

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E MELHORAMENTO

**MARIA NILZA CORRÊA MARTINS**

**ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE LODO DE  
ESGOTO EM *Allium cepa***

ALEGRE-ES

2015

MARIA NILZA CORRÊA MARTINS

**ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE LODO DE  
ESGOTO EM *Allium cepa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiana da Silva Souza

ALEGRE-ES

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)

(Biblioteca Setorial de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

---

Martins, Maria Nilza Corrêa, 1981-

M386a Análise do potencial genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto em *Allium cepa*/Maria Nilza Corrêa Martins. – 2015.

79f. : il.

Orientador: Tatiana da Silva Souza.

Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Agrárias.

1. Cebola. 2. Mutagenicidade. 3. Metais pesados. 4. Lodo residual. 5. Genotoxicidade. 6. Citotoxicidade I. Souza, Tatiana da Silva. II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências Agrárias. III. Título.

CDU: 575:631.5:

---

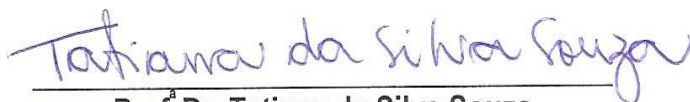
**MARIA NILZA CORRÊA MARTINS**

**ANÁLISE DO POTENCIAL GENOTÓXICO E MUTAGÊNICO DE LODO DE  
ESGOTO EM *Allium cepa***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Genética e Melhoramento.

Aprovada em 26 de Fevereiro de 2014.

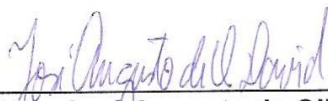
**COMISSÃO EXAMINADORA**



**Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana da Silva Souza**  
Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento-UFES  
Orientadora



**Prof<sup>o</sup> Dr. José Carlos Lopes**  
Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal-UFES  
Examinador Externo



**Prof<sup>o</sup> Dr. José Augusto de Oliveira David**  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias-UFES  
Examinador Externo

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de estar vivendo esse momento único da minha vida, me sustentando e me guardando a todo o momento.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Espírito Santo, que me proporcionou conquistar esse sonho e o desenvolvimento da pesquisa.

Aos meus pais, Ernani Martins e Nilzete Corrêa Martins pelo apoio, força, amor, dedicação e orações, para que eu nunca desistisse de lutar pelo meu sonho.

À minha família que me apoiou a cada momento nas mudanças de humor, na hora do desespero e nas alegrias.

Ao meu marido, meu companheiro de todas as horas, Renato Cesar Costa da Silva, que nunca me deixou desanimar. Por todas as madrugadas que me levava para embarcar no ônibus, na chuva, no escuro e sempre teve uma palavra de apoio. Esse que está conquistando esse sonho junto comigo.

À minha orientadora Professora Dr<sup>a</sup> Tatiana da Silva Souza, por tudo que fez por mim nesse período do mestrado. Por acreditar no meu sonho, mesmo sabendo da minha dificuldade pessoal e profissional, me proporcionou adquirir novos conhecimentos científicos, acreditando que poderia ser capaz. Obrigada por todo apoio, críticas construtivas e palavras de incentivo. Meu eterno agradecimento.

Aos Professores Doutores do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento que me proporcionaram um crescimento educacional, pessoal e profissional.

Ao Professor Dr. José Carlos Lopes e Professor Dr. José Augusto de Oliveira David, pela prontidão de aceitar ser membro da banca examinadora. Agradeço imensamente.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que estiveram comigo durante todo esse período, acreditando que eu seria capaz de conquistar esse sonho. Em especial Prof<sup>a</sup> Ms. Marcela Lougon, que me ensinou o caminho e incentivou a seguir em frente. Muito obrigada!

À Sabrina Lino Furtado Gonçalves, secretária do PPGM-UFES, que me ajudou a todo o momento. Agradeço imensamente seu apoio.

Aos meus queridos amigos de curso, que mesmo sabendo da minha dificuldade, por trabalhar e estudar, sempre me incentivaram, me deram força e apoio. Agradeço especialmente meu amigo Vinícius Ferreira Moreira, por todo apoio nas coletas e as palavras de incentivo.

Aos amigos do Laboratório de Morfologia, que me acolheram e me ajudaram desde o início do meu trabalho, obrigada por cada sorriso, conversa, apoio e incentivo. Tenho que agradecer especialmente ao Emerson Miranda, que sempre com sorriso me ajudava a todo o momento, ensinando, aconselhando e apoiando durante todo período do meu trabalho. E ao Victor Ventura de Souza, que me ajudou nas análises e nos trabalhos sem medir esforços e sempre carismático. Só tenho que agradecer imensamente.

Ao Allan Rocha de Freitas pelo apoio à pesquisa e pela dedicada atenção.

## RESUMO

O lodo de esgoto pode conter elevados níveis de compostos inorgânicos e orgânicos com propriedades tóxicas, genotóxicas e mutagênicas. Sua utilização em solos agrícolas pode ser estudada pelo comportamento (pelo desenvolvimento e crescimento) relacionando aos efeitos tóxicos desse resíduo em diferentes espécies vegetais. Em uma revisão foi possível obter dados dos efeitos da transferência de contaminantes presentes em solos suplementados com lodo de esgoto para as plantas e das plantas via cadeia alimentar. O organismo teste *Allium cepa* apresenta resposta positiva para analisar esses efeitos, o qual se objetivou estudar a toxicidade genética do lodo de esgoto em *Allium cepa*. O experimento foi conduzido no Laboratório de Morfologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo (CCA-UFES), no município de Alegre, utilizando-se sementes de *Allium cepa* tratadas com lodos provenientes da ETE JM e da ETE M. Os lodos foram analisados quanto às características físico-químicas e biológicas, de acordo com a resolução CONAMA 375/2006. Para a análise de toxicidade nas sementes de *Allium cepa*, foram avaliadas 5.000 células por tratamento de contato direto e solubilizados das amostras e controles. O lodo bruto apresentou resultados físico-químicos dentro dos limites estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006. Somente na análise microbiológica o lodo da ETE JM apresentou limite de coliformes termotolerantes acima do estabelecido pela resolução. Para o teste de potencial de toxicidade o lodo da ETE JM foi fitotóxico para o lodo de esgoto bruto, citotóxica e genotóxica para o lodo de esgoto solubilizado. O lodo bruto da ETE M apresentou potencial genotóxico e mutagênico, enquanto o lodo solubilizado foi citotóxico. O lodo de esgoto com adição de cal apresentou potencial fitotóxico para o lodo bruto, e para o lodo solubilizado apresentou efeito citotóxico e genotóxico. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). Conclui-se que ambos os lodos apresentam potencialidade tóxica, servindo de alerta para a sua utilização em solos agrícolas, que deverá ser monitorada com análises citogenéticas e controle dos elementos tóxicos presentes em sua composição.

Palavra-chave: Mutagenicidade, *Allium cepa*, tratamento de esgoto.

## ABSTRACT

The sewage sludge can contain high levels of inorganic and organic compounds with toxic, genotoxic and mutagenic properties. Its use in agricultural soils can be studied by the behaviour (or by the development and growth) of the different plant species relating to the toxic effects of this residue in different plant species. In a review it was possible to obtain data from the effects of the transfer of contaminants in soils supplemented with sewage sludge for plants and plants via the food chain. An organism test *Allium cepa* shows a positive response to this analysis of toxicity, that aimed to study the genetic toxicity of sewage sludge in *Allium cepa*. The experiment was conducted in the Laboratory of Morphology of the Center for Agricultural Sciences at the Federal University of Espírito Santo (CCA-UFES), in the municipality of Alegre, using seeds of *Allium cepa* treated with sludge from the ETE Jerônimo Monteiro and ETE Mulembá. The sludge were analysed with regard to physico-chemical and biological properties, according to the resolution CONAMA 375/2006. For the analysis of toxicity on the seeds of *Allium cepa*, 5.000 cells per treatment were evaluated by direct contact and trapped the samples and controls. The gross sludge presented physico-chemical results within the limits established by CONAMA resolution 375/2006. Only in the microbiological analysis the sludge of ETE of Jerônimo Monteiro presented fecal coliforms above the limit established by the resolution. For potential toxicity testing the sludge of ETE Jerônimo Monteiro was phytotoxic to raw sewage sludge, cytotoxic and genotoxic for sewage sludge solubilization. The gross sludge of ETE Mulembá presented genotoxic and mutagenic potential, while the sludge solubilized was cytotoxic. The sewage sludge with addition of lime presented potential phytotoxic to raw sludge, and for the sludge solubilized showed genotoxic and cytotoxic effect. The results were expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Statistical analysis was performed using the non-parametric test of Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ). It is concluded that both sludge have toxic potential, serving warning to their use in agricultural soils, which should be monitored with cytogenetic analyses and control of toxic elements present in its composition.

Keyword: Mutagenicity, *Allium cepa*, sewage treatment.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Posição geográfica do Município de Jerônimo Monteiro – ES. Fonte: IBGE (2014).....14
- Figura 2:** A.-B. Estação de Tratamento de Esgoto JM. C. Leito de secagem. D. Área de aterro do lodo desidratado. Fotos: Maria Nilza Corrêa Martins (2013).....15
- Figura 3:** Estação de Tratamento de Esgoto UASB e Biofiltro. Fonte: Silva et al. (2002).....15
- Figura 4:** Posição geográfica dos bairros do município de Vitória – ES atendidos pela ETE Mulembá. Fonte: IBGE (2014)..... 17
- Figura 5:** Etapas do processo de tratamento da ETE M: A. Estação de tratamento; B. Tanque de aeração; C. Tanque de digestão; D. Adensador de lodo; E. Desidratação por centrífuga e F. Lodo desidratado (GOMES; BERNARDINO, 2013).....18
- Figura 6:** Potencial de aplicação de biossólido no Estado do Espírito Santo. Fonte: GEOBASES (2013).....21
- Figura 7:** Percentual das áreas com alto potencial para a disposição do lodo de esgoto, por microrregião, no Estado do Espírito Santo. Fonte: COSTA e COSTA (2011).....22
- Figura 8:** Potencial de aplicação de biossólido no município de Jerônimo Monteiro (ES). Alto: 30,40%, médio: 22,83% e baixo: 46,97%. Fonte: COSTA e COSTA (2011).....22
- Artigo 2**

**Figura 1:** Alterações mitóticas e cromossômicas observadas em *Allium cepa*. A. Micronúcleo (seta) e Anáfase com ponte (cabeça de seta). B. Telófase com ponte (seta). C. Anáfase multipolar (cabeça de seta) e núcleo lobulado (seta). D. Núcleo lobulado (seta). E. Perda cromossômica (seta). F. Aderência cromossômica (seta). G. Anáfase multipolar (cabeça de seta) e aderência cromossômica (seta). H. Célula binucleada (seta). I. Núcleo lobulado (seta), célula multinucleada (cabeça de seta), micronúcleo (seta branca) e metáfase poliplóide (asterisco). J. Micronúcleo (seta). K. Micronúcleo (seta). L. Núcleo lobulado (seta), micronúcleo (seta branca) e aderência cromossômica (cabeça de seta).....60

## LISTA DE TABELAS

**Tabela1.** Análise físico-química e microbiológica das amostras de solo controle e dos lodos da ETE JM e ETE M.....55

**Tabela 2.** Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) em *A. cepa*, após exposição ao lodo de esgoto da ETE JM e da ETE M (ETE M).....58

**Tabela 3.** Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*, após exposição ao lodo de esgoto da ETE JM e da ETE M.....59

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	14
2.1. Estação de Tratamento de Esgoto de Jerônimo Monteiro.....	14
2.2. Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá.....	16
2.2.1. Composição do lodo de esgoto.....	18
2.2.2. Alternativas de disposição final do lodo de esgoto.....	20
2.2.3. Disposição do lodo de esgoto em solos agrícolas: panorama no Espírito Santo.....	21
2.3. Bioensaios de toxicidade genética com <i>A. cepa</i> .....	25
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	27
3.1 Objetivo geral.....	27
3.2 Objetivos específicos.....	27
<b>4. RESULTADOS</b> .....	28
<b>4.1. Artigo 1: Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants</b> .....	29
Abstract.....	31
1. Introduction.....	32
2. Sewage sludge composition.....	32
3. Cytotoxic, mutagenic, and genotoxic effects of sewage sludge on higher plants.....	33
3.1 Toxicity on <i>H. vulgare</i> and <i>Lepidium sativum</i> .....	34
3.2 Point mutation induction and chromosomal aberrations in <i>Zea mays</i> .....	34
3.3. Induction of point mutations and chromosomal aberrations in <i>Vicia faba</i> .....	35
3.4. Induction of somatic mutation in <i>Nicotiana tabacum</i> .....	36
3.5. Induction of chromosomal aberrations in <i>A. cepa</i> .....	36
3.6. Induction of micronuclei in <i>Tradescantia</i> (Trad-MCN).....	37
3.7. Mutagenicity of extracts of plants cultivated in fertilized soil with sewage sludge.....	37

4. Sewage sludge: transference of contaminants from soil to plant, and from plant to animal.....	38
5. Conclusion.....	39
Acknowledgements.....	39
References.....	39
<b>4.2. Artigo 2: Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico por meio de bioensaio com <i>Allium cepa</i>.....</b>	<b>46</b>
Resumo.....	48
Abstract.....	49
1. Introdução.....	50
2. Material e Métodos.....	51
2.1. Material.....	51
2.2. Coleta e análise físico-químicas e microbiológicas das amostras de lodo de esgoto.....	51
2.3. Análise físico-químicas do substrato comercial.....	51
2.4. Solubilização do lodo de esgoto e do substrato comercial.....	52
2.5. Tratamentos.....	52
2.6. Bioensaio com <i>A. cepa</i> .....	53
3. Resultados.....	54
3.1. Análise físico-químicas e microbiológicas das amostras.....	54
3.2. Bioensaio com <i>Allium cepa</i> .....	56
4. Discussão.....	61
5. Conclusões.....	67
6. Referências.....	68
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>72</b>
<b>6. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A produção de lodo de esgoto é uma característica intrínseca dos processos de tratamento de esgoto e tende a um crescimento no mínimo proporcional ao crescimento da população humana (CONAMA 375/2006).

Considerando que apenas 30% da população urbana têm seu esgoto devidamente coletado e tratado, estima-se que a produção de lodo no Brasil esteja entre 150 a 220 mil toneladas de massa seca por ano (PEDROZA et al., 2010). De acordo com Lima et al. (2011) a produção média de lodo gerado na região da Grande Vitória e interior do estado do Espírito Santo é de aproximadamente 350 e 70 toneladas/mês, respectivamente.

Diante da crescente produção, a solução para a disposição final do lodo de esgoto é medida que se impõe com urgência (CONAMA 375/2006). Do ponto de vista ambiental e econômico, o reuso de lodo de esgoto em solos agrícolas é, por muitos, considerado uma alternativa viável, pois esse resíduo é fonte de matéria orgânica e de nutrientes, melhorando assim as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo e, conseqüentemente, a produtividade agrícola (SAITO, 2007).

Quando as características químicas e biológicas do resíduo permitem seu uso de forma benéfica, pode ser denominado bio sólido (HAYNES et al, 2009; LIMA et al., 2011). Contudo, o lodo de esgoto é fonte potencial de substâncias químicas, genotóxicas e mutagênicas, em concentrações nocivas à saúde e ao ambiente (CONAMA 375/2006).

Considerando que as análises físico-químicas exigidas pela legislação não informam sobre os possíveis efeitos tóxicos dos poluentes presentes no lodo de esgoto, bioensaios com vegetais superiores se fazem necessários, pois estes são capazes de detectar substâncias deletérias presentes nas amostras avaliadas, mesmo em baixas concentrações (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

De acordo com pesquisadores do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER) e da Companhia Espírito Santense de Saneamento (CESAN), o estado do Espírito Santo apresenta áreas com potencialidade de aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas (COSTA; COSTA, 2011).

Portanto, diante do exposto, objetivou-se estudar a toxicidade, a genotoxicidade e a mutagenicidade lodo de esgoto em *Allium cepa*.

## 1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Estação de Tratamento de Esgoto de Jerônimo Monteiro

O município de Jerônimo Monteiro (Figura 1) conta com uma população de 11.707 habitantes e uma extensão territorial de 161, 980 km<sup>2</sup>. A cidade está localizada na macrorregião administrativa Sul do Espírito Santo (IBGE, 2014).



