

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/01/2017.

---

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 Christofolletti 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  
S697a      Sommaggio, Lais Roberta Deroldo  
                 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 Christofolletti Mazzeo

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

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

**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**

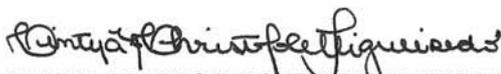
**AUTORA: LAÍS ROBERTA DEROLDO SOMMAGGIO**

**ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

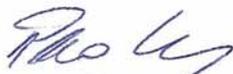
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:



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



Profa. Dra. CINTYA APARECIDA CHRISTOFOLETTI DE FIGUEIREDO  
Fundação Herminio 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 condicionante 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, conseqüentemente, 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 agrônômico 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 agrônômico 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 agrônômico, 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 decomposition 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 addition of rice hulls, on the SS decontamination, by ecotoxicological assays with *A. cepa* and HepG2 cell culture. Additionally, 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 <sup>3</sup>	Metros cúbicos
mg	Miligramas
mL	Mililitros
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 <i>Allium cepa</i> .....	22
3.6	Cultura de células de mamíferos .....	23
3.7	Potencial agrônômico .....	24
3.8	Caracterização e avaliação do uso de <i>Lactuca sativa</i> 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 <i>Allium cepa</i> .....	28
4.5	Cultura de células de mamífero .....	29
4.5.1	Teste do MTT (brometo tiazol 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 agrônômico do LE e suas associações em <i>Lactuca sativa</i> .....	32
4.7.1	Análises Biométricas de <i>L. sativa</i> .....	32
4.7.2	Análise de fertilidade das amostras .....	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	34
	Artigo 1. Avaliação da produtividade de <i>Lactuca sativa</i> tratada com amostras de lodo de esgoto biorremediado.....	35
	Artigo 2. Avaliação dos efeitos fitotóxicos e toxicogênicos do lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de ensaios com <i>Allium cepa</i> .....	50
	Artigo 3. Avaliação da potencialidade 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 (HERNÁNDEZ 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 empregadas 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.

## 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 fitotóxicos, 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 agrônômicos 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 BRASILEIRA 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 Management** 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 Brasileira 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 growth 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 de 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 nº. 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 agrônômica 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.; ALCANIZ, 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 Resíduos 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 polyploidized 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, Florianópolis, 2005.

FIA, R.; MATOS, A. T.; AGUIRRE, C. I. Produtividade e concentração de nutrientes e metais pesados em milho adubado com doses crescentes de lodo de esgoto caledo. **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<sup>o</sup> 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.; MANUSADZ'IANAS, 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.

HARMSSEN, 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. Butterworth-Hetmann Publishing, 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 sativa* 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 *Allium* 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 agrônômica 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 composto 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 effects 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.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, n.1, p.148-158, 2006.

MAYER, F. D.; HOFFMANN, R.; RUPPENTHAL, J. E. Gestão energética, econômica e Ambiental do resíduo casca de arroz em pequenas e médias agroindústrias 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 biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **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 physicochemical 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 oxisols amended 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 microorganisms from sugarcane bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. **Letter in Applied Microbiology**, 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.; NAŁĘCZ-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 meristemas. La formación de intercambios entre cromátidas hermanas. 1978. 276f. Tese (Doutorado), Universidade de Complutense, Madrid.

RAMÍREZ, W.A.; DOMENE, X.; ANDRÉS, P.; ALCANÍS. 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?secaold=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 Agrônômico**, 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 (Bacharel 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 bio sólido 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 bio sólidos 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 bio sólidos**. In: TSUTIYA, M.T. et al. (Ed.). **Bio sólidos 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 Research**, 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.