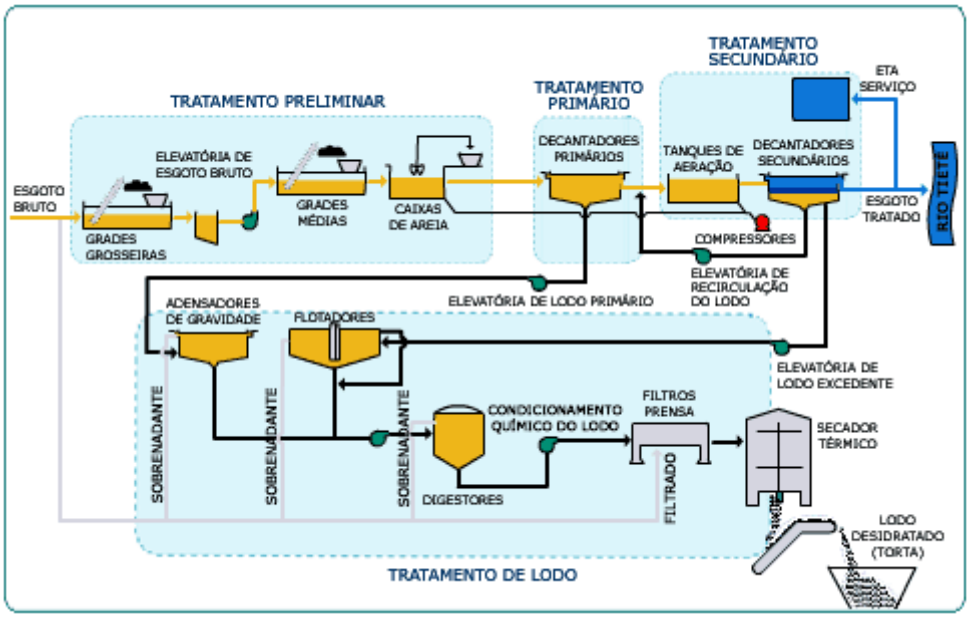

Figura 1: Exemplo de etapas do tratamento das águas residuais.
Fonte: SABESP (www.sabesp.com.br – 2016).

A produção de esgoto doméstico no Brasil é cerca de 80 a 200 litros/habitante/dia, sendo que, cada habitante gera por dia cerca de 150 gramas de lodo centrifugado (SOBRINHO, 2001). O volume total de esgoto tratado no ano de 2014, foi de 3 763 851 mil m^3, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2016), e a produção de LE está em torno de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca por ano (PEDROZA et al., 2010),

cujo destino final, em sua maioria, são os aterros sanitários.

O aumento do volume do LE produzido nas ETEs está diretamente relacionado ao aumento da industrialização e urbanização (KHAN et al., 2013). Em países da Europa como a Alemanha, Reino Unido, Espanha, França e Itália a produção de LE chega a 2,17; 1,771; 1,121; 1,059 e 1,053 milhões de toneladas de sólido seco por ano, respectivamente (KELESSIDIS; STASINAKIS, 2012). Na China, cerca de 30 milhões de toneladas de lodo foram produzidos em 2010 (YU, 2011).

Segundo Lopes e colaboradores (2005), o destino final do lodo das ETEs é uma preocupação mundial, devido ao crescente volume gerado desse resíduo. Dessa forma, há uma preocupação com relação ao gerenciamento e disposição final do LE, devido aos problemas ambientais que o mesmo pode causar (GIANICO et al., 2013).

3.2 Alternativa para utilização do LE e Resolução CONAMA 375/06

Diversas alternativas vêm sendo sugeridas para a destinação final do LE, como, por exemplo, sua disposição em aterros sanitários apropriados; uso na produção de tijolos e cimentos; matéria de combustão; acondicionamento em oceanos; e uso como fertilizante agrícola (SILVÉRIO, 2004). Dentre essas alternativas, seu uso como fertilizante agrícola e recondicionante de solos agricultáveis se mostra a opção mais vantajosa, do ponto de vista econômico e ambiental (FIA; MATOS; AGUIRRE, 2006; SINGH; AGRAWAL, 2008; GIANICO et al., 2013), visto que à sua composição é predominantemente de matéria orgânica e de nutrientes, como nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, zinco e manganês (ANDREOLI et al., 2004; SILVÉRIO, 2004; BOVI et al., 2007; SINGH; AGRAWAL, 2008; MCGEEHAN, 2012; GIANICO et al., 2013). Outra vantagem no uso do LE como fertilizante seria a diminuição da utilização de fertilizantes sintéticos (WALTER; MARTINEZ; CALA, 2006), pois o LE também contém elementos importantes como nitrogênio e fósforo, essenciais para o desenvolvimento das plantas (FYTILI; ZABANIOTOU, 2008).

Além disso, segundo Singh e Agrawal (2008), o uso do LE pode melhorar outras características do solo como a retenção hídrica, por aumentar a capacidade de campo; aumentar a capacidade de troca catiônica; diminuir a densidade do solo e aumentar a estabilidade dos agregados; diminuir processos

erosivos; aumentar o teor de ácido húmico e carbono orgânico.

Muitos países já aplicam o lodo gerado na agricultura, como o Reino Unido que usa cerca de 60% do LE gerado para este fim (GRAY, 2010), a Espanha, que em 2005, destinou em solos agricultáveis 725.000 toneladas das 1.120.000 toneladas de matéria seca geradas (BARNETO et al., 2009) e a China, que deu destino agrícola para 44% do lodo de esgoto produzido no país (YU, 2011).

Espécies de interesse agronômico tem sido cultivadas em solos tratados com LE (DEFELIPO et al., 1991), devido ao aumento de produtividade das mesmas (SILVA et al., 2010), como por exemplo, girassóis (LOBO; FILHO, 2007; RIBEIRINHO et al., 2012), eucaliptos (TRIGUEIRO; GUERRINI, 2003), culturas de cana de açúcar, milho, arroz, feijão e café (BETIOL; CAMARGO, 2006, 2007).

No entanto, a composição do LE está altamente relacionada com a origem do esgoto tratado, ao tipo de tratamento utilizado pela ETE e à época do ano em que ele é produzido, o que confere ao LE uma característica bastante diversificada (BETTIOL; CAMARGO, 2006; FYTILLI; ZABANIOTOU, 2008; SINGH; AGRAWAL, 2008). Dessa forma, o LE pode conter substâncias nocivas aos organismos vivos e ao meio ambiente, como metais potencialmente tóxicos, como o zinco, cobre, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio; compostos orgânicos, tais como fenóis, benzenos, antracenos, alquilbenzenos linear sulfonados; além de microrganismos patogênicos (LOURENÇO, 1997; ALMEIDA et al., 1998; HOLMSTRUP et al., 2001; LOPES et al., 2005; PARAIBA; SAITO, 2005, HARRISON et al., 2006).

Apesar do uso do LE ser interessante na agricultura, o fato dele conter uma mistura complexa de compostos tóxicos e agentes patogênicos, pode acarretar em riscos quando este é depositado no solo, pois esses contaminantes podem tornarem-se disponíveis aos organismos expostos (ENGWALL; HJELM, 2000) e movimentarem-se no ambiente o que, consequentemente, leva à contaminação das camadas superficiais do solo (BERTONCINI; MATTIAZZO,1999). Assim, seu uso na agricultura pode ser preocupante, se feito de maneira inadequada. Além disso, a lixiviação química dos solos, promovida pela ação de águas pluviais, pode disseminar a contaminação para águas subterrâneas e sistemas fluviais vizinhos (RODRIGUES-FILHO; MADDOCK, 1997 apud YALLOUZ et al., 2008).

Tendo em vista a reutilização segura do LE em solos agrícolas, o

Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) estabeleceu, em 2006, critérios e procedimentos para a sua utilização (BRASIL, 2006). O uso do LE ou seus produtos derivados devem estar de acordo com a legislação prescrita no Artigo 11 da Resolução 375 do CONAMA (BRASIL, 2006), que define limites para substâncias potencialmente tóxicas, além de critérios para liberação dos resíduos. No entanto, diante de variações dos lodos gerados nas ETEs, há uma necessidade da atualização desta norma, para que haja uma adequação compatível com as novas tecnologias usadas nos tratamentos do lodo, e assim, se evite possíveis impactos ambientais. Trannin et al. (2005) afirmam que, devido a variabilidade da composição química do LE e seu teor de umidade, que acaba dificultando a busca de padrões de doses recomendadas para seu uso, há uma necessidade de estudos que avaliem a possibilidade do seu uso agronômico seguro. Contudo, a revisão realizada por Harrison et al. (2006), sobre químicos orgânicos presentes em LE, mostra que este resíduo pode conter, além de nutrientes e matéria orgânica importantes para as culturas vegetais, contaminantes orgânicos, inorgânicos e patógenos. Os autores citam que dos 516 compostos diferentes identificados em LE, 83% deles não constam na lista estabelecida pela agência ambiental norte americana (USEPA), para poluentes prioritários, e 80% não estão na lista de compostos alvo desta mesma agência. Frente a esta análise, os autores alertam que análises baseadas em parâmetros previstos pela agência ambiental norte americana pode contemplar apenas uma pequena fração dos produtos químicos orgânicos presentes em LE, o que reforça a necessidade de uma avaliação mais aprofundada dos riscos e efeitos que o LE pode proporcionar ao ambiente.

3.3 Biorremediação

Pensando nos benefícios que o LE possa trazer para a agricultura, muitos esforços têm sido direcionados para o desenvolvimento de novas tecnologias que possam minimizar a toxicidade do LE e, assim, garantir um destino mais nobre a este resíduo (TAS, 2010).

Antes da sua aplicação ao solo, o LE deve ser submetido a tratamentos adequados para melhorar a estabilidade da matéria orgânica (M.O.) e evitar efeitos perigosos sobre as propriedades do solo, bem como sobre a saúde ambiental (PLAZA et al., 2003). A biorremediação é uma metodologia que

consiste na utilização de organismos capazes de modificar ou decompor poluentes, que pode ser vista como uma estratégia econômica e ambientalmente vantajosa (TYAGI et al., 2011), para a diminuição da toxicidade de resíduos orgânicos. A atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação, compostagem, entre outras são técnicas frequentemente utilizadas na biorremediação de locais ou resíduos contaminados (SKIPPER, 1999), que promovem a estimulação do metabolismo microbiano e, por consequência, a degradação mais eficiente de compostos tóxicos.

A compostagem é uma das técnicas de biorremediação mais utilizadas no mundo para o tratamento do LE (CORRÊA et al., 2007). Esta técnica consiste na degradação da matéria orgânica pela ação dos microrganismos em condições físicas e químicas ideais, havendo o acréscimo de materiais como palhas, folhas, cascas e bagaços vegetais, aumentando a porosidade e oxigenação das pilhas ou leiras formadas (LEMOS et al., 2009). Mena et al. (2003) estudaram a compostagem de um LE misturado com maravalha e observaram redução das frações da matéria orgânica, devido à sua mineralização; diminuição de microrganismos patogênicos; e eliminação dos compostos fitotóxicos, que permitiu um índice maior de germinação no final do processo. Neste estudo, os autores demonstraram a eficiência dessas técnicas de biorremediação na descontaminação do LE.

A porosidade e a aeração dos solos são parâmetros importantes a serem considerados em processos de biorremediação, uma vez que a melhora na degradação dos poluentes orgânicos está relacionada com a porosidade do solo e, consequentemente, com a quantidade de oxigênio disponível no meio, pois em condições aeróbias há um favorecimento do processo biorremediação (HARMSEN, 1991; PEREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004). A aeração do solo pode ser obtida e/ou melhorada por adição de agentes de volume ao substrato (VASUDEVAN; RAJARAM, 2001; SOUZA et al., 2009), como, por exemplo, os resíduos vegetais. Esse processo melhora o fornecimento de oxigênio à biomassa bacteriana, o que torna o processo de degradação de contaminantes mais efetivo (MOLINA-BARAHONA et al., 2004). A adição de agentes estimulantes, como nutrientes e oxigênio, é conhecido como bioestimulação, que impulsiona o crescimento da microbiota autóctone (MAZZEO et al., 2014).

A casca de arroz é um resíduo agroindustrial, subproduto de

beneficiamento deste cereal, que pode atuar como um bom agente de volume (descompactante), e contribuir para a aerobiose do sistema em processos de biorremediação, devido a sua constituição fibrosa. Esse resíduo tem uma produção expressiva no Brasil, que atinge, aproximadamente, três milhões de toneladas por ano (MAYER et al., 2006). Essa casca é constituída de quatro camadas fibrosas que são altamente silicosas (HOUSTON, 1972). Fernandes et al. (2015) cita que a casca de arroz é composta de celulose (43,5%), hemicelulose (22%), lignina (17,2%), cinzas (11,4 %) e outros (5,9%). Segundo Ferreira (2005), as cinzas da casca de arroz contêm 80-90% de SiO_2, 5% de K_2O, 4% de P_2O_5 e 1-2% de CaO e pequenas quantidades de Mg, Fe e Na. Além dos compostos presentes na casca de arroz, Hamdi et al. (2007) afirmam que ela contém, ainda, estirpes microbianas capazes de metabolizar poluentes, o que auxilia muito o processo de biorremediação de compostos orgânicos.

Em ambientes naturais, as bactérias são os principais organismos que atuam nos processos de biorremediação dos contaminantes (WATANABE, 2001). Sendo assim, é muito importante a identificação dos microrganismos presentes na biorremediação, já que os mesmos podem ser magnificados no ambiente e, consequentemente, melhorar o processo de biodegradação. No entanto, segundo Harrison et al. (2006), a degradação de compostos orgânicos pode resultar em outros compostos com toxicidade maior ou menor que os presentes inicialmente nas amostras. Como alguns autores (PHILLIPS et al., 2000; OLESZCZUK, 2008; SOMMAGGIO, 2013) relatam a formação de compostos intermediários tóxicos durante o processo de biorremediação, é necessário a realização de ensaios biológicos, além das análises químicas, para que confirmem a efetividade desses processos (PLAZA et al., 2005).

3.4 Bioensaios

Os bioensaios são essenciais para as avaliações de risco ambiental, e da biodisponibilidade das substâncias presentes em amostras ambientais, já que as análises químicas medem somente a concentração dos químicos presentes no ambiente (MOREIRA et al., 2008). Segundo Rodrigues (1999), os ensaios biológicos fornecem resultados confiáveis e auxiliam nas tomadas de decisões, quanto ao tratamento e disposição adequada dos resíduos gerados. Além de possibilitarem a identificação de efeitos aditivos, sinergísticos e antagônicos dos

compostos químicos presentes em amostras ambientais complexas (PANDARD et al., 2006).

3.5 Organismo teste *Allium cepa*

Como a grande maioria das plantas utiliza o solo como meio de crescimento, esses organismos são excelentes bioindicadores para avaliação de genotoxicidade de solos (WHITE; CLAXTON, 2004). Além disto, os vegetais superiores apresentam uma alta sensibilidade aos compostos químicos e produzem poucos resultados falsos positivos (GRANT, 1994). Como as plantas superiores são alvos diretos dos possíveis contaminantes de solos suplementados com LE, eles são recomendados para ser usados como bioindicadores em avaliação da toxicidade genética de solos (MARTINS et al., 2016a).

A espécie *Allium cepa* é considerada um eficiente organismo-teste para avaliação de contaminantes ambientais (FISKEJÖ, 1985; BUSHRA ATEEQ et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; 2009) e avaliação da efetividade do processo de biorremediação (MAILA; CLOETE, 2005; MAZZEO et al., 2010; SOMMAGGIO, 2013; MAZZEO et al., 2015). Essa espécie é também um dos mais antigos organismos teste utilizados nas análises de anormalidades celulares por poluentes ambientais (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

A espécie *A. cepa* possui características ideais para ser usada como organismo teste, devido a sua cinética de proliferação, o crescimento rápido de suas raízes, o grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido (2n=16) e de grande tamanho (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006), além de serem facilmente corados e observados em microscopia de luz (KURÁS et al., 2006).

De acordo com Caritá (2007) e Souza et al. (2009), a espécie *A. cepa* caracteriza-se em um eficiente sistema-teste para a detecção de danos genotóxicos e mutagênicos induzidos por solos e solubilizados de solos contaminados. Outra vantagem, é o fato de que a exposição pode ser feita diretamente no material a ser testado, incluindo misturas complexas, sem a necessidade de se realizar procedimentos de extração ou pré tratamento das

amostras (RANK; NIELSEN, 1993).

Os parâmetros passíveis de serem analisados nas células meristemáticas de *A. cepa* são as aberrações cromossômicas e cromatídicas, troca entre cromátides irmãs, alterações no índice mitótico, anormalidades nucleares e formação de micronúcleos (MN) (MIGID; AZAB; IBRAHIM, 2007). A região F1, constituída de células diferenciadas originadas das células meristemáticas, fornecem excelentes resultados sobre a mutagenicidade de agentes tóxicos, pois está relacionada com a avaliação do progresso dos danos induzidos nas células meristemáticas e repassados para as F1 (LEME; MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011).

Martins e colaboradores (2016a) compilaram diversas informações sobre a avaliação da toxicidade de diferentes LE, em várias espécies de plantas, e dentre elas destaca-se o uso do organismo teste *A. cepa.* Diversos estudos mostram a sensibilidade das células meristemáticas e F1 dessa espécie para avaliar a toxicidade e toxicogenética de diferentes tipos de LE (industriais e domésticos), tanto dos extratos aquosos, quanto de suas amostras brutas (SRIVASTAVA et al., 2005; MAZIVIEIRO, 2011; CHRISTOFOLETTI et al., 2012; CHRISTOFOLETTI et al., 2013; MAZZEO et al., 2015; MARTINS et al., 2016 b).

3.6 Cultura de células de mamíferos

Devido ao controle mais rigoroso da experimentação animal, novos métodos foram padronizados para serem usados em avaliação da toxicidade das substâncias, dentre eles os testes *in vitro* (ROGERO et al., 2003). A adequação e disseminação da utilização dos testes *in vitro* se deu pela obtenção de resultados semelhantes aos desenvolvidos *in vivo,* porém com utilização de pequenas amostras de células, sem a necessidade de sacrifício de grandes quantidades de animais (CARVALHO, 1996). Assim, os testes ecotoxicológicos realizados com cultura de células de mamíferos são de extrema importância.

As células mantidas em cultura são facilmente manipuladas e observadas do ponto de vista microscópio, bioquímico e molecular, possibilitando o seu uso em diversos ensaios de toxicidade (MORALES, 2008). Segundo Carvalho (1996), se um agente químico promove uma resposta positiva em um organismo vivo, provavelmente, as respostas serão semelhantes às observadas em sistemas testes *in vitro*. Segundo Brusick (1987), os ensaios *in vitro* podem

auxiliar no entendimento do modo de ação de agentes tóxicos, além de permitir uma melhor padronização das etapas experimentais, possibilitando manipular ou introduzir variáveis desejadas, como tempo de tratamento, temperatura, pH, dentre outros.

Testes *in vitro,* realizados com cultura de células de mamíferos, podem ser utilizados em estudos de avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade dos químicos ambientais (CARDOZO et al., 2006), sendo comumente utilizados nesses ensaios por apresentarem uma boa correlação entre o efeito observado e o esperado no homem (BRUSICK, 1987).

As células de hepatoma humano (HepG2) são consideradas um competente sistema-teste para avaliação do potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes (WESTERINK et al., 2010; LEME et al., 2011), por se apresentarem muito próximas das características humanas *in vivo* (Van der WATER et al., 2011). Estas células apresentam uma intensa capacidade de proliferação, facilidade de cultivo e manutenção das características da linhagem, por longos períodos (OSAMA et al., 2004).

Segundo Mazzeo (2013), as células HepG2 empregadas em seu estudo para a avaliação da toxicidade de um LE atenuado naturalmente, se mostraram sensíveis na avaliação do potencial mutagênico do LE.

3.7 Potencial agronômico

O aumento da utilização do LE em diferentes culturas agrícolas, como abacaxi, banana, café, cana de açúcar, goiaba, mamão e milho (COSTA; COSTA, 2011), está associado ao seu considerável potencial orgânico e a presença de macro e micronutrientes essenciais para as plantas, o que confere a esse resíduo a possibilidade de, mesmo que parcialmente, substituir os fertilizantes minerais (NASCIMENTO et al., 2004). Dessa forma, a utilização do lodo, em substituição aos adubos químicos, se dá de forma mais natural, uma vez que o recondicionamento do solo é feito pela reciclagem da matéria orgânica e dos nutrientes presentes no LE, o que confere a possibilidade de trazer benefícios ambientais (COSCIONE et al., 2010). A utilização do LE como biofertilizante e condicionador de solos, pode promover o aumento da produtividade agrícola, com redução do uso de insumos agrícolas de alto custo (fertilizantes minerais). Assim, esta prática, além de vantajosa sob o ponto de

vista ambiental, pode ser também considerada economicamente viável, pois gera ganhos ao produtor e também aos geradores do LE (GUEDES et al., 2006).

De acordo com Tsutiya (2001), o LE seria uma forma de adubação orgânica, que favorece a formação de agregados, facilitando a penetração das raízes e da vida microbiana, levando a um aumento da resistência dos solos a erosão, por estabilizar a sua estrutura. Além disso, o LE aumenta a capacidade de retenção de água, tornando as culturas mais resistentes à seca, e fornece nutrientes para as plantas, proporcionando maior rendimento da biomassa seca.

A utilização de LE como biofertilizante tem mostrado um aumento da produtividade de diversas culturas de interesse agronômico (SILVA et al., 2010), como por exemplo girassol (RIBEIRINHO et al., 2012), milho, arroz e feijão (BETIOL; CAMARGO, 2006). Lemainski e Silva (2006), após aplicarem o LE em uma cultura de soja, concluíram que a eficiência agronômica do LE é cerca de 20% maior que a obtida por fertilizantes minerias, mostrando que sua aplicação é uma alternativa agronomicamente viável e vantajosa.

3.8 Caracterização e avaliação do uso de *Lactuca sativa* em testes de produtividade agrícola

A espécie *L. sativa*, conhecida popularmente como alface, pertence à família Asteraceae, e é a mais popular das hortaliças folhosas, sendo cultivada em quase todas as regiões do globo terrestre (CARPINSKI et al., 2013). Segundo Filgueira (2003), essa espécie originou-se de espécies silvestres, ainda encontradas em regiões de clima temperado, no sul da Europa e na Ásia Ocidental.

O solo ideal para cultivo dessa hortaliça é o de textura média, rico em matéria orgânica e com boa disponibilidade de nutrientes. Para esta planta apresentar uma maior produtividade, é necessário que seja cultivada em solos com boas características físico-químicas, o que pode ser obtido pelo acréscimo de doses crescentes de compostos orgânicos (SOUZA et al., 2005). A alface é um cultivar possível de ser plantado ao longo do ano, devido a sua boa tolerância e adaptação a variação climática (SOUZA; RESENDE, 2003; FILGUEIRA, 2000). Apresenta um ciclo rápido (50 a 70 dias depende do tipo do cultivar), o que a torna exigente em nutrientes (KATAYAMA, 1993).

Bevacqua e Mellano (1993) estudaram os efeitos da aplicação de

compostado de LE em diferentes culturas, incluindo a alface. Os autores relataram um aumento de matéria orgânica, nutrientes, sais solúveis e metais no solo tratado com o compostado e a consequente melhoria do rendimento das culturas.

O emprego do LE na agricultura pode trazer benefícios aos sistemas agrícolas, incluindo ganho de produtividade e melhorias nas propriedades físicas e químicas dos solos, além de ser uma forma de disposição de baixo custo (MARCIANO et al., 2001) e promover uma reciclagem de resíduos.

Devido essa espécie apresentar um ciclo curto, ser de fácil manuseio e sensível a nutrientes para o seu crescimento, esse trabalho utilizou essa cultura para verificar se os LE biorremediados podem favorecer uma melhor produtividade desse vegetal, quando aplicados ao solo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material e preparo das amostras

O LE ativado centrifugado foi coletado, em 2014, na ETE Praia Azul na cidade de Americana, São Paulo, Brasil (latitude 22° 44' 21" S e longitude 47° 19' 53" W). Esta ETE recebe somente efluente de esgoto doméstico, proveniente do bairro Praia Azul, localizado na margem esquerda do Córrego Olho d´Agua, no limite do parque residencial Tancredi, gerando, mensalmente, cerca de 115 m^3 de LE.

Para o preparo das amostras, foi utilizado um solo de textura argilosa, coletado no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil), considerado de boa qualidade agrícola. Como agente descompactante (agente de volume), foi utilizado a casca de arroz, obtida de uma indústria de beneficiamento de arroz da região. As amostras utilizadas nesse estudo foram preparadas nas seguintes associações: amostra de LE pura (LEP); LE+solo (LE+S: 3:1 – v/v); LE+solo+casca de arroz (LE+S+CA: 3:1:1 – v/v) (Figura 2).