Figura 1. Posição geográfica do município de JM - ES. Fonte: IBGE (2014).

O município possui uma ETE (Figura 2) que atende 60% da população local (comunicação pessoal). De acordo com Silva et al.(2002), a ETE JM é do tipo UASB (*Upflow Anaerobic Sludge Blanket*), caracterizando-se por ser compacta, com reatores anaeróbios e aeróbios em série. O lodo de esgoto gerado é disposto em um tanque de secagem e depois aterrado na área da própria estação (comunicação pessoal) (Figura 2 C; D). De acordo com Silva et al. (2002), esta é uma excelente alternativa para áreas urbanas de pequeno e médio porte.



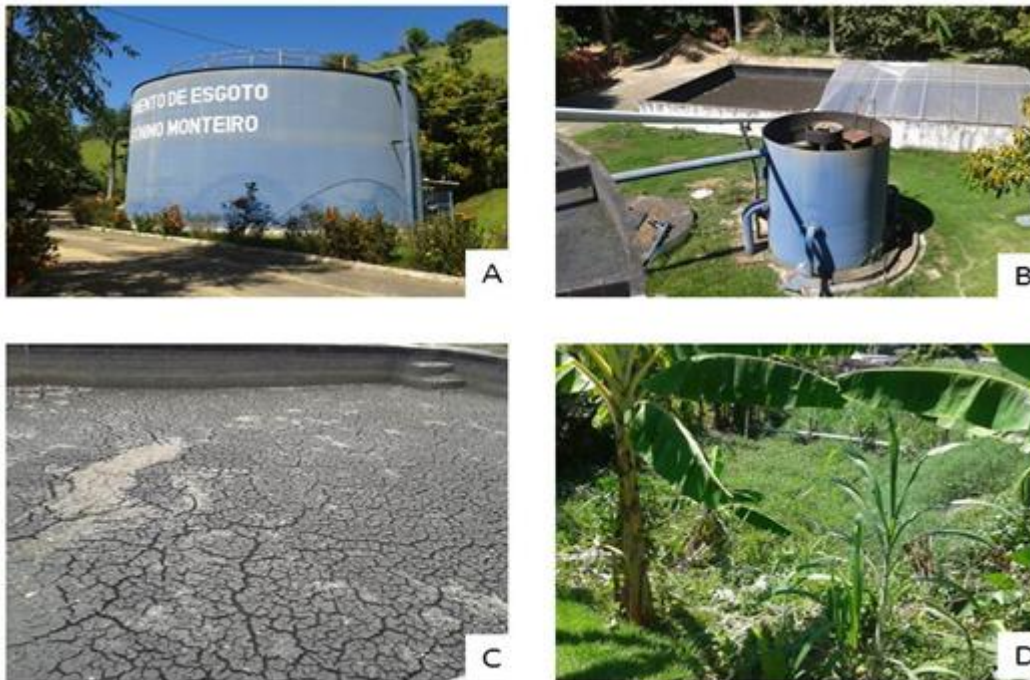


Figura 2. A.-B. Estação de tratamento de esgoto de JM. C. Leito de secagem. D. Área de aterro do lodo desidratado. Fotos: Maria Nilza Corrêa Martins (2013).

Silva et al.(2002) apresentaram um esquema de uma ETE UASB e destacaram as etapas do processo (Figura 3):

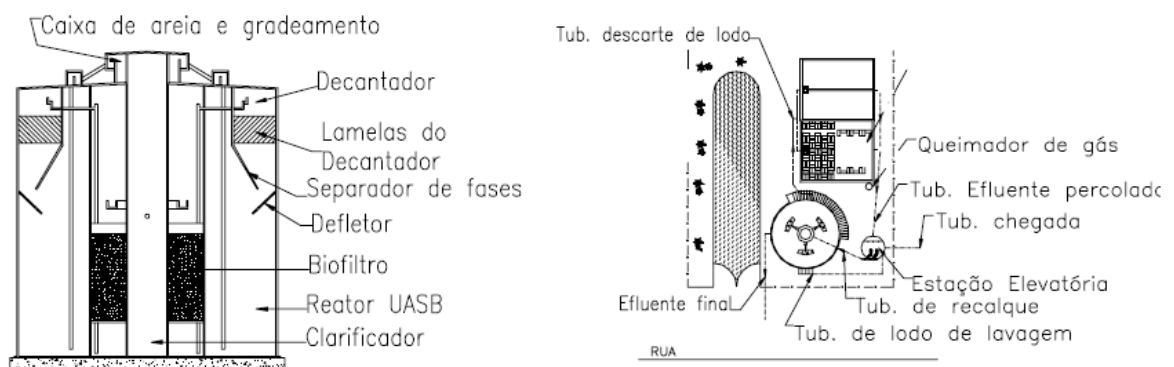


Figura 3. Estação de tratamento de esgoto UASB e Biofiltro. Fonte: Silva et al.(2002).

- O esgoto chega até a estação elevatória, através das redes coletoras, encaminhando o esgoto bruto até a caixa de areia e gradeamento de forma a reter sedimentos maiores e objetos que passam pela tubulação.
- O tratamento do efluente é realizado nos biofiltros aerados submersos, objetivando a remoção de matéria orgânica e sólidos suspensos

remanescentes, de forma a compatibilizar o efluente tratado aos padrões de lançamento fixados pela legislação ambiental.

- c) Os biofiltros possuem um sistema de aeração, no qual uma bomba succiona o efluente, captando o ar nas imediações dos orifícios, e injeta água e ar dissolvido na base dos biofiltros.
- d) O lodo em excesso produzido nos biofiltros é recirculado para o UASB, onde ocorre a digestão e adensamento pela via anaeróbia.
- e) O excesso de lodo produzido no UASB, que apresenta elevado grau de estabilização e adensamento, é descartado por gravidade e disposto em leitos de secagem para desidratação.

## **2.2. Estação de Tratamento de Esgoto Mulembá**

O município de Vitória abrange uma área de 93 km<sup>2</sup>, com uma população de 352.104 habitantes IBGE (2014).

A ETE M (Figura 4), localizada no bairro Joana D'arc, em Vitória, recebe os esgotos sanitários provenientes de parte dos bairros Lourdes, Bento Ferreira, Consolação, Gurigica, Horto, Ilha de Monte Belo, Nazareth e Praia do Canto (figura 4), atendendo aproximadamente 144 mil habitantes (MORAIS, 2008).

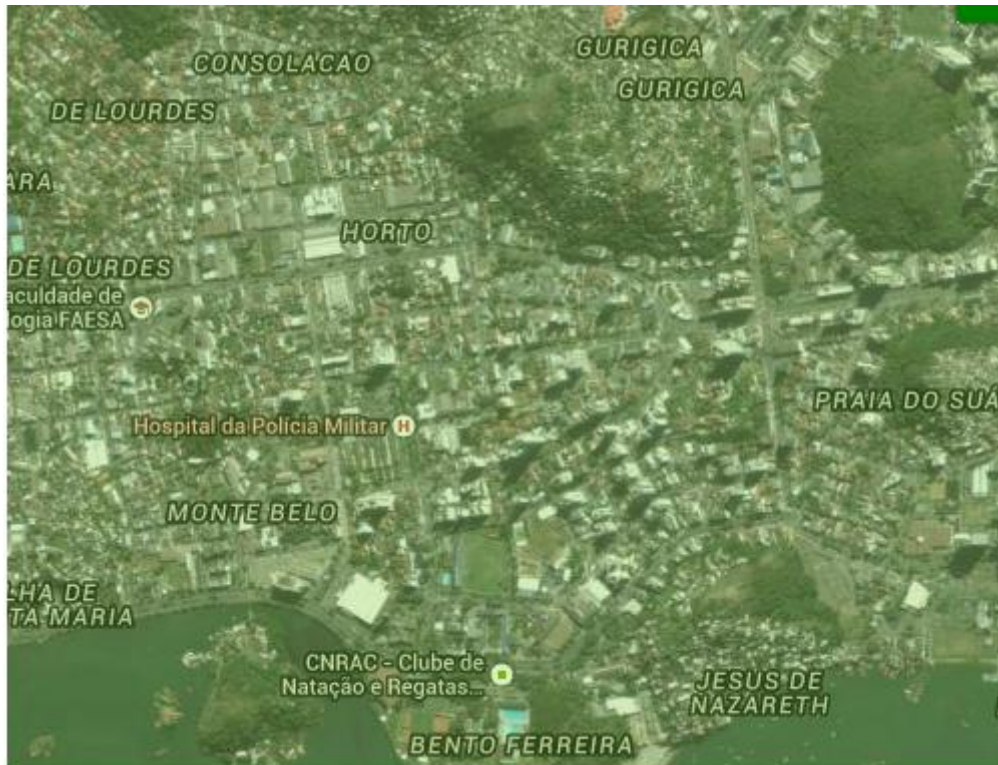


Figura 4. Posição geográfica dos bairros do município de Vitória – ES atendidos pela ETE Mulembá.  
Fonte: IBGE (2014).

A ETE trata esgotos domésticos, pelo processo de lodo ativado no sistema UNITANK. Com base nos cálculos realizados por Gomes e Bernadino (2013), a ETE M tem uma produção média mensal de 52 toneladas de lodo desidratado. De acordo com Lima et al. (2009), as quatro grandes ETEs do Espírito Santo que utilizam o processo de lodo ativado, ETE Araçás (Vila Velha), ETE Mulembá (Vitória), ETE Bandeirantes (Cariacica) e ETE Aeroporto (Guarapari), devem gerar 235 m<sup>3</sup>/dia de lodo até 2023.

De acordo com a CESAN (2013), no tratamento por lodo ativado, o esgoto, ao chegar à estação, passa pela estação elevatória, que destinará o esgoto à caixa de areia e gradeamento de forma a reter todo sólido grosseiro, para após o efluente ser encaminhado para um tanque onde é submetido à aeração. A quantidade de oxigênio introduzido na mistura através dos aeradores propicia o desenvolvimento de bactérias aeróbias que irão digerir a matéria orgânica. A atuação de microrganismos específicos forma flocos denominados lodo ativado ou lodo biológico.

A produção do lodo no tratamento de lodo ativado depende das etapas de: a) adensamento (redução de umidade e do volume), estabilização (redução de matéria



orgânica); b) condicionamento (preparação para a desidratação); c) desidratação (redução adicional de umidade) e e) disposição final (destinação final dos subprodutos) (PEDROZA et al., 2010).

As etapas de funcionamento da ETE M estão representadas na Figura 5.

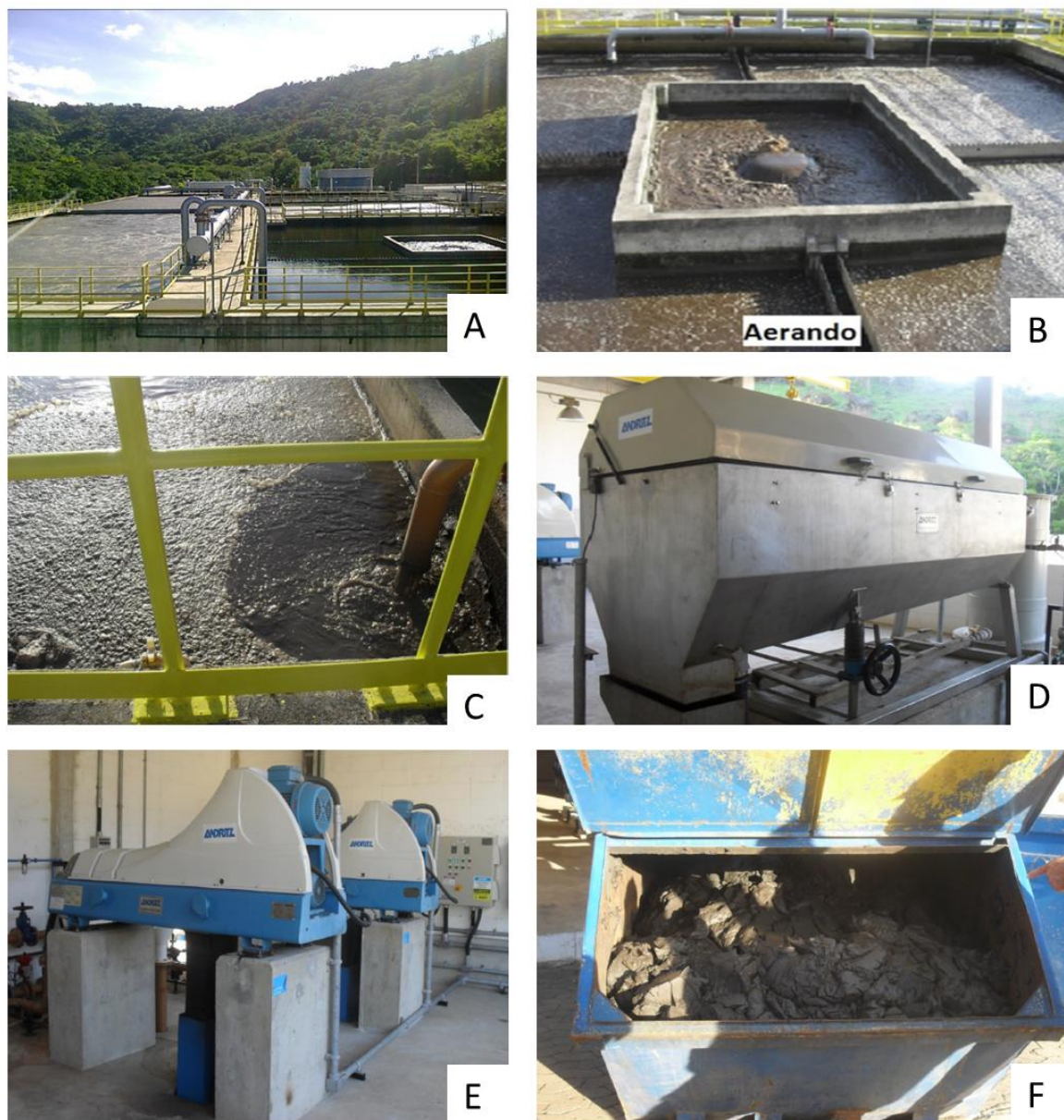


Figura 5. Etapas do processo de tratamento da ETE M: A. Estação de tratamento; B. Tanque de aeração; C. Tanque de digestão; D. Adensador de lodo; E. Desidratação por centrífuga e F. Lodo desidratado (GOMES; BERNARDINO, 2013).

### 2.2.1 Composição do lodo de esgoto

A composição do lodo de esgoto é variável e está relacionada com a origem do esgoto tratado (esgoto doméstico ou industrial), da tecnologia utilizada em seu tratamento e da época do ano. De modo geral, o lodo de esgoto apresenta alto teor de umidade e altas concentrações de matéria orgânica e de macro e micronutrientes, que despertam o interesse agrônomo (LIMA et al., 2011).

Em geral, a matéria orgânica contida no lodo de esgoto corresponde a valores entre 40 a 80% da composição total de sua massa seca, origina-se da excreta humana e é uma mistura complexa de gorduras, proteínas, carboidratos, lignina, aminoácidos, açúcares, celulose, material húmico e ácidos graxos, além de muitos microrganismos (SAITO, 2007).

Os principais riscos associados à disposição de lodo de esgoto em solos agrícolas estão relacionados à presença de patógenos (ovos viáveis de helmintos, coliformes termotolerantes, *Salmonella* e vírus entéricos), metais pesados e poluentes orgânicos (SANTOS, 2009).

O uso agrícola do lodo de esgoto depende de tratamentos para redução de patógenos, destacando-se: biológicos (compostagem, vermicompostagem); físicos (secagem térmica, solarização, radiação gama) e químicos (adição de cal virgem ou outras substâncias alcalinas) (ALMEIDA et al., 2006).

A concentração de metais no lodo de esgoto é um dos fatores que vai determinar a viabilidade de sua aplicação na agricultura e por quanto tempo o mesmo poderá ser aplicado, até que a concentração dos mesmos no solo atinja um potencial elevado de risco para o ambiente e para a saúde humana (MAZIVIEIRO, 2011).

De acordo com Lara (1999), os metais pesados presentes no lodo podem ter três origens: rejeitos domésticos: canalizações, fezes e águas residuárias de lavagem; águas pluviais: as águas de escoamento de superfícies metálicas ou das ruas carregam resíduos de metais dispersos na fumaça de veículos; efluentes industriais: são a principal fonte de metais no esgoto, contribuindo com certos tipos específicos de cátions de acordo com a atividade da indústria.

O lodo das estações de tratamento que recebem apenas efluentes domésticos contém pequena quantidade de metais pesados provenientes da própria natureza dos resíduos e das canalizações. Entretanto, além dos níveis naturais, podem ocorrer ligações clandestinas de pequenas fontes de contaminação de

metais pesados, tais como: laboratórios fotográficos, fábricas de baterias, tintas e cromagens, que adicionam um determinado nível de metais na rede (LARA,1999).

De acordo com Villar (2003) e Lima et al. (2011), a presença de metais pesados no lodo de esgoto pode ocasionar diversos problemas, tais como: acúmulo desses compostos na cadeia trófica, resultante de sua assimilação pelas plantas; fitotoxicidade, que acarreta uma perda ou diminuição da produtividade agrícola; perda da diversidade microbiana do solo, o que afeta a nutrição das plantas; e contaminação das águas superficiais em virtude do arraste dos metais pelas águas pluviais.

Dentre os compostos orgânicos tóxicos presentes no lodo de esgoto estão os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), pesticidas, polibrominatos bifenil (PBBS), policlorinato bifenil (PCBs) dentre outros (COSTA; COSTA, 2011).

### **2.2.2 Alternativas de disposição final do lodo de esgoto**

Existem várias alternativas tecnicamente aceitáveis para a disposição final do lodo, desde as alternativas que o consideram apenas como um resíduo a ser confinado, até as opções que primam pela introdução do seu uso na geração de novos produtos (DUARTE, 2008).

De acordo com Lara (1999) e Lessa (2005), as alternativas mais utilizadas para disposição final do lodo de esgoto são: a) aterro sanitário (aterro exclusivo e co-disposição com resíduos sólidos urbanos); b) uso agrícola (aplicação direta no solo, como fertilizante); c) incineração (exclusiva e co-incineração com resíduos sólidos urbanos); d) recuperação de solos (recuperação de áreas degradadas e áreas de mineração); e) disposição oceânica; f) *landfarming* (prática em que microrganismos presentes no solo são utilizados como um sistema de tratamento. O solo passa a ser o suporte da atividade biológica, retenção de metais, local de exposição ao sol e bioxidação, o que provocará a degradação da matéria orgânica); g) reuso industrial (produção de agregados leves, fabricação de tijolos e cerâmicas e produção de

cimento) e h) reuso na construção civil (produção de argamassas, concretos e blocos de concreto).

### **2.2.3 Disposição do lodo de esgoto em solos agrícolas: panorama no Espírito Santo**

A Resolução CONAMA 375/2006 estabelece os aspectos legais que devem ser considerados na aplicação do lodo de esgoto no solo, incluindo os critérios de restrições locacional e de aptidão do solo das áreas de aplicação. Desse modo, não é permitida a disposição do lodo de esgoto em áreas de conservação ambiental; de preservação permanente e de preservação de mananciais, em zonas de transporte de água para fontes de água mineral; em balneários e estâncias de águas minerais e potáveis de mesa; em solos rasos, com menos de 50 cm de espessura até o horizonte C; em áreas com profundidade do lençol freático menor que 1,5 m; em proximidade de poços rasos, residências e vias públicas, bem como a forma de aplicação de acordo com a declividade da parcela.

Com base nessas diretrizes, um mapeamento para a definição das áreas com potencialidade para aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas do Espírito Santo foi realizado por pesquisadores do INCAPER e da CESAN. De acordo com esses estudos, a região Norte do estado é a que apresenta mais áreas aptas (COSTA; COSTA, 2011) (Figura 6).

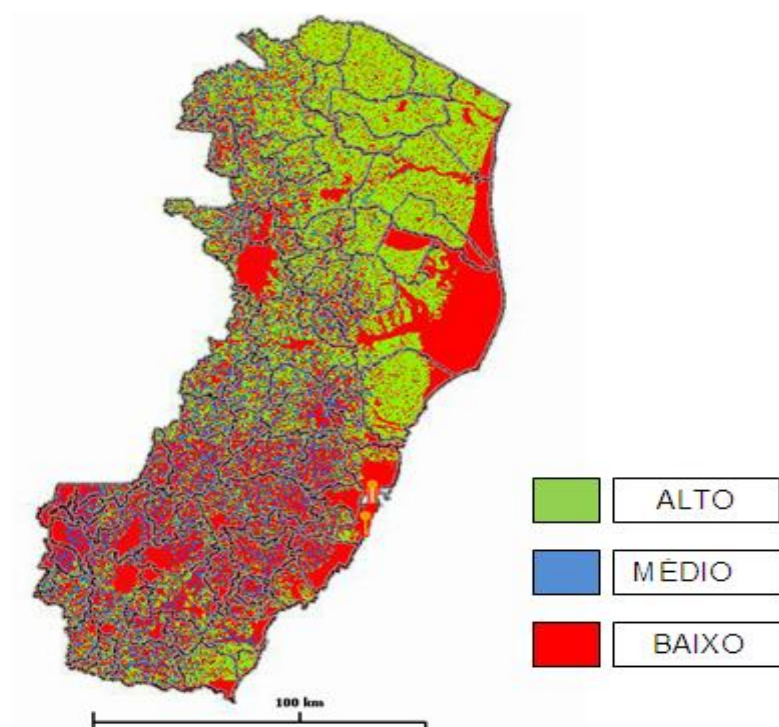


Figura 6. Potencial de aplicação de biossólido no estado do Espírito Santo. Fonte: Geobases (2013).

A Figura 7 apresenta o percentual das áreas com alto potencial para a disposição do lodo de esgoto, por microrregião, no estado do Espírito Santo. O pólo Cachoeiro, que abrange o município de Jerônimo Monteiro, apresenta 6% de áreas com potencial para a disposição de lodo de esgoto na agricultura. Já, a Figura 8 mostra, especificamente, a potencialidade para áreas da cidade de Jerônimo Monteiro (COSTA; COSTA, 2011).

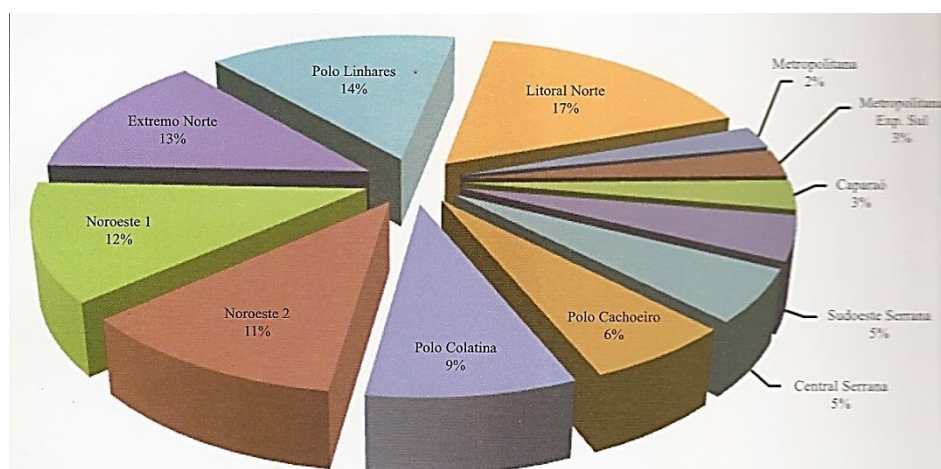


Figura 7. Percentual das áreas com alto potencial para a disposição do lodo de esgoto, por microrregião, no estado do Espírito Santo. Fonte: Costa e Costa (2011).



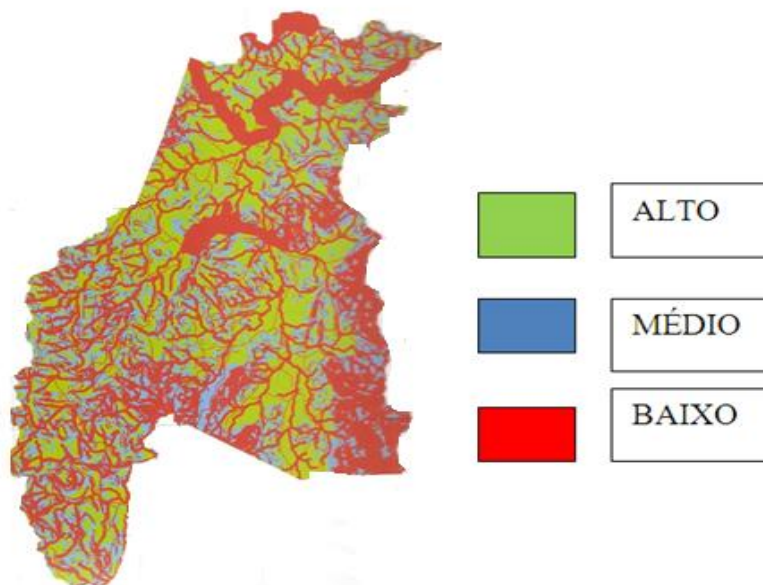


Figura 8. Potencial de aplicação de biossólido no município de Jerônimo Monteiro (ES). Alto: 30,40%, médio: 22,83% e baixo: 46,97%. Fonte: Costa e Costa (2011).

A Resolução CONAMA 375/2006 ressalta ainda a exigência quanto à proibição da utilização de qualquer classe de lodo de esgoto ou produto derivado em pastagens e cultivo de oleícolas, tubérculos e raízes, culturas inundadas, bem como as culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo. De acordo com Costa e Costa (2011), no Espírito Santo, o lodo de esgoto tem sido aplicado em diferentes culturas: mamão, banana, café conilon, café arábica, eucalipto, seringueira, palmeira Real, açaí, milho, goiaba, abacaxi e cana-de-açúcar.

Costa et al. (2008) caracterizaram o lodo de diferentes ETEs, visando sua utilização como insumo agrícola em cultura de goiaba, na fazenda experimental de Bananal do Norte (Cachoeiro de Itapemirim). Os resultados das análises confirmaram a qualidade do resíduo para o uso agrícola, visto que o mesmo mostrou-se bastante rico em nutrientes, e desprovido de potenciais contaminantes. Ainda em Cachoeiro de Itapemirim, Caetano et al. (2009) observaram que a produtividade da goiabeira aumentou com a aplicação de lodo de esgoto, com resultados equivalentes àqueles obtidos com a adubação química e com o esterco bovino.

Gonçalves et al. (2009) avaliaram o potencial de utilização do lodo de esgoto doméstico da ETE de Jerônimo Monteiro e concluíram que o resíduo pode ser uma

ótima alternativa aos fertilizantes químicos, pois apresentou baixa concentração de metais e grande quantidade de nutrientes, principalmente N, Ca, Mg e S. Lopes et al. (2005) também avaliaram o lodo de Jerônimo Monteiro e concluíram que o lodo de esgoto pode ser utilizado como fertilizante agrícola para o cultivo de alface, desde que se mantenha o pH corrigido, concentrações de metais pesados abaixo dos valores admissíveis para o uso agrícola e eliminação de patógenos.

Freitas (2013) avaliou a emergência e o crescimento de maracujazeiro doce (*Passiflora alata Curtis*), no município de Alegre, em diferentes níveis de sombreamento e em solo fertilizado com lodo de esgoto tratado, sob condições de viveiro. O autor observou que a aplicação do lodo de esgoto elevou os teores de nutrientes do solo e, conseqüentemente, o maracujazeiro doce apresentou maior desenvolvimento fisiológico e morfológico em solos tratados com o mesmo, sob condições de sol pleno e de sombreamento.

Oliveira et al.,(2009) avaliaram o efeito do lodo de esgoto no desenvolvimento inicial de duas cultivares de mamona (*Ricinus communis L.*) em dois tipos de solos (Latossolo e Argissolo). O lodo de esgoto utilizado foi coletado junto à lagoa anaeróbica da ETE da CESAN de Valparaíso, município da Serra. Os tratamentos constituíram dos dois tipos de solo com três níveis de lodo de esgoto: sem lodo, com lodo e com lodo de esgoto corrigido com calcário até 60% de saturação das bases. Os autores concluíram que em função de seu comportamento, o lodo de esgoto aumentou a fertilidade do solo, pela elevação dos teores de matéria orgânica, incrementando o crescimento e a produção de massa seca da mamoneira.

Bonomo (2014) avaliou os efeitos da aplicação de lodo de esgoto higienizado (CESAN) no crescimento inicial de *Carica papaya* e observou que a adição de lodo de esgoto higienizado ao solo modificou as características nutricionais do mesmo, levando a melhorias no desenvolvimento das plantas quanto aos aspectos de crescimento vegetal.

Taques et al. (2008) mapearam as áreas propícias na região Norte do Espírito Santo para aplicação de lodo de esgoto na cultura da bananeira, considerando-se as exigências da Resolução CONAMA 375/06, e concluíram que os municípios mais promissores foram Linhares, Sooretama e Pinheiros.

Ainda no Norte do estado, o lodo de esgoto, proveniente da ETE de Pedro Canário, mostrou-se como uma fonte alternativa de adubação orgânica para as

culturas da palmeira-real-da-austrália (*Archontophoenix spp.*) e do açazeiro (*Euterpe oleracea*), visto que as plantas adubadas com biossólido apresentaram maior altura em comparação às plantas adubadas com fertilizantes químicos (COSTA et al., 2011).

Costa et al. (2009) estudaram a produção de café arábica no município de Domingos Martins (região serrana do Espírito Santo), no primeiro ano agrícola de aplicação de lodo de esgoto submetido a higienização com 30% de cal virgem, e verificaram que houve correlação positiva entre as doses de biossólido aplicadas e o aumento de produção. Similarmente, os autores verificaram que o lodo de esgoto tratado promoveu significativo desenvolvimento e crescimento inicial de bananeiras, em relação ao esterco de cama de frango e adubação química.

### **2.3. BIOENSAIO DE TOXICIDADE GENÉTICA COM *Allium cepa***

Os testes citogenéticos são bastante adequados para a identificação de efeitos perigosos de substâncias sobre organismos vivos, em diferentes concentrações e em diversos tempos de exposição. Estes testes são também utilizados no biomonitoramento da extensão da poluição e na avaliação dos efeitos de substâncias tóxicas e mutagênicas sobre os organismos, no ambiente natural (MORAES, 2000).

Existem mais de 200 testes de curta duração, utilizando uma ampla variedade de organismos-teste (microrganismos, vegetais e animais), com a finalidade de avaliar poluentes ambientais potencialmente causadores de danos (VANZELLA, 2006).

Segundo Mielli (2008), a escolha do organismo depende do objetivo do estudo, e da disponibilidade de organismos para validação dos métodos. As plantas, por exemplo, apesar das suas diferenças estruturais e metabólicas, podem oferecer informações importantes sobre o potencial genotóxico e mutagênico de substâncias, além de algumas vantagens como cultivo de baixo custo e fácil manutenção.

Os vegetais superiores constituem um importante material para testes genéticos usados para monitoramento de poluentes, sendo atualmente reconhecidos como bons indicadores de efeitos citogenéticos e mutagênicos de substâncias químicas ambientais (GRANT, 1982; YI; MENG, 2003).

Dentre as espécies vegetais, a espécie *A. cepa* tem sido freqüentemente utilizada na avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxico e mutagênico de várias substâncias, devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, pela sua disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ( $2n = 16$ ) e de grande tamanho, além de serem facilmente corados e observados (CARITÁ, 2010).

Leme e Marin-Morales (2009) afirmam que o teste de *A. cepa* é uma técnica rápida e sensível para detectar substâncias genotóxicas e mutagênicas dispersas no ambiente. Além disso, permite avaliar vários parâmetros genéticos, bem como os mecanismos de ação dos agentes testados no DNA dos organismos expostos.

Para Grant (1982), *A. cepa* é um eficiente sistema–teste rotineiramente utilizado para analisar o potencial genotóxico de químicos ambientais, devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas–teste de mamíferos. A sensibilidade do teste de mutagenicidade com *A. cepa* foi calculada, por Rank e Nielsen (1993), como sendo superior em 82% aos resultados obtidos com roedores.