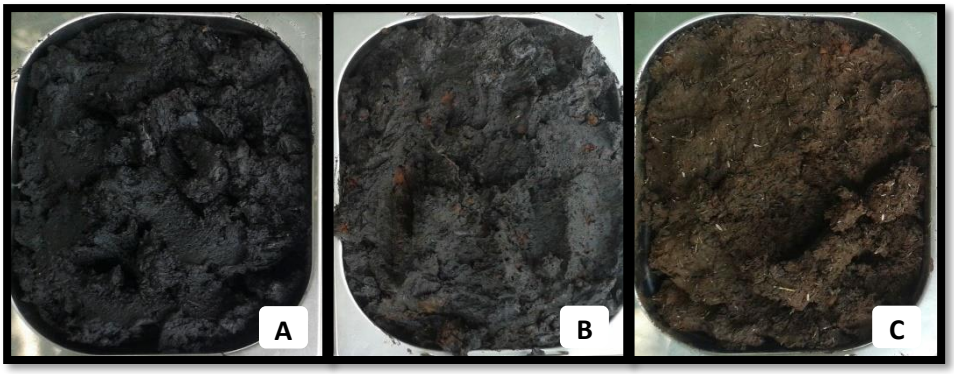

Figura 2: Amostras utilizadas no estudo e submetidas a biorremediação. **A**: LEP: lodo de esgoto puro; **B**: LE+S: lodo misturado com solo; **C**: LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz. Fonte: Registrada pela própria autora.

4.2 Organização dos ensaios de bioestimulação

As diferentes amostras (associações de solo, LE e casca de arroz) foram dispostas em cubas de aço inox (14 L). Durante todo o período de biorremediação, as cubas foram mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local coberto e sob temperatura ambiente. Os períodos escolhidos para avaliação da biorremediação foram: tempo zero (T0), antes do início do processo de biorremediação, usada como referência da toxicidade do LE; 3 meses de biorremediação/bioestimulação (T1); e 6 meses de biorremediação/bioestimulação (T2).

Com as amostras brutas (LEP, LE+S e LE+S+CA) foram realizados os ensaios microbiológicos, os testes agronômicos com *Lactuca sativa*, obtenção de peso seco e o preparo dos solubilizados. Os solubilizados dessas amostras foram utilizados nos ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade com o organismo teste *A. cepa* e nos ensaios com cultura de células HepG2.

4.3 Obtenção dos extratos aquoso

4.3.1 Cálculo do peso seco

O peso seco de cada amostra foi obtido pela pesagem de, aproximadamente, 10 g da amostra, em recipientes individuais tarados. Esse ensaio foi realizado em triplicata. A secagem ocorreu em estufa a 105 °C por 24 horas. Posteriormente, uma nova pesagem foi realizada e a média de cada triplicata foi considerada como equivalente ao peso seco da amostra.

4.3.2 Obtenção dos solubilizado

A obtenção dos solubilizados (fase líquida) (Figura 3) foi baseada na norma ABNT NBR 10.006 (2004), adicionando 62,5 g de cada amostra (referente ao seu peso seco) em 250 mL de água destilada, seguido por agitação constante por 5 minutos. Contudo, foi necessário adicionar mais água no sistema, para se conseguir fase líquida suficiente para análise, uma vez que houve uma grande retenção da água adicionada ao lodo. Para isso, foram adicionadas 350 mL, 150 mL e 100 mL de água destilada nas amostras de LEP, LE+S e LE+S+CA, respectivamente. Após 7 dias de decantação, realizada a temperatura de 22 °C, foi coletada e filtrada em membrana com 0,45 µm de porosidade a fase líquida de cada amostra.

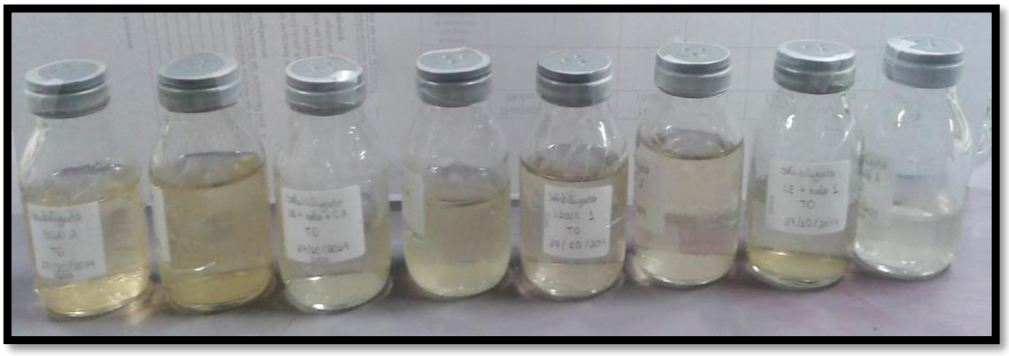

Figura 3: Solubilizados das diferentes amostras de LE e suas associações com solo e casca de arroz. Fonte: Registrada pela própria autora.

4.4 Bioensaio com sementes de *Allium cepa*

A germinação das sementes de *A. cepa* (2n=16 cromossomos), variedade “Baia Periforme”, foi realizada em placas de Petri contendo extrato aquoso, obtido por solubilização das amostras de LEP; LE+S; LE+S+CA, para o T0 e após os dois períodos escolhidos de biorremediação (T1, T2).

Os tratamentos controles foram realizados com água destilada (controle negativo), com o extrato aquoso do solo de referência (controle ambiental) e em 10 mg/L de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3 – para controle positivo).

Após germinação, radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool e ácido acético: 3;1 – v/v), por 6 a 8 horas

a temperatura ambiente. Decorrido esse período, o fixador foi substituído por um fixador novo e as raízes foram armazenada a 4°C. Para a confecção das lâminas com as raízes fixadas, tanto da região meristemática quanto da região F1, foi seguido o protocolo descrito por Leme e Marin-Morales (2008).

Dentre as análises realizadas com as células meristemáticas de *A. cepa* foi avaliado, pelo índice mitótico (razão entre número de células em divisão e número total de células), o *endpoint* de citotoxicidade. O *endpoint* de genotoxicidade foi caracterizado pelo índice das aberrações cromossômicas (perda, ponte, atraso, aderência cromossômica, metáfase poliplóide e C-metáfases) e anormalidades nucleares (broto, núcleo lobulado e núcleo poliplóide) encontradas. Para o *endpoint* de mutagenicidade foram consideradas as quebras cromossômicas e a presença de MN. Para as análises da região F1, foram consideradas a presença de MN como indutor de mutagenicidade. A análise de todos os parâmetros foi realizada pela contagem de aproximadamente 7500 células por tratamento, sendo 15 lâminas por amostra (cerca de 500 células/lâmina). As análises estatísticas foram feitas pelo teste de Kruskal Wallis a 0,05 de nível de significância, utilizando o software BioEstat 5.0.

4.5 Cultura de células de mamífero

4.5.1 Teste do MTT (brometo tiazoil azul tetrazólio)

O teste do MTT foi utilizado para avaliar a viabilidade celular, a fim de determinar as concentrações não tóxicas de LE, a serem usadas nos ensaios com as células HepG2 mantidas em cultura.

O teste do MTT foi realizado em placas de ELISA de 96 poços. Foram semeadas 2,34 x 10^4 células por poço, em um volume total de 100 µL de meio com soro, exceto nos poços referentes ao branco, onde foi adicionado apenas o meio de cultura. A placa foi incubada por um período de 24 horas. O meio foi retirado e um novo meio de cultura (sem soro) contendo os tratamentos foi adicionado aos poços, em um volume final de 200 µL. Para a validação do experimento, foram realizados, em poços específicos, testes de controle positivo (Triton X-100, diluído em meio de cultura sem soro, na concentração de 1%) e controle negativo (meio de cultura sem soro). Nos demais poços, foram testadas cinco diferentes concentrações de cada amostra estudada (LEP, LE+S,

LE+S+CA). Os tratamentos permaneceram nos poços por um período de 24 horas e, posteriormente, foram retirados e substituídos por 150 µL de MTT, diluído em PBS, na concentração de 1 x 10^{-6} mg/mL. Após a adição do MTT, a placa foi incubada por 4 horas, em estufa a 37° C. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram lidas em espectrofotômetro com leitor de microplaca, filtro de 540 nm (Aparelho Multiskan FC – ThermoScientific). A análise estatística foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA (1 critério), seguido pelo teste de comparação de Dunnet ($p<0,05$).

4.5.2 Teste do micronúcleo em células mantidas em cultura (HepG2)

Para a realização do teste do micronúcleo com células mantidas em cultura (HepG2), foi utilizada a técnica descrita por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações, como segue: as células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas), antes da adição dos tratamentos. Em seguida, foram realizados tratamentos simultâneos de 24 horas, com a adição das diferentes concentrações dos solubilizados das amostras (três frascos para cada amostra), após os diferentes períodos de biorremediação. O controle positivo foi feito adicionando, 50 µL de MMS (4x10^{-2} M) e o CN, 50 µL de PBS.

Após os tratamentos, as células foram lavadas por duas vezes com PBS. Foram adicionados aos frascos, 5 mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B. Após 28 horas de incubação, as células foram colhidas e fixadas em Carnoy (metanol/ácido acético 3:1 – v:v). Posteriormente, foram depositadas algumas gotas da cultura celular sobre lâminas limpas e geladas, contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 10 minutos.

Foram analisadas, sob microscopia de luz (aumento de 1000 vezes), cerca de 6000 células por tratamento, sendo contabilizadas duas lâminas, com aproximadamente 1000 células cada, para cada uma das triplicatas realizadas. Foram consideradas na análise, apenas células binucleadas que apresentaram membrana citoplasmática e envoltório nuclear íntegros, além de núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração. Os MN, brotos e pontes contabilizados nas células analisadas foram considerados como potencial genotóxico do solubilizado do LE e suas misturas.

A análise estatística dos resultados foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis ($p<0,05$), devido aos resultados não apresentarem distribuição normal.

4.6 Análises microbiológicas

A caracterização microbiológica do LE e de suas associações com solo e casca de arroz foram feitas após cada período de biorremediação, a fim de observar a biodiversidade microbiana nestes materiais. Esses procedimentos foram realizados em parceria com o Prof. Dr. Carlos Emilio Levy do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4.6.1 Diluição, semeadura e identificação de microrganismos das amostras

Para a diluição das amostras, foi adicionado 1 g de cada uma das amostras, individualmente, em 10 mL de solução salina estéril a 0,85%. Após esse procedimento, foi realizada uma homogeneização em Vortex, e uma sequente transferência de 1 mL da mistura para um frasco contendo 9 mL de outra solução salina. Em seguida, foi feito uma nova homogeneização, onde uma nova alíquota de 1 mL foi transferida a outro frasco com 9 mL de solução salina, sendo a nova mistura, novamente, homogeneizada. Em seguida, foram semeados 100, 10 e 1 µL (por meio de alça calibrada descartável) das três diluições nos meios: Ágar Sangue, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud e Cromoágar UriSELECT 4 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquete, França). A avaliação da densidade e da contagem da microbiota presente nas amostras foi feita por método quantitativo.

As placas semeadas foram incubadas em estufa a 35°C, exceto as de Ágar Sabouraud, que foram mantidas a temperatura ambiente, por sete dias, ininterruptamente. Após este período, as placas foram analisadas quanto ao tipo e quantidade de colônias. As colônias foram identificadas por meio de provas bioquímicas manuais e, posteriormente, os microrganismos foram re-identificados em equipamento de automação Vitek®2 Compact, BioMérieux®.

4.6.2 Contagem de microrganismos presentes na amostra

A quantificação dos microrganismos presentes em cada amostra foi realizada pela contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia), referente a 1 g do material original. Para a contagem final, foi considerado o meio de cultura que apresentou maior quantidade de cada microrganismo, pois nem todos crescem em todos os meios de cultura, pelo fato de alguns meios serem seletivos para alguns microrganismos ou por acelerar o crescimento de alguns microrganismos, dificultando assim a observação e contagem dos demais presentes na amostra. Após a identificação, as cepas foram congeladas em caldo BHI com glicerol a -80°C, para servirem de inóculo para futuros trabalhos de biorremediação.

4.7 Avaliação do potencial agronômico do LE e suas associações em *Lactuca sativa*

Essa avaliação foi realizada junto ao Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, em parceria com o Prof. Dr. Gustavo Habermann.

Para os ensaios realizados com *L. sativa*, foram preparadas associações entre solo referência e as amostras biorremediadas (LEP, LE+S, LE+S+CA, em T1 e T2) sendo uma mistura para cada tipo de amostra estudada, na proporção de 6:1, respectivamente. O teste controle foi realizado somente com o solo.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação no ano de 2015. Foram preparados 5 vasos de plástico, com capacidade de 1L, para cada tipo de amostra citada acima.

4.7.1 Análises biométricas de *L. sativa*

As análises biométricas avaliam o desenvolvimento das plantas, em um dado período, que correspondeu a 45 dias para a alface. Após este período, foram realizadas coletas destrutivas (separação dos órgãos vegetais), para análise do comprimento radicular (cm), altura (cm) das plantas (do colo até o meristema apical caulinar), número de folhas e área foliar (AF; cm^2). A área foliar foi medida com o integrador automático de área foliar (Li-3100, Li-COR, Lincoln-NE, USA). Após a coleta, os diferentes órgãos (raiz, caule e folha) das diferentes

repetições (plantas) foram acondicionados, separadamente, em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60ºC, até a obtenção da massa constante das amostras.

As análises dos parâmetros estipulados foram comparadas com os dados das alfaces cultivadas no solo controle (testemunha). Foi utilizado o programa estatístico Bioestat, para análise de normalidade. Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo o teste estatístico Kruskal Wallis usado para os dados não paramétricos, e o teste estatístico ANOVA para os dados paramétricos.

4.7.2 Análise de fertilidade das amostras

A determinação do pH, macronutrientes e micronutrientes foi realizada por análise de rotina do Laboratório Iso-Lab, no Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ, USP- Piracicaba).

Os métodos utilizados foram: pH em $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}; fósforo (P), por método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons; potássio (K), por extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; cálcio (Ca) e magnésio (Mg), por extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica; e acidez potencial (H+Al), extraído com tampão SMP. Para a obtenção dos micronutrientes foi utilizado os seguintes métodos: Boro (B), por extração com água quente e determinação por colorimetria; cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe), por extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo 1 – Avaliação da produtividade de *Lactuca sativa* tratada com amostras de lodo de esgoto biorremediado

Artigo 2 – Avaliação dos efeitos fitotóxicos e toxicogenéticos do lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de ensaios com *Allium cepa*

Artigo 3 – Avaliação da pontencialidade de uso agrícola de lodo de esgoto bioestimulado por meio de ensaio com cultura de células de mamífero

Artigo 1. Avaliação da produtividade de *Lactuca sativa* tratada com amostras de lodo de esgoto biorremediado

RESUMO

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo semi-sólido, constituído principalmente de matéria orgânica, macro e micronutrientes. Além disso, o LE pode melhorar algumas propriedades físicas do solo. Devido as essas características, autores sugerem a sua utilização na agricultura como condicionante de solos ou biofertilizante. Porém, devido ao LE ter uma origem bastante diversa, o mesmo pode apresentar compostos perigosos ao ambiente. Para a descontaminação de resíduos tóxicos, tem sido empregado tratamentos biológicos como a biorremediação. Frente a importância da reciclagem desse resíduo como biofertilizante, e também do emprego de processos de biorremediação do LE, este estudo teve como objetivo investigar o potencial agronômico de amostras biorremediadas de LE na espécie *Lactuca sativa*. Amostras de LE pura, sem nenhum tipo de mistura (LEP) e misturadas com solo (LE+S) e casca de arroz (LE+S+CA) foram biorremediadas por 3 (T1) e 6 (T2) meses. Após esses períodos, os compostos biorremediados foram adicionados ao solo para o plantio das alfaces. Decorrido 45 dias de cultivo, as plantas foram coletadas para serem realizadas análises biométricas de suas folhas, caule e raiz. Como resultado das análises de fertilidade, foi observado um aumento do pH, matéria orgânica, macro e micro nutrientes, CTC, SB e V%, para todas as amostras que receberam os tratamentos, quando comparado com o solo controle. Com relação ao número de folhas, foi observado resultado significativo para todas as alfaces cultivadas com as amostras biorremediadas, tanto do T1 quanto do T2. No entanto, com relação as análises das biomassas (raiz, caule e folhas) das alfaces cultivadas com as amostras biorremediadas do T1, os resultados foram significativos apenas LE+S+CA. Para a biomassas em T2, obteve-se resultado significativo para raiz na alface tratada com LE+S+CA e para as folhas e caules dos tratamentos LEP. Para área foliar, houve aumento desse parâmetro nas alfaces tratadas com LE+S+CA em T1, e LEP em T2. Com esse estudo, pode-se concluir que o LE biorremediado também pode ser considerado um bom insumo agrícola, já que houve uma melhora das qualidades agronômicas das alfaces cultivadas com os as amostras biorremediadas.

PALAVRAS-CHAVE: fertilidade, potencial agronômico, biomassa, área foliar, casca de arroz.

1. Introdução

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo proveniente do tratamento das águas residuais (ROIG et al., 2012) e sua produção nas estações de tratamento de esgoto (ETE) está diretamente relacionada com o aumento da industrialização e urbazinação (KHAN et al., 2013). O destino final do LE é uma preocupação mundial devido ao seu crescente volume gerado (LOPES et al., 2005). A utilização do LE como fertilizante agrícola e/ou condicionador de solos tem se mostrado uma opção vantajosa de destinação do LE, tanto do ponto de vista econômico quanto ambiental (GIANICO et al., 2013).

Tem sido sugerida a utilização do LE na agricultura, devido à sua composição predominante de matéria orgânica e nutrientes (nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, zinco e manganês) (ANDREOLI et al., 2004; SILVÉRIO, 2004; BOVI et al., 2007; SINGH; AGRAWAL, 2008; MCGEEHAN, 2012; GIANICO et al., 2013), por melhorar as características físicas do solo, como por exemplo, a retenção hídrica, capacidade de campo, capacidade de troca catiônica (CTC) e poder diminuir processos erosivos (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Plantas de interesse agronômicos têm sido cultivadas em solos tratados com LE, sendo relatados aumento na produção de matéria seca e de grãos dessas espécies (DEFELIPO et al., 1991). Girassol cultivado com o LE apresentou aumento significativo na produtividade de grãos, de óleo e de matéria seca (LOBO; FILHO, 2007). Os lodos produzidos nas ETEs do Brasil têm sido utilizados principalmente nas culturas de cana de açúcar, milho, café e eucaliptos (BETIOL; CAMARGO, 2007). O uso de LE na produção de mudas de eucalipto gera uma economia de 64% de fertilizante (TRIGUEIRO; GUERRINI, 2003).

Cerca de 60% do LE gerado no Reino Unido tem destino agrícola (GRAY, 2010). Na Espanha, em 2005, a produção de lodo foi de 1 120 000 t de matéria seca, sendo 725 000 t destinada para recondicionar o solo (BARNETO et al., 2009). Também na China, 44% do lodo de esgoto gerado é destinado à utilização agrícola (YU, 2011).

Apesar do LE ser interessante para aplicação agrícola, ele pode conter substâncias tóxicas aos organismos como alguns metais potencialmente tóxicos, compostos orgânicos perigosos, além de microrganismos patogênicos (HOLMSTRUP et al., 2001; LOPES et al., 2005; PARAIBA; SAITO, 2005). A composição do LE está diretamente relacionada com a origem do esgoto tratado,

tipo de tratamento utilizado pela ETE e a época do ano em que ele é gerado (FYTILLI; ZABANIOTOU, 2008; SINGH; AGRAWAL, 2008).

O processo de biorremediação tem sido largamente utilizado para a descontaminação de resíduos tóxicos, porque emprega tratamentos biológicos para limpeza de compostos perigosos no ambiente (SEMPLE et al., 2003). A biorremediação, processo usado para despoluir resíduos gerados pelas atividades antropogênicas, é uma estratégia econômica e ambientalmente vantajosa, por utilizar organismos capazes de modificar ou decompor poluentes (TYAGI et al., 2011). Os microrganismos interagem química e fisicamente com uma ampla variedade de compostos xenobióticos e naturais, causando uma mudança estrutural ou degradação completa da molécula-alvo (HEAD, 1998).

Devido à importância de utilização agrícola do LE, o presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial agronômico de LE biorremediado puro e associado a resíduo vegetal no cultivo de alface (*Lactuca sativa),* por meio de análises biométricas do crescimento das plantas e testes de fertilidades de solos que foram misturados às amostras de LE biorremediadas.

2. Material e Métodos

2.1. Material e amostras

O LE utilizado neste estudo é de origem doméstica e foi coletado em 2014 na ETE Praia Azul na cidade de Americana, São Paulo, Brasil. O LE foi avaliado logo após a coleta (Tempo T0) e após dois períodos de biorremediação: T1 (3 meses) e T2 (6 meses). Para a otimização desse processo, o LE foi misturado com solo (S) e casca de arroz (CA). Dessa forma, após cada período de biorremediação, foram obtidas três amostras, as quais foram utilizadas nesse estudo: LEP (LE puro) biorremediado em T1 e T2; LE+S biorremediado em T1 e T2; e o LE+S+CA biorremediado em T1 e T2.

Para os ensaios realizados com *L. sativa*, foram preparadas associações entre solo referência e as amostras biorremediadas (LEP, LE+S, LE+S+CA, em T1 e T2), sendo feita uma mistura para cada tipo de amostra estudada, na proporção de 6:1 (solo: amostras estudadas). O teste controle foi realizado usando somente o solo controle.

Os experimentos foram conduzidos em casa de vegetação, no ano de 2015. Foram preparados 5 vasos de plásticos (preto) de 1L, para cada tipo de

amostra citada acima, nos quais foram plantadas mudas de alface, uma em cada vaso.

O solo utilizado mostrava textura argilosa e foi coletado no Jardim Experimental da Universidade Estadual de São Paulo – UNESP (Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil).

2.2. Análises biométricas

Ao final do ciclo da planta (45 dias), foram realizadas coletas destrutivas para determinação do comprimento radicular (cm), altura (cm) das plantas (do colo até o meristema apical caulinar), número de folhas e área foliar (AF; cm^2). A área foliar foi medida com o integrador automático de área foliar (Li-3100, Li-COR, Lincoln-NE, USA). Após a coleta, os diferentes órgãos (raiz, caule e folha) das diferentes repetições (plantas) foram acondicionados, separadamente, em sacos de papel e submetidos à secagem em estufa de circulação forçada de ar à 60ºC, até a obtenção da massa constante.

Foi utilizado o programa estatístico Bioestat, para análise de normalidade. Os dados foram submetidos a análise de variância, sendo o teste estatístico Kruskal Wallis, para os dados não paramétricos e a análise de variância ANOVA, para os dados paramétricos ($p< 0,05$).

2.3 Análise de fertilidade das amostras

A determinação do pH, macronutrientes e micronutrientes foi realizada por análise de rotina do Laboratório Iso-Lab, no Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz (ESALQ, USP- Piracicaba).

Os métodos utilizados foram: pH em $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}; fósforo (P) pelo método colorimétrico, extraído com resina trocadora de íons; potássio (K) por extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica; cálcio (Ca) e magnésio (Mg) por extração com resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica. A acidez potencial (H+Al) foi determinada com tampão SMP. Para a obtenção dos micronutrientes, foram utilizados os seguintes métodos: Boro (B) por extração com água quente e determinação por colorimetria; cobre (Cu), zinco (Zn), manganês (Mn) e ferro (Fe) por extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica (Manual de análise química para

avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001).

3. Resultados e discussão

Nas análises de fertilidade foi observado um aumento tanto dos macro quanto dos micronutrientes para todos os solos condicionados com os tratamentos (Tabela 1). Esses dados corroboram os relatados por Betiol e Camargo (2007), nos quais o uso do LE em solos agrícolas aumentou a concentração de N, P, Zn, Cu, Fe, Mn e Mo do solo. Solos tratados com LE também mostram maior condutividade elétrica e melhor fertilidade (MORENO et al., 1997). Portanto, no presente estudo, a melhora na fertilidade do solo (Tabela 1) segue o mesmo padrão de resposta relatada pelos autores supra-descritos. Demonstrando que a utilização desse resíduo promove uma melhoria de nutrientes no solo, podendo favorecer o desenvolvimento de plantas.