O índice mitótico, caracterizado pelo número total de células em divisão, tem sido utilizado como um parâmetro na avaliação da citotoxicidade de diversos agentes. Dessa forma, índices mitóticos menores que os registrados no controle negativo podem indicar alterações derivadas da ação química no crescimento e desenvolvimento dos organismos expostos. No entanto, índices acima do controle negativo são resultados de um aumento da divisão celular, que podem levar à proliferação celular desordenada (BONOMO, 2014).

As aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças na estrutura normal de um cromossomo ou no número total de cromossomos, podendo ocorrer espontaneamente ou como resultado da exposição a agentes físicos ou químicos (RUSSEL, 2002). Dessa forma, quebras cromossômicas são indicativas de agentes clastogênicos, enquanto pontes, perdas cromossômicas, atrasos, aderências,

multipolaridade e C-metáfases resultam de danos no fuso mitótico, característicos de agentes aneugênicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009).

Anormalidades nucleares também correspondem a aberrações cromossômicas, sendo caracterizadas por alterações morfológicas nos núcleos interfásicos, observadas na forma de núcleos lobulados que são decorrentes de anáfases multipolares com pontes cromossômicas, no qual o envoltório nuclear se reestrutura acompanhando a distribuição irregular do material genético e brotos nucleares que são relacionados com a reorganização do envoltório nuclear, no qual o broto se desprende do núcleo originando um micronúcleo e este pode ser expulso da célula sob a forma de mini célula (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008). O micronúcleo pode derivar de aberrações cromossômicas como quebras e perdas, consequência de danos nas células parentais, não reparados ou reparados de forma errada, sendo observado tanto em células meristemáticas quanto em células F<sub>1</sub> de raízes de plantas (BONOMO, 2014).

## **2. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo geral**

Estudar a toxicidade genética do lodo de esgoto em *Allium cepa*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- a) Avaliar o potencial citotóxico do lodo de esgoto por meio da análise do índice mitótico do meristema radicular de *A. cepa*;
- b) Avaliar o potencial genotóxico do lodo de esgoto por meio do teste de aberrações mitóticas e cromossômicas em *A. cepa*;
- c) Avaliar o potencial mutagênico do lodo de esgoto por meio da contagem de células micronucleadas e de quebras cromossômicas no meristema radicular de *A. cepa* e por meio da contagem de micronúcleos em células da F<sub>1</sub>;

- d) Comparar as análises físico-químicas das amostras de lodo de esgoto com os resultados biológicos obtidos;
- e) Gerar subsídios para disposição agrícola do lodo de esgoto gerado nas ETEs.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Artigo 1. Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants**

Esse artigo foi submetido ao periódico Mutation Research – Reviews.

**Genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on higher plants**

Maria Nilza Corrêa Martins, Victor Ventura de Souza, Tatiana da Silva Souza

Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Rua Alto Universitário s/n – Cx Postal 16- CEP: 29.500.000 – Alegre – ES.

Correspondence to: Tatiana da Silva Souza. Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, UFES, Alto Universitário, s/nº Guararema, 29500-000, Alegre, ES Brasil. E-mail: [tatianas.souza@hotmail.com](mailto:tatianas.souza@hotmail.com)



**Abstract**

Sewage treatment generates a crude product termed "sewage sludge". One of the alternatives for its use is employing it as a fertilizer in plantations, given that it contains elevated concentrations of macro and micronutrients. However, this input may also contain high levels of inorganic and organic compounds with toxic, genotoxic and mutagenic properties. In agricultural soils, higher plants are in direct contact with the sewage sludge, thereby, the objective of this review was to compile information related to the toxic effects of this residue in different plant species. In this study were also presented data on the effects of the transfer of contaminants in soil supplemented with sewage sludge to plants and those via the food chain.

Keywords: Sewage sludge, agricultural soils, plants, mutagenicity, heavy metals.

## 1. Introduction

The increasing use of sewage sludge for growing different crops, such as pineapple, banana, coffee, sugarcane, guava, papaya, and corn [1] is due to its considerable percentage of organic material and of macro and micronutrients essential for plants; substituting—even if only partially—mineral fertilizers [2].

Despite facilitating increased productivity and having many economic advantages (due to the high price of chemical fertilizers), the application of sewage sludge to agricultural soils, in the long run, can lead to the introduction of organic and inorganic compounds, with genotoxic and mutagenic potential [3, 4]. When this occurs, these compounds can be translocated to the plants and then transferred to other organisms via the food chain [5]. Therefore, rigorous regulation of these soil additives is needed, in accordance with what studies determine to be the short and long-term risks [6].

Genetic toxicity bioassays with higher plants are particularly suited to monitoring soils supplemented with sewage sludge, because these organisms are direct targets of the possible contaminants. In addition to detecting deleterious substances, even at low concentrations, several genetic bio-indicators, from point mutations to chromosomal aberrations, can be evaluated from different organs like leaves, endosperm, pollen grains, and roots [7].

This work aims to gather information on the possible deleterious effects of sewage sludge on the genetic material of higher plants, and to warn about the potential risks of the indiscriminate use of this residuum in agricultural soils.

## 2. Sewage sludge composition

The composition of sewage sludge varies as a function its origin; in other words, if it comes from a predominantly residential and/or industrial area, the time of year it was processed, and the treatment technology used to process it in the different Sewage Treatment Stations (STSs) [8].

Generally, sewage sludge has agronomic appeal because of it has high moisture content, abundance of organic material (proteins, carbohydrates, lipids), and macro and micronutrients essential to the growth and development of plants [9].

Ramulu [10] related an increase in the quantity of pathogens in soils fertilized with sewage sludge. However, to be used in agriculture, sewage sludge must go through processes that aim to decrease the number of pathogenic organisms in it (viable

helminth eggs, fecal coliform, Salmonella, and enteric viruses), creating a residuum termed as "biosolid" [11].

The genotoxicity of sewage sludge has been primarily attributed to toxic metals [12, 3, 4, 13], which tend to accumulate in soils following application of the residuum [3, 4]. There are records of significant accumulation of heavy metals in different plant tissues, whose hosts were cultivated in soils supplemented with sewage sludge. Henning et al. [14] reported that *Zea mays* plants exhibit high levels of Pb, Cu, and Zn in their tissues, which reduces growth, while Rangel et al. [15] documented an increase in Mn and Zn content in leaves and corn grains. Antolín et al. [16] concluded that *Hordeum vulgare* grains displayed a considerable increase in heavy metal levels.

Sewage sludge can also contain organic compounds, such as organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls (PCBs), and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [9], with genotoxic and mutagenic properties [17]. Hopke et al. [18] reported that the mutagenicity of sewage sludge from the US state of Chicago can be attributed to the presence of compounds utilized in the petrochemical industry, in addition to heavy metals. Paraíba et al.[19] concluded that PAHs of low molecular weight, with two, three, or four aromatic rings have a greater propensity to accumulate in corn grains than PAHs of high molecular weight. However, according to the authors, sewage sludge containing significant concentrations of light PAHs should not be recommended as fertilizers for food crops.

According to Singh and Agrawal [20] the chemical composition of sewage sludge should be known preceding its dispersal in agricultural soils. However, the identification and quantification of all its compounds, for habitual environmental monitoring, is made difficult by the complexity of the mixture [9, 17]. Additionally, analytic examinations come at high cost. For these reasons, according to [17], the determination of the genotoxic potential of sewage sludge, by way of relatively simple and cheap tests, can provide important information about the quality of the residuum and contribute towards decisions made about its dispersal.

### **3. Cytotoxic, mutagenic, and genotoxic effects of sewage sludge on higher plants**

### 3.1 Toxicity on *H. vulgare* and *Lepidium sativum*

The analysis of toxicity, based on the evaluation of seed germination and root growth, allows for the detection of deleterious effects of chemical composites, still in the initial stage of plant development. The species *H. vulgare* and *L. sativum* have been used by numerous authors [16, 21, 22, 23, 24] to evaluate cytotoxic compounds, because of their rapid germination, high sensitivity, and easy handling. According to [25] seeds of *L. sativum* and *H. vulgare*, cultivated in sewage sludge, experienced a reduction in germination rate and root growth. In a similar way, [26] reported a decrease of 10% drop in the germination rate of *L. sativum* seeds.

### 3.2 Point mutation induction and chromosomal aberrations in *Zea mays*

Economically, corn (*Z. mays*,  $2n=20$ ) is one of the most important food cultures in the world and was the first plant for which a genetic map was established [27]. Genetic toxicity essays in *Z. mays* are particularly useful for the detection of chromosomal aberrations in mitotic and meiotic cells, sister chromatid exchanges and point mutations [28].

In *Z. mays*, numerous loci have already been used for evaluating mutagenicity, including alterations in the coloration of the aleurone layer of the pericarp and endosperm, in the composition and development of the endosperm and pollen grains, and in the morphology of leaves and cob structure [29, 27].

The waxen locus (*wx*), found in position 59 of chromosome 9, controls amylose synthesis in *Z. mays*. The pollen grains (microgametophytes) are functional haploids and express their own genetic makeup rather than that of their parent sporophyte. In this way, pollen grains allow for the detection of mutations that alter starch composition [30, 31].

In the bioassays of wax-pollen grains from *Z. mays*, two directional changes can be evaluated: a) reverse-mutation – the test reveals revertant pollen grains (*Wx*), black-stained by iodine, from homozygous plants that produce red pollen (*wxwx*) and b) direct mutation – in the direct mutation test, *wx* pollen grains are detected after acquiring red coloration when they react with iodine, which distinguishes them from the black-colored grains – homozygous amyloitic plants (*WxWx*) [30, 31]. Aborted pollen grains are identified by their deflated appearance and should also be recorded

[31]. According to Hopke et al [32], a significant increase in dead pollen grains indicates that the tested agent or sample is toxic.

In in situ studies, Plewa; Wagner [33] and Hopke et al [32] reported that no significant increase was observed in revertant pollen grain production from the homozygotic wx-C line. However, an increased frequency of aborted pollen grains was correlated with higher sewage sludge concentration in the evaluated soils. According to [32], the negative result for reverse mutation would be, in part, due to the observed toxicity. Contrarily, for the allele wx-90, the authors reported a high frequency of revertant pollen grains and a low frequency of aborted pollen. It was discovered that the alleles wx-C and wx-90 are susceptible to different lesions and, because of this, produce different responses to sewage sludge.

Hopke et al. [32] and Hopke et al. [18] also found that even soils with low concentrations of sewage sludge induce direct mutation in *Z. mays* and significant frequencies of aborted pollen grains.

Amin et al. [3] reported alterations in characteristics of  $M_2$  seeds of *Z. mays*, whose plants had developed in areas with a history of sewage sludge application. The authors associated such alterations with point mutations in genes responsible for those characteristics; for instance, the genotype of seeds without pits is ptpt [34]. According to Amin et al. [3], the increase or decrease in frequency of seeds with or without pits in relation to spontaneous rates observed in control treatments indicate that there was an increase in the reversion rates of the gene pt to the dominant state Pt, and vice versa. It was suggested that sewage sludge should only be used for fertilization after pre-treatment of the residuum to reduce the concentration of heavy metals and thus the amount of point mutations.

In Amin [13] reported that two residual applications of sewage sludge induced chromosomal aberrations in the mother cells of the pollen grains of *Z. mays*. The percentage of aberrant cells in meiosis II was three times higher than that observed in meiosis I. The total number of aberrations rose significantly with the concentration of sewage sludge in the soil. Aberrations related to inactivation or poor functioning of the mitotic fuse were the most frequently observed.

### 3.3. Induction of point mutations and chromosomal aberrations in *Vicia faba*

*Vicia faba*, fava bean, ( $2n=12$ ) is one of the most consumed legumes in the world and one of the most used plant species for evaluating genotoxicity [28,35]. According to the conclusions of Amin et al. [4] metals present in soils after successive applications of sewage sludge induce genetic mutations in *V. faba*. These mutations are in genes that regulate node formation and chlorophyll production. Additionally, the authors reported a significant increase in the frequency of the mitotic index, and abnormalities in mitosis and micronuclei in *V. faba*.

#### 3.4. Induction of somatic mutation in *Nicotiana tabacum*

Two loci are involved in the differentiation of chloroplasts in *N. tabacum*,  $a_1$  and  $a_2$ . In the bioassays of reverse mutation, the double heterozygote ( $a_1^+/a_1 a_2^+/a_2$ ), partially chlorophyll-deficient, has yellow-green leaves. Mutational events alter their genetic composition, creating revertant green cells. With the growth of the plant, the reverted cell produces a clone that has green or pale splotches on the yellow-green leaf [36].

Samples of sewage sludge and of agricultural soil were directly evaluated by way of somatic mutation tests in *N. tabacum* [37]. According to the authors, the samples did not display mutagenic activity, owing to the elevated capacity of absorption of the soil, limiting the availability of genotoxic compounds for the plants.

#### 3.5. Induction of chromosomal aberrations in *Allium cepa*

*Allium cepa* ( $2n=16$ ) has few, large chromosomes ( $2n=16$ ); elevated root kinetic proliferation (and, therefore, a large number of cells in division); high tolerance to different cultivation conditions; and can be grown all year long [38, 39]. In accordance with [38], the test of chromosomal aberrations in *A. cepa* demonstrates a sensitivity similar to that of bioassays with human lymphocytes. Rank and Nielsen [40] compared the results obtained with the test in *A. cepa* with the Ames, Microscreen, and carcinogenic tests in rodents, and claimed that the sensitivity of the plant species was about 82%.

Rank and Nielsen [17] evaluated samples of sewage sludge in three differently-sized STSs which received different industrial duties. The authors found that only the smallest STSs, with the smallest industrial load, displayed genotoxic activity for *A.*

*cepa*. The studies were conducted during three years, always in the winter; it was concluded that additional studies should be conducted in different seasons.

Srivastava et al. [12] reported that leached samples of sewage sludge induced chromosomal aberrations in *A. cepa* and that, in contradistinction, after vermicomposting, the genotoxic potential of the residuum was considerably reduced, indicating that the worms bio-accumulated heavy metals present in the sample. According to the authors, bio-remediation of sewage sludge is recommended before it reaches its final destination. Just as worms, millipedes also bio-accumulate heavy metals. However, [41] showed that samples of primary sewage sludge, bisolid, and stillage of cane sugar, as well as its combinations, were toxic, cytotoxic, genotoxic, and mutagenic for *A. cepa*, before and after bio-processing by diplopods.

### 3.6. Induction of micronuclei in *Tradescantia* (Trad-MCN)

The micronucleus test, in *Tradescantia* (Trad-MCN) mother cells of pollen grains, estimates genetic damage, in chromosomal fragments or whole chromosomes that can be transmitted to the next generations [42].

Samples of concentrated or diluted sewage sludge induce micronuclei in *Tradescantia* [18, 32]. Hopke et al. [32] observed a significant increase in tetrads containing more than one micronucleus and concluded that the residuum can induce numerous instances of genetic damage in a single tetrad. According to Hopke et al. [18], the bioassay with *Tradescantia* indicated that sludge coming from stations handling only domestic wastewater has less mutagenic potential than sludge coming from more industrial sources.

Mielli et al. [43] concluded that chronic exposure in situ of *Tradescantia* seedlings is more effective for detecting the mutagenicity of sewage sludge samples than exposure in the laboratory.

### 3.7. Mutagenicity of extracts of plants cultivated in fertilized soil with sewage sludge

Boyd et al. [44] cultivated cabbage, beets, green beans, and pumpkin in soils with sewage sludge. When the Ames test was applied, extracts of green beans displayed mutagenic activity.

Fiedler et al. [45] used the test with *Salmonella / microsome* to measure the mutagenic potential of organic extracts from alfalfa (*Medicago sativa*) and grass (*Cynodondactylon*), cultivated in soils with sewage sludge. However, in view of the negative results, the authors concluded that the plants were unable to absorb significant quantities of organic mutagens present in sewage sludge. According to them, the results can be attributed to diverse factors, such as the type of sludge, the plants, and the extraction procedures.

#### **4. Sewage sludge: transference of contaminants from soil to plant, and from plant to animal**

Translocation of contaminants from sewage sludge to consumers is possible. Babish et al. [5] reported an increase in the concentration of the following heavy metals in organs of pigs fed with cabbage cultivated in sewage sludge: Cd, Cu, Ni and Zn, in the bladder; Cd, Pb and Zn, in the liver; Zn in the muscles; and Cd in the spleen. In the liver of these animals, there was also a significant increase in the concentration and levels of PCBs and aryl hydroxylase hydrocarbon, respectively, responsible for processes of detoxification that can activate pro-carcinogens [46]. However, during the experiment, the animals did not show signs of intoxication.