A matéria orgânica (M.O.) desempenha um importante papel na sustentabilidade de solos agrícolas, uma vez que influencia atributos físicos, químicos e biológicos do solo, refletindo diretamente na capacidade produtiva de um solo. Na análise de fertilidade, observou-se um aumento da M.O. em todos os solos que receberam os tratamentos, isso ocorre devido à característica do próprio LE, cuja principal constituição é de M.O. Solo cultivado com feijoeiros mostraram aumento de 467,5% na matéria orgânica, após o tratamento com LE (TEIXEIRA et al., 2007). Isso ratifica que a incorporação do LE à solo causa aumento da M.O., favorecendo a fertilidade do solo em geral. Desta forma, há uma relação diretamente proporcional entre as doses aplicadas de LE e a concentração de matéria orgânica presente no solo (TRANNIN, 2004).

Neste estudo também foi observado um aumento da capacidade de troca catiônica (CTC) (Tabela 1), que representa a quantidade total de cátions retido à superfície dessas amostras (Ca^{2+}, Mg^{2+}; K^{+}, H^{+} e Al^{3+}). Dessa forma, devido ao maior valor da CTC para os solos que receberam as amostras biorremediadas, podemos inferir que, esses solos tratados com as amostras biorremediadas apresentam uma maior capacidade para reter cátions em forma trocável, e, devido ao maior crescimento das alfaces nesses tratamentos, a maior parte da CTC estava ocupada por cátions essenciais (Ca^{2+}, Mg^{2+}; K^{+}) havendo então, uma melhor nutrição das plantas ali cultivadas. Com relação a soma de bases trocáveis (SB), que representa a soma dos teores de cátions permutáveis, com

exceção do H^+ e Al^{3+}, e a saturação por bases (V%), que representa as condições gerais de fertilidade dos solos, também foram observados aumentos desses parâmetros nos solos que receberam as amostras biorremediadas.

Os valores de V% (saturação por bases) são excelentes indicativos das condições gerais de fertilidade dos solos, sendo esse parâmetro utilizados na classificação dos solos. São considerados solos férteis (solos eutróficos), aqueles que apresentam V%≥ 50% (EMBRAPA, 2010). Portanto, podemos dizer que, as amostras LEP (T1), LE+S+CA (T1), LE+S+CA (T1) e LEP (T2), se enquadram como amostras férteis, devido aos seus valores 72%, 63%, 63% e 64%, respectivamente. Já as amostras de LE+S (T2) e LE+S+CA (T2), apresentaram valores de 46% e 45% respectivamente, sendo menor que 50%. No entanto, esses valores não foram tão baixos, quando se compara com o valor observado no solo controle (sem tratamento), que foi de 20%. Esses valores também comprovam o melhor desenvolvimento das alfaces nos solos tratados com as amostras biorremediadas, quando comparado com as alfaces cultivadas no solo controle. Já para os valores da acidez potencial (H+Al), foi observada uma diminuição para todos os solos tratados com as amostras biorremediadas, quando comparado ao controle negativo.

Em um estudo realizado por Garcia et al. (2009), os autores avaliaram as características químicas de um solo degradado, após aplicação de LE doméstico e observaram que a aplicação crescente de doses de LE, promoveram um aumento do pH e maiores teores de MO, fósforo, potássio, sódio, cálcio, além do aumento da CTC, SB e diminuição do H+Al. Esses dados reforçam os dados obtidos nesse trabalho, já que também podemos observar resultados semelhantes em nossas análises.

Tabela 1: Determinação química da fertilidade das amostras

Determinações		Unidades	Amostras						
			Solo	T1			T2		
				LEP	LE+S	LE+S+CA	LEP	LE+S	LE+S+CA
pH		g.dm³	4,7	6,2	5,7	5,6	6,1	5,2	5,3
M.O.		mg.dm³	13	33	34	31	22	21	20
SB		mmolc.dm³	9,3	51,9	47,7	47,7	35,8	28,8	25,1
CTC		mmolc.dm³	47,3	71,9	75,7	75,7	55,8	62,8	56,1
V		%	20	72	63	63	64	46	45
H+Al		mmolc.dm³	38	20	28	28	20	34	31
Macronutrientes	**P**	mmolc.dm³	10	214	141	97	160	69	44
	K	mmolc.dm³	1,3	5,9	4,9	3,7	6,8	3,8	3,1
	Ca	mmolc.dm³	5	32	37	33	18	16	14
	Mg	mmolc.dm³	3	14	14	11	11	9	8
Micronutrientes	**B**	mg.dm³	0,29	0,82	0,78	0,59	0,63	0,58	0,56
	Cu	mg.dm³	2,4	4,2	4,6	3,4	3,4	3	3
	Fe	mg.dm³	10	26	33	27	16	24	29
	Mn	mg.dm³	15,8	61,6	98,4	102,4	20	24,4	22,4
	Zn	mg.dm³	0,4	12,2	11,4	9	5,8	4,8	4,4

M.O.: Matéria orgânica; **SB:** Soma de bases trocáveis; **CTC**: Capacidade de troca de cátions; **V:** Saturação da CTC por bases; **H+Al**: acidez potencial. **T1**: compostos que foram biorremediados por 3 meses e foram misturados com solo na proporção de 1:6. **T2**: compostos que foram biorremediados por 6 meses e foram misturados com solo na proporção de 1:6.

O comprimento da raiz foi semelhante entre os tratamentos com LE (LEP, LE+S, LE+S+CA) e o solo original, tanto após 3 meses de biorremediação (T1) como 6 meses (T2) (Figura 1). No entanto, o número de folhas aumentou em todos os tratamentos, em relação ao solo original, tanto T1, como para T2 (Figura 2). Mostrando que o incremento do LE para todos os tratamentos produziu alfaces com maior quantidade de folhas.

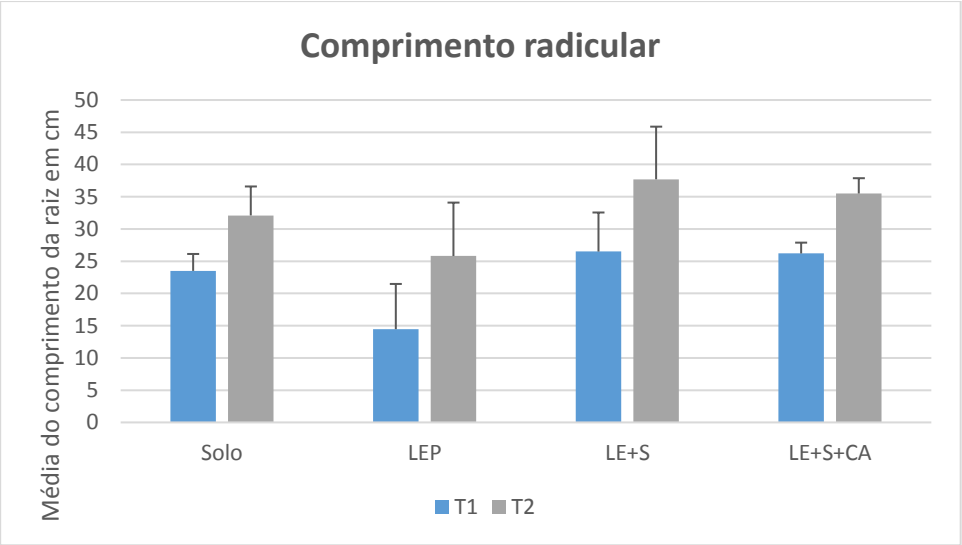

Figura 1: Média do comprimento das raízes dos indivíduos de *Lactuca sativa,* cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. * Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

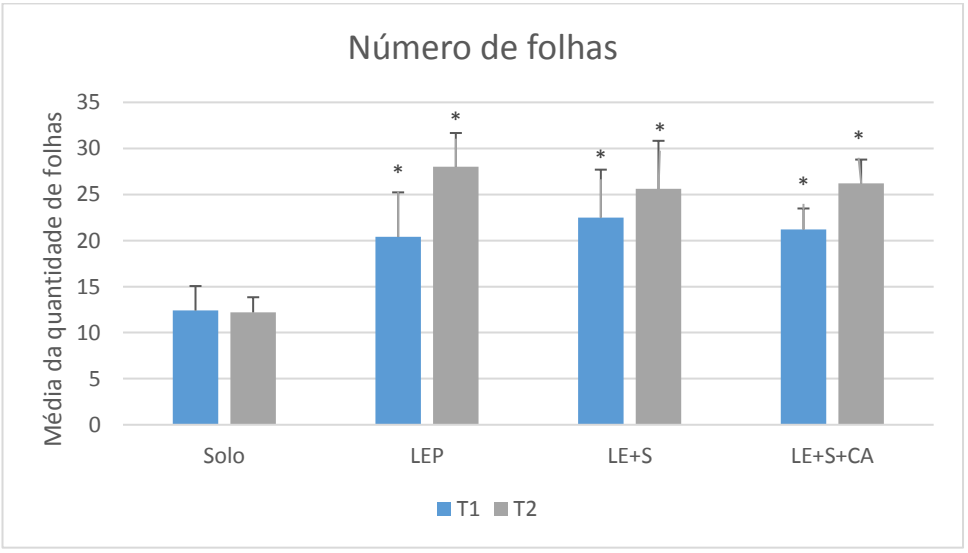

Figura 2: Média da quantidade foliar dos indivíduos de *Lactuca sativa*, cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. *Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

A área foliar foi maior nas plantas tratadas com LEP, após 6 meses de remediação e nas plantas tratadas com LE+S+CA, após 3 meses de remediação (Figura 3). O maior crescimento das alfaces tratadas com LE e suas respectivas misturas com solo e casca de arroz, pode estar diretamente relacionada com o aumento da disponibilidade de macro e micronutrientes, essenciais para o crescimento da planta. Pelas análises químicas, foi observado que os solos tratados com as amostras biorremediadas apresentaram um V% maior que o do solo controle, sendo esse valor diretamente relacionado com a fertilidade do mesmo, corroborando os dados de crescimento das alfaces. O aumento de doses de lodo de esgoto introduzidas no solo promoveu uma absorção significativa de N, P, Ca e Mg em plantas de sorgo (OLIVEIRA et al., 1995). Esses resultados podem ser relacionados com os obtidos no presente estudo, já que houve um melhor crescimento dos exemplares cultivados nas amostras com LE.

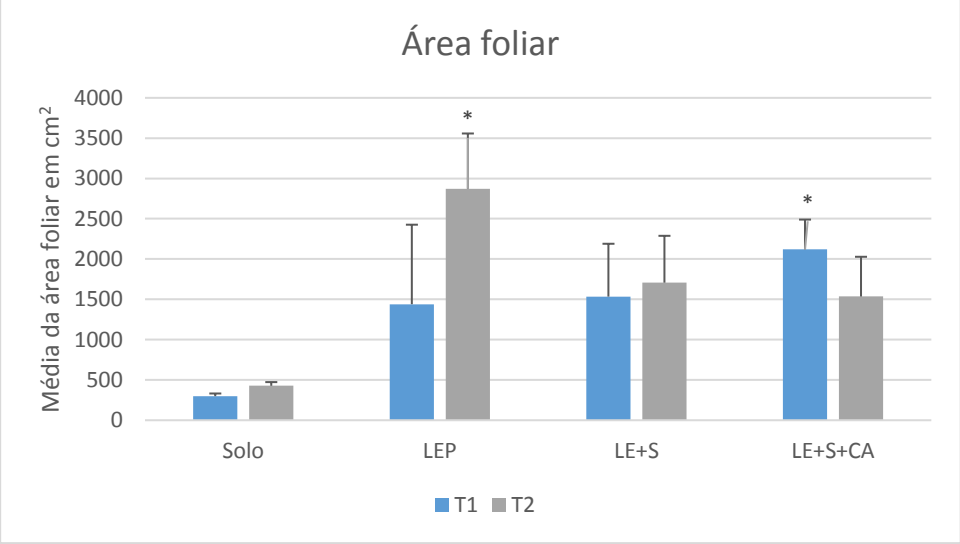

Figura 3: Média da área foliar dos indivíduos de *Lactuca sativa*, cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. * Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

Backes et al. (2009), observaram em seus estudos com planta de mamona, que o uso de doses de LE no cultivo das mesmas proporcionou um

aumento tanto da altura das plantas quanto de sua biomassa seca, além de ter efeitos positivos nas concentrações de micronutrientes e de nitrogênio, potássio, magnésio e enxofre.

A biomassa de raiz aumentou, em relação ao solo original, apenas quando as plantas foram tratadas com a amostra biorremediada LE+S+CA, para ambos os períodos (T1 e T2) (Figura 4). No entanto, as biomassas das folhas (Figura 5) e de caule (Figura 6) só aumentaram, em relação ao solo original, nas plantas tratadas com LEP, após 6 meses de biorremediação e naquelas tratadas com LE+S+CA, após 3 meses de biorremediação.

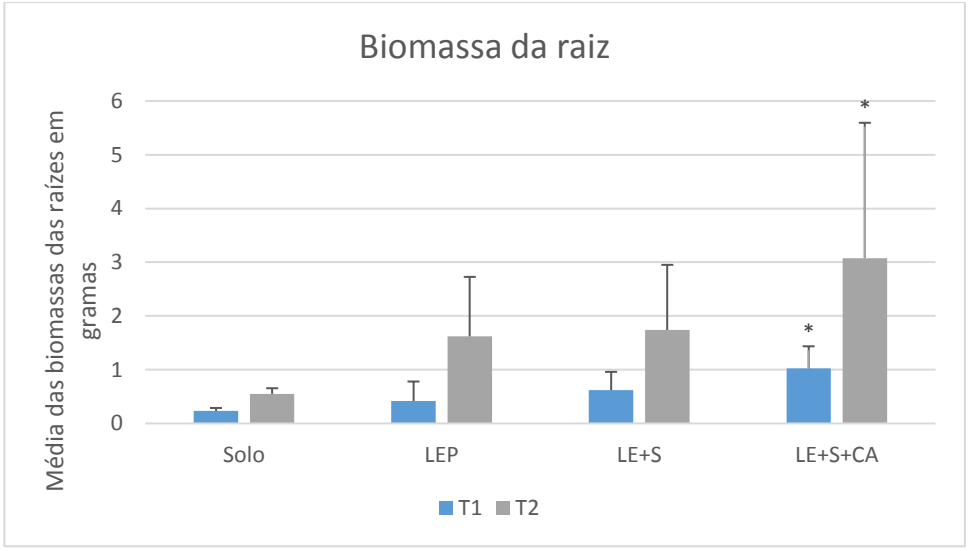

Figura 4: Média do peso seco da raiz dos indivíduos de *Lactuca sativa*, cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. * Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

Os estudos com incorporação do lodo em solos agrícolas, realizados por Cunninchan et al. (1975), mostraram que houve, para os solos com lodo, uma maior produção de grãos de milho, que estava relacionada com a maior disponibilidade de N, P e K. Bevacqua e Mellano (1993) observaram uma melhoria de rendimento de culturas, inclusive de alface, após a aplicação de LE. O aumento desse rendimento, foi descrito pelos autores como consequência do acréscimo de matéria orgânica, nutrientes, sais solúveis e metais no solo tratado

com o LE. Dessa forma, também podemos relacionar uma maior produção de biomassa foliar com o aumento de macronutrientes observados nas análises de fertilidade da Tabela 1, reafirmando que o LE pode servir como um efetivo fertilizante.

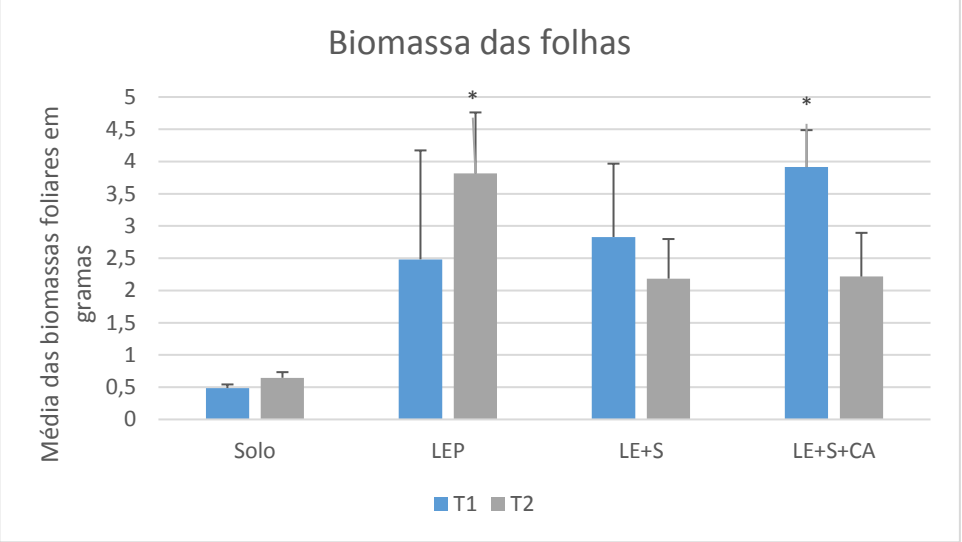

Figura 5: Média do peso seco das folhas dos indivíduos de *Lactuca sativa*, cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. * Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

Dessa forma, o uso do LE em solos agrícolas, além de ser uma forma de disposição de baixo custo, pode trazer benefícios aos sistemas agrícolas, incluindo ganhos de produtividade e melhoria nas propriedades físico-químicas dos solos (MARCIANO et al., 2001). Além disso, os bioensaios que avaliam os efeitos causados pelo LE, quando disposto no solo, são excelentes ferramentas para a avaliação da utilização sustentável desse resíduo (RICCI et al., 2010).

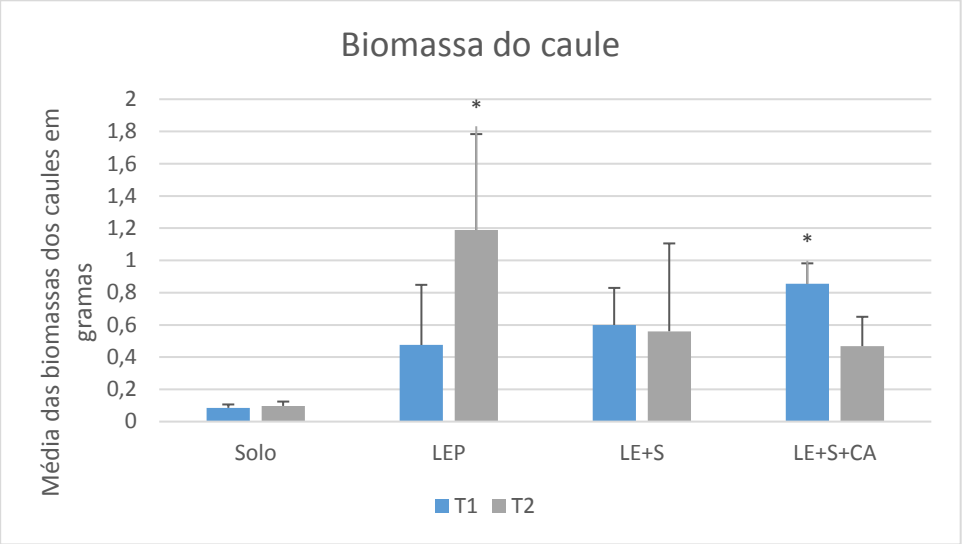

Figura 6: Média do peso seco dos caules dos indivíduos de *Lactuca sativa*, cultivados nas diferentes amostras analisadas, coletados após 45 dias de cultivo. T1: Amostras que foram biorremediadas por 3 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção 1:6, para cultivo das alfaces. T2: Amostras que foram biorremediadas por 6 meses (LEP: lodo de esgoto puro; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz) e posteriormente incorporadas ao solo na proporção de 1:6 para o cultivo das alfaces. * Estatisticamente significativo com relação ao solo controle.

4. Conclusão

Com esse estudo podemos concluir que o LE é um excelente condicionador de solo para o cultivo de alface, já que houve um aumento da produção de biomassa foliar e aumento de número de folhas das amostras cultivadas nos tratamentos que continham este resíduo. Além disso, as análises de fertilidade demonstraram uma melhora das propriedades químicas do solo avaliado. No entanto, são necessários outros monitoramentos toxicológicos, para se assegurar o uso deste resíduo como biofertilizante, pois o LE poder conter substâncias perigosas e contaminar as plantas, especialmente aquelas utilizadas para o consumo humano direto, como alface.

Referências

ANDREOLI, C.V.; SPERLING, M.V.; FERNANDES, F. **Princípios do tratamento biológico de águas residuais**. Curitiba: FCO, v. 6, 2004.

BACKES, C.; LIMA, C.P.; FERNANDES, D. M.; GODOY, L.J. G.; KIIHL, T. A. M.; VILLAS BOAS, R. L. Effect of sewage sludge and nitrogen in the nutrition and initial development of castorbean. **Bioscience Journal**. v. 25, n. 1, p. 90-98, 2009.

BARNETO, A. G., CARMONA, J. A., ALFONSO, J. E. M., BLANCO, J. D. Kinetic models based in biomass components for the combustion and pyrolysis of sewage sludge and its compost. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis.** v. 86, p.108-114, 2009.

BETIOL, W.; CAMARGO, O.A. Lodo de esgoto na agricultura: potencial de uso e problemas.**TEC Hoje**, Belo Horizonte, p. 1-4, 2007.

BEVACQUA, R.F.; MELLANO, V.J. **Sewage sludge compost's cumulative effects on crop grownth and soil properties**. Compost Science e Utilization, 1993.

BOVI, M.L.A.; GODOY JUNIOR, 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.

CUNNINCHAM, J. D.; KEENEY, D. R.; RYAN, J. A. Yeald and metal composition of crop and rye grown on sewage amended soil. **Journal Environment Quality**, Madilson, v. 4, p.448- 454, 1975.

DEFELIPO, B.V.; NOGUEIRA, A.V.; LOUDES, E.G.; ALVARES, Z.V.H. Eficiência agronômica do lodo de esgoto proveniente de uma siderurgia. **Revista Brasileira de Ciencias do Solo**, v. 15, p. 389-393, 1991.

EMBRAPA. Boletim de pesquisa e desenvolvimento: **conceitos de fertilidade sdo solo e manejo adequado para as regiões tropicais.** 1ed. Embrapa monitoramento por satélite, Campinas, SP, 2010.

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

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C.M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrientes and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, p.6256-6265, 2013.

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

HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, p. 599-608, 1998.

HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H.; LOKKE, H.; WOLF, W.; 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.

KHAN, S.; WANG, N.; REID, B.J.; FREDDO, A.; CAI, C. Reduced bioaccumulation of PAHs by *Lactuca sativa* L. grown in contaminated soil amended with sewage sludge and sewage sludge derived biochar. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 64-68, 2013.

LOBO, T. F.; FILHO, H. G. Níveis de lodo de esgoto na produtividade de girassol. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 7, p. 16-25, 2007.

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

MARCIANO et al. Efeito do lodo de esgoto e do compos-to de lixo urbano sobre a condutividade hidráulica de um Latossolo Amarelo saturado e não saturado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, n.1, p.1-9, 2001.

MCGEEHAN, S.L. Impact of waste materials and organic amendments on soil properties and vegetative performance. **Applied and Environmental Soil Science**, p.1-11, 2012.

MORENO, J.L; GARCÍA, C.; HERNÁNDEZ, T.; AYUSO, M. Application of composted sewage sludges contaminated wuth heavy metals to na agricultural soil. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 43, p. 565-573, 1997.

OLIVEIRA, F. C.; MARQUES, M. O.; BELLINGIERI, P. A.; PERECIN, D. Lodo de esgoto como fonte de macronutrientes para a cultura do sorgo granífero. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 52, p. 360-367, 1995.

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.

RICCI et al. Uso de lodo de esgoto estabilizado em um solo decapitado. I – Atributos físicos e revegetação. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, n.2, p.535-542, 2010.

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

SEMPLE, K. T.; MORRISS, A. W. J.; PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis**. European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 809-818, 2003.

SILVÉRIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, da matéria orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. **O Agronômico**, v.56, p.5-8, 2004.

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

TEIXEIRA FILHO, M. C. M. et al. Resposta de cultivares de trigo irrigado por aspersão ao nitrogênio em cobertura na região do cerrado. **Acta Scienthiarum Agronomy**, Maringá, PR, v. 29, n. 3, p. 421-425, 2007.

TRANNIN, I. C. de B. **Avaliação agronômica de um biossólido industrial e de seus efeitos sobre atributos do solo.** 2004. 171 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas), Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG, 2004.

TRIGUEIRO, R.M.; GUERRINI, L.A. Uso de biossólidos como substratos para produção de mudas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.64, p.150-162, 2003.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes**. Biodegradation**, 2011.

YU, J. The foreground analysis of sewage sludge agriculture application in China. Advanced Materials Research, v.335-336, p. 1316-1320, 2011.