Sheep fed with cabbages cultivated in soils with sewage sludge displayed a slight increase in levels of Ni in the bladder. In the liver of these animals, augmented concentrations of CU and PCBs, an increased organ weight, various degenerative alterations, and a proliferated smooth endoplasmic reticulum were found [47]. In a similar experiment, but with corn silage, Heffron et al. [48] reported that sheep showed an increase in the volume of mitochondria and hepatic necroses.

Boyd et al. [44] recorded an increase in the concentration of Cd in the bladder of rats fed with cultivated beets. The urine of these animals demonstrated a positive result for the Ames test conducted with metabolic activation.

Goats that consumed a mixture of grass and legumes exposed to sewage sludge reduced drastically the quantity of milk produced [49]. Mclachlan et al. [50] reported high levels of PCBs and polychlorinated dibenzofuran in the milk of cows that grazed in soils fertilized with sewage sludge.



## 5. Conclusion

The data showcased in this review suggest that sewage sludge, or the biosolid, can induce different genetic damage in plants, such as genetic mutations, chromosomal aberrations, and micronuclei. Both somatic cells and germinative cells of different plant species can be affected. This problem is due to the presence of toxic composites in the residuum; among other factors, the number of sewage sludge applications as a function of time, type of agricultural soil, and type of culture. The toxic composites can be transferred from the soil to different plant tissues, where they accumulate, and there they are passed on to potential consumers. For the safe use of sewage sludge in agricultural soils, constant monitoring of this residuum, as well as of the soil receiving it, is recommended. However, from the economic point of view, this is not always possible. Additionally, the analysis of contaminants is not always sufficient to evaluate the risk of absorption by plants, for there are variations among species. In this way, beyond the physical-chemical parameters and the evaluation of levels of pathogens present, it would be interesting to find out which bio-indicators of genetic toxicity were also required by the regulatory agencies. Some studies suggest that, in certain cases, despite the sewage sludge meeting the requirements of these agencies, the residuum can induce a genotoxic and/or mutagenic response in some plant species.

This revision alerts about the potential risks of the indiscriminate use of this residuum and, according to the data presented, it is hoped that this work will contribute to decision making processes about the use and final fate of sewage sludge.

## Acknowledgements

We thank the Departamento de Biologia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo and the Programa de Pós Graduação em Genética e Melhoramento of this same institution for the physical space provided.

## References

[1] A. N. Costa, A. F. S. Costa, Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo, first ed, DCM/INCAPER, Vitória, Espírito Santo, 2011.

[2] C. W. A. Nascimento, D. A. S. Barros, E. E. C. Melo, A. B. Oliveira, Alterações químicas em solos e crescimento de milho e feijoeiro após aplicação de lodo de esgoto, Rev. Bras. Ci. Solo. 28 (2004) 385-392.

[3] A.W. Amin, F.K. Sherif, E. El-Atar, H. Ez-Eldin, Residual effect of sewage sludge on soil and several yield parameters of *Zea mays*, Res. J. of Environ. Toxicol. 3 (2009) 86-93.

[4] A.W. Amin, F.K. Sherif, E. El-Atar, H. Ez-Eldin, Effect of residual and accumulative sewage sludge on heavy metals bioaccumulation: gene action and some yield parameters of *Vicia faba*, Res. J. of Environ. Toxicol. 3 (2009) 60-75.

[5] J. G. Babish, L. G., Stoewsand, A. K., Furr, T. F., Parkinson, C. A. B. W.H.G., Gutenmann, P.C., Wszolek, D. J., Lisk, Elemental and polychlorinated biphenyl content of tissues and intestinal aryl hydrocarbon hydroxylase activity of Guinea Pig's fed cabbage grown on municipal sewage sludge, J. Agric. FoodChem. 27 (1979) 399-402.

[6] A. M. M. Pires, Uso agrícola do lodo de esgoto: aspectos legais. Embrapa MeioAmbiente, Jaguariúna, São Paulo, 2006, pp. 1-4.

[7] W. F. Grant, The present status of higher plants bioassays for the detection of environmental mutagens, Mutat. Res. 310 (1994) 175-185.

[8] M. F. Lima, C. N. Mattos, P. L. C. Vieira, L.F. Almeida, Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura, in: A. N. Costa, A. F. S. Costa (Eds.), Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo, CESAN & INCAPER, Vitória, Espírito Santo, 2011. p 11.

[9] M. L. Saito, O Uso do Lodo de Esgoto na Agricultura: Precauções com os contaminantes orgânicos, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, 2007.

- [10] U. S. S. Ramulu, Reuse of municipal sewage and sludge in agriculture, Scientific Publishers, Jdhpur, India, 2002.
- [11] R. J. Haynes, G. Murtaza, R. Naidu, Inorganic and organic constituents and contaminants of biosolids: implications for land application, *Advances in Agronomy*, 104 (2009) 165-267.
- [12] A. R. Srivastava, B. D. Kumar, S. K. A. Gupta, Bioremediation of municipal sludge by vermitechnology and toxicity assessment by *Allium cepa*, *Bioresource Technology* 96 (2005) 1867–1871.
- [13] A.W. Amin, Evaluation of the genotoxicity of residual repeated applications of sewage sludge on M2 meiocytes of *Zea Plants*, *Res. J. of Environ. Toxicol.* 5 (2011) 235-250.
- [14] B. J. Henning, H.G. Snyman, T.A.S. Aveling, Plant-soil interactions of sludge-borne heavy metals and the effect on maize (*Zea mays* L.) seedling growth, *Water SA*. 27 (2001), 71-78.
- [15] O. J. P. Rangel, C. A. Silva, W. Bettiol, J. F. Dynia, Efeito de aplicações de lodos de esgoto sobre os teores de metais pesados em folhas e grãos de milho, *Rev. Bras. Ci. Solo* 30 (2006) 583-594.
- [16] M. C. Antolín, I. Pascual, C. Garcia, A. Polo, M. Sánchez-Díaz, A growth yield and solute content of barley in soils treated with sewage sludge under semiarid Mediterranean conditions, *Field Crops Res.* 94 (2005) 224–237.
- [17] J. Rank, M. H. Nielsen, Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay, *Mutat. Res.* 418 (1998) 113–119.
- [18] P. K. Hopke, M. J. Plewa, P. L. Stapleton, D. L. Weaver, Comparison of the mutagenicity of sewage sludges, *Environ. Sci. Technol.* 18 (1984) 909-916.

- [19] L. C. Paraíba, S. C. N. Queiroz, A. H. N. Maia, V. L. Ferracini, Bioconcentration factor estimates of polycyclic aromatic hydrocarbons in grains of corn plants cultivated in soils treated with sewage sludge, *Sci. Total Environ.* 408 (2010) 3270–3276.
- [20] R. P., Singh, M. Agrawal, Potential benefits and risks of land application of sewage sludge, *Waste Management* 28 (2008) 347–358.
- [21] A. Albuzio, G. Ferrari, S. Nardi, Effects of humic substances on nitrate uptake and assimilation in barley seedlings, *Can. J. Soil Sci.* 66 (1986), 731–736.
- [22] R. Zufiaurre, A. Olivar, P. Chamorro, C. Nerín, A. Callizo, Speciation of metals in sewage sludge for agricultural uses, *Analyst* 123 (1998), 255–259.
- [23] M. Beltrami, D. Rossi, R. Baudo, Phytotoxicity assessment of Lake orta sediments, *Aquatic Ecosyst. and Management* 2 (1999), 391–401.
- [24] N. J. Hoekstra, T. Bosker, E.A. Lantinga, Effects of cattle dung from farms with different feeding strategies on germination and initial root growth of cress (*Lepidium sativum* L.), *Agriculture, Ecosyst. Environ.* 93 (2002) 189–196.
- [25] A Fuentes, M. Lloréns, J. Sáez, M. I. Aguilar, J. F. Ortuño, V. F. Meseguer, Phytotoxicity and heavy metals speciation of stabilised sewage sludges, *Journal of Hazard. Mater.* 108 (2004), 161–169
- [26] A. P. Oleszczuk, B. H. Hollert, Comparison of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils, *Chemosphere* 83 (2011) 502–509.
- [27] W. F. Grant, E. T. Owens, *Zea mays* assays of chemical/radiation genotoxicity for the Study of environmental mutagens, *Mutat. Res.* 613 (2006) 17–64.

- [28] W. F. Grant, Higher plant assays for the detection of chromosomal aberrations and gene mutations—a brief historical background on their use for screening and monitoring environmental chemicals, *Mutat. Res.* 426 (1999) 107–112.
- [29] G. S. Rodrigues, D. Pimentel, L. H. Weinstein, In situ assessment of pesticide mutagenicity in an integrated pest management program II- maize waxy mutation assay *Mutat. Res.* 412 (1998) 245-250.
- [30] M. J. Plewa, Specific locus assay in *Zea mays*, *Mutation Res.* 99 (1982) 317-337.
- [31] G.S.Rodrigues, Bioensaios de toxicidade genética com plantas superiores *Tradescantia* (MCN e SHM), milho e soja, first ed., Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna, São Paulo, 1999.
- [32] P. K. Hopke, M. J. Plewa, J.B. Johnston, D. L. Weaver, S. G. Wood, R. A. Larson, T. Hinesly, Multitechnique screening of Chicago municipal sewage sludge for mutagenic activity, *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 140-147.
- [33] M. J. Plewa, E. D. Wagner, Germinal cell mutagenesis in specially designed maize genotypes, *Environ Heal. Perspec.* 37 (1981) 61-73.
- [34] W.F, Sheridan, M.G. Neuffer, Maize development mutants, *J. Heredit.* 73 (1982) 318-329.
- [35] N. Kanaya, B.S. Gill, I.S. Grover, A. Murin, R. Osiecka, S.S. Sandhu, H.C. Andersson, *Vicia faba* chromosomal aberration assay, *Mutat. Res.* 310 (1994) 231–240.
- [36] H. Dulieu, Somatic variations on a yellow mutant in *Nicotianatabacum* L. (ap1 a1 ap2 a2). II. Reciprocal geneticevents occurring in leaf cells, *Mutat. Res.* 28 (1975) 69–77.

- [37] P. Chenon, L. Gauthier, P. Loubières, A. Séverac, M. Delpoux, Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. xanthi Dulieu, *Mutat. Res.* 301 (2003) 139-150.
- [38] G. Fiskesjö, The *Allium* test as a standard in environmental monitoring, *J. Heredit.* 102 (1985) 99–112.
- [39] D. M. Leme, M. A. Marin-Morales, *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application, *Mutat. Res.* 682 (2009) 71-81.
- [40] J. Rank, M. H. Nielsen, Evaluation of the *Allium* anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater, *Mutat. Res.* 312 (1994) 17-24.
- [41] C. A. Christofolletti, A. Francisco, C. S. Fontanetti, Biosolid Soil Application: Toxicity Tests under Laboratory Conditions, *Appl. and Environmental Soil Science*, 2012 (2012), 1-9.
- [42] T-H. Ma, *Tradescantia* cytogenetic tests (root-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis): A report of the U.S. environmental protection agency Gene-Tox program, 99 (1982) 293–302.
- [43] A.C. Mielli, M.E.M. Matta, A. Nersesyan, P.H.N. Saldiva, G. A. Umbuzeiro, Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay, *Mutat. Res.* 672 (2009) 51–54.
- [44] J. N. Boyd, G. S. Stoewsand, J. G. Babish, J. N. Telford, D. J. Lisk, Safety evaluation of vegetables cultured on municipal sewage sludge-amended soil, *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 11 (1982) 399-405.

[45] D. A. Fiedler, K. W. Brown, J. C. Thomas, K. C. Donnelly, Mutagenic Potential of Plants Grown on Municipal Sewage Sludge-Amended Soil, *Arch. Environ. Contain. Toxicol.* 20 (1991) 385-390.

[46] D. V. Parke, In "Enzyme Induction", Plenum Press. 1975, pp. 207-2071.

[47] W.M. Hashek, A. K. Furr, T. F. Parkison, C. L. Heffron, J. T. Reid, C.A. Bache, P. C. Wszolek, W. H. Gutenmann, D. J. Lisk. Element and polychlorinated biphenyl disposition and effects in sheep feed cabbage grown on municipal sewage sludge, *Cornell Vet.* 69 (1979) 302.

[48] C. L. Heffron, J. T. Reid , D. C. Elfving, G. S. Stoewsand, W. M. Haschek, J. N. Telford, A. K. Furr, T. F. Parkinson, C. A. Bache, Cadmium and zinc in growing sheep fed silage corn grown on municipal sludge-amended soil, *Agric. Food Chem.* 28 (1980) 58–61.

[49] J. N. Telford, J. G. Babish, B. E. Johnson, M. L. Thonney, W. B. Currie, C. A. Bache, W. H. Gutenmann, D. J. Lisk, Toxicologic studies with pregnant goats fed grass-legume silage grown on municipal sludge-amended subsoil, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13 (1984) 635-640.

[50] M. S. McLachlan, M. Hinkel, M. Reissinger, M. Hippelei, H. Kaupp, A study of the influence of sewage sludge fertilization on the concentrations of PCDD/F and PCB in soil and milk, *Environ. Pollut.* 85 3 (1994) 337-343.

**4.2. Artigo 2. Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico por meio de bioensaio com *Allium cepa***



**Análise do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico por meio de bioensaio com *Allium cepa***

Maria Nilza Corrêa Martins<sup>1</sup>, Victor Ventura de Souza<sup>2</sup>, Tatiana da Silva Souza<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo, CEP 29500-000, Alegre – ES.

<sup>2</sup> Departamento de Biologia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, Rua Alto Universitário s/n – Cx Postal 16- CEP: 29.500.000 – Alegre – ES.

## RESUMO

O uso do lodo de esgoto em solos agrícolas tem se tornado uma alternativa para o seu descarte, mesmo sendo necessárias regulamentações que fixem condições e restrições para que sua aplicação ocorra de forma segura a população e o ambiente. Objetivou-se com este estudo analisar a toxicidade genética em *Allium cepa* em função ou causada pelo lodo de esgoto. O lodo de esgoto bruto apresentou composição físico-química dentro dos limites estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006. Na análise microbiológica, o lodo da ETE de Jerônimo Monteiro apresentou limite de coliformes termotolerantes acima do estabelecido pela resolução. Para o teste de potencial de toxicidade em *A. cepa*, o lodo da ETE Jerônimo Monteiro foi fitotóxico para o lodo de esgoto bruto, e citotóxico e genotóxico para o lodo de esgoto solubilizado. O lodo bruto da ETE Mulembá apresentou potencial genotóxico e mutagênico, enquanto o lodo solubilizado foi citotóxico. O lodo bruto com adição de cal apresentou potencial fitotóxico, e o lodo solubilizado apresentou ser citotóxico e genotóxico. Pode-se concluir que os lodos de esgoto analisados apresentaram potencialidade tóxica, servindo de alerta para aplicação do lodo em solo agrícola, que deverão ser monitorados com análises citogenéticas; controle dos elementos tóxicos e de sua aplicabilidade em solos agrícolas.

Palavra-chave: Mutagenicidade, *Allium cepa*, tratamento de esgoto.

## ABSTRACT

The use of sewage sludge in agricultural soils has become an alternative to your disposal, even though necessary regulations which lay down conditions and constraints for your application takes place safely to the population and the environment. The aim of this study to analyze the genetic toxicity in *Allium cepa* in function or caused by sewage sludge. The raw sewage sludge presented physical-chemical composition within the limits established by CONAMA resolution 375/2006. In microbiological analysis, the sludge of ETE of Jerônimo Monteiro presented fecal coliforms above the limit established by the resolution. For potential toxicity testing in the *A. cepa*, the sludge of ETE Jerônimo Monteiro was phytotoxic to raw sewage sludge, and cytotoxic and genotoxic for sewage sludge solubilization. The gross sludge of ETE Mulembá presented genotoxic and mutagenic potential, while the sludge solubilized was cytotoxic. The gross sludge with addition of lime presented potential phytotoxic, and the sludge solubilized presented be cytotoxic and genotoxic. It can be concluded that the sewage sludge analyzed showed toxic potential, serving as lookout for sludge application in agricultural soil, which should be monitored with cytogenetic analyses; control of toxic elements and its applicability in agricultural soils.