Artigo 2. Caracterização microbiológica e avaliação dos efeitos ecotoxicogenéticos de lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de ensaios com *Allium cepa*

RESUMO

As atividades antrópicas geram muitos resíduos, os quais podem impactar os ecossistemas por se acumularem no ambiente. O lodo de esgoto (LE), um resíduo gerado no processo de tratamento das Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs), são compostos, principalmente, de matéria orgânica, o que gera uma potencialidade de sua utilização como fertilizante agrícola. Porém, o LE possui uma origem bastante diversa, podendo apresentar substâncias prejudiciais aos organismos vivos e ao ambiente. Existem estratégias que podem auxiliar na detoxificação do LE e, assim, dar um destino mais seguro e sustentável ao mesmo. A biorremediação utiliza de organismos capazes de modificar ou decompor poluentes, podendo ser estimulada por meio de agentes descompactantes, como casca de arroz (CA). Neste experimento foram utilizadas cubas contendo amostras de LE puro (LEP); LE+solo (3:1–v/v); LE+solo+CA (3:1:1-v/v/v), que foram biorremediadas por períodos de 3 (T1) e 6 meses (T2). Decorrido cada período, foi realizada uma avaliação dos potenciais fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de seus solubilizados, nas células meristemáticas e F1 do organismo teste *Allium cepa*. Também sendo avaliadas amostras antes da biorremediação (T0). A análise microbiológica foi feita tanto para o LEP como para as suas associações, após cada período experimental. A amostra de LEP, para T1 e T2, inibiu a germinação das sementes, sendo necessária, para a obtenção de radículas, sua diluição em água. Foram observados efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para as amostras diluídas do LEP no T1 e T2. Com relação a mutagenicidade em F1, nenhum dos tratamentos foi estatisticamente significativo. Foi observada pela análise microbiológica uma maior diversidade de bactérias do que de fungos, sendo possível identificar os microrganismos tolerantes ao LE. Com este estudo, foi possível concluir que os períodos empregados na biorremediação das amostras misturadas com solo e CA foram eficientes na detoxificação do LE. No entanto, para as amostras de LEP, que apresentaram efeitos tóxicos, fica um alerta para a necessidade de monitoramento a longo prazo deste resíduo, quando aplicado em solos. A bioestimulação mostrou ser um processo importante para a estabilização do LE, que deve ser considerada quando se busca uma aplicação segura do LE na agricultura.

PALAVRAS-CHAVE: Bioensaio, casca de arroz, fertilizante agrícola, análise microbiológica.

1 Introdução

As atividades antrópicas geram muitos resíduos, que podem ser detrimentais para os ecossistemas. Muitos desses resíduos podem ser depositados de maneira inadequada e, por isso, podem se acumular no ambiente, se transformando em um sério problema para o próprio ambiente e à saúde ambiental.

Em locais com alta densidade demográfica, as águas residuais são descartadas nos recursos hídricos, se caracterizando em uma das principais fontes poluidoras dos rios (MARIA et al., 2007). As Estações de Tratamento de Esgoto (ETE), são responsáveis pela remoção dos poluentes das águas residuais, que utiliza de uma sequência de tratamentos, cuja finalidade é, principalmente, separar as frações sólidas das líquidas. Ao final do processo de tratamento das ETEs, é gerado um resíduo denominado de lodo de esgoto (LE) (ROIG et al., 2012). No Brasil, segundo o Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SNIS, 2016), o volume total de esgoto tratado em 2014 foi de 3.763.851 mil m^3 e a produção de LE em torno de 150 a 220 mil toneladas de matéria seca/ano (PEDROZA et al., 2010), cujo destino final, em sua maioria, são os aterros sanitários.

Em países da Europa, como a Alemanha, Reino Unido, Espanha, França e Itália, a produção de LE chega a 2,17; 1,771; 1,121; 1,059 e 1,053 milhões de toneladas de sólido seco por ano, respectivamente (KELESSIDIS; STASINAKIS, 2012). Por isso, há uma preocupação com relação ao gerenciamento e disposição final deste resíduo urbano (LE), devido aos problemas que ele pode causar no ambiente (GIANICO et al., 2013). Diversas alternativas vêm sendo sugeridas para a destinação final do LE, dentre elas o seu uso como fertilizante e/ou recondicionante de solos agricultáveis, visto que a sua composição é, predominantemente, de matéria orgânica e nutrientes, como nitrogênio, potássio, cálcio, fósforo, zinco e manganês (ANDREOLI et al., 2004; SILVÉRIO, 2004; BOVI et al., 2007; SINGH; AGRAWAL, 2008; MCGEEHAN, 2012; GIANICO et al., 2013).

A composição do LE está altamente relacionada com a origem do esgoto tratado, ao tipo de tratamento utilizado pela ETE e a época do ano em que ele é produzido, o que confere a ele uma característica própria e muito diversificada (BETTIOL; CAMARGO, 2006; FYTILLI; ZABANIOTOU, 2008; SINGH; AGRAWAL, 2008). Desta forma, o LE pode conter substâncias nocivas aos organismos vivos e ao meio ambiente, como metais potencialmente tóxicos (zinco, cobre, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio); compostos orgânicos (fenóis, benzenos, antracenos,

alquilbenzenos lineares sulfonados); e microrganismos patogênicos (LOURENÇO, 1997; ALMEIDA et al., 1998; HOLMSTRUP et al., 2001; LOPES et al., 2005; PARAIBA; SAITO, 2005).

Apesar da possibilidade de se usar o LE na agricultura, o fato dele conter uma mistura complexa de compostos tóxicos pode torná-lo inviável para este fim, pelos riscos que existe deste resíduo disponibilizar seus compostos tóxicos aos organismos presentes no local da aplicação (ENGWALL; HJELM, 2000). Sua aplicação em solos agricultáveis pode, ainda, possibilitar a movimentação dos seus contaminantes no ambiente e, consequentemente, contaminar as camadas superficiais do solo (BERTONCINI; MATTIAZZO,1999). Assim, o seu uso pode ser preocupante se for feito de maneira inadequada. Além disso, a lixiviação dos solos, promovida pela ação de águas pluviais, pode carrear os contaminantes para águas subterrâneas e sistemas fluviais próximos (RODRIGUES-FILHO; MADDOCK, 1997 apud YALLOUZ et al., 2008).

A biorremediação, metodologia que consiste na utilização de organismos capazes de modificar ou decompor poluentes, é uma estratégia econômica e ambientalmente vantajosa (TYAGI et al., 2011) para diminuir a toxicidade de resíduos orgânicos. Processos como atenuação natural, bioestimulação, bioaumentação, compostagem, entre outras, são estratégias frequentemente utilizadas na biorremediação de locais ou de resíduos contaminados (SKIPPER, 1999). Esses processos são eficientes para estimular o aumento do metabolismo microbiano endêmico do material a ser degradado e, assim, promover a detoxificação química do mesmo.

A porosidade e a aeração dos solos são parâmetros importantes a serem considerados em processos de biorremediação, uma vez que a melhora na degradação dos poluentes orgânicos está relacionada com a porosidade do solo e, consequentemente, com a quantidade de oxigênio disponível no meio, pois em condições aeróbias há um favorecimento do processo (HARMSEN, 1991; PEREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004). Tais características podem ser obtidas e/ou melhoradas pela adição de agentes de volume (agentes descompactantes) ao substrato (VASUDEVAN; RAJARAM, 2001; SOUZA et al., 2009). A casca de arroz é um resíduo agroindustrial, subproduto do beneficiamento desse cereal, que tem uma produção expressiva no Brasil de, aproximadamente, três milhões de toneladas por ano (MAYER et al., 2006). Essa casca é constituída por quatro camadas fibrosas que são

altamente silicosas (HOUSTON, 1972). Para Fernandes et al. (2015), a casca de arroz é composta por celulose (43,5%), hemicelulose (22%), lignina (17,2%), cinzas (11,4 %) e outros (5,9%). Segundo Ferreira (2005), as cinzas da casca de arroz contêm 80-90% de SiO_2, 5% de K_2O, 4% de P_2O_5 e 1-2% de CaO e pequenas quantidades de Mg, Fe e Na. Por estas qualidades, a casca de arroz pode constituir um bom agente de agentes descompactantes e, assim, contribuir para a aerobiose do sistema de biorremediação. Além dos compostos presentes na casca de arroz, Hamdi et al. (2007) afirma que ela contém, ainda, estirpes microbianas capazes de metabolizar poluentes, o que auxilia muito o processo de biorremediação de compostos orgânicos.

Os bioensaios são essenciais para uma ampla análise de riscos ambientais, assim, são muito úteis na avaliação da biodisponibilidade das substâncias presentes em amostras ambientais, já que as análises químicas medem somente a concentração dos químicos presentes no ambiente (MOREIRA et al., 2008), e não os seus efeitos sobre os organismos expostos. Segundo Rodrigues (1999), os ensaios biológicos fornecem resultados confiáveis e auxiliam nas tomadas de decisões quanto ao tratamento e disposição adequada de resíduos, além de possibilitarem a identificação de efeitos aditivos, sinergísticos e antagônicos dos compostos químicos presentes em amostras ambientais complexas (PANDARD et al., 2006).

Como a grande maioria das plantas utiliza o solo como meio de crescimento, esses organismos são excelentes bioindicadores para avaliação de genotoxicidade de solos (WHITE; CLAXTON, 2004). A espécie *Allium cepa* é considerada um eficiente organismo teste para estudos da ação dos contaminantes ambientais (FISKEJÖ, 1985; BUSHRA ATEEQ et al., 2002; FERNANDES et al., 2007; 2009; MAZZEO et al., 2011), além da avaliação da efetividade do processo de biorremediação (MAILA; CLOETE, 2005; MAZZEO et al., 2010; 2015). Esta espécie tem características ideais para seu uso como organismo teste, como a sua cinética de proliferação, o crescimento rápido de suas raízes, o grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos grandes em número reduzido (2n=16) (QUINZANI-JORDÃO, 1978; RANK; NIELSEN, 1998; PATRA; SHARMA, 2002; MATSUMOTO et al., 2006), além de serem facilmente corados e observados em microscopia de luz (KURÁS et al., 2006). De acordo com Caritá (2007) e Souza et al. (2009), a espécie *A. cepa* caracteriza-se em um eficiente sistema-teste para a detecção de danos genotóxicos e mutagênicos induzidos por solos e solubilizados de

solos contaminados.

A possibilidade da aplicação agrícola do LE pode ser uma importante estratégia para a melhoria das questões ambientais, pois poderá contribuir para o reaproveitamento desse resíduo e também para minimizar os impactos ecológicos que ele possa promover nos locais onde são disponibilizados. A avaliação do potencial tóxico do LE em sistema biológico, bem como o aprimoramento de técnicas para descontaminação deste resíduo, trazem informações relevantes sobre o potencial de reuso do LE. Assim, este trabalho teve como objetivos caracterizar a comunidade microbiana do LE e avaliar os efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos desse resíduo no organismo teste *A. cepa,* bem como estimar a possibilidade de detoxificação do mesmo, pela bioderremediação/bioestimulação com solo e casca de arroz.

2 Material e Métodos

2.1 Material e preparo das amostras

O LE ativado centrifugado foi coletado, em 2014, na ETE Praia Azul da cidade de Americana, São Paulo, Brasil (22° 44' 21" S e 47° 19' 53" W). Esta ETE recebe somente efluente de esgoto doméstico proveniente da região do bairro Praia Azul, localizado à margem esquerda do Córrego Olho d´Agua, no limite do Parque residencial Tancredi, gerando, mensalmente, cerca de 115 m^3 de LE.

Para o preparo das amostras, foi utilizado um solo de textura argilosa, coletado no Jardim Experimental da Universidade Estadual Paulista – UNESP (Campus de Rio Claro, São Paulo, Brasil), considerado de boa qualidade agrícola. Como agente descompactante foi utilizado a casca de arroz, obtida de uma indústria de beneficiamento de arroz da região. As amostras utilizadas nesse estudo foram preparadas nas seguintes associações: amostra de LE pura, sem nenhuma mistura (LEP); LE+solo (LE+S: 3:1 – v/v); LE+solo+casca de arroz (LE+S+CA: 3:1:1 – v/v).

2.2 Organização dos ensaios de bioestimulação

As misturas foram dispostas em cubas de aço inox (14 L). Durante todo o período de biorremediação, as cubas foram mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local coberto e sob temperatura ambiente. Os períodos escolhidos para avaliação da biorremediação foram: tempo zero (T0), antes do início do processo de biorremediação, usada como referência da toxicidade do LE, tempo 1

(T1) e tempo 2 (T2) referente aos períodos de 3 e 6 meses de biorremediação/bioestimulação respectivamente.

2.3 Obtenção dos extratos aquosos (solubilizados)

A obtenção dos solubilizados (fase líquida) foi baseada na norma ABNT NBR 10.006 (2004), adicionando 62,5 g de cada amostra (referente ao seu peso seco) em 250 mL de água destilada, seguido por agitação constante por 5 minutos. Contudo, foi necessário adicionar mais água no sistema, para se conseguir fase líquida suficiente para análise, uma vez que houve uma grande retenção da água adicionada pelo lodo. Para isso, foram adicionados 350mL, 150 mL e 100 mL de água destilada nas amostras de LEP, LE+S e LE+S+CA, respectivamente. Após 7 dias de decantação, na temperatura de 22° C, a fase líquida de cada amostra foi coletada e filtrada em membrana com 0,45 µm de porosidade.

O peso seco de cada amostra foi obtido pela pesagem de, aproximadamente, 10 g da amostra, em recipientes individuais tarados. Esse ensaio foi realizado em triplicata. A secagem ocorreu em estufa a 105° C por 24 horas. Posteriormente, uma nova pesagem foi realizada e a média de cada triplicata foi considerada como equivalente ao peso seco da amostra.

2.4 Bioensaio com sementes de *Allium cepa*

A germinação das sementes de *A. cepa* (2n=16 cromossomos), variedade “Baia Periforme”, foi realizada em placas de Petri contendo 100 sementes em extrato aquoso, obtido por solubilização das amostras de LEP; LE+S; LE+S+CA, para o T0 e para os dois períodos de biorremediação (T1, T2).

Os tratamentos controles foram realizados com água destilada (controle negativo - CN), com o extrato aquoso do solo de referência (controle ambiental) e com solução de metilmetano sulfonato a 10 mg/L (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3 – para controle positivo).

Após germinação, radículas com cerca de 2,0 cm de comprimento foram coletadas e fixadas em Carnoy (álcool e ácido acético: 3:1 – v/v), por 6 a 8 horas em temperatura ambiente. Decorrido esse período, foi realizada a troca do fixador para o armazenamento das raízes a 4°C. Para a confecção das lâminas, tanto da região meristemática quanto da região F1 das raízes, foi seguido o protocolo descrito por Leme e Marin-Morales (2009).

As sementes que germinaram foram contabilizadas e foi calculado a porcentagem de germinação (taxa de germinação) das sementes em cada tratamento, essa taxa foi considerada como parâmetro de fitotoxicidade. Com relação as análises das células meristemáticas, o índice mitótico (razão entre número de células em divisão e número total de células observadas), caracterizou o *endpoint* de citotoxicidade. Para o *endpoint* de genotoxicidade, foram consideradas todas as aberrações cromossômicas (perda, ponte, atraso, aderência cromossômica, metáfase poliplóide e C-metáfases) e anormalidades nucleares (broto, núcleo lobulado e núcleo poliplóide) encontradas. Para o *endpoint* de mutagenicidade foram consideradas as quebras cromossômicas e a presença de micronúcleo (MN). Para as análises da região F1, foi considerada a presença de MN como indutor de mutagenicidade. A análise de todos os parâmetros foi realizada pela contagem de aproximadamente 7500 células por tratamento, sendo 15 lâminas por amostra (cerca de 500 células/lâmina). As análises estatísticas foram feitas pelo teste de Kruskal-Wallis a 0,05 de nível de significância, utilizando o software BioEstat 5.0.

2.5 Identificação e quantificação dos microrganismos

Para a identificação dos microrganismos, após cada período estudado, foram adicionados, individualmente, 1 g de cada uma das amostras (LEP; LE+S e LE+S+CA) em 100 mL de solução salina estéril. Para a avaliação da diversidade de microrganismos nas amostras, 10 µL dessa solução foi semeada, por esgotamento, em placas de Petri contendo Ágar Sangue, Ágar MacConkey, Ágar Sabouraud ou Cromoágar UriSELECT 4 (Bio-Rad Laboratories, Marnes-La-Coquete, França). As placas foram incubadas a 35°C, exceto as de Ágar Sabouraud, que foram mantidas a temperatura ambiente, por 7 dias. Após esse período, as placas foram analisadas quanto ao tipo e quantidade de colônias encontradas. Os microrganismos de cada placa foram isolados e, inicialmente, identificados por meio de testes bioquímicos convencionais. Posteriormente, esses microrganismos foram reidentificados por meio do equipamento de automação Vitek®2 Compact (BioMérieux®, Inc, St Louis, MO, USA). A quantificação dos microrganismos presentes em cada amostra foi realizada pela contagem de UFC (Unidades Formadoras de Colônia).

3 Resultados e Discussão

3.1 Organismo teste *Allium cepa*

As plantas superiores são excelentes organismos para a avalição de poluentes ambientais, pois apresentam características que as tornam ótimos modelos para estudos de monitoramento ambiental (LEME; MARIN-MORALES, 2009). O organismo teste empregado neste estudo (*A. cepa*) tem como vantagem a possibilidade da sua exposição direta a misturas complexas, sem necessidade de tratamento prévio das amostras (RANK; NIELSEN, 1993), além de ser um teste simples e de baixo custo (RANK; NIELSEN, 1998), que fornece informações importantes sobre a característica do resíduo, auxiliando na compreensão das suas características tóxicas, o que pode nortear a sua disposição final mais segura. Como o LE é uma mistura complexa, vem sendo recomendado o uso de bioensaios para a avaliação de sua toxicidade, já que as análises químicas não podem prever os efeitos sinergísticos, nem a biodisponibilidade das substâncias químicas presentes nas amostras, além de apresentarem um alto custo (SEMPLE et al., 2003; MARTINS et al., 2016). Czerniawska-Kusza et al. (2006) afirmam que os testes de fitotoxicidade são úteis para a avaliação da toxicidade da matriz de solos e sedimentos, assim como de resíduos antropogênicos, como é o caso do lodo de esgoto.

Na avaliação da fitotoxicidade, pelos ensaios de germinação com as sementes de *A. cepa*, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos realizados com as amostras do T0. No entanto, para os tempos T1 e T2, as amostras de LEP inibiram completamente a germinação das sementes, sendo, por isso, consideradas tóxicas para *A. cepa* (Tabela 1). Devido a toxicidade observada, foram então realizadas diluições dos extratos aquosos das amostras de T1 e T2, na proporção de 1:1 (v/v, amostra aquosa de LEP/H_2O destilada) (Tabela 1). Os ensaios realizados com as amostras LEP diluídas apresentaram uma taxa de germinação de 78,7% e 76% para T1 e T2, respectivamente, denotando que para essas novas concentrações não houve efeito fitotóxico. Segundo Oleszczuk (2008), o aumento da toxicidade de solos que recebem LE pode ser devido à formação de metabólitos tóxicos, a partir da degradação de compostos orgânicos inicialmente presentes ou, então, devido a presença de metais.

Quando o LE foi misturado com o solo e a casca de arroz (LE+S e LE+S+CA) não foram observadas diferenças estatísticas na germinação das sementes de *A. cepa*, portanto, essa mistura não apresentou compostos fitotóxicos biodisponíveis ao

organismo. Mena et al. (2003) utilizaram a germinação de sementes para avaliar a compostagem de LE misturado com maravalha. Esses autores observaram uma inibição da germinação das sementes submetidas a amostra inicial de LE e uma diminuição da toxicidade ao longo dos períodos de compostagem testados. Os autores relacionaram essa diminuição da toxicidade com a possível estabilização da matéria orgânica. Esses resultados corroboram o fato de que a biorremediação, associada a adição de agentes descompactantes ao LE, como por exemplo a casca de arroz, pode se caracterizar em um eficiente método para a detoxificação desse resíduo.

Tabela 1: Taxa de germinação das sementes de *A. cepa* expostas a solubilizados de amostras de lodo de esgoto, com e sem associação com solo e casca de arroz, antes (T0) e após os períodos de 3 (T1) e 6 (T2) meses de biorremediação.

Amostras	**Germinação**		
	T0	T1	T2
CN	83,3 ± 5,86	85,7 ± 3,79	81,0 ± 3,61
CP	66,7 ± 4,16	77,7 ± 2,52	77,7 ± 2,08
Solo	67,0 ± 1	75,7 ± 2,52	80,3 ± 3,21
LEP	65,7 ± 6,03	0 *	0 *
LEP diluído	-	78,7 ± 2,08	76,0 ± 5,29
LE+S	67,3 ± 3,51	63,3 ± 4,73	70,3 ± 3,39
LE+S+CA	66,3 ± 1,53	67,3 ± 6,51	74,0 ± 2,65

*****p< 0,05 estatisticamente significativo em relação ao CN; - ensaio não realizado pois houve germinação para as amostras de LEP; CN: controle negativo; CP: controle positivo; LEP: lodo de esgoto puro; LEP diluído: amostra de lodo de esgoto puro que foi diluída na proporção 1:1 com água destilada; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz.

Os resultados de citotoxicidade, obtidos para a amostra de LEP diluído, reforçam os dados observados para germinação com esta mesma amostra, pois houve um decréscimo do índice mitótico (IM) para os tratamentos T1 e T2, embora os valores de T0 não tenham sido significativos, em relação ao CN (Tabela 2). De acordo com esses resultados, podemos inferir que a ausência de citotoxicidade para a amostra T0 do LEP pode estar relacionada com a falta de biodisponibilidade das substâncias presentes no lodo, que, só após biorremediação, se tornam tóxicas para o organismo exposto. Assim, o processo de biorremediação do LEP degrada compostos presentes neste material (LE), cujos metabólitos (compostos

intermediários) apresentam toxicidade para a germinação e para o desenvolvimento adequado das raízes, por redução da divisão celular. Isto porque, com a diluição do LEP, a concentração das substâncias tóxicas diminuiu e, assim, não impediram completamente o desenvolvimento radicular, como observado para o material não diluído, mas reduziram o IM, conforme observado em T1 e T2. A degradação de compostos orgânicos pode produzir outros compostos com toxicidade maior ou menor que os presentes nas amostras iniciais (HARRISON et al., 2006). Segundo o Departamento de Água e Esgoto de Americana-SP (Brasil), o LE estudado foi classificado, como de Classe IIA - Resíduo não inerte pela NORMA ABNT NBR 10004 (2004). Os resíduos dessa classe podem ter características de biodegradabilidade, combustibilidade ou solubilidade em água. Assim, podemos inferir, que o LE estudado neste trabalho sofreu biodegradação de seus compostos orgânicos, produzindo outros compostos hidrossolúveis com toxicidade maior que os compostos originalmente presentes no lodo bruto. Adicionalmente, o histórico de contaminação do LE estudado apresentou uma concentração de fenóis totais superior ao indicado pela norma brasileira (NORMA ABNT NBR 10004:2004), segundo o Departamento de Água e Esgoto de Americana. Dessa maneira, podemos inferir que a disposição do LE em solos, sem o devido tratamento prévio, pode levar a prejuízos ambientais consideráveis, já que esse LE pode induzir efeitos citotóxicos, mesmo após 6 meses de biorremediação.

As análises genotóxicas e mutagênicas estimam os danos causados por xenobióticos sobre o material genético das células a eles expostos, sem a necessidade de caracterização química convencional (CLAXTON et al., 1998). Para os parâmetros de genotoxicidade (aberrações cromossômicas e alterações nucleares) e mutagenicidade (micronúcleo e quebras cromossômicas) também foram observados resultados significativos para os solubilizados de LEP diluído nos períodos T1 e T2 (Tabela 2), demonstrando que o LE sem a incorporação de solo e/ou casca de arroz não é recomendado para ser utilização na agricultura. Esses efeitos tóxicos, observados para os tratamentos T1 e T2 com o LEP diluído podem ter ocorrido devido à biodisponibilização de substâncias que antes estavam adsorvidas na matéria orgânica. Essa toxicidade deve ser, conforme citado anteriormente, decorrente do processo de degradação dos compostos inicialmente inertes, que são transformados em metabólitos tóxicos, já que os efeitos genotóxicos e mutagênicos foram observados apenas após 3 e 6 meses do início do experimento. Segundo Boopathy

(2000), a biodisponibilidade está relacionada com vários processos físico-químicos, como por exemplo adsorção, dessorção, difusão e dissolução. A fração biodísponível de um composto é aquela que pode ser absorvida pelos organismos, enquanto que a fração não-disponível não é passível de ser absorvida (GEVAO et al., 2000). Pelo efeito observado nos testes com *A. cepa*, realizados com o LEP, nos tempos T1 e T2, podemos corroborar o aumento de compostos tóxicos nestes tratamentos, devido à biodisponibilização e/ou degradação dos compostos presentes em T0 do LEP. Martins et al. (2016) também encontraram um efeito genotóxico significativo para o organismo *A. cepa,* após exposição ao extrato aquoso de LE proveniente de uma ETE com tratamento anaeróbio.