Keyword: Mutagenicity, *Allium cepa*, sewage treatment.

## 1. INTRODUÇÃO

A crescente população dos centros urbanos é uma importante produtora de diversos resíduos, os quais, muitas vezes, são acumulados no ambiente sem o tratamento adequado. Dentre esses resíduos, destaca-se o lodo de esgoto, ou biossólido, resultante do tratamento das águas servidas, que apresenta potencialidade para utilização agrícola (NASCIMENTO et al., 2004).

O reuso de lodo de esgoto em solos agrícolas deve ser feito com controle, pois embora apresente características consideravelmente favoráveis ao seu uso, esse resíduo pode conter inúmeras substâncias prejudiciais ao meio ambiente e ao homem (LESSA, 2005).

De acordo com Costa e Costa (2011), o uso agrícola do lodo de esgoto deve considerar os aspectos referentes à qualidade dos biossólidos, principalmente quanto aos metais pesados, organismos patogênicos e atração de vetores, sendo ainda avaliados os aspectos de condições do solo, características das áreas de aplicação, taxa de aplicação e culturas agrícolas recomendadas.

Assim, considerando que o lodo de esgoto é fonte potencial de substâncias tóxicas e de organismos patogênicos, objetivou-se com este estudo analisar a toxicidade genética em *Allium cepa* em função do lodo de esgoto proveniente da ETEs J M e M.

## **2. MATERIAL e MÉTODOS**

### **2.1. Material**

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Morfologia no campus do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Espírito Santo, localizado no município de Alegre – ES, utilizando-se sementes de cebola (*Allium cepa*), cv Baia Periforme, oriundas de lote comercial da marca Feltrin®.

### **2.2. Coleta e análise físico-química e microbiológica do lodo de esgoto**

Os lodos brutos foram coletados na ETE Jerônimo Monteiro em setembro de 2013, e na ETE Mulembá em fevereiro de 2014, sendo cada amostra homogeneizados separadamente e enviados para realização das análises de: pH, umidade, carbono orgânico total, quantidade de matéria orgânica, concentração de macronutrientes (Ca, S, P, Mg e K), micronutrientes( Mn, Ni, Zn, Mo, Na, Cu) e), metais pesados (As, Ba, Cd, Pb, Cu, Cr, Hg, Mo, Ni, Se e Zn) e parâmetros microbiológicos (coliformes termotolerantes e coliformes totais). Para análises citogenéticas foram reservadas 500 g das amostras, armazenadas em câmara fria, à 4°C até o início dos experimentos.

As coletas foram feitas em conformidade com a ABNT-NBR 10007 (2004), e as análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas pela Agrolab – Análises e Controle de Qualidade LTDA, localizado em Vila Velha - ES.

### **2.3. Análise físico-química do substrato comercial**

Foi utilizado substrato comercial da marca Plant Fertil®, sem aditivos químicos e atóxico, como controle, cujas análises físico-químicas foram feitas pela empresa Agrolab-Análises e Controle de Qualidade LTDA, localizada em Vila Velha-ES; as

análises químicas de macronutrientes, umidade, pH, MO e carbono orgânico total foram feitas no Laboratório de Solos do Centro de Ciências Agrárias da UFES, conforme metodologia proposta pela EMBRAPA (1997); os micronutrientes Cu, Zn, Fe e Mn e B, de acordo com a Comissão de Fertilidade-RS/SC (1994) e os teores de metais pesados, Cd, Cr, Ni, Pb e Hg, conforme descrito por Ure e Shand (1974).

#### **2.4. Solubilização do lodo de esgoto e do substrato comercial**

A solubilização do lodo de esgoto seguiu a norma ABNT-NBR 10006 (2004)- Solubilização de Resíduos, em que 250 gramas de lodo de esgoto (base seca) foram adicionados a 1000 mL de água destilada, mantidos sobre agitação mecânica por 5 minutos e, em seguida, em repouso em temperatura ambiente por sete dias. Após a decantação dos sólidos, o sobrenadante foi retirado para obtenção do solubilizado. Procedimento similar foi utilizado para obtenção de substrato solubilizado.

#### **2.5. Tratamentos**

Os tratamentos utilizados foram: água destilada (controle negativo) (CN); trifluralina(190 µL de trifluralina/100 mL de água destilada) (controle positivo) (CP); substrato comercial solubilizado (controle)(SCs);lodo de esgoto solubilizado(LEs); substrato comercial (controle)(SC) e lodo de esgoto (LE), num delineamento inteiramente casualizado.

A partir do lodo de esgoto da ETE Mulembá, amostras de biossólido também foram analisadas mediante o bioensaio com *Allium cepa*. O lodo de esgoto tratado foi transportado em bombas plásticas de 200 litros. Em Alegre, o lodo foi colocado para secar sobre lona plástica, sendo que nesse período adicionou-se 30% de cal virgem. Onde permaneceu por 50 dias antes do uso (LIMA et al., 2011).

Desse modo, para a ETE Mulembá, além dos tratamentos supracitados, as seguintes amostras também foram analisadas: lodo de esgoto com adição de cal (LEC) e lodo de esgoto com adição de cal solubilizado (LECs).

## 2.6. Bioensaio com *A. cepa*

Foram semeadas 100 sementes de *Allium cepa*, em placas de Petri, forradas com papel filtro embebidas com as diferentes soluções, com quantidade equivalente a 3,0 vezes a massa do papel seco.

A germinação foi realizada em câmara tipo BOD à  $\pm 24^{\circ}\text{C}$ . Quando as raízes atingiram aproximadamente 1,5 cm de comprimento foram fixadas em Carnoy I (álcool etílico + ácido acético na proporção 3:1) por 24 h. Posteriormente, as raízes passaram por 5 banhos, de 5 minutos cada, em água destilada, e foram hidrolisadas em HCl 1N, em temperatura ambiente por 20 minutos e passaram por mais um banho de água destilada. As pontas das raízes foram seccionadas em lâmina, coradas comorceína acética a 2%, recobertas por lamínulas e maceradas. Para a análise de micronúcleos em células F1 (região não meristemática), foi seguido o protocolo estabelecido por Ma et al. (1995).

O material foi analisado em microscópio de luz (com aumento de 400 x.) por tratamento, sendo que 5.000 células foram contadas (500 células em 10 lâminas).

O potencial citotóxico foi avaliado por meio do cálculo do índice mitótico (IM). O potencial genotóxico foi avaliado por meio da contagem de anormalidades mitóticas e cromossômicas (anáfases multipolares, C-metáfases, células poliplóides, aderências, perdas e pontes cromossômicas) nas células do meristema radicular. Micronúcleos (MN) meristemáticos, micronúcleos da F1e quebras cromossômicas (QC) foram quantificados para a avaliação da atividade mutagênica dos tratamentos.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis ( $p < 0.05$ ).

## RESULTADOS

### 2.2. Análise físico-química e microbiológica das amostras

A análise físico-química e microbiológica do substrato comercial e do lodo de esgoto das ETEs JM e M são apresentadas na Tabela 1.

Considerando as análises físico-químicas, todas as amostras apresentaram resultados dentro dos valores estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006. O lodo da ETE de JM apresentou valores elevados de fósforo total e nitrogênio total comparado ao lodo da ETE M e ao substrato. Já o lodo da ETE M apresentou valores elevados de cálcio, enxofre, magnésio e potássio em relação ao lodo da ETE JM e ao substrato.

Os metais pesados presentes nas amostras de lodo de ambas as ETEs apresentaram resultados dentro dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006. O lodo da ETE M apresentou valores de Ba, Pb, Cr, Hg, Ni, e Zn, mais elevados que os valores encontrados no lodo da ETE JM. Para este, o nível de Mo foi elevado, comparado com o lodo da ETE M.

Para a análise microbiológica, o lodo da ETE de JM apresentou valores de coliformes termotolerantes acima do valor estabelecido pela legislação ( $<10^3$  NMP/g de ST).



Tabela1. Análise físico-química e microbiológica de substrato e lodos da ETE de JM e da ETE M

Elementos	Substrato	Lodo JM	Lodo M	Conama 375/2006
Arsênio (mg/kg)	<L.Q.	<L.Q.	<L.Q.	41
Bário (mg/kg)	63,3	201	518	1300
Cádmio Total (mg/kg)	<L.Q.	<L.Q.	<L.Q.	39
Cálcio (mg/kg)	3,36	2.322	8.221	N.E.
Carbono Orgânico Total (%)	N.A.	5,70	6,55	N.E
Chumbo Total (mg/kg)	33,6	24,40	45,4	300
Cobre Total (mg/kg)	47,8	125	315	1500
Cromo Total (mg/kg)	60,5	30,10	41,1	1000
Enxofre (mg/kg)	727	13.855	18.306	N.E.
Fósforo Total (%)	287,82	5.956	0,115	N.E.
Magnésio (mg/kg)	1,79	994	3.761	N.E.
Manganês Total (mg/kg)	249	160	220	N.E.
Matéria Orgânica (%)	20	9,83	11,30	N.E
Mercúrio (mg/kg)	0,028	0,035	2,33	17
Molibdênio (mg /kg)	3,05	6,57	<L.Q.	50
Nitrogênio Total	1,5-3%	44.026	5.505	N. E
Níquel Total (mg/kg)	9,89	14,50	20,3	420
pH	6,92	7,55	6,51	N.E.
Potássio (mg/kg)	131,50	2.843	4.622	N.E.
Selênio (mg/kg)	<L.Q	<L.Q.	<L.Q.	100
Sódio (mg /kg)	21	1.114	2.764	N.E.
Umidade (%)	N.A.	85,19	82,89	N.E.
Zinco Total (mg/kg)	110	545	738	2800
Coliformes				<10 <sup>3</sup> NMP/g de
Termotolerantes (NMP/100mL)	N.A.	> 5,0 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup>	ST
Coliformes Totais (NMP/100mL)	N.A.	> 5,0 x 10 <sup>3</sup>	1,2 x 10 <sup>2</sup>	N.E.

L.Q.= Limite de Quantificação;

N.E.= Não Especificado;

N. A.= Não Analisado

## 3.2. Bioensaio com *Allium cepa*

### 3.2.1. Lodo da ETE Jerônimo Monteiro

Ocorreu inibição total da germinação das sementes de *A. cepa* expostas ao lodo de esgoto. Portanto, essa amostra foi considerada fitotóxica para espécie vegetal (Tabela 2).

O lodo de esgoto solubilizado apresentou maior índice mitótico que o substrato solubilizado e o controle positivo, e valores estatisticamente significativos para o teste de genotoxicidade, em relação ao substrato (SC) e ao substrato solubilizado (SCs) (Tabela 2).

De acordo com os dados apresentados na Tabela 3, o lodo solubilizado (LEs) apresentou frequência significativa de C-metáfase em relação ao CN, SC e SCs. O LEs também apresentou resposta significativa para poliploidia e ponte cromossômica, em relação ao controle positivo, substrato solubilizado e substrato controle.

As amostras de lodos não apresentaram resposta significativa para os testes de MN+ QC e MN F<sub>1</sub>, o que sugere que as alterações encontradas em AMC foram passíveis de reparo ou morte durante o processo de desenvolvimento da raiz da planta. Como confirmação do teste somente o CP apresentou resposta significativa para ambas as análises de mutagenicidade em relação ao controles (CN, SC e SCs) (Tabela 2).

### 3.2.2 Lodo da ETE Mulembá

As sementes de *Allium cepa* expostas ao lodo de esgoto com adição de cal não germinaram. Portanto, esse lodo foi considerado como fitotóxico para espécie vegetal (Tabela 2).

O lodo de esgoto solubilizado (em relação ao CN) e o lodo de esgoto com adição de cal solubilizado (LECs) (em relação ao CN e SC) também apresentaram valores estatisticamente significativos para o teste de citotoxicidade.

O lodo de esgoto (relação ao controle negativo e lodo de esgoto solubilizado) e lodo de esgoto com adição de cal solubilizado (relação ao CN) apresentou valores estatisticamente significativos para o teste de genotoxicidade.

Para análise de mutagenicidade (MN+QC) o lodo de esgoto (LE) apresentou valores estatisticamente significativos em relação aos LECs, CN, SC e SCs, entretanto, para análise de MN em região F1 nenhuma amostra foi significativa (Tabela 2).

Para todas as análises realizadas o controle positivo apresentou resposta significativa em relação ao CN, confirmando a eficiência do teste.

Nas Tabelas de alterações mitóticas e cromossômicas apenas o CP apresentou respostas significativas para aderência cromossômica, em relação ao CN, SCs, LECs, LE e LECs, e células multinucleadas em relação ao CN, SCs, SC e LECs (Tabela 3).

As alterações mitóticas e cromossômicas encontradas nas amostras de lodo de esgoto estão na figura 1.

Tabela 2. Média  $\pm$  desvio padrão do índice mitótico (IM), aberrações mitóticas e cromossômicas (AMC) e de micronúcleos (MN) em *Allium cepa*, após exposição ao lodo de esgoto da ETE JM e da ETE M

Amostras	Tratamentos	Alterações			
		IM	AMC	MN+QC	MN F1
Lodo ETE JM	CN	26,9 $\pm$ 16,8	4,9 $\pm$ 5,7	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	CP	22,1 $\pm$ 20,3	11,7 $\pm$ 8,6 <sup>c, d</sup>	2,1 $\pm$ 2,3 <sup>a, c, d</sup>	1,0 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>
	SCs	25,0 $\pm$ 10,5	0,9 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	1,1 $\pm$ 1,4
	LEs	46,5 $\pm$ 13,0 <sup>b, c</sup>	13,4 $\pm$ 4,8 <sup>c, d</sup>	0,1 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,6
	SC	34,5 $\pm$ 12,1	1,4 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,4
	LE	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.
Lodo ETE M	CN	60,0 $\pm$ 4,3	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	CP	29,1 $\pm$ 82,0 <sup>a</sup>	24,5 $\pm$ 23,8 <sup>a</sup>	2,8 $\pm$ 4,8 <sup>a</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
	SCs	25,0 $\pm$ 4,9	0,9 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LEs	17,3 $\pm$ 30,4 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	SC	34,5 $\pm$ 2,1	1,4 $\pm$ 0,8	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LE	54,0 $\pm$ 12,7	2,0 $\pm$ 1,5 <sup>a, f</sup>	2,7 $\pm$ 1,5 <sup>a, c, d, f</sup>	0,0 $\pm$ 0,0
	LEC	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.
	LECs	11,0 $\pm$ 18,4 <sup>a, d</sup>	2,8 $\pm$ 3,9 <sup>a</sup>	0,2 $\pm$ 0,6	0,5 $\pm$ 1,0

CN: controle negativo (água destilada); CP: Trifluralina; SCs: Solo Controle solubilizado; LEs: Lodo de esgoto solubilizado; SC: solo controle; LE: lodo de esgoto; LEC: lodo de esgoto com adição de cal; LECs: lodo de esgoto com adição de cal solubilizado.

AMC: Aberrações mitóticas e cromossômicas; MN + QC: Micronúcleos e quebras cromossômicas contabilizados em células meristemáticas (índice de mutagenicidade); MN F1: Micronúcleos contabilizados em células F1.

Número de células analisadas por tratamento: 5000. Teste estatístico: Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).

<sup>a</sup>significativo em relação ao controle negativo (CN); <sup>b</sup> significativo em relação ao controle positivo (CP); <sup>c</sup> significativo em relação ao substrato controle solubilizado (SCs); <sup>d</sup> significativo em relação ao substrato controle (SC); <sup>e</sup> significativo em relação ao lodo de esgoto (LE); <sup>f</sup> significativo em relação ao lodo de esgoto solubilizado (LEs); N.G.: Sementes que não germinaram.