Ainda com relação ao parâmetro de genotoxicidade, registrado pela presença de aberrações cromossômicas e anormalidades nucleares, a presença de núcleos lobulados foi a alteração mais expressiva observada na amostra de LEP diluído, tanto para T1 quanto para T2 (Figura 1 – F_1, G_1, H_1, I_1, J_1). Outra anormalidade encontrada em nossas análises, foi a presença de brotos nucleares, porém esta alteração somente foi significativa para o tratamento T2 do LEP diluído (Figura 3-E, Tabela 4). As aberrações cromossômicas e nucleares são parâmetros importantes para se estimar os efeitos que uma substância possa ter sobre o material genético do organismo exposto e para se inferir sobre o modo de ação da substância sobre o sistema orgânico (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Segundo Fernandes et al. (2009), os núcleos lobulados são decorrentes de alterações aneugênicas, como poliploidizações seguidas de indução de anáfases multipolares com pontes cromossômicas. Isto acontece porque as poliploidizações celulares são decorrentes de processos aneugênicos, como inativação ou não polimerização do fuso mitótico, que levam a um aumento de ploidia tanto dos cromossomos como dos centrossomos da célula. Esse aumento de centrossomo, leva a anáfases alteradas, podendo incorrer em células multinucleadas ou, no caso dessas anáfases ainda portarem pontes cromossômicas, núcleos lobulados (Figura 1). Amin (2011) observou alterações em células meristemáticas de *Vicia faba* e meiócitos de *Zea mays*, induzidas pela exposição ao LE, decorrentes da inativação ou mau funcionamento do fuso celular.

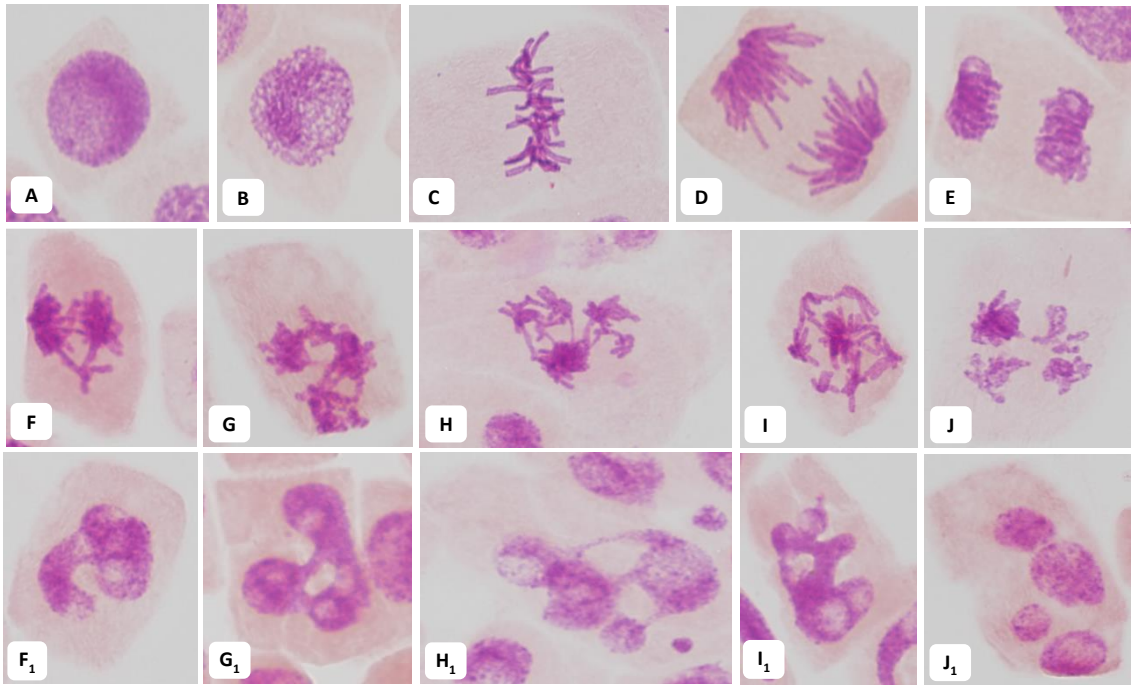

Figura 1: Fases normais da mitose e as alterações mais prevalentes vistas nas amostras submetidas aos tratamentos com LEP diluído (T1 e T2). **A-E**: Células normais em divisão- **A**: intérfase; **B**: prófase; **C**: metáfase; **D**: anáfase; **E**: telófase. **F-J_1**: Células com alterações- **F**: anáfase com ponte cromossômica; **F_1**: célula com núcleo bilobulado; **G**: anáfase tripolar com pontes cromossômicas; **G_1**: célula com núcleo trilobulado; **H e I**: anáfases multipolares com pontes cromossômicas; **H_1 e I_1**: células com núcleo multilobulado; **J**: anáfase multipolar; **J_1:** célula multinucleada.

No presente estudo, as análises realizadas com as amostras compostas de LE/solo e/ou casca de arroz, indicaram que não houve efeitos genotóxicos e mutagênicos (Tabela 2). Srivastava et al. (2005) observaram que raízes de *A. cepa* expostas a um LE bruto apresentaram alterações significativas nas frequências de aberrações cromossômicas, o que não foi observado quando o LE foi biorremediado por vermicompostagem. Os autores concluiram que este tipo de biorremediação é uma ferramenta eficaz para a detoxificação do LE.

Os resíduos vegetais favorecem a biorremediação por atuarem como agentes descompactentes, que melhoram a oxigenação do sistema e fornecem biomassa bacteriana, o que torna o processo de degradação de contaminantes mais efetivo (MOLINA-BARAHONA et al., 2004). Souza et al. (2009), pelo teste de *A. cepa,* demonstraram que o uso de casca de arroz otimizou a eficácia do processo de biodegradação, reduzindo a clastogenicidade induzida por resíduos de landfarming. Além disso, a associação com solo também foi importante para a diminuição da toxicidade do LE. Segundo Mazzeo et al. (2015), o LE misturado com diferentes

proporções de solo diminuiu a toxicidade para *A. cepa,* quando comparado ao lodo sem a mistura. Harrison et al. (2006) relataram que, quando o LE é misturado ao solo, há uma diluição dos compostos químicos presentes no lodo, resultando em uma mistura menos tóxica, devido às menores concentrações das substâncias presentes.

Com relação à presença de micronúcleos, foram observadas frequências significativas de MN nas células meristemáticas de *A. cepa* expostas aos tratamentos com LEP diluído, em T1 e T2 (Figura 3). Já nas células F1, não foram observados resultados estatisticamente significativos, para todos os tratamentos realizados, com exceção do controle positivo (Tabela 5). Contudo, destacamos que não foi possível a realização das análises de micronúcleo em células da região F1 de *A. cepa* expostas ao LEP diluído, por não serem encontradas células vivas nesta região.

A análise realizada na região F1 das radículas de *A. cepa* mostrou uma indução total de morte celular para os tratamentos T1 e T2 com o LEP diluído, cujas células apresentaram aspectos típicos de necrose (citoplasma hipertrofiado, núcleo altamente condensado e morfologia celular alterada – células arredondadas) (Figura 2). Já para as raízes submetidas ao tratamento LEP do T0, não foram observadas na região F1 células em processo de morte. Com relação as células meristemáticas de *A. cepa*, submetidas aos tratamentos realizados com o LEP diluído (T1 e T2), pudemos observar que houve uma indução de mortalidade celular, porém os valores registrados não foram estatisticamente significativos, quando comparados ao controle negativo (Tabela 3). E para o tratamento T0 de LEP, não foi registrada morte dessas células.

Assim, podemos afirmar que, apesar de não terem sido registrados valores significativos para morte de células meristemáticas (T1 e T2, LEP diluído), a presença de células em processo de morte, neste material, já se caracteriza em um alerta para a possibilidade de dano celulares causados pelo LE, fato este confirmado pela alta indução de morte registrada para células F1, expostas a estes mesmos tratamentos. Além da alta quantidade de núcleos lobulados encontrado para o tratamento de LEP (T1 e T2), que provavelmente resultou em morte celular, observada na região F1, devido a não reversão dessa anormalidade nuclear.

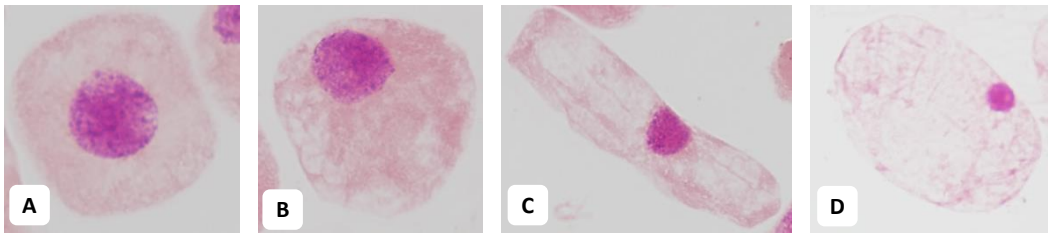

Figura 2: Morte celular em células meristemáticas e F1 de *A. cepa,* após tratamento com LEP diluído. **A**: Célula meristemática em interfase normal; **B** Célula meristemática em processo de morte celular; **C:** Célula F1 com morfologia característica; **D**: Célula F1 em processo de morte celular.

A evidência de células micronucleadas na região meristemática de radículas expostas ao LEP diluído e a alta indução de processo de morte celular na região F1 dessas mesmas radículas, comprovam a alta toxicidade do lodo para o organismo teste utilizado.

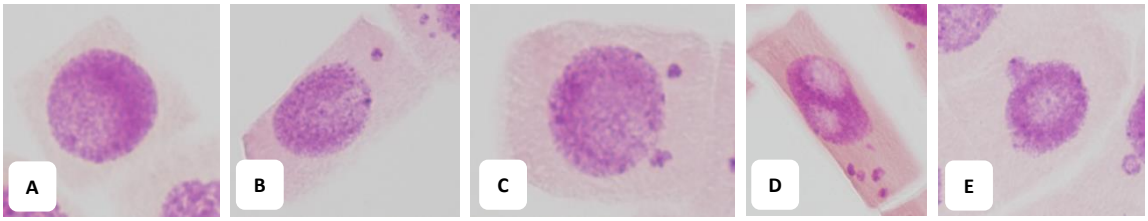

Figura 3: Presença de micronúcleos e broto nuclear em células meristemáticas de *A. cepa,* expostas aos extratos aquosos de LEP diluído (T1 e T2). **Células interfásicas – A**: normal; **B**: com um MN; **C**: com dois MN; **D**: multimicronucleada; **E**: com broto celular.

Tabela 2: Índice Mitótico, genotoxicidade e mutagenicidade em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas à germinação nos solubilizados de LE e suas misturas com solo e casca de arroz, antes do início da biorremediação (T0) e após três (T1) e seis (T2) meses desse processo

Amostras	**Índice mitótico**			**Genotoxicidade**			**Mutagenicidade**		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
CN	23,33 ± 5,19	26,70 ± 4,66	24,72 ± 2,11	0,06 ± 0,25	0,06 ± 0,24	0 ± 0	0,13 ± 0,34	0,25 ± 0,56	0,38 ± 0,75
CP	19,24 ± 10,83	22,45 ± 6,01	25,82 ± 4,07	7,53 ± 4,57*****	7,77 ± 4,32 *	6,05 ± 2,03*	45,05 ± 8,13 *****	33,99 ± 13,03 *	29,49 ±10,93 *
Solo	23,73 ± 2,85	22,09 ± 3,93	22,54 ± 3,23	0,25 ± 0,42	0,13 ± 0,34	0,39 ± 0,49	0,19 ± 0,40	0,26 ± 0,44	0,71 ± 0,78
LEP	23,03 ± 5,81	**-**	**-**	0,32 ± 0,47	**-**	**-**	1,08 ± 1,02	**-**	**-**
LEP diluído	=	9,18 ± 7,91 *	11,40 ± 4,73 *	=	7,78 ± 8,44 *	14,03 ± 2,74 *	=	3,59 ± 2,24*	6,23 ± 3,98 *
LE+S	22,41 ± 4,17	21,25 ± 9,80	19,99 ± 6,93	0,20 ± 0,40	0,26 ± 0,44	7,35 ± 5,69	0,26 ± 0,59	1,89 ± 2,14	1,93 ± 1,13
LE+S+CA	25,07 ± 5,01	25,32 ± 4,24	22,52 ± 4,39	0,19 ± 0,39	0,32 ± 0,47	0,39 ± 0,62	0,31 ± 0,58	0,52 ± 0,62	0,63 ± 0,77

*****p < 0,05 estatisticamente significativo em relação ao CN; **-** :sementes expostas a esses tratamentos não germinaram, por isso, foi realizada uma diluição dessa amostra em água destilada,resultando no LEP diluído; = : devido a germinação do LEP no T0, não foi necessário a realização desse ensaio. CN: controle negativo; CP: controle positivo; LEP: lodo sem misturas, puro; LEP diluído: diluição em água destilada do solubilizado de LEP; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz.

Tabela 3: Índice de mortalidade celular em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a solubilizados das amostras LE, com e sem associação com solo e casca de arroz, antes (T0) e após períodos de 3 (T1) e 6 (T2) meses de bioderremediação.

Amostras	Morte Celular		
	T0	T1	T2
CN	0	0	0
CP	0	0,39 ± 1,52	0
Solo	0	0	0
LEP	0	**-**	**-**
LEP diluído	=	1,77 ± 2,25	0,91 ± 1,19
LE+S	0	0	0
LE+S+CA	0	0	0

CN: controle negativo; **CP:** controle positivo; **LEP:** lodo sem misturas, puro; **LEP diluído**: diluição em água destilada do solubilizado de LEP; **LE+S:** lodo misturado com solo; **LE+S+CA**: lodo misturado com solo e casca de arroz. **-** : ensaio não realizado devido as sementes não germinarem; **=** devido a germinação no LEP T0, não houve a necessidade de diluição dessa amostra, por isso o ensaio de LEP diluído no T0 não foi realizado.

Tabela 4: Alterações nucleares observadas em células meristemáticas de *A. cepa* submetidas a tratamento com LEP diluído.

Alterações nucleares	T1	T2
Broto	1,10 ± 1,38	1,45 ± 1,29 *
Célula binucleada	0,33 ± 0,61	0,43 ± 0,91
Célula multinucleada	0,85 ± 1,38	0,71 ±1,02
Núcleo lobulado	4,42 ± 4,87 *	4,39 ± 5,31 *
C-metáfase	0,79 ± 2,09	0,06 ± 0,23
Ponte	0,26 ± 0,58	0,32 ± 0,61
Multipolaridade	0,13 ± 0,49	0,32 ± 0,9

***** $p < 0,05$: estatisticamente significativo em relação ao CN.

Tabela 5: Índice de mutagenicidade nas células da região F1 de *A. cepa* expostas a solubilizados das amostras LE, com e sem associação com solo e casca de arroz, antes (T0) e após períodos de 3 (T1) e 6 (T2) meses de bioderremediação.

Amostra	Mutagenicidade em F1		
	T0	T1	T2
CN	0,06 ± 0,25	0,07± 0,26	0
CP	7,80 ± 5,35 *	9,54±4,48*	9,58 ± 2,69*
Solo	0	0,13±0,34	0,13 ± 0,33
LEP	0,26 ± 0,58	**-**	**-**
LEP diluído	=	**ł**	**ł**
LE+S	0,26 ± 0,57	0,13±0,34	0,13 ± 0,34
LE+S+CA	0,07 ± 0,26	0,25±0,44	0,07 ± 0,26

*****p < 0,05 estatisticamnte significativo em relação ao CN; **-** : ensaio não realizado devido as sementes não germinarem; = devido a germinação no LEP T0, não houve a necessidade de diluição dessa amostra, por isso o ensaio de LEP diluído no T0 não foi realizado; **ł**: células não contabilizadas devido a morte das mesmas. CN: controle negativo; CP: controle positivo; LEP: lodo sem misturas, puro; LEP diluído: diluição em água destilada do solubilizado de LEP; LE+S: lodo misturado com solo; LE+S+CA: lodo misturado com solo e casca de arroz

Todos esses resultados apresentados para o LE estudado demonstram a necessidade de um monitoramento cauteloso desse resíduo ao longo do tempo, por meio de bioensaios que possam avaliar o comportamento da toxicidade do mesmo, e assegurar a dimimuição da sua toxicidade a níveis seguros. Também devem ser associados aos estudos dos processos de detoxificação do LE, a inclusão de novas tecnologias que possam promover uma certificação tanto da característica do produto final como corretivo agrícola, como a segurança de sua aplicação em solos.

3.2 Análise microbiológica

A biorremediação é uma estratégia eficaz e ambientalmente interessante, pois resulta na biotransformação parcial ou completa de poluentes orgânicos em produtos finais potencialmente inofensivos, pela biomassa microbiana (COLLERAN, 1997). Os microrganismos possuem uma capacidade de interação com uma grande variedade de compostos naturais e xenobiontes, podendo levar a uma alteração estrutural ou a uma degradação completa da molécula alvo (HEAD, 1998). Como a utilização de microrganismos adaptados ao poluente alvo melhora a efetividade e a rapidez da biorremediação (EL FANTROUSSI; AGATHOS, 2005), é essencial a identificação das

populações microbianas envolvidas na biorremediação, para o sucesso do processo (WATANABE, 2001). Portanto, a caracterização dos organismos presentes no LE, durante processos de descontaminação, é de crucial importância, devido à possibilidade de isolamento e utilização na otimização do processo de detoxificação deste resíduo, para sua aplicação como fertilizante agrícola.

Os resultados da caracterização microbiológica das amostras avaliadas neste estudo mostraram a prevalência de 18 gêneros de bactérias e 4 gêneros de fungos, os quais estão apresentados na Tabela 6. Foi observada uma alternância na composição e quantidade microbiana ao longo dos períodos testados. Dentre as bactérias, foram encontrados bacilos gram positivos (BGP), bacilos gram negativos não fermentadores (BGN-NF) e enterobactérias, sendo os BGN-NF os mais frequentes, para todos os tempos avaliados. Embora as bactérias possuam papel central nos processos de biorremediação, outros microrganismos, como os fungos e protozoários, também podem estar envolvidos no processo (WATANABE, 2001). No entanto, no presente estudo, a caracterização microbiológica revelou uma predominância de bactérias, refletindo a relevância desses organismos para essa tecnologia avaliada, bem como uma maior tolerância desses organismos para ambientes diversos. Segundo Harms et al. (2011), as bactérias suportam uma ampla diversidade de habitats, possuem crescimento rápido e, por desempenharem um grande número de reações bioquímicas específicas, podem metabolizar compostos tóxicos durante o uso dos mesmos como substratos para o seu crescimento, consumindo-os como fonte de energia.

Viñas et al. (2005) notaram uma alternância da comunidade bacteriana em solos contaminados com creosoto, antes e após a adição de nutrientes, comprovando que diferentes grupos filogenéticos estão associados com as diferentes fases da degradação, havendo interações complexas entre as comunidades microbianas e a capacidade de biodegradação em cada fase do processo. Pelos nossos resultados obtidos nos bioensaios com *A. cepa*, as amostras bioestimuladas (LE+S e LE+S+CA) não foram tóxicas para este organismo. Isto deve ter, possivelmente, acontecido devido a interação harmônica entre os microrganismos do lodo com os dos agentes bioestimulantes (solo e casca de arroz), que favoreceram a degradação de compostos tóxicos. Esses nossos dados podem ser explicados pelas afirmações de Boopathy (2000), onde o autor afirma que a interação entre os microrganismos (concorrência, sucessão ou predação) está intimamente relacionada com a eficiência da

biorremediação, uma vez que a quebra e a disponibilidade de certas substâncias orgânicas por um grupo de microrganismos específicos podem alterar a atividade de outros. Assim, entendemos que a inclusão dos agentes decompactantes proporcionou um maior potencial de biodegradação dos compostos tóxicos do LE, uma vez que, as amostras testadas só com o LE se mostraram muito mais tóxicas para todos os *endpoints* avaliados, que as bioestimuladas.

A adição de casca de arroz e/ou solo ao LE pode ter contribuído para uma alteração na diversidade microbiana do LE, sendo encontrado gêneros e espécies específicas, não observadas para a amostra de LEP, como, por exemplo: gêneros *Klebsiella* e *Nocardia* (LE+S+CA); espécies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Leclercia adecarboxylata* (LE+S+CA), *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Citrobacter freundii* e *Citrobacter koseri* (LE+S); *Achromobacter*, *Pseudomonas stutzeri* e *Enterobacter aerogenes* (LE+S e LE+S+CA) (Tabela 6). Tais bactérias possivelmente estão envolvidas no processo de degradação e/ou sorção de contaminantes, uma vez que estavam presentes apenas em amostras consideradas não tóxicas.

Pelo fato do LEP conter uma alta concentração de matéria orgânica, esta amostra apresentou uma grande diversidade de microrganismos (Tabela 6). No entanto, a toxicidade observada para as amostras solubilizadas do LEP nos tempos T1 e T2, nos ensaios com *Allium cepa*, mostraram que a degradação dos poluentes presentes no LE levou a produção de compostos não inertes. Os microrganismos utilizam os compostos orgânicos como substratos, os quais podem ser totalmente ou parcialmente eliminados pela biodegradação (MENA et al., 2003). No entanto, segundo El Fantroussi e Agathos (2005), a microbiota presente pode não apresentar metabolismo adequado para a completa degradação das substâncias em produtos inertes como CO_2 e H_2O. Dessa forma, acreditamos que, nestes casos (LEP T1 e T2), a eficiência da biorremediação pode ter sido prejudicada, devido à interação negativa entre a comunidade microbiana ou até mesmo pela presença de determinadas substâncias tóxicas em quantidades suficientes para impedir o desenvolvimento de *A. cepa* e as atividades das bactérias.

A presença da espécie *Acinetobacter lwoffii* foi observada para as três diferentes amostras estudadas (LEP, LE+S e LE+S+CA), apenas no período inicial, indicando que tal espécie atuou apenas no início do processo de biorremediação. Algumas espécies de *Acinetobacter* estão envolvidas na biodegradação de muitos compostos, como por exemplo, fenol, benzoato, óleo bruto, acetonitrila e até na

remoção de metais pesados (ABDEL-EL-HALEEM, 2003). No entanto, neste estudo, não parece ter contribuído para a mineralização de compostos tóxicos, uma vez que efeitos tóxicos significativos foram encontrados na amostra de LEP em T1 e T2, períodos nos quais essa espécie não estava mais presente.

Já o gênero *Pseudomonas* possui representantes em todas as amostras analisadas, independente dos períodos de biorremediação. O mesmo também foi observado para alguns representantes da família Bacillaceae, onde o gênero *Bacillus* foi o mais prevalente em todas as amostras testadas. Outros estudos já demonstraram que bactérias do gênero *Pseudomona*s, isoladas de solo contaminado com petróleo, foram capazes de metabolizar diversos poluentes, como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) (M'RASSI et al., 2015), compostos fenólicos (AGARRY; SOLOMON, 2008; BASHA et al.,2010) e pesticidas (SASIKALA et al., 2012). O gênero *Bacillus* também já foi relacionado com a degradação de ftalato (NIAZI et al., 2001) e cresol (TALLUR et al., 2006). No entanto, como as bactérias do gênero *Pseudomonas* (com exceção da *Pseudomonas stutzeri*) e *Bacillus* também estavam presentes no LEP, amostra considerada tóxica no T1 e T2, podemos afirmar que essas bactérias foram tolerantes às condições das amostras, mas não foram eficientes na degradação dos poluentes ali presentes.

Como esperado pela própria origem do LE, também foi verificada uma diversidade de enterobactérias, das quais algumas persistiram durante todo o período estudado (6 meses). Nos estudos realizados por Sommaggio (2013), sobre a biorremediação de LE, a autora verificou que as enterobactérias só estavam presentes nos períodos iniciais da biorremediação (1 e 3 meses), não sendo mais encontradas nas avaliações realizadas com 6 meses de degradação. Os estudos de Mazzeo et al. (2015), realizados com atenuação natural do LE, mostraram que algumas enterobactérias, como *Citrobacter freundii* e *Enterobacter cloacae* estavam presentes nas amostras até 6 meses do processo de biorremediação, bactérias estas também observadas nesse trabalho.

Em relação aos fungos, estes estiverem presentes em todos os tempos estudados. No entanto, pode-se perceber um leve aumento da diversidade dos mesmos ao longo do tempo, sendo o gênero *Penicillium* e um fungo anemófilo isolado, mas não identificado, os únicos comum às três amostras avaliadas. Embora os fungos apresentem crescimento mais lento quando comparados as bactérias (LEITÃO, 2009), eles também são importantes na degradação ou deterioração de uma grande

variedade de materiais (SINGH et al., 2011). Sabe-se que representantes do gênero *Penicillium* são capazes de degradar fenol, polietileno, fluoreno, pireno e HPAs (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2010; LEITÃO, 2009; LEITÃO et al., 2007; YAMADA-ONODERA et al., 2001; HOFRICHTER et al., 1994;), além de poderem ser biosorvente de metais como o cobre e o zinco (LEITÃO, 2009). No entanto, este gênero parece não ter contribuído para a detoxicação do LE estudado, pelo menos até o período de 6 meses, pois o LEP, nos períodos T1 e T2, se apresentou altamente tóxico para o bioensaios realizado com *A. cepa*.

Logo, foi demonstrado que, embora a incorporação de solo e casca de arroz ao LE não tenha contribuído para um significativo aumento da diversidade microbiana das amostras estudadas, a adição desses materiais possibilitou o aparecimento de novas espécies, que podem ter contribuído para a ausência de toxicidade das amostras incorporadas a esses materiais. Tal fato reforça a importância de se testar agentes estimulantes para promover a biorremediação de amostras de LE. Adicionalmente, embora tenha sido observada uma interação entre diferentes espécies de bactérias e, em menor número, de fungos, a maioria das espécies presentes no LEP parece não ter contribuído efetivamente para a degradação dos contaminantes tóxicos do LE.

Tabela 6: Análise microbiológica das amostras de LE e suas misturas com solo e casca de arroz, antes (T0) e após 3 (T1) e 6 (T2) meses de biorremediação. Microrganismos quantificados por UFC (unidades formadoras de colônias).

	Microrganismos	**LEP**			**LE+S**			**LE+S+CA**		
		T0	T1	T2	T0	T1	T2	T0	T1	T2
	Bactérias									
BGN- NF	*Achromobacter sp.*	-	-	-	-	$5x10^6$	$1x10^7$	-	$3,0x10^4$	$2x10^6$
	Acinetobacter lowoffii	$1,0 \times 10^6$	-	-	$1x10^5$	-	-	$1x10^5$	-	-
	Acinetobacter calcoaceticus	-	$1,5x10^7$	-	-	-	-	-	-	-
	Alcaligenes faecalis	$1,5x10^5$	-	-	-	-	-	$5x10^6$	-	-
	Chryseobacterium indologenes	$1,8x10^5$	-	-	-	-	-	$2,0x10^5$	$1,0x10^6$	-
	Klebsiella pneumoniae	$1,5x10^5$	-	$9x10^3$	$2x10^5$	-	-	-	-	-
	Klebsiella sp	-	-	-	-	-	-	$1x10^5$	-	-
	Ochrobactrum anthropi	-	$1x10^5$	-	-	$1x10^7$	$9x10^6$	$2x10^5$	$6x10^6$	-
	Pseudomonas aeruginosa	-	$1,0 \times 10^6$	$8x10^3$	-	-	$2x10^5$	-	$1x10^4$	-
	Pseudomonas fluorescens	$1,6x10^5$	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudomonas oryzihabitans	-	$5x10^5$	-	-	-	-	-	-	-
	Pseudomonas putida	-	$1,5x10^7$	$6x10^4$	-	-	-	$5x10^5$	$5x10^5$	-
	Pseudomonas stutzeri	-	-	-	$3x10^4$	-	-	$5x10^5$	-	-
	Stenotrophomonas maltophilia	-	-	-	-	-	-	-	$3x10^4$	-
	Vibrio spp	$1,0x10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-
BGP	*Bacillus sp*	$5,0 \times 10^4$	-	$6,0x10^4$	$6,0x10^5$	$4x10^5$	$3x10^6$	$7,0x\ 10^4$	$4,0x10^6$	$2x10^7$
	Bacillus cereus	-	-	-	-	$2x10^5$	-	-	-	-
	Bacillus megaterium	-	-		-	$15x10^4$	-	-	-	-
	BGP não identificado	-	$5,0x10^6$	-	-	-	-	-	-	-
	Nocardia sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	$5,0 \times 10^6$
Enterobacteria (BGN)	*Citrobacter freundii*	-	-	-	-	$1x10^4$	$5x10^3$	-	-	-
	Citrobacter koseri	-	-	-	$1,5x10^4$	-	-	-	-	-
	Enterobacter aerogenes	-	-	-	-	-	$1x10^4$	-	$6x10^4$	-
	Enterobacter cloacae	$1,5x10^5$	-	-	-	-	$1,0x10^7$	-	-	-
	Escherichia coli	-	-	$1,0x10^4$	$4,0x\ 10^5$	-	-	$5,0x10^5$	-	-
	Kluyvera ascorbata	-	-	$7x10^4$	-	-	-	-	-	-
	Leclercia adecarboxylata	-	-	-	-	-	-	-	$2,0x10^4$	-
	Serratia marcescens	-	$2,2x10^5$	-	-	-	-	-	-	-
	Fungos									
Filamentoso	Aspergillus sp.	-	$4x10^5$	-	-	-	-	-	-	-
	Fungo anemófilo	$1,0x10^4$	-	-	$2,0x10^4$	-	$3,0x10^4$	$2,0x10^4$	-	$>10^7$
	Mucor sp (Zigomiceto)	-	-	$1x10^4$	-	$4x10^3$	-	-	-	-
	Penicillium sp.	-	-	$5x10^6$	-	$4x10^4$	$2x10^5$	-	-	10^5

- : microrganismos não detectados na amostra correspondente; **BGN-NF:** bacilo gram negativo não fermentador; **BGP**: bacilo gram positivo.

4. Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, conclui-se que os extratos aquosos do LE estudado sem as misturas com solo e casca de arroz apresentaram efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para a espécie *A. cepa*. O fato desses efeitos serem observados para os extratos aquosos acarreta uma preocupação adicional, uma vez que, se o LE sem tratamento for disposto no ambiente, não apenas o solo receptor poderá ser contaminado, mas também as águas superficiais e subterrâneas do entorno, por meio da possível lixiviação dos poluentes presentes no LE.

Nas análises microbiológicas foi observado que a via de degradação preferencial do LE foi a aeróbia, com uma predominância de espécies bacterianas.

A adição de casca de arroz e solo ao LE foi importante no processo de detoxificação do LE, uma vez que nas misturas com esses elementos não foram observados efeitos prejudiciais ao organismo teste. Além disso, os períodos de biorremediação testados parecem ter sido apropriados para todos os tratamentos realizados, com exceção da amostra de LEP.

Assim, este estudo demostrou a importância do monitoramento contínuo do LE, pois apesar da destinação agrícola desse resíduo ser uma alternativa interessante, não se deve aplicá-lo a solos sem o tratamento prévio do lodo a fim de descontaminá-lo. Pois, como foi observado, mesmo após 3 e 6 meses de biorremediação, o extrato aquoso do LE sem nenhuma mistura, induziu lesões celulares e genéticas no organismo teste *A. cepa.*

Referências

ABDEL-EL-HALEEM, D. Acinetobacter:environmental and biotechnological applications. **African Journal of Biotechnology**, v.2, p. 71-74, 2003.

AGARRY, S. E.; SOLOMON, B. O. Kinetics of batch microbial degradation of phenols by indigenous *Pseudomonas fluorescence*. **International Journal Environment Science Technology***, v.5,* p. 223–232, 2008.

ALMEIDA, V.C. de; LENZI, E.; BORTOTTI-FAVERO, L.O.; LUCHESE, E.B. Avaliação do teor de alguns metais e de nutrientes de lodos de estacoes de tratamento de Maringa. **Acta Scientiarum**, v.20, p.419-425, 1998

ANDREOLI, C.V.; SPERLING, M.V.; FERNANDES, F. **Princípios do tratamento biológico de águas residuais**. Curitiba: FCO, v. 6, 2004.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004**: Classificação de resíduos sólidos. ABNT, Rio de Janeiro, 2004.

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

BASHA, K. M.; RAJENDRAN, A.; THANGAVELU, V. Recent advances in the biodegradation of phenol: a review***.*** **Asian Journal of Experimental Biology and Science**, *v. 1*, p. 219–234, 2010.

BERTONCINI, E.I. & MATTIAZZO, M.E. Lixiviação de metais pesados em Latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.23, p.737- 744, 1999.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura.** Jaguariuna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 349p.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation Technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63-67, 2000.

BOVI, M.L.A.; GODOY JUNIOR, 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 das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2014**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2016.

BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by *Allium* root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

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

CERNIGLIA, C.E.; SUTHERLAND, J.B. degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. **Handbook of hydrocarbon and lipid microbiology**, p.2079-2110, 2010.

CLAXTON, L. D.; HOUK, V. S.; HUGHES, T. J. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. **Mutation Research**, v. 410, p. 237-243, 1998.

COLLERAN, E. **Uses of bactéria in bioremediation**. In Methods in Biotechnology. Sheehan, D. Humana Press INC, Totowa, New Jersey, 1997.

CZERNIAWSKA-KUSZA, I.; CIESIELCZUK, T.; KUZKA, G.; CICHON, A. Comparison of the phytotoxkit microbiotest and chemical variables for toxicity evaluation of sediments. Enviromental Toxicology, v. 21, p. 367-372, 2006.

EL FANTROUSSI, S.; AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 268-275, 2005.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species - assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere**, v.40, p.1189-1195, 2000.

FERNANDES, I. J., SANTOS, E. C. A., OLIVEIRA, R., REIS, J.M., CALHEIRO, D., MORAES, C.A.M., MODOLO, R.C. E. Caracterização do resíduo industrial casca de arroz com vistas a sua utilização como biomassa. 6o **Forum Internacional de Ressíduos sólidos**. São José dos Campos. 2015. http://www.6firs.institutoventuri.org.br/images/trabalhos/T13.pdf. Acesso em 1 Maio de 2016.

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

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1680–1686, 2009.

FERREIRA, C.S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir de cinza de casca de arroz.** Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, 2005.

FISKEJÖ, G. The *Allium* test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112,1985.

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

GEVAO, B.; SEMPLE, K. T.; JONES, K.C. Bound pesticide residues in soil: a review. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 3-14, 2000.

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C.M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrientes and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environmental Science and Pollution Research**, v.20, p.6256-6265, 2013.

HAMDI,H.; BENZARTI,S.; MANUSADZˇIANAS,L.; AOYAMA,I.; JEDIDID,N. Soil bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology Biochemistry**, v.39, p.1926–1935, 2007.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK., L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews Microbiology**, v.9. p.177- 191, 2011.

HARMSEN, J. Possibilities and limitations of landfarming for cleaning contaminated sites. In: HINCHEE, R.E.; OLFENBUTTEL, R.F. (Eds.), **On-site Bior- eclamation: Processes for Xenobiotic and Hydrocarbon Treatment**. Butter- worth-Heinemann, London, 1991

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

HEAD, I. M. Bioremediation: towards a credible technology. **Microbiology**, v. 144, p. 599-608, 1998.

HOFRICHTER, M.; BUBLITZ, F.; FRITSCHE, W. Unspecific degradation of halogenated phenols by the soil fungus *Penicillium* frequentans Bi 7/2. **Journal of Basic Microbiology**, v. 34, p. 163-172, 1994.

HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H.; LOKKE, H.; WOLF, W.; 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.

HOUSTON, D.F. **Rice, chemistry and technology**. American Association of Cereal Chemical. St. Paul. Minnesota, USA, p. 301-351, 1972.

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

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

LEITÃO, A. L. Potential of P*enicillium* species in the bioremediation field. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 6, p. 1393-1417, 2009.

LEITÃO, A. L.; DUARTE, M. P.; OLIVEIRA, J. S. Degradation of phenol by a halotolerant strain of Penicillium chrysogenum. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 3, p. 220-225, 2007.

LEME, D. M.; AMGELIS D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Action mechanisms of petroleum hydrocarbons presente in Waters impacted by na oil spill on the genetic material of *Allium cepa* roots cells. **Aquatic Toxicology,** v.88, p.214-219, 2008.

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

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

LOURENCO, R.S. **Utilização de lodo de esgoto aeróbio e calado em florestas**. Embrapa- PA, p.1-3, 1997 (Comunicado técnico, 18).

M'RASSI, A. G.; BENSALAH, F.; GURY, J.; DURAN, R. Isolation and characterization of different bacterial strains for bioremediation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environmental Science and Pullution Research**, v. 22, p. 15332-15346, 2015.

MAILA, M.P.; CLOETE, T.E. The use of biological actives to monitor the removal of fuel contaminants – perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration Biodedradation**, v. 55, p. 1-8, 2005.

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

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SOUZA, T. S. Genotoxic and mutagenic effets of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 489-496, 2016.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MAYER, F. D.; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J. E. Gestão energetica, econômica e Ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindúsrias de arroz, In: SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, XIII., 2006, Bauru. **Anais**...Bauru: Faculdade de engenharia de Bauru, UNESP.

MAZZEO, D.E.C.;LEVY,C.E.;ANGELIS,D.F.;MARIN-MORALES,M.A. BTEX biodegration by bactéria from effluents of petroleum refinary. **Science of the Total Environment**, n.408, p. 4334-4340, 2010.

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

MCGEEHAN, S.L. Impact of waste materials and organic amendments on soil properties and vegetative performance. **Applied and Environmental Soil Science**, p.1-11, 2012.

MEHTA, P.K. & PITT, N. A new process of rice utilization. In: International conference on the utilization of rice by-products. Valencia, Spain, 1974. **Proceedings.**.Valencia: IATA, published in 1977, p. 45-58.

MENA, E.; GARRIDO, A.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Bioremediation of sewage sludge by composting. **Communications in soil Science and plant analysis**, v. 34, p. 957-971, 2003.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEJA-JARQUÍN, C.; ZAPARA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 165-175, 2004.

MOREIRA, R.;SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological testing of a digested sewagesludge and derived composts. **Bioresour. Technol**. v. 99, p.8382–8389, 2008.

NIAZI, J. H.; PRASAD, D. T.; KAREGOUDAR, T. B. Initial degradation of dimethylphthalate by esterases from *Bacillus* species. **FEMS Microbiology Letters**, v.196, p. 201-205, 2001.

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

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSOU, A. M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J. F.; GRAND, C.; BISPO, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 114-125, 2006.

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.

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, v.57, p.409-414, 2002.

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 Mocrobiology**, v.38, 373-377p, 2004.

QUINZANI-JORDÃO, B. **Ciclo celular em meristemos. La formatión de intercâmbios entre cromátidas hermanas**. 1978. 276f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.118, p.49-53, 1993.

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

RODRIGUES, G., S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja.** Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, 56p., 1999.

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

SASIKALA, C.; JIWAL, S.; ROUT, P.; RAMYA, M. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. **World J Microbiology Biotechnology**, v. 28, p. 1301-1308, 2012.

SEMPLE, K. T.; MORRISS, A. W. J.; PATON, G. I. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis**. European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 809-818, 2003.

SILVÉRIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, da matéria orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. **O Agronômico**, v.56, p.5-8, 2004.

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

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

SKIPPER, H.D., 1999**. Bioremediation of contaminated soils**. In: Sylvia,D.M. (Ed.), Principles and Applications of Soil Microbiology.Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, pp. 469–481.

SOMMAGGIO, L. R. D. **Avaliação da atenuação da toxicidade de lodo de esgoto por associação com resíduo vegetal da indústria sucro-alcooleira**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

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

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

TALLUR, P. N.; MEGADI, V. B.; KAMANAVALLI, C. M.; NINNEKAR, H. Z. Biodegradation of p-cresol by *Bacillu*s sp. Strais PHN 1**. Current Microbiology**, v. 53, p. 529-533, 2006.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes**. Biodegradation**, 2011.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental international** v.26, p.409-411, 2001.

VINÃS, M.; SABATÉ, J.; ESPUNY, M. J.; SOLANAS, A. M. Bacterial Community Dynamics and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Degradation during Bioremediation of Heavily Creosote-Contaminated Soil**. Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 7008-7018, 2005.

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. **Mutation Research**, v. 567, p. 227–345, 2004.

YALLOUZ, A.V.; CESAR, R.G.; EGLER, S.G. Potential application of a semi-quantitative method for mercury determination in soils, sediments and gold mining residues. **Environmental Pollution**, v.151, p. 420-433, 2008.

YAMADA-ONODERA, K.; MUKOMOTOA, H.; KATSUYAYAB, Y.; SAIGANJIB, A.; TANIA, Y. Degradaton of polythylene by a fungus Penicillium simplocissimum YK**. Polymer Degradation and Stability**, v. 72, p. 323-327, 2001.

Artigo 3. Avaliação da pontencialidade de uso agrícola de lodo de esgoto bioestimulado, por meio de ensaio com cultura de células de mamífero

RESUMO

A bioestimulação é um processo de remediação de poluentes, que consiste no acréscimo de agentes que estimulam o desenvolvimento da microbiota indígena, sendo efetiva para a descontaminação de resíduos orgânicos. A casca de arroz é um agente bioestimulante, que promove aeração de sistemas edáficos e estimula a atividade aerobiótica dos microrganismos do solo. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia do processo de biorremediação/bioestimulação na diminuição da toxicidade do LE e do seu possível uso agrícola, por meio do ensaio do MN em células de hepatoma humano (HepG2). O LE de origem doméstica foi testado puro (LEP) e em mistura com solo (S) e com agentes estimulantes, como a casca de arroz (CA), em diferentes proporções (LE+S e LE+S+CA), e diferentes tempos de remediação (3 meses - T1 e 6 meses - T2). Foram observados indução significativa de MN para solubilizado da amostra LEP, em T2; de brotos celulares para os solubilizados de LEP, em todos os períodos avaliados e a presença de mais de uma alteração por célula (MN e broto nuclear) para os tratamentos com os solubilizados de LEP, em T1 e T2. Dessa forma, pode-se concluir que a amostra de LEP apresentou efeitos genotóxicos para células HepG2, mesmo após ser biorremediada. Já para as amostras contendo solo e/ou casca de arroz, não foram encontrados efeitos tóxicos para o sistema teste empregado. Assim, o uso de LE em solos agrícolas deve ser feito com cautela, sendo importante que o mesmo passe por processo de remediação, como os tratamentos de biorremediação/bioestimulação.

PALAVRAS-CHAVE: HepG2, genotoxicidade, biorremediação, micronúcleo, casca de arroz.

1 Introdução

Os seres humanos produzem inúmeros resíduos que são depositados diariamente no ambiente. O lodo de esgoto (LE) é um resíduo semi-sólido, cuja produção mundial é cerca de milhões de toneladas por ano (APARICIO; SANTOS; ALONSO, 2009). Apesar de sua composição variada, esse resíduo é composto predominantemente de matéria orgânica e macronutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio e magnésio) (GRAY, 2010), o que o torna um material interessante para ser utilizado como recondicionante de solos agrícolas (ÇIFCI; KINACI; ARIKAN, 2013).

O uso do LE em atividades agrícolas se caracteriza em um excelente destino para este resíduo, tanto devido à sua crescente produção (BRIGHT; HEALEY, 2003) como pela possibilidade de reciclagem de um resíduo rico em matéria orgânica que seria descartado. Entretanto, esse resíduo pode conter uma grande quantidade de compostos tóxicos persistentes e bioacumuláveis, que podem contaminar e, consequentemente, prejudicar a qualidade do solo onde são dispostos, além de interferir em outras malhas ambientais, como a atmosfera e os recursos hídricos do seu entorno (CINCINELLI et al., 2012).

Considerando os benefícios que o LE possa conferir à agricultura e a possível toxicidade que ele possa proporcionar ao solo onde é disposto, têm sido direcionados esforços para o desenvolvimento de novas tecnologias que minimizem a sua toxicidade e permita o seu uso como recondicionantes de solos agricultáveis (TAS, 2010).

A biorremediação é uma das metodologias de detoxificação de resíduos orgânico, que utiliza organismos capazes de modificar ou decompor poluentes (TYAGI et al., 2011).

Como a degradação de compostos orgânicos está diretamente relacionada com a quantidade de oxigênio disponível no meio, melhoras nas condições de aerobiose do solo podem também promover uma efetividade maior no processo de biorremediação (HARMSEN, 1991; MOLINA-BARAHONA et al., 2004; PEREZ-ARMENDÁRIZ et al., 2004; MAZZEO et al., 2014). O aumento da aeração em um dado sistema pode se dar pela adição de agentes de volume ao substrato (VASUDEVAN; RAJARAM, 2001; SOUZA et al., 2009), como, por exemplo, os resíduos vegetais. A casca de arroz pode atuar como um bom agente de volume e contribuir para a aerobiose do sistema em processos de

biorremediação. Além dos compostos presentes na casca de arroz, que são incorporados ao solo onde são inseridos, ela também contém cepas microbianas que metabolizam contaminantes, auxiliando no processo de biorremediação de compostos orgânicos (HAMDI et al., 2007).

Alguns autores têm alertado que, para o LE ser aplicado ao solo, é indicado que o mesmo seja submetido a tratamentos que melhore a estabilidade da sua matéria orgânica, evitem efeitos que alterem as propriedades do solo e não causem danos ambientais (PLAZA et al., 2005). Rathod et al. (2009) relataram que muitos métodos vêm sendo propostos com o intuito de promover a desintoxicação de LE e assegurar a sua estabilidade química e biológica.

A tecnologia de bioestimulação, que consiste no acréscimo de agentes estimulantes como oxigênio e nutrientes, se caracteriza em uma interessante proposta para estimular o crescimento dos microrganismos autóctones (MAZZEO et al., 2014), contituindo em uma possível alternativa para descontaminação do LE.

A realização de bioensaios que possam estabelecer os impactos dos contaminantes no ambiente (PLAZA et al., 2005), é de extrema importância para estudos que visem o monitoramento ambiental. Os micronúcleos (MN) são bioindicadores de danos cromossômicos e instabilidade genômica (LAJMANIVICH et al., 2014), podendo ser realizado em diferentes tipos celulares (FENECH, 2000). Em estudos de toxicologia, é aplicado o ensaio do MN, por ser este um método já validado e padronizado para este fim (VRAL; FENECH; THIERENS, 2011). O ensaio do MN tem sido empregado para avaliação dos efeitos tóxicos do LE (SOLANO et al., 2009; GAJSKI; OREŠČANIN; GARAJ-VRHOVAC, 2011; BONOMO et al., 2016).

Ensaios com cultura de células de mamíferos têm sido amplamente aplicadas em estudos de investigação do potencial genotóxico e mutagênico de poluentes ambientais (CARDOZO et al., 2006; MAZZEO et al., 2010), por essas células apresentarem uma boa correlação com os efeitos observados em humanos (BRUSICK, 1987). A cultura de células HepG2 é considerada um eficiente sistema teste para avaliação de potencial citotóxico e genotóxico de contaminantes (LEME et al., 2011; LIU et al., 2012). A avaliação da toxicidade de LE atenuado, realizada por Mazzeo (2013b), mostraram que as células HepG2 são sensíveis e indicadas para a verificação do potencial mutagênico do

LE.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a efetividade do processo de biorremediação/bioestimulação do LE de origem doméstica, e possibilidade de seu uso agrícola, por meio de ensaios genotóxicos com amostras biorremediadas e não biorremediadas, realizados com cultura de células de hepatoma humano (HepG2).

2 Material e métodos

2.1 Obtenção das amostras

O LE de origem doméstica estudado foi coletado em 2014 na Estação de Tratamento de Esgoto Praia Azul, localizada na cidade de Americana (São Paulo- Brasil) (latitude 22° 44' 21" S e longitude 47° 19' 53" W). Para a melhora da oxigenação do sistema, foi utilizada, como agente descompactante, casca de arroz adquirida em uma fábrica de beneficiamento deste grão na cidade de Rio Claro (São Paulo- Brasil). O solo utilizado no preparo das misturas é um solo argiloso e sem toxicidade, coletado no Jardim Experimental da UNESP (Rio Claro – SP, Brasil).

Para o estudo da biorremediação/bioestimulação, foram confeccionadas 3 diferentes amostras com o LE: LEP (LE puro); LE+S (LE misturado com solo na proporção de 3:1 – v/v); LE+S+CA (LE misturado com solo e casca de arroz na proporção de 3:1:1 – v/v/v). Após o preparo, essas amostras foram dispostas em cubas de inox (14 L de volume), para serem submetidas a períodos de biorremediação por 3 (T1) e 6 (T2) meses. Todo o processo se deu em ambiente coberto.

2.2 Obtenção dos extratos aquosos (solubilizados)

Para a obtenção dos solubilizados, primeiramente foi calculado o peso seco referente a cada amostra estudada. O peso seco foi obtido pela pesagem de, aproximadamente, 10 g da amostra, em recipientes individuais tarados, seguido por secagem em estufa a 105° C por 24 horas. Esse ensaio foi realizado em triplicata. Posteriormente, uma nova pesagem foi realizada e a média de cada triplicata foi considerada como equivalente ao peso seco da amostra.