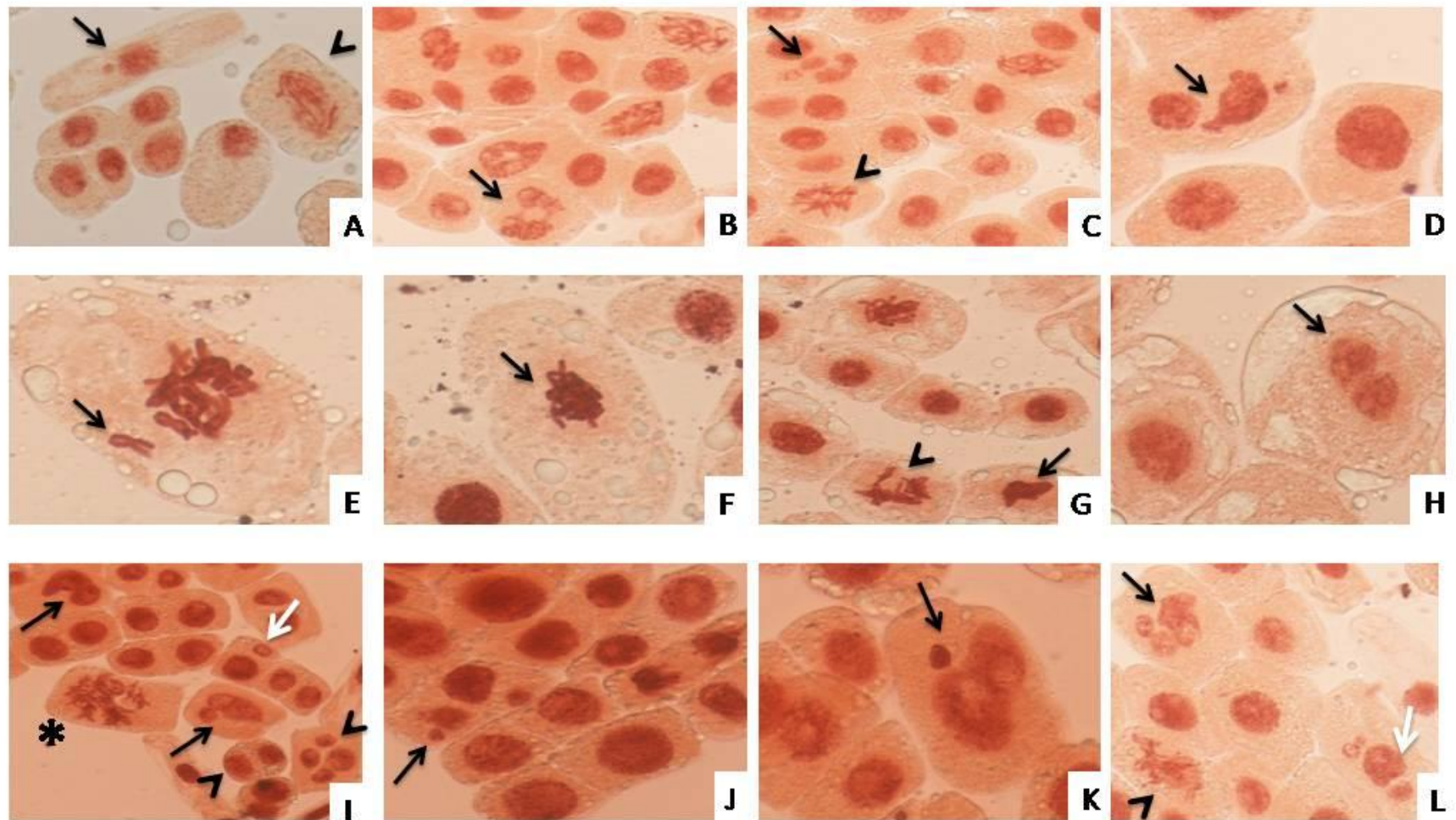
Tabela 3. Média  $\pm$  desvio padrão das alterações mitóticas e cromossômicas em *Allium cepa*, após exposição ao lodo de esgoto da ETE JM e da ETE M

Tratamentos	Alterações mitóticas e cromossômicas									
	AC	C-M	PC	PP	PTC	BN	NC	NL	C. Mn	
Lodo - ETE JM	CN	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	2,9 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,6 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0
	CP	1,3 $\pm$ 0,7	2,2 $\pm$ 4,2 <sub>a</sub>	1,4 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 2,8	0,4 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	3,0 $\pm$ 1,4 <sup>c,d</sup>	1,1 $\pm$ 2,1
	SCs	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LEs	1,3 $\pm$ 0,7	2,7 $\pm$ 3,5 <sub>a,c,d</sub>	0,1 $\pm$ 0,7	4,6 $\pm$ 2,1 <sup>b,c,d</sup>	3,9 $\pm$ 1,4 <sup>b,c,d</sup>	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,70
	SC	0,5 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LE	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.
	CN	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
Lodo - ETE M	CP	8,7 $\pm$ 35,3 <sub>a,c,e,f,g</sub>	3,6 $\pm$ 3,5	0,1 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,7	0,3 $\pm$ 0,7	1,3 $\pm$ 0,0	2,6 $\pm$ 4,2	1,9 $\pm$ 1,7	4,2 $\pm$ 3,0 <sup>a,c,d,e</sup>
	SCs	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LEs	0,2 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	SC	0,5 $\pm$ 0,7	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0
	LE	0,0 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,4 $\pm$ 0,7	0,4 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 1,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,31	0,6 $\pm$ 1,0
	LEC	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.	N.G.
	LECs	0,1 $\pm$ 0,0	0,2 $\pm$ 0,0	0,0 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,7	0,0 $\pm$ 0,0	0,1 $\pm$ 0,0	1,2 $\pm$ 3,4	0,0 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,9

CN: controle negativo (água destilada); CP: Trifluralina; SCs: Solo Controle solubilizado; LEs: Lodo de esgoto solubilizado; SC: Solo controle bruto; LE: Lodo de esgoto; LEC: lodo de esgoto com adição de cal; LECs: lodo de esgoto com adição de cal solubilizado.

AC: aderência cromossômica; C-M: C-metáfase; PC: perda cromossômica; PP: poliploidia; PTC: ponte cromossômica; BN: broto nuclear; NC: núcleo condensado; NL: núcleo lobulado; C.Mn: célula multinucleada.

Teste estatístico: Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ).<sup>a</sup>significativo em relação ao controle negativo (CN); <sup>b</sup> significativo em relação ao controle positivo (CP); <sup>c</sup> significativo em relação ao substrato controle solubilizado (SCs); <sup>d</sup> significativo em relação ao substrato controle (SC); <sup>e</sup> significativo em relação ao lodo solubilizado; <sup>f</sup> significativo em relação ao lodo de esgoto; <sup>g</sup> significativo em relação ao lodo de esgoto com adição de cal solubilizado; N.G.: Sementes que não germinaram.



**Figura 1:** Alterações mitóticas e cromossômicas observadas em *Allium cepa*. A. Micronúcleo (seta) e Anáfase com ponte (cabeça de seta). B. Telófase com ponte (seta). C. Anáfase multipolar (cabeça de seta) e núcleo lobulado (seta). D. Núcleo lobulado (seta). E. Perda cromossômica (seta). F. Aderência cromossômica (seta). G. Anáfase multipolar (cabeça de seta) e aderência cromossômica (seta). H. Célula binucleada (seta). I. Núcleo lobulado (seta), célula multinucleada (cabeça de seta), micronúcleo (seta branca) e metáfase poliplóide (asterisco). J. Micronúcleo (seta). K. Micronúcleo (seta). L. Núcleo lobulado (seta), micronúcleo (seta branca) e aderência cromossômica (cabeça de seta).

### 3. DISCUSSÃO

#### 4.1- Análises físico-químicas e Microbiológicas das amostras de lodo de esgoto

Os lodos de esgoto analisados apresentaram características distintas, como o volume de esgoto coletado, percentual de residências atendidas pelas ETEs, tipo de estação de tratamento, processo final de secagem e destino final do lodo.

Apesar dessas diferenças, as amostras de lodo da ETE de JM e ETE M apresentaram valores físico-químicos abaixo do estabelecido pela resolução CONAMA 375/2006.

Com relação à análise microbiológica, o lodo de esgoto da ETE M é considerado de classe A na análise de coliformes termotolerantes, por apresentar valor inferior ao estabelecido na legislação. Já o lodo da ETE de JM é considerado de classe B, por apresentar valores acima do estabelecido pela legislação para coliformes termotolerantes, sendo assim necessário um controle de higienização do lodo para eliminação de microrganismos patogênicos e aplicação do mesmo em solo agrícola (BETTIOL et al., 2006).

O lodo contém matéria orgânica, macronutrientes e micronutrientes, que exercem um papel fundamental na produção agrícola e na manutenção da fertilidade do solo (COSTA, 2009). Comparando-se os dois lodos verifica-se que houve valores elevados de fósforo total e nitrogênio total na ETE de JM, valendo destacar que o fósforo desempenha um papel importante na transferência de energia da célula, na respiração e na fotossíntese (GRANT et al., 2001), enquanto o nitrogênio é considerado como o elemento-chave para o desenvolvimento e crescimento das plantas (LIMA, 2010).

Bettiol e Camargo (2006) relataram que a matéria orgânica do lodo aplicado ao solo sofre mineralização, liberando nitrogênio na forma amoniacal e nítrica que não é somado ao existente antes da aplicação. O uso adequado do lodo deve visar a sua eficiente utilização com um mínimo de perdas por percolação, volatilização, desnitrificação e arraste superficial.

Esses dados corroboram com os resultados encontrados por Gonçalves et al. (2009), os quais relataram que o lodo da ETE de JM apresentou teores de fósforo

elevados, próximos aos dos esterco bovino e de galinha, e bem superior aos teores encontrados na vinhaça e no composto de lixo.

A ETE M apresentou valores elevados de cálcio, enxofre, magnésio e potássio em relação à ETE JM. De acordo com Prado (2005), o cálcio apresenta funções na estrutura da planta, como integrante da parede celular, e sua falta afeta particularmente os pontos de crescimento da raiz, enquanto o magnésio é um constituinte da clorofila que intervém no processo da fotossíntese. Lima (2010) descreve o potássio e o enxofre como importantes para o desenvolvimento e produtividade das plantas.

Nos elementos metálicos, os dois lodos analisados estão dentro dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006. O lodo de esgoto da ETE M apresentou valores superiores de Ba, Cr, Ni, Zn, Pb e Hg, quando comparado com o lodo da ETE JM, que apresentou valor superior apenas para Mo. De acordo com Mazivieiro (2011), dentre os elementos que oferecem maior perigo, destacam-se o cádmio (Cd), cobre (Cu), molibdênio (Mo), níquel (Ni) e zinco (Zn), sendo que os outros elementos também apresentam toxicidade para plantas e animais, dependendo da concentração disponibilizada.

De acordo com Lima (2010), a presença de metais pesados em lodos de esgotos sanitários está associada a diferentes fontes, podendo destacar as próprias fezes, urina, águas cinza, papel sanitário, produtos vinculados a atividades humanas e aqueles usados em consultórios dentários, farmácias de manipulações, laboratórios de análises clínicas, entre outros, que representam fontes potenciais para a ocorrência de metais nos esgotos sanitários.

Nas análises feitas, não foi possível quantificar o valor de cádmio por apresentar valor abaixo do estabelecido para avaliação. Lara et al. (1999) relataram que o Cd é um dos elementos de grande interesse relacionado à aplicação agrícola do lodo, por oferecer riscos potenciais para a saúde humana. É o metal que se destaca como o mais perigoso, e desnecessário ao metabolismo vegetal e animal.

O Ba é ainda um elemento pouco estudado em solos tratados com lodo de esgoto, embora presente nas plantas, aparentemente não é um componente essencial aos tecidos vegetais, enquanto o Cr apresenta a absorção e translocação variando de acordo com a espécie vegetal, e dependendo das concentrações, pode ocasionar toxicidade nas plantas (MERLINO, 2010).



Lara (1999) avalia o Zn como um elemento essencial às plantas e animais, cuja toxicidade pode ser manifestada quando o pH for menor que 6,5. Porém, mesmo mantendo o pH a 6,5 durante a aplicação do lodo, a toxicidade nas plantas pode ser manifestada.

Os lodos estudados apresentaram pH 7,55 (ETE JM) e 6,51 (ETE M), sugerindo assim, possível contribuição para a elevação do pH do solo, minimizando os riscos de solubilização dos metais e assim a lixiviação no solo e a translocação nas plantas (BETTIOL; CAMARGO, 2006; GONÇALVES et al., 2009). Lara (1999) relatou que é recomendado entre as legislações internacionais a manutenção de pH alcalino ou neutro para diminuir a mobilidade de metais pesados do lodo ao solo e do solo às plantas.

Merlino (2010) destaca o Pb como um dos maiores poluentes do meio, sendo atribuído ao seu largo uso industrial. Apesar de não ser um elemento essencial às plantas, o Pb é facilmente absorvido e acumulado em suas diferentes partes, podendo causar diferentes sintomas de toxicidade em plantas e em animais.

Com relação ao molibdênio, os lodos apresentaram baixos valores, e embora não seja considerado como um elemento muito tóxico aos humanos, elevadas doses podem resultar em toxicidade crônica (LARA, 1999).

#### **4.2 Bioensaio com *Allium cepa***

Os lodos de esgoto avaliados possuem características distintas em sua forma de tratamento. O lodo de esgoto de Jerônimo Monteiro é produzido em uma estação de tratamento de pequeno porte, atendendo aproximadamente 60% da população local (comunicação pessoal), sendo um modelo do sistema UASB, em que o processo de tratamento é circular/aeróbica que proporciona a produção de lodo ativado. Após o tratamento o lodo é descartado no tanque de secagem, passando pelo processo natural de desidratação e em seguida o lodo é depositado em um aterro na própria estação de tratamento de esgoto. De acordo com Lara (1999), a condição para seu uso é que o lodo seja bem estabilizado, pois desta forma o lodo será facilmente drenável e não apresentará problemas de odores.

Até a data da coleta, o lodo não apresentava um controle de análises físico-químicas e microbiológicas (comunicação pessoal), que poderia informar se o mesmo estaria dentro dos padrões estabelecidos pela Resolução CONAMA 375/2006, para possível disposição em solo agrícola, já que o município possui um potencial de aplicação para agricultura (COSTA; COSTA, 2011). O descarte do lodo de esgoto desidratado na própria área da estação apresenta um risco de infiltração dos elementos tóxicos presentes no lodo para o lençol freático, tornando uma fonte de contaminação para os corpos d'água.

O lodo da ETE M atende uma vazão de esgoto maior do que da ETE JM, conseqüentemente, produzindo um volume maior do produto final. Seu processo de tratamento é completo, sendo realizado o processo de desidratação por adensadores e centrífugas, proporcionando um lodo adequado para descarte. O lodo é analisado seguindo as normas estabelecidas pela legislação vigente e seu descarte é realizado para aterros sanitários e para o uso agrícola (comunicação pessoal).

No lodo de esgoto da ETE JM, pode ser observada a inibição da germinação das sementes de cebola, assim como relatado por Maziviero (2011), que ocorreu provavelmente pela elevada concentração de amônia. Sperling (1996) relata que a proporção entre as diferentes formas da amônia está intrinsecamente ligada ao pH. Abaixo de pH 8, a amônia apresenta-se praticamente na forma ionizada, conseqüentemente, disponível para absorção das plantas.

Nas análises físico-químicas do lodo de Jerônimo Monteiro foi possível observar um valor elevado de nitrogênio, em que a grande maioria deste elemento é absorvida sob sua forma hidrolisada do íon amônio ( $\text{NH}_4^+$ ) (Maziviero, 2011), sendo, possivelmente, um dos fatores que desempenhou o potencial fitotóxico para as plântulas oriundas de sementes de *Allium cepa*, podendo ser relacionado com o valor pH, que foi de 7,55.

O lodo de esgoto com adição de cal virgem da ETE Mulembá apresentou a inibição do crescimento da raiz das sementes de cebola, caracterizando o efeito fitotóxico. Assim como relatado por Bonomo (2014), em que o tratamento somente com o lodo de esgoto higienizado levou à inibição do desenvolvimento radicular de *A. cepa*. Na literatura não foi encontrado nenhum estudo relacionando o efeito do carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) no processo de inibição de raízes de plantas, sendo

necessária uma avaliação mais detalhada das possíveis reações químicas dos elementos químicos presentes no lodo de esgoto e a adição da cal virgem.