A obtenção dos solubilizados (fase líquida) foi baseada na norma ABNT NBR 10.006 (2004), adicionando 62,5 g de cada amostra (referente ao seu peso seco)

em 250 mL de água destilada, seguido por agitação constante por 5 minutos. Entretanto, foi necessário adicionar mais água no sistema, para se conseguir fase líquida suficiente para coleta do solubilizado, uma vez que houve uma grande retenção da água pelo lodo. Para isso, foram adicionados 350mL, 150 mL e 100 mL de água destilada nas amostras de LEP, LE+S e LE+S+CA, respectivamente, além dos 250 mL adicionados inicialmente. Após 7 dias de decantação em temperatura de 22 °C, foi coletada a fase líquida de cada amostra, sendo a mesma filtrada em membrana com 0,45 µm de porosidade.

2.3 Ensaios com cultura de células HepG2

2.3.1 Linhagem celular

As células HepG2 (*Human derived hepatoma cell*) utilizadas neste estudo foram adquiridas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro (Brasil). As culturas, mantidas em frascos descartáveis de 25 cm^2, foram cultivadas em 5 mL de meio MEM, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 0,1% de solução antibiótica-antimicótica (10.000 U.I./mL de penicilina e 10 mg/mL de estreptomicina), em estufa de CO_2 (5%) a 37°C. Nessas condições, o ciclo celular dessa linhagem é de aproximadamente 24 horas.

2.3.2 Teste do MTT

Para a determinação das concentrações não citotóxicas das amostras, para as células HepG2, foi realizado, o protocolo de Mosmann (1983), com algumas modificações, o teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide – CAS n. 298-93-1, Sigma). Foram plaqueadas 2,34 x 10^4 células em cada um dos 96 poços de uma microplaca, para estabilização por um período de 24 horas em estufa de CO_2 (5%) a 37°C. Posteriormente, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos solubilizados do LEP, LE+S e LE+S+CA dos diferentes períodos de biorremediação (T0, T1 e T2), por 24 horas. O controle negativo (CN) foi realizado com meio de cultura e o controle positivo (CP) com Triton X-100 a 1%. Posteriormente, os tratamentos foram removidos e foi adicionado 150 µL da solução de MTT (5mg/mL). As placas foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C. Em seguida, a solução de MTT foi descartada e foram adicionados 100 µL de dimetil sulfóxido (DMSO) em cada poço. Esse procedimento foi realizado em triplicata, em experimentos independentes.

A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Aparelho Multiskan FC – Thermo Scientific) a 540 nm. As concentrações que induziram viabilidade abaixo de 80% foram consideradas citotóxicas. Assim, a partir do ensaio do MTT, foram estabelecidas as concentrações não citotóxicas dos solubilizados do LE, para posterior realização do teste do MN.

2.3.3 Teste do MN com bloqueio de citocinese

Para a realização do teste do MN, foi utilizado o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. A concentração dos solubilizados utilizada nesse ensaio foi a de 50 µL/mL de cada amostra (LEP; LE+S; LE+S+CA de T0, T1 e T2), que correspondeu a maior concentração não citotóxica avaliada no teste do MTT.

As células foram cultivadas por um ciclo celular completo (24 horas). Posteriormente, foram realizados os tratamentos com os solubilizados descritos anteriormente, em frascos individuais e em triplicata. O CN foi realizado adicionando PBS (50 µL/mL) e o CP, adicionando 50 µL de metilmetano sulfonato (1×10^{-2} M). Após os tratamentos, as células foram lavadas, por duas vezes, com PBS e foi adicionado 5mL de meio de cultura completo com 3 µg/mL de citocalasina B, sendo armazenadas em estufa a 37°C por 28 horas. Em seguida, as células foram coletadas e fixadas em Carnoy (metanol/ ácido acético 3:1 – v/v). Para a confecção das lâminas, foram depositadas algumas gotas da cultura de células sobre lâminas limpas, geladas, contendo um filme de água. Após secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa 5% por 10 minutos.

A análise foi feita em microscópio de luz, no aumento de 1000 vezes, sendo contadas cerca de 1000 células binucleadas com membrana citoplasmática e envoltório celular íntegros e núcleos de tamanhos similares não sobrepostos. Foram analisadas duas lâminas para cada repetição, totalizando cerca de 6000 células para cada tratamento e controles avaliados. Para a avaliação do potencial genotóxico do LE, os resultados deste ensaio foram comparados com o CN, pelo teste estatístico não paramétrico de Kruskall Wallis ($p < 0,05$).

Neste ensaio, foram contabilizados os MNs, brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas e alterações que apareceram em conjunto, como células binucleadas que apresentavam ponte e broto (P+B), MN e broto (MN+B), MN e

ponte (MN+P) e as que apresentavam outros tipos de associação de alterações, como ponte, broto e micronúcleo (MN+B+P) em uma mesma célula binucleada.

3. Resultados e Discussão

Em virtude do reaproveitamento agrícola do LE, há uma necessidade de um monitoramento desse resíduo, a fim de se conhecer o seu potencial risco para o ambiente. O LE pode conter uma mistura complexa de compostos tóxicos, podendo prejudicar os organismos expostos, quando o mesmo é depositado no solo (ENGWALL; HJELM, 2000). Segundo Alvarenga et al. (2007), uma estratégia para avaliação dos riscos que este resíduo pode desencadear aos organismos expostos, seria o uso de diferentes bioensaios, os quais podem aferir a biodisponibilidade dos contaminantes presentes no LE. As análises químicas, além de serem custosas e laboriosas, não conseguem predizer os efeitos tóxicos combinados dos constituintes de uma amostra. Dessa forma, são indispensáveis as avaliações com sistemas biológicos, pela capacidade que eles têm de oferecer um prognostico de toxicidade de misturas complexas (TEWARI et al., 2005).

Sendo as células de hepatoma humano (HepG2) um sistema-teste eficiente para avaliação do potencial genotóxico de contaminantes (LEME et al., 2011), diversos estudos têm sido realizados com cultura de células de mamíferos, para investigar os efeitos tóxicos dos poluentes ambientais (MATSUMOTO et al., 2005; LEME et al., 2011; MAZZEO et al., 2010; 2013a).

Os testes de viabilidade celular pelo MTT foram realizados com 5 diferentes concentrações dos solubilizados de LEP, LE+S e LE+S+CA, para todos os períodos estudados (T0, T1 e T2). De acordo com este teste, foram escolhidas a maior concentração de cada solubilizado a ser utilizado no teste do MN, sendo esta de 50 µL/mL. Desta forma, foi assegurado que nenhuma das concentrações testadas foi considerada citotóxica para as células HepG2.

Para o parâmetro de MN, foram avaliadas as presenças de um MN, dois MN e três ou mais MNs em uma única célula binucleada (Tabela 1), pois, segundo Fenech (2007), essas alterações são biomarcadoras de quebras e/ou perdas cromossômicas. Nos resultados mostrados na tabela 1, foi possível observar uma maior quantidade de células binucleadas portadoras de apenas um MN por célula. No entanto, esse valor não foi estatisticamente significativo

para nenhum dos tratamentos realizados com as amostras. Ainda, podemos observar que a amostra LEP, para todos os períodos avaliados (T0, T1 e T2), apresentou uma maior quantidade de células portadoras de MN, quando comparado com os demais tratamentos (LE+S; LE+S+CA para T0, T1 e T2) e com o CN. Já, quando foi analisado o total de MNs encontrados nas células, seja um, dois ou mais, observa-se resultado estatisticamente significativo para a amostra LEP no T2 (após seis meses de biorremediação). Tal fato sugere que, após seis meses do processo de biorremediação do LE, houve uma potencialização do extrato aquoso dessa amostra (LEP) induzir MNs nas células HepG2, mostrando que o LE estudado pode conter substâncias capazes de induzir quebras ou perdas cromossômicas.

Mazzeo (2013b), analisou, em células HepG2, o potencial mutagênico de extratos aquosos de LE que passou por períodos de atenuação natural. A autora relatou um efeito mutagênico significativo, com relação à quantidade de MNs, nos períodos iniciais do estudo (0 e 2 meses de biorremediação). Em um estudo realizado com lixiviado de LE, Gajski e colaboradores (2011) observaram um aumento significativo na frequência de MN, para testes *in vitro* realizados com linfócitos humanos. Os autores concluíram que a amostra de LE testada podia causar efeitos adversos às populações humanas expostas. Tewari et al. (2005), também relataram um aumento significativo na frequência de micronúcleos em eritrócitos de ratos, após exposição dos mesmos a concentrações de lixiviado de LE. Hopke et al. (1982) observaram que os extratos obtidos de um LE de origem doméstica foram capazes de induzir mutações pontuais em células germinativas de *Zea mays* e um efeito clastogênico em *Tradescantia paludosa*. Esses estudos corroboram os dados de MNs obtidos neste trabalho, no qual o solubilizado do LEP também induziu efeitos clastogênicos em células humanas mantidas em cultura.

Nas análises dos brotos nucleares, foram encontrados em células binucleadas de HepG2 a presença de um ou dois brotos, conforme pode ser visto na Tabela 1. Os resultados demonstram uma alta quantidade de brotos nucleares únicos em célula binucleada das amostras de LEP, para todos os períodos avaliados, sendo os resultados estatisticamente significativos, em relação ao CN. Também foi observado resultados estatisticamente significativos para a somatória das células binucleadas com 1 broto e 2 brotos nucleares.

Segundo Fenech (2006) e Fernandes et al. (2009), os brotos nucleares são originados por um mecanismo celular de remoção de DNA amplificado e/ou excesso do mesmo, sendo um biomarcador de genes amplificados ou dosagem de gene alterado. Dessa forma, devido à presença significativa de brotos nucleares nas células expostas ao lodo bruto, o LE analisado pode também ter induzido danos genotóxicos no sistema teste empregado neste estudo, por meio de eliminação de material genético amplificado, além das perdas e quebras cromossômicas.

Rank e Nielsen (1998) também avaliaram, em células meristemáticas de *Allium cepa*, os efeitos genotóxicos de um LE. No estudo, devido a observação de efeitos genotóxicos significativos no lodo estudado, os autores concluíram que esses efeitos poderiam ser devido a presença de metais potencialmente tóxicos no LE. No entanto, no presente estudo, não podemos afirmar que os efeitos observados estão relacionados, exclusivamente, à presença de metais, pois, LE é uma mistura complexa, constituída por diversas substâncias, sendo difícil atribuir o efeito toxicológico observado a um composto específico, já que, segundo Oleszczuk (2008), podem ocorrer inúmeras interações químicas entre as diferentes substâncias presentes nesse resíduo.

Com relação a presença de pontes nucleoplasmáticas, nenhuma das amostras, das diversas associações testadas, induziu efeito estatisticamente significativo para esta alteração.

Segundo Fenech (2007), a presença de micronúcleos, brotos e pontes nucleoplasmáticas são indicativos de danos cromossômicos ou de instabilidade genética. A avaliação de danos no DNA fornece importantes respostas sobre os efeitos das substâncias tóxicas, já que as mutações são eventos cruciais a serem considerados em processos carcinogênicos (FENECH, 2008).

Para as alterações compostas, que compreendem mais de uma anormalidade encontrada em apenas uma célula binucleada, foi possível observar neste trabalho, uma maior quantidade de células portadoras de MN e broto (tabela 1), estatisticamente significativa para a amostra LEP no T1 e no T2, que corroboram as anormalidades mais encontradas separadamente. Dessa forma, podemos inferir, mais uma vez, que o LE estudado pode conter substâncias com capacidade de induzir, por diversas vias (quebras e eliminação de material genético excedente), a formação de brotos nucleares.

Os extratos aquosos das misturas do LE com solo e casca de arroz não apresentaram resultados estatisticamente significativo, para nenhum dos períodos testados, demonstrando a importância de um pré-tratamento deste resíduo antes do mesmo ser depositado no ambiente. Roig et al. (2012) analisaram diferentes tipos de LE e constataram, em ensaios de toxicidade com vegetais e bactérias, que aqueles lodos que não receberam um tratamento prévio apresentaram maiores índices de toxicidade, enquanto que o LE que foi submetido à compostagem foi considerado menos tóxico. Em um estudo de atenuação natural com LE, no qual o mesmo foi misturado em diferentes proporções de solo, foi destacada a importância da busca e aplicação de novas metodologias, para a diminuição da toxicidade do LE e avaliação do processo usado. Os autores observaram que, após um determinado período de biorremediação, a mutagenicidade, avaliada em células HepG2, diminuiu significativamente em relação ao período inicial da análise, constatando a eficiência de processo usado e adequação do organismo utilizado como bioindicador (MAZZEO, 2013b).

Apesar do LEP ter sofrido um processo de biorremediação, no qual os microrganismos do próprio LE estavam atuando no processo, os períodos avaliados (3 e 6 meses) não foram suficientes para a diminuição da toxicidade das amostras aquosas do LEP. Estudos realizados por Donnelly et al. (1990), por meio do Teste de Ames, encontraram substâncias mutagênicas presentes em LE, que persistiram por longos períodos no solo, sendo necessário cerca de dois anos, para a diminuição da atividade mutagênica. Já, quando o LE foi misturado ao solo e a casca de arroz, foi possível observar uma diminuição da genotoxicidade deste resíduo, provavelmente devido a uma otimização do processo de biorremediação, que pode ser resultado da incorporação de novos microrganismos ao sistema, além de uma melhora na aeração da amostra que continha casca de arroz.

No presente trabalho, realizado em células HepG2, observamos que amostras dos solubilizados de LE+S+CA foram, de maneira geral, as que apresentaram menores índices de alterações. Esses resultados demonstraram, que a casca de arroz foi um importante agente para a detoxificação do LE e para a consequente diminuição do seu potencial genotóxico das amostras de LEP. Sommaggio et al. (2016), também verificaram, em bioensaios com *A. cepa*, uma

menor indução de genotoxicidade nas amostras misturadas com casca de arroz, quando comparado aos demais tratamentos. O uso de agentes vegetais favorece a biorremediação, por otimizar a aerobiose do sistema, além de poder incrementar a biomassa microbiana presente no processo, levando, assim, a uma melhora na degradação dos poluentes (MOLINA-BARAHONA et al., 2004). Em um estudo realizado por Souza et al. (2009), o uso de casca de arroz melhorou o processo de biodegradação, diminuindo o potencial clastogênico de amostras contaminadas submetidas a um tratamento por landfarming.

A realização de um tratamento prévio do LE influencia, de modo direto, em algumas de suas propriedades, como a sua toxicidade (ROIG et al., 2012). O extrato aquoso de um LE compostado foi avaliado em *Vicia faba,* com relação a sua genotoxicidade, sendo observado uma diminuição do potencial genotóxico nesse lodo, quando comparado ao não compostado, comprovando que compostagem foi essencial para a redução da toxicidade do LE (EL FELS et al., 2015). Kapanen et al. (2013) avaliaram a eficiência da compostagem de amostras de LE doméstico misturado com casca de arroz e turfa. Os autores observaram, por análises químicas, uma redução de alguns compostos orgânicos tóxicos, que obtiveram, como consequência a diminuição da toxicidade aguda e da genotoxicidade dessa amostra compostada. A partir do estudo realizado, os autores concluíram que a avaliação da ecotoxicidade fornece importantes informações sobre o destino desses materiais, sugerindo que os bioensaios são ótimas ferramentas para avaliar a qualidade do LE ou seu produto compostado, indicando os possíveis riscos desses produtos para aplicações agrícolas.

Assim, esse estudo reforça a importância da utilização de técnicas de biorremediação para a descontaminação do LE, e demonstra a relevância da utilização de bioensaios realizados com indicadores eficientes em diagnosticar a potencialidade tóxica desse resíduo, como as células (HepG2) usadas neste trabalho.

Tabela 1: Alterações encontradas nas células binucleadas de HepG2 submetidas a tratamentos com os extratos aquosos do LE e suas misturas com solo e casca de arroz, durante os períodos de biorremediação.

Alterações	CN	CP	T0			T1			T2		
			LEP	LE+S	LE+S+CA	LEP	LE+S	LE+S+CA	LEP	LE+S	LE+S+CA
Presença de MN											
1 MN	24,16 ± 3,38	65,87 ± 3,71 *****	38,09 ± 3,15	24,46 ± 3,74	22,72 ± 3,12	39,12 ± 4,02	21,50 ± 2,42	20,80 ± 2,08	40,17 ± 4,36	29,76 ± 3,76	26,75 ± 3,15
2 MN	3,8 ± 1,47	8,98 ± 2,75	4,99 ± 2,83	3,49 ± 1,64	2,32 ± 1,75	4,81 ± 1,74	2,83 ± 1,17	3,33 ± 1,86	5,81 ± 3,42	4,82 ± 2,04	3,49 ± 1,87
3 MN	0,17 ± 0,41	2,33 ± 1,85	0,33 ± 0,52	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0 ± 0	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0,99 ± 1,25	0,66 ± 0,81	0,17 ± 0,41
Total de MNs	28,16 ± 4,22	77,18 ± 5,31*****	43,42 ± 3, 58	27,96 ± 4,43	25,21 ± 3,05	43,93 ± 4,97	24,33 ± 2,57	24,29 ± 2,46	46,98 ± 4,48*****	35,24 ± 3,98	30,41 ± 2,42
Presença de anormalidades											
1 broto	13,33 ± 4,08	35,92 ± 6,38*****	27,12 ± 3,73*****	21,96 ± 3,73	19,23 ± 2,27	27,04 ± 3,68*****	18,50 ± 3,39	18,47 ± 2,90	31,03 ± 6,11*****	25,11 ± 2,77	18,46 ± 3,07
2 brotos	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0,33 ± 0,52	1,16 ± 0,98	0,33 ± 0,52	0,33 ± 0,51	2,32 ± 1,84	1,49 ± 1,64	1,00 ± 0,63
Total brotos	13,33 ± 4,08	35,92 ± 6,83*****	27,12 ± 3,07*****	22,13 ± 3,64	19,56 ± 2,10	28,20 ± 4,30*****	18,83 ± 3,31	18,80 ± 2,65	33,34 ± 7,32*****	26,61 ± 2,30	19,46 ± 2,94
Ponte	10,50 ± 2,42	28,28 ± 5,78*****	16, 97 ± 2,83	15,31 ± 3,73	13,61 ± 2,59	19,40 ± 5,66	11,00 ± 2,28	10,98 ± 3,83	14,12 ± 4,72	13,96 ± 5,19	13,80 ± 3,93
Presença de alterações compostas (múltiplas)											
P+B	1,33 ± 0,82	0, 33 ± 0,81	1,00 ± 2,45	0,50± 0,55	1,00 ± 0,89	1,83 ± 1,94	0,50 ± 0,84	0 ± 0	2,82 ± 1,33	0,83 ± 1,58	1,49 ± 1,04
MN+B	2,33 ± 1,37	8,48 ± 4,97*****	4,82 ± 1,59	3,50 ± 1,98	4,48 ± 1,76	5,97 ± 1,26*****	4,17 ± 1,47	2,50 ± 1,64	8,63 ± 3,77*****	5,65 ± 1,93	3,99 ± 1,88
MN+P	0,67 ± 1,21	4,49 ± 1,52*****	1,33 ± 1,51	1,00 ± 1,09	0,99 ± 0,61	0,83 ± 0,98	1,17 ± 1,60	1,00 ± 1,55	0,33 ± 0,82	1,66 ± 1,02	0,33 ± 0,51
MN+B+P	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0 ± 0	0 ± 0	0,17 ± 0,41	0,16 ± 0,40	0,33 ± 0,51
Total de alterações compostas	4,33 ± 1,37	13,48 ± 5,75*****	7,32 ± 3,01	4,99 ± 2,76	6,46 ± 1,97	8,80 ± 2,16	5,83 ± 2,23	3,49 ± 1,23	11,95 ± 3,94*****	8,30 ± 4,29	6,14 ± 2,81

*valor estatisticamente significativo com relação ao CN ($p<0,05$). CN: controle negativo; CP: controle positivo; LEP: solubilizado de lodo de esgoto sem nenhuma mistura; LE+S: solubilizado de lodo misturado com solo; LE+S+CA: solubilizado de lodo misturado com solo e casca de arroz. T0: amostras iniciais (antes do início da biorremediação); T1: amostras após 3 meses de biorremediação; T2: amostras após 6 meses de biorremediação. MN: micronúcleo; P: ponte; B: broto.

4 Conclusão:

As células HepG2 se mostram sensíveis aos contaminantes presentes no LE, caracterizando um bom sistema teste para estudos com esse resíduo.

Os períodos de biorremediação para as amostras de LE sem misturas (LEP) não foram eficientes para a diminuição da toxicidade do lodo estudado, constatando que o mesmo não deve ser disposto no ambiente sem um tratamento prévio.

Quando o LE foi misturado ao solo e casca de arroz, não foram identificados efeitos genotóxicos significativos para essas amostras (LE+S e LE+S+CA), em nenhum período de biorremediação estudado, mostrando que as misturas foram importantes para a diminuição da toxicidade do lodo estudado.

Pelo ensaio realizado, esse estudo demonstrou a importância do monitoramento do LE, ao longo do tempo, por meio de ensaios biológicos, além da relevância da busca de novas metodologias na remediação de lodos de esgotos.

Referências

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

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

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

BONOMO, M.M.; MOROZESK, M.; DUARTE, I.D.; ROCHA, L.D.; FERNANDES, M.N.; MATSUMOTO, S.T. Sewage sludge hazardous assessment: chemical evaluation and cytological effects in CHO-k1 cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, p.11069-11075, 2016.

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

BRUSICK, D.J**. Principles of Genetic Toxicology**, New York: Plenum Press, 1987. 284 p.

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

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

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

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

EL FELS, L.; HAFIDI, M.; SILVESTRE, J.; KALLERHOFF, J.; MERLINA, G.; PINELLI, E. Efficiency of co-composting process to remove genotoxicity from sewage sludge contaminated with hexavalent chromium. **Ecological Engineering,** v. 82, p. 355-360, 2015.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species - assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere,** v.40, p.1189-1195, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. **Mutation Research**, v. 600, p. 58-66, 2006.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature Protocols**, v.2, n.5, 2007.

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

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1680-1686, 2009.

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

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

HAMDI,H.; BENZARTI,S.; MANUSADZˇIANAS,L.; AOYAMA,I.; JEDIDID,N. Soil bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology Biochemistry**, v.39, p.1926–1935, 2007.

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

HOPKE, P. K.; PLEWA, M.J.; JOHNSTON, J.B.; WEAVER, D.; WOOD, S.G. Multitechnique screening of chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity**, Environmental Science and Technology,** v.16, p.140–147, 1982.

KAPANEN, A.; VIKMAN, M.; RAJASÄRKKÄ, J.; VIRTA, M.; ITÄVAARA, M. Biotests for environmental quality assessment of composted sewage sludge. **Waste Management**, v.33, p.1451– 1460, 2013.

LAJMANOVICH, R., C. et al. Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in tadpoles of the common toad (*Rhinella arenarum*) treated with the herbicides Liberty and glufosinate-ammonium. **Mutation Research**, 2014.

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2148-2155, 2011.

LIU, J.; SONG, E.; LIU, L.; MA, X.; TIAN, X.; DONG, H.; SONG, Y. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v.26, p.841–8, 2012.

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

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 20, p. 4334-4340, 2010.

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

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. 225f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: biologia celular e molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Rio Claro, 2013b.

MAZZEO, D.E.C; VENTURA-CAMARGO, B.C; SOMMAGGIO, L.R.D; MARIN-MORALES, M.A. Endpoints and bioassays to asses bioremediation efficiency of contaminated soils. In: **Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects.** Editors: Jesús Bernardino Velázquez-Fernández et al. Nova Science Plublishers, 2014.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEJA-JARQUÍN, C.; ZAPARA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues**. Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 165-175, 2004.

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

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

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

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 Mocrobiology**, v.38, 373-377p, 2004.

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

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

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

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

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

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

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

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

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes**. Biodegradation**, 2011.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental international,** v.26, p.409-411, 2001.

VRAL, A.; FENECH, M.; THIERENS, H. The micronucleus assay as a biological dosimeter of in vivo ionising radiation exposure**. Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 11-17, 2011.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As amostras de solo que receberam LE biorremediados, para o cultivo da *L. sativa* (alface), apresentaram uma melhora das suas características químicas, observada pelas análises de fertilidade, quando comparadas às características do solo na ausência desses compostos;

Houve um aumento das biomassas secas (folhas, caule e raiz) dos espécimes de *L. sativa* que foram cultivadas com os compostos do LE, demonstrando que os compostos biorremediados podem ser utilizados como biofertilizante;

Os extratos aquosos da amostra LEP (T0) apresentaram efeitos tóxicos e fititóxicos, e as amostras diluídas de LEP (T1 e T2) mostram efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos para o organismo teste *A. cepa*;

As amostras de LEP (sem bioestimulação) induziu efeitos genotóxicos nas células HepG2, para todos os períodos avaliados. Já as células expostas aos solubilizados de LE+S e LE+S+CA não foram observados efeitos significativos;

A análise microbiológica apresentou 18 gêneros de bactérias e 4 gêneros de fungos, os quais variaram ao longo do processo de biorremediação, bem como nas diferentes amostras. Este ensaio também revelou uma predominância de bactérias aeróbias para todos os períodos e amostras testados;

Apesar dos testes agronômicos e de desenvolvimento da alface mostrarem uma melhora na fertilidade dos solos que receberam o LEP, os ensaios ecotoxicológicos, mostraram que a utilização do LE sem misturas pode apresentar riscos aos organismos expostos;

Houve uma melhora na detoxificação do LE, quando o mesmo foi misturado com casca de arroz e solo, já que para essas misturas (LE+S e LE+S+CA) não foram observados efeitos tóxicos sobre os sistemas teste utilizados;

Uma vez que foram registrados efeitos tóxicos para os extratos aquosos da amostra de LEP, pode-se concluir que os contaminantes presentes neste material são hidrossolúveis, e que se o LE sem tratamento for disposto no ambiente, poderá contaminar recursos hídricos adjacentes, além do próprio solo receptor;

As análises biológicas demonstraram ser um instrumento importante para a avaliação ecotoxicológica de amostras de LE submetidas a processos de

biorremediação;

Devido aos resultados obtidos nesse trabalho, acreditamos que o LE sem nenhum tratamento prévio não deve ser disponibilizado em solos agrícolas, já que o mesmo, após 6 meses de biorremediação ainda apresentou efeitos tóxicos aos sistemas testes empregados;

Com relação às amostras bioestimuladas, a mistura com solo e casca de arroz parece ter sido benéfica na otimização do processo de biorremediação, pois reduziu de forma significativa a indução de danos sobre nos sistemas testes utilizados. Esse resultado indica que esses agentes devem ser incorporados ao LE, a fim de garantir uma maior segurança na utilização do LE como fertilizante de solos agrícolas;

A tecnologia de bioestimulação aqui proposta parece ser um método promissor a ser aplicado na detoxificação do LE, pois, além de seu baixo custo, mostrou ser bastante eficiente na diminuição de potencial tóxico do LE, contribuindo, dessa forma, para um melhor aproveitamento deste resíduo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEITA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004**: Classificação de resíduos sólidos.** Rio de Janeiro, 2004.

ADRIANO, D.; CHANG, A.; PRATT, P.; SHARPLESS, R. Effect of soil application of dairy manure on germination and emergence of some selected crops. **Journal of Environmental Quality**, v.2, p. 396-399, 1973.

ALMEIDA, V. C. de; LENZI, E.; BORTOTTI-FAVERO, L. O.; LUCHESE, E. B. Avaliação do teor de alguns metais e de nutrientes de lodos de estações de tratamento de Maringá. **Acta Scientiarum**, v. 20, p. 419-425, 1998.

ALONSO, E.; CALLEJÓN, M.; JIMÉNEZ, J.C.; TERNERO, M. Heavy metal extractable forms in sludge from wastewater treatment plants. **Chemosphere**, v.47, p.765-775, 2002.

ANDREOLI, C.V.; SPERLING, M.V.; FERNANDES, F. **Princípios do tratamento biológico de águas residuais**. Curitiba: FCO, 2004. v. 6

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

BACKES, C.; LIMA, C. P.; FERNANDES, D. M.; GODOY, L. J. G.; KIIHL, T. A. M.; VILLAS BÔAS, R. L. Efeito do lodo de esgoto e nitrogênio na nutrição e desenvolvimento inicial da mamoneira. **Revista Biosciência Journal**, Uberlândia, v. 25, n. 1, p. 90-98, 2009.

BARNETO, A. G.; CARMONA, J. A.; ALFONSO, J. E. M.; BLANCO, J. D. Kinetic models based in biomass components for the combustion and pyrolysis of sewage sludge and its compost. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**, v. 86, p. 108-114, 2009.

BERTONCINI, E. I.; MATTIAZZO, M. E. Lixiviação de metais pesados em Latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Revista Brassileria de Ciência do Solo**, v.23, p.737-744, 1999.

BETIOL, W.; CAMARGO, O.A. Lodo de esgoto na agricultura: potencial de uso e problemas. **TEC Hoje**, Belo Horizonte, p. 1-4, 2007.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Lodo de esgoto:** impactos ambientais na agricultura. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. 394p.

BEVACQUA, R.F.; MELLANO, V.J. **Sewage sludge compost's cumulative effects on crop grownth and soil properties. Compost Science e**

Utilization, 1993.

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.

BRAGUGLIA, C.; PALERM, J. Pollutants in Urban Wastewater and Sewage Sludge. **European Commission. Directorate-General Environment,** 2001.

BRASIL. Decreto-Lei n. 152, de 19 de junho de 1997. Dispõe sobre recolha, tratamento e descarga de águas residuais no ambiente aquático. **Diário da República**, Brasília, n. 139, I-série A, p. 2959, 1997.

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

BRUSICK, D.J. **Principles of Genetic Toxicology**. New York: Plenum Press, 1987. 284 p.

BUSHRA ATEEQ, M.; ABUL FARAH, M.; NIAMAT ALI, W. A. Clastogenicity of pentachlorophenol, 2,4-D and butachlor evaluated by Allium root tip test. **Mutation Research**, v. 514, p. 105-113, 2002.

CARDOZO, T. R; ROSA D. P.; FEIDEN, I. R.; ROCHA, J. A. V.; OLIVEIRA, N. C. D.; PEREIRA, T. S.; PASTORIZA, T. F.; MARQUES, D. M.; LEMOS, C. T.; TERRA, N. R.; VARGAS, V. M. F. Genotoxicity and toxicity assessment in urban hydrographic basins. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 603, p. 83–96, 2006.

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

CARPINSKI, M.; SANTOS, R.F; ROSA, H.A.; BASSEGIO, D.; SILVEIRA, L.; TOMASSONI, F. Sensibilidade da alface americana (lactuca sativa) sob nível freático. **Acta Iguazu**, v.2, p.55-64, 2013.

CARVALHO, A. R.; OLIVEIRA, M. V. C. **Princípios básicos do saneamento do meio**. 10 ed. São Paulo: Senac São Paulo, 2010. 400 p.

CARVALHO, T. U. Cultura de células animais. In: BENCHIMOL, M. (Org.). **Métodos de estudo da célula**. Rio de Janeiro: FENORTE/UENF, 1996. Cap.2, p.45-58.

CESARO, A.; BELGIORNO, V.; GUIDA, M. Compost from organic solid waste: Quality assessment and European regulations for its sustainable use**.**

Resources, Conservation and Recycling, v. 94, p.72-79, 2015.

CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C. S. Assesment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water Air Soil Pollut**, v. 224, p. 1523-1536, 2013.

CHRISTOFOLETTI, C. A; FRANCISCO, A.; FONTANETTI, C. S. Biosolid soil application: toxicity tests under laboratory conditions. **Applied and Environmental Soil Science**, p. 1-9, 2012.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente (Brasil). **Resoluções do Conama:** resoluções vigentes publicadas entre setembro e 1984 e janeiro de 2012. Brasília: MMA, 2012. 1126 p.

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.

COSCIONE, A. R.; PIRES, A. M.; NOGUEIRA, T. 2010. **Uso agrícola de lodo de esgoto:** avaliação após a resolução n°. 375 do CONAMA. São Paulo: FEPAF, 2010. 407 p.

COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S. **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**. 1 ed. Vitória: Incaper, 2011.

CROUAU, Y.; GISCLARD, C.; PEROTTI, P. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isotomidae) in bioassays of waste. **Applied Soil Ecology**, v. 19, p. 65-70, 2002.

DEFELIPO, B. V.; NOGUEIRA, A. V.; LOUDES, E. G.; ALVARES, Z. V. H. Eficiência agronômica do lodo de esgoto proveniente de uma siderurgia. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p. 389-393, 1991.

DÉPORTES, I.; BENOIT-GUYED, J.L.; ZMIROUB, D. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. **Science Total Environmental**, v.172, p. 197–222, 1995.

DOMENE, X.; ALCAÑIZ, J.M.; ANDRÉS, P. Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 549-558, 2008.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species - assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere**, v. 40, p. 1189-1195, 2000.

FARIA, L.C**. Uso do lodo de esgoto (biossólido) como fertilizante em eucaliptos: demanda, potencial e crescimento das árvores e viabilidade econômica.** 2007. 124f. Tese (Doutorado) Escola Superior de Agricultura Luiz

de Queiroz, ESALQ/USP, Piracicaba, 2007. 124f.

FERNANDES, I. J., SANTOS, E. C. A., OLIVEIRA, R., REIS, J.M., CALHEIRO, D., MORAES, C.A.M., MODOLO, R.C. E. Caracterização do resíduo industrial casca de arroz com vistas a sua utilização como biomassa. 6o **Forum Internacional de Ressíduos sólidos**. São José dos Campos. 2015. Disponível em:<http://www.6firs.institutoventuri.org.br/images/trabalhos/T13.pdf>. Acesso em 1 Maio de 2016.

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

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent - trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.72, p. 1680-1686, 2009.

FERREIRA, C.S. **Desenvolvimento do processo de obtenção de filme polimérico a partir de cinza de casca de arroz**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), UFSC, Florianopolis, 2005.

FIA, R.; MATOS, A. T.; AGUIRRE, C. I. Produtividade e concentração de nutrients e metais pesados em milho adubado com doses crescentes de lodo de esgoto caleado. **Engenharia na Agricultura**, v.14, p.39-50, 2006.

FILGUEIRA, F. A. R. **Novo Manual de Olericultura: Agrotecnologia moderna na produção de hortaliças**. Viçosa: UFV, 2000. 402p. editora Agronômica Ceres.

FILGUEIRA, F.A.R. **Novo manual de olericultura: agrotecnologia moderna na produção e comercialização de hortaliças**. 2ª ed., UFV, 2003.

FISKEJÖ, G. The Allium test as a standart in environmental monitoring. **Hereditas**, v.102, p.99-112, 1985.

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.

GARCIA, G. O.; GONÇALVES, I. Z.; MADALÃO, J. C.; NAZÁRIO, A. A.; Bragança, H. N. Características químicas de um solo degradado após aplicação de lodo de esgoto doméstico. **Revista verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável,** v. 4, p. 1-12, 2009.

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C. M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrientes and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 20, p. 6256-6265, 2013.

GRANT, W. F. The present status of higher plane bioassay for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research,** v.310, p.175-185, 1994.

GRAY, N. F. Sludge treatment and disposal. In: GRAY, N. F. **Water technology an introduction for environmental scientists and engineers**. 3° ed. Elsevier, 2010. p. 645-685.

GUEDES, M. C.; ANDRADE, C. A. de; POGGIANI, F. &MATIAZZO, M. E. Propriedades químicas do solo e nutrição do eucalipto em função da aplicação de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 30, p. 267-280, 2006.

HAMDI,H.; BENZARTI,S.; MANUSADZˇIANAS,L.; AOYAMA,I.; JEDIDID,N. Soil bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biology Biochemistry**, v.39, p.1926–1935, 2007

HARGREAVES, J.C.; ADL, M.S.; WARMAN, P.R. A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.123, p. 1–14, 2008.

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

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

HARTMANN, H.; AHRING, B.K. Strategies for the anaerobic digestion of the organic fraction of municipal solid waste: an overview. **Water Science Technology**., v.53, p.7–22, 2006.

HERNÁNDEZ, T.; MORENO, J.L.; COSTA, F. Influence of sewage sludge application on crop yields in heavy metal availability. **Soil Science and Plant Nutrition**, v. 37, p. 201-202, 1991.

HOEKSTRA, N.J.; BOSKER, T.; LANTINGA, E.A. Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.). **Agriculture, Ecosystems and Environment.**, v.93, p. 189-196, 2002.

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.

HOUSTON, D.F. **Rice, chemistry and technology**. American Association of

Cereal Chemical. St. Paul. Minnesota, USA, p. 301-351, 1972.

IQBAL, M.K.; SHAFIQ, T.; HUSSAIN, A.; AHMED, K. Effect of enrichment on chemical properties of MSW compost. **Bioresource Technology**, v.101, p. 5969–5977, 2010.

KATAYAMA, M. Nutrição e Adubação de Alface, Chicória e Almeirão. In: FERREIRA, M.E.; CASTELLANE, P.D.; CRUZ, M.C.P.da. **Nutrição e adubação de Hortaliças**. Piracicaba: Potafos, 1993. p. 141 – 148.

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

KHAN, S.; WANG, N.; REID, B. J.; FREDDO, A.; CAI, C. Reduced bioaccumulation of PAHs by *Lactuca satuva* L. grown in contaminated soil amended with sewage sludge and sewage sludge derived biochar. **Environmental Pollution**, v. 175, p. 64-68, 2013.

KÚRAS, 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 A*llium* test induced by barck water extract of Uncaria tomentosa (Willd) DC. **Chemosphere**, Oxford, v.107, p.211-221, 2006.

LEMAINSKI, J.; SILVA, J.E. da. Avaliação agronômica e econômica da aplicação de biossólido na produção de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, p.1477-1484, 2006.

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

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

LEME, D.M.; GRUMMT, T.; HEINZE, R.; SEHR, A.; SKERSWETAT, M.; MARCHI, M.R.R.; MACHADO, M.C.; OLIVEIRA, D.P.; MARIN-MORALES, M.A. Cytotoxicity of water-soluble fraction from biodiesel and its diesel blends to human cell lines. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.2148-2155, 2011.

LEMOS M, VAN GESTEL C, SOARES A. Endocrine disruption in a terrestrial isopod under exposure to bisphenol A and vinclozolin. **Journal of Soils and Sediments**, v.9, p.492–500, 2009.

LIU, J.; SONG, E.; LIU, L.; MA, X.; TIAN, X.; DONG, H.; SONG, Y. Polychlorinated biphenyl quinone metabolites lead to oxidative stress in HepG2 cells and the protective role of dihydrolipoic acid. **Toxicology in Vitro**, v.26,

p.841–8, 2012.

LOBO, T. F.; FILHO, H. G. Níveis de lodo de esgoto na produtividade de girassol. R. C. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition.**, v. 7, p. 16-25, 2007.

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.

LOURENÇO, R.S. **Utilização de lodo de esgoto aeróbio e calado em florestas**. Embrapa- PA, p.1-3, 1997 (Comunicado técnico, 18).

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. **International Biodeterioration Biodegradation**, v.55, p.1-8, 2005.

MARCIANO et al. Efeito do lodo de esgoto e do compos-to de lixo urbano sobre a condutividade hidráulica de um Latossolo Amarelo saturado e não saturado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.25, n.1, p.1-9, 2001.

MARIA, I. C.; KOCSSI, M. A.; DECHEN, S. C. F. Agregação do solo em área que recebeu lodo de esgoto. **Solos e Nutrição de plantas**, Bragantia, v. 66, p. 291-298, 2007.

MARTINS, M. N. C.; SOUZA, V. V.; SOUZA, T. S. Genotoxic and mutagenic effets of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 489-496, 2016.

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

MARTINS, M.N.C.; SOUZA, V.V.; SOUZA, T.S. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p.489-496, 2016a.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTII, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MAYER, F. D.; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J. E. Gestão energetica, econômica e Ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindúsrias de arroz, In: **SIMPÓSIO DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO, XIII.**, 2006, Bauru. Anais...Bauru: Faculdade de engenharia de Bauru, UNESP.

MAZIVIERO, G. T. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* e *Tradescantia pallida***. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biologia Celular e Molecular) – Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2011.

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. 225f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: biologia celular e molecular) – Universidade Estadual Paulista Júlio De Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

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

MAZZEO, D. E. C.; VENTURA, B. C.; SOMMAGGIO, L.R.D.; MARIN-MORALES, M. A. Endpoints and Bioassays to Assess Bioremediation Efficiency of Contaminated Soils. In: Jesús Bernardino Velázquez-Fernández; Saé Muñiz-Hernández. (Org.). **Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects**. 1ed.New York: Nova Science Publishers, 2014, v. 1, p. 243-268.

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

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

MAZZEO, D.E.C.; LEVY,C.E.; ANGELIS,D.F.;MARIN-MORALES,M.A. BTEX biodegration by bactéria from effluents of petroleum refinary. **Science of the Total Environment**, n.408, p. 4334-4340, 2010.

MCGEEHAN, S. L. Impact of waste materials and organic amendments on soil properties and vegetative performance. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2012, p. 1-11, 2012.

MENA, E.; GARRIDO, A.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Bioremediation of sewage sludge by composting. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 34, p. 957-971, 2003.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 66, p. 57-64, 2007.

MINGOT, J.L.; OBRADOR, A.; ÁLVAREZ, J.M.; RICO, M.I. Acid extraction and sequential fractionation of heavy metals in water treatment sludges. **Environ. Technol**, v.16, p. 869-876, 1995.

MOLINA-BARAHONA, L.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R.; HERNÁNDEZ-VELASCO, M.; VEJA-JARQUÍN, C.; ZAPARA-PÉREZ, O.; MENDOZA-CANTÚ, A.; ALBORES, A. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. **Applied Soil Ecology**, v. 27, p. 165-175, 2004.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

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

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

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

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

OLESZCZUK, P.; HOLLERT, H. Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. **Chemosphere**, v.83, p. 502–509, 2011.

OLIVEIRA, F.C., MELO, W.J.; PEREIRA, G.T.; MELO, V.P.; MELO, G.M.P.H. Heavy metals in oxisoils omended with biosolids and cropped with maize in a long-term experiment. **Scientia Agricola**, v. 62, n.4, p.381-388, 2005.

PANDARD, P.; DEVILLERS, J.; CHARISSOU, A. M.; POULSEN, V.; JOURDAIN, M.J.; FÉRARD, J. F.; GRAND, C.; BISPO, A. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. **Science of the Total Environment**, v. 363, p. 114-125, 2006.

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.

PATRA, M.; SHARMA, A. Relative efficacy of *Allium cepa* and *Allium sativum* in anaphase-telophase test screening metal genotoxicity. **Biologia**, v.57, p.409-414, 2002.

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.

PEGORINI, E.S.; LARA, A.I.; FERREIRA, C.C.; ANDREOLI, E.S.; IHLENFELD, R.G.K. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. Curitiba: SANEPAR, 1999. 92p.

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 Mocrobiology**, v.38, 373-377p, 2004.

PHILLIPS, T.M.; LIU, D.; SEECH, A.G.; LEE, H.; TREVORS, J.T. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests**. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v.24, p.132–139, 2000.

PLAZA, C.; SENESI, N.; POLO, A.; BRUNETTI, G.; GARCIA-GIL, J. C.; D'ORAZIO, V. Soil fulvic acid properties as a means to assess the use of pig slurry amendment. **Soil Tillage Res**., v. 74, p. 179-190, 2003.

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

QUINTANA, N. R. G.; CARMO, M. S. do; MELO, W. J. de. Lodo de esgoto como fertilizante: produtividade agrícola e rentabilidade econômica. **Nucleus**, v. 8, n. 1, 2011.

QUINZANI-JORDÃO, B. Ciclo celular em meristemos. La formatión de intercâmbios entre cromátidas hermanas. 1978. 276f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid.

RAMÍREZ, W.A.; DOMENE, X.; ANDRÉS, P.; ALCAÑIS. Phytotoxic effects of sewage sludge extracts on the germination of three plant species. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 834-844, 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. A modified *Allium* test as a tool in the screening of genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.118, p.49-53, 1993.

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

RIBEIRINHO, V. S.; MELO, W. J. de; SILVA, D. H.; FIGUEIREDO, L. A.; MELO, G. M. P. de. 2012. Fertilidade do solo, estado nutricional e produtividade de girassol, em função da aplicação de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 166-173, 2012.

RODRIGUES, G.S. **Bioensaios de toxicidade genética com plantas**

superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, São Paulo, 56p., 1999.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

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

SABESP. **Tratamento de esgotos**. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>. Acesso em: 04/04/2016.

SILVA, F. C.; BOARETTO, A. E.; ABREU JUNIOR, C. H.; BERTON, R. S.; BASSO, L. C.; BARBIERI, V. Impactos da aplicação de lodo de esgoto na cultura da cana-de-açúcar e no ambiente. **LOS Environmental**, v. 10, n. 1, 2010.

SILVÉRIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, do material orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. **O Agronômico**, v. 56, p. 5-8, 2004.

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

SKIPPER, H.D. **Bioremediation of contaminated soils**. In: Sylvia,D.M. (Ed.), Principles and Applications of Soil Microbiology.Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999, p. 469–481.

SNIS – Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento. **Diagnóstico dos serviços de água e esgoto** – 2013. Ministério das Cidades – Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental, Brasília, 2014. 616p.

SOBRINHO, P. A. Tratamento de esgoto e produção de lodo. In: **Biossólidos na agricultura.** São Paulo: SABESP, 2001. p. 7-40.

SOMMAGGIO, L. R. D. **Avaliação da atenuação da toxicidade de lodo de esgoto por associação com resíduo vegetal da indústria sucro-alcooleira**. Trabalho de conclusão de curso (Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013.

SOUZA, J. L. de; RESENDE, P. **Manual de Horticultura orgânica.** Viçosa: Aprenda Fácil, 2003. 564 p.

SOUZA, P.A.; NEGREIROS, M.Z.; MENEZES, J.B.; BEZERRA NETO, F.; SOUZA, G.L.F.M.; CARNEIRO, C.R; QUEIROGA, R.C.F. Características químicas de alface cultivada sob efeito residual da adubação com composto

orgânico. **Horticultura Brasileira,** Brasília, v. 23, n.3, p. 754-757, 2005.

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

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

TAHIR, M.; ARSHAD, M.; NAVEED, M.; ZAHIR, Z.A.; SHAHAROONA, B.; AHMAD, R. Enrichment of recycled organic waste with N fertilizer and PGPR containing ACC-deaminase for improving growth and yield of tomato. **Soil Environmental**, v.25, p.105–112, 2006.

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

THORNTON, I.; BUTLER, D.; DOCX, P.; HESSION, M.; MAKROPOULOS, C.; MCMULLEN, M.; NIEUWENHUIJSEN, M.; PITMAN, A.; RAUTIU, R.; SAWYER, R.; SMITH, S.; WHITE, P.; WILDERER, P.; PARIS, S.; MARANI, D.; **Pollutants in Urban Wastewater and Sewage Sludge**. European Commission. Directorate-General Environment, 2001.

TRANNIN, I. C. B; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. Avaliação agronômica de um biossólido industrial para a cultura do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 3, p. 261-269, 2005.

TRIGUEIRO, R. M.; GUERRINI, L. A. Uso de biossólidos como substratos para produção de mudas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n.64, p.150-162, 2003.

TSUTIYA, M. T. 2001. **Alternativas de disposição final de biossólidos.** In: TSUTIYA, M.T. et al. (Ed.). **Biossólidos na Agricultura.** São Paulo: SABESP, 2001. p.133-180.

TYAGI, M.; FONSECA, M.M.R.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes**. Biodegradation**, 2011.

UNIÃO EUROPÉIA, **Relatório sobre a aplicação da estratégia temática do solo e atividades em curso**. Bruxelles, 2012.

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

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental international** v.26, p.409-411, 2001.

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

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

WESTERINK, W.M.A.; STEVENSON, J.C.R.; HORBACH, G.J.; SCHOONEN, W.G.E.J. The development of RAD51C, cystatin A, p53 and Nrf2 luciferase-reporter assays in metabolically competent HepG2 cells for the assessment of mechanism-based genotoxicity and of oxidative stress in the early research phase of drug development. **Mutation Reseach**, v.696, p.21-40, 2010.

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research**, v. 567, p. 227–345, 2004.

WONG, J.W.C.; LI, K.; FANG, M.; SU, D.C. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. **Environment International.**, v.27, p. 373-380, 2001.

YALLOUZ, A. V.; CESAR, R. G.; EGLER, S. G. Potential application of a semi-quantitative method for mercury determination in soils, sediments and gold mining residues. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 420-433, 2008.

YU, J. The foreground analysis of sewage sludge agriculture application in China. **Advance Materials Research**, v. 335-336, p. 1316-1320, 2011.

ZUFIAURRE, R.; OLIVAR, A.; CHAMORRO, P.; NERÍN, C.; CALLIZO, A. Speciation of metals in sewage sludge for agricultural uses. **Analyst**, v. 123, p. 255-259, 1998.