O potencial citotóxico é relacionado com o aumento ou diminuição do índice mitótico (FERNANDES et al., 2007). Plântulas oriundas de sementes tratadas com lodo de esgoto solubilizado, das duas ETEs, apresentaram aumento ou inibição do índice mitótico em relação aos seus respectivos controles. Bonomo (2014) relata que o índice mitótico reflete diretamente os níveis de proliferação celular, consistindo em um importante parâmetro para avaliar a taxa de crescimento radicular das plantas. Maziviero (2011) descreve que o teste de IM demonstrou em suas análises que todas as amostras apresentaram comportamento similar, não havendo diferença estatisticamente significativa, concluindo a validade do teste.

Caritá e Marin Morales (2010) descrevem que índices mitóticos inferiores ao controle negativo indicam a presença de agente tóxico, que compromete o crescimento e o desenvolvimento dos organismos testes, e o índice mitótico superior e aos observados nos testes controle é resultante de indução da divisão celular. Este teste pode ser um importante indicador de níveis de poluição dos ambientes, especialmente por compostos tóxicos e citotóxicos.

Chenon et al. (2003) relatam que o extrato aquoso representa uma comparação com acontecimentos naturais. Seus efeitos podem ser comparados à chuvas drásticas em parcelas. Nestas condições, substância potencialmente genotóxica absorvida na fração orgânica – mineral do solo pode ser dissolvido e assim expressar seus efeitos genéticos em organismos expostos a água, mesmo em baixas concentrações.

O lodo de esgoto solubilizado da ETE JM, apesar de ser genotóxico, não foi mutagênico para o *Allium cepa*. Em comparação, o lodo de esgoto solubilizado da ETE M não foi genotóxico e nem mutagênico, ao contrário do lodo de esgoto bruto. O lodo de esgoto com adição de cal solubilizado, também foi genotóxico. Assim, pode-se observar neste estudo o efeito desses compostos tóxicos dissolvidos, já que todos os lodos solubilizados apresentaram respostas significativas para diferentes toxicidades.

As aberrações cromossômicas são caracterizadas por mudanças, tanto na estrutura quanto no número total de cromossomos, podendo ser espontânea ou resultado de exposição a agentes físicos ou químicos (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Os lodos que apresentaram resposta genotóxica demonstraram que as

alterações presentes no AMC foram reparadas, pois na célula não-meristemática MN F<sub>1</sub>, não foi identificada resposta significativa. Mesmo o lodo de esgoto da ETE M tendo sido mutagênico, não apresentou efeitos de danos da AMC para MN em célula F<sub>1</sub>, sendo que os micronúcleos e quebras cromossômicas presentes foram eliminadas antes de atingirem a células não meristemáticas. Estes resultados corroboram com os de Christofolletti et al. (2013), que relataram com base nos efeitos genotóxico/mutagênico que o mecanismo de reparação celular foi capaz de reverter os danos causados por metais durante o processo celular, em que o dano induzido em células meristemáticas não progrediu para região F1.

Somente o lodo solubilizado da ETE JM apresentou resultados estatisticamente significativos para ponte cromossômica, C-metáfase e poliploidia. De acordo com Caritá e Marin-Morales (2010), C-metáfases, cromossomos perdidos, atrasos cromossômicos e poliploidia são fenômenos que podem ser derivados de problemas nos microtúbulos citoplasmático, podendo ser usadas como parâmetros de avaliação de efeitos genotóxicos de uma substância ou de um ambiente. Bonomo (2014) e Maziviero (2011) observaram a predominância da formação de pontes cromossômicas, consequência geralmente relacionada à presença de metais pesados em compostos possivelmente presentes em substâncias solúveis. Leme; Marin-Morales (2009) relatam que as pontes cromossômicas podendo ocorrer como consequência da aderência, pois quando se desprende pode levar a ruptura ou a perda cromossômica levando a aneuploidia e poliploidia.

#### 4. CONCLUSÕES

Os resultados das análises físico-químicas apresentaram dentro do limite estabelecido pela resolução CONAMA 375/06.

O lodo da ETE JM pode ser classificado como sendo de classe B, sendo necessário o processo de higienização antes de sua utilização na agricultura.

O lodo bruto da ETE JM e o lodo com adição de cal da ETE M apresentam potencial fitotóxico.

O lodo solubilizado da ETE JM, e os lodos solubilizados e com adição de cal solubilizado da ETE M apresentam potencial citotóxico.

O lodo de esgoto solubilizado ETE JM e o lodo de esgoto e lodo de esgoto com adição de cal solubilizado para ETE M apresentam efeito genotóxico.

O lodo da ETE JM não apresenta potencial mutagênico.

O lodo de esgoto (LE) da ETE M apesar de ser mutagênico para MN+ QC, as alterações encontradas foram passíveis de reparo na região F1, porém esses resultados servem de alerta para a aplicação em solo agrícola.

O lodo de esgoto solubilizado da ETE de JM apresentou C-metáfase, poliploidia e ponte cromossômica, que são indicativos de contaminação do ambiente.

Os resultados mostraram que mesmo passando por processo de higienização os compostos tóxicos ainda estão presentes nas amostras e principalmente solúveis em água, demonstrando o risco para o processo de lixiviação.

Comparando os resultados encontrados no lodo de esgoto bruto e o lodo de esgoto com adição de cal virgem da ETE M foi possível observar os efeitos tóxicos, ficando um alerta para a disposição do mesmo em solo agrícola.

## 6. REFERÊNCIAS

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR. 1006**. Solubilização de Resíduos. 2ª edição. 2004.

ABNT. Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR. 1007**. Resíduos Sólidos Classificação. 2ª edição. 2004.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **A disposição de Lodo de Esgoto e Solo Agrícola IN: Lodo de Esgoto: Impactos Ambientais na Agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 349p. 2006.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A.; GALVÃO, J. A. H.; GHINI, R. Impacto Ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto: Descrição do estudo. In: SÃO PAULO. **Lodo de esgoto: Impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa, 2006. Cap. 1. p. 17-24.

BONOMO, M. M.; **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em caricapapaya I**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

CARITÁ, R.; MARIN MORALES, M. A. **Efeito genotóxico e mutagênico de amostras de águas coletadas em rios que recebem efluentes urbanos e industriais de um pólo ceramista por meio do sistema-teste *Allium cepa***. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, 2010.

CHENON, Pascale et al. Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. **Elsevier: The Science of the Total Environment**, France, v. 301, p.139-150, 2003.

CHRISTOFOLETTI, C. A. **Avaliação da toxicidade de resíduos industriais e urbanos aplicados na agricultura**. 2013. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de

Ciências Biológicas (biologia Celular e Molecular), Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2013.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. RESOLUÇÃO N° 375: Gestão de resíduos e produtos perigosos – Uso. 167 ed. Brasília: Resolução Conama, 2006.p. 25.

COSTA, A. F. S.; COSTA, A. N.; MAIA, F. G.; LIMA, M. F; ALMEIDA, L. F.. Avaliação do desenvolvimento inicial da bananeira (*musa spp.*) Sobre o efeito de diferentes doses de lodo de esgoto tratado. In: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 1., 2009, Vitória. **Anais...** . Vitória: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 2009. p. 1 - 1.

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

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de métodos de análise de solo**. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 212 p, 2. ed. Rio de Janeiro, 1997.

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**, San Diego, v.88, n.3, p. 252-259, 2007.

GONÇALVES, I.Z.; GARCIA, G. O.; MADALÃO, J.C.; BRAGANÇA, H. N.; NAZÁRIO, A. A. Potencial agrícola de utilização do lodo de esgoto doméstico da estação de tratamento de esgoto de Jerônimo Monteiro. In: Congresso Brasileiro De Resíduos Orgânicos, 1., 2009, Vitória. **Anais...** . Vitória: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 2009. p. 1 - 6.

GRANT, C.A.; FLATEN, D. N.; TOMASIGWICZ, D. J.; SHEPPARD, S. .C.A importância do fósforo no desenvolvimento inicial da planta. **Potafos**, Piracicaba, n.

95, p.1-5, set. 2001. Disponível em: <<http://www.potafos.org>>. Acesso em: 10 jan. 2015.

LARA, A. I. (Curitiba). Companhia de Saneamento do Paraná Sanepar Programa de Pesquisa em Saneamento Básico Prosab (Org.). **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. Curitiba: Sanepar Prosab, 1999. 98 f. 1 v.

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

LESSA, G.T. **Contribuição ao estudo da viabilidade da utilização do lodo de estação de tratamento biológico de esgoto misto na construção civil**. 2005. 135 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental e Tecnologias Limpas, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LIMA, M. F.; COSTA, A. F. S.; MATTOS, C. N.; COSTA, A. N. **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo: Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura**. Vitória: Incaper, 2011. 1 v.

LIMA, M. R. P. **Uso de estufa agrícola para secagem e higienização do lodo de esgoto**. 286 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia, Engenharia Hidráulica e Sanitária, Escola Politécnica- Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MA, T.-H.; XU, Z.; XU, C.; McCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research**, v.334, p.185-195, 1995.

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) - Curso de Ciências Biológicas (biologia Celular e Molecular), Biociências, Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2011.



MERLINO, L. C. S. **Bário, cádmio, cromo e chumbo em plantas de milho e em latossolo que recebeu lodo de esgoto por onze anos consecutivos.** Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia (produção Vegetal), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Jaboticabal, 2010.

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. **Rev. Bras. Cien. Solo**, 28. 385-392, 2004.

PRADO, R. de M., **Nutrição da cultura de algodão.** Jaboticabal: FCAV/UNESP. 2005.

SPERLING, Marcos Von. **Princípios do Tratamento de Esgoto**, volume 2. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFMG. Belo Horizonte.1996.

URE, A.M.; SHAND, C.A. The determination of mercury in soils and related materials by cold vapor atomic absorption spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v.2, 1974.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

- Apesar do lodo de esgoto atender os parâmetros exigidos pela legislação, o resíduo pode induzir uma resposta genotóxica e/ou mutagênica em algumas espécies vegetais.
- As amostras de lodo de esgoto da ETE JM e ETE M apresentaram resultados físico-químicos dentro dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006.
- O resultado microbiológico do lodo da ETE JM apresentou valores fora dos padrões, não sendo um lodo caracterizado para possível disposição em solo agrícola, sendo necessário um tratamento adequado de higienização.
- O lodo de esgoto de JM apresentou características fitotóxica, citotóxica e genotóxica, demonstrando que os metais pesados mesmo estando dentro dos padrões estabelecidos pela resolução CONAMA 375/2006, possam induzir efeitos tóxicos para o vegetal superior.
- O lodo da ETE M apresentou resultados citotóxicos, genotóxico e mutagênico em suas amostras de lodo de esgoto.
- Para as amostras de lodo de esgoto com adição de cal (ETE M) foram observadas características fitotóxica, citotóxica e genotóxica, demonstrando que os elementos químicos presentes no lodo possam ter efeito tóxico para amostra de lodo com adição de cal.

De acordo com os dados apresentados, podemos concluir que ambas as amostras de lodo de esgoto analisadas deverão ser monitoradas com análises citogenéticas. Assim, poderão ter respostas imediatas dos elementos tóxicos presentes no lodo de esgoto e um controle de sua aplicabilidade em solo agrícola, sendo necessário o estudo dessas amostras em campo.

## 6. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G. C.; FANHANI, J. C.; D'OLIVEIRA, P. S.; FILHO, B. P. D. Eficiência dos processos químico e térmico na higienização de lodo de esgoto. **CESUMAR**, Maringá, v. 8, n. 1, p.95-99, 2006.

BONOMO, M. M. **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em *carica papaya* l.** Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

CAETANO, L. C. S.; COSTA, A. N; COSTA, A. F. S. Utilização do lodo de estação de tratamento de esgoto para adubação da goiabeira. In: congresso brasileiro de resíduos orgânicos, 1, 2009, Vitória. **Anais...** .Vitória: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 2009. p. 1 - 1.

Cesan. Companhia Espírito Santense de Saneamento (Ed.). **Tratamento de Esgoto**. Vitória: Cesan, 2013. 15 f.

CARITÁ, R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP.** 2010. 190 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, Rio Claro, 2010.

CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M.A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, Oxford, v.72, n.5, p.722-725, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO N° 375:** Gestão de resíduos e produtos perigosos – Uso. 167 ed. Brasília: Resolução Conama, 2006.p. 25.

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

COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S.; CAETANO, L. C. S.; GOULART, F. V. B.; BASSANI, P. D.; LIMA, M. F.; ALMEIDA, L. F.; MATTOS, C. N.; BASTOS, F. A.. Caracterização do lodo de esgoto para utilização como insumo agrícola no cultivo da goiabeira no sul do Espírito Santo. In: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 20., 2008, Vitória. **Anais...** . Vitória: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008. p. 1 - 1.

COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S.; SÁ PAYE, H.; MAIA, F.G.; LIMA, M. F. Produtividade do café arábica (*coffea arábica*) submetido diferentes doses de lodo de estação de tratamento de esgoto tratado com cal virgem. In: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 1., 2009, Vitória. **Anais...** . Vitória: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 2009. p. 1 - 1.

DUARTE, A. C. L. **Incorporação de lodo de esgoto na massa cerâmica para a fabricação de tijolos maciços: Uma alternativa para a disposição final do resíduo**. 2008. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2008.

FREITAS, A. R. **Formação de Mudas de Maracujazeiro Doce em Solos Tratados Com Lodo de Esgoto e Diferentes Níveis de Sombreamento**. 2013. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Produção Vegetal, Produção Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, 2013.

GEOBASE. (Org.). Sistema Integrado de Bases Geoespaciais do Estado do Espírito Santo. 2013. Disponível em: <[www.geobases.es.gov.br](http://www.geobases.es.gov.br)>. Acesso em: 13 maio 2013.

GOMES, I. H.; BERNADINO, U. B.. **Estudo comparativo da produção de lodo das estações de tratamento de esgoto de Mulembá e Vale Encantado e avaliação dos custos com sua disposição**. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, Engenharia Ambiental, Fundação de Assistência e Educação – FAESA Faculdades Integradas Espírito-Santenses. Vitória, 2013.

GONÇALVES, I. Z.; GARCIA, G. O.; MADALÃO, J.C.; BRAGANÇA, H. N.; NAZÁRIO, A. A. Potencial agrícola de utilização do lodo de esgoto doméstico da estação de tratamento de esgoto de Jerônimo Monteiro. In: Congresso Brasileiro De Resíduos Orgânicos, 1., 2009, Vitória. **Anais...** . Vitória: Congresso Brasileiro de Resíduos Orgânicos, 2009. p. 1 - 6.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the US Environmental Agency Gene - Toxicology Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 273- 291, 1982.

HAYNES, R. J.; MURTAZA.G.; NAIDU, R. Inorganic and organic constituents and contaminants of biosolids: implications for land application. **Advances in Agronomy, San Diego**, v. 104 p. 165-267, 2009.

IBGE. (Org.). Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. Disponível em: <<http://cidades.ibge.gov.br>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

LARA, A. I. (Curitiba). Companhia de Saneamento do Paraná Sanepar Programa de Pesquisa em Saneamento Básico Prosab (Org.). **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. Curitiba: Sanepar Prosab, 1999. 98 f. 1 v.

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

LESSA, G. T. **Contribuição ao estudo da viabilidade da utilização do lodo de estação de tratamento biológico de esgoto misto na construção civil**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental e Tecnologias Limpas, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

LIMA, M. F.; COSTA, A. F. S.; MATTOS, C. N.; COSTA, A. N. **Manual de uso agrícola e disposição do lodo de esgoto para o estado do Espírito Santo**: Geração de lodo de esgoto e seu potencial como fonte de matéria orgânica para a agricultura. Vitória: Incaper, 2011. 1 v.

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*, Alegre, v. 23, n. 1, p.143-147, jan. 2005.

MAZIVIERO, G. T. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas-teste *Allium cepa* E *Tradescantiapallida***. 2011. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Biológicas (biologia Celular e Molecular), Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2011.

MIELLI, A. C. ; MATTA, M. E. M.; NERSESYAN, A.; SALDIVA, P.H.N.; UMBUZEIRO, G.A. Evaluation of the genotoxicity of treated urban sludge in the *Tradescantia* micronucleus assay. *Mutation Research/genetic Toxicology And Environmental Mutagenesis: Elsevier*. São Paulo, p. 51-54. jan. 2009.

MORAES, D. S. L.; JORDÃO, B. Q. **Avaliação dos potenciais tóxico, citotóxico e genotóxico de águas ambientais de Corumbá- MS em raízes de *Allium cepa***. 2000. 1 v. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Melhoramento, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2000.

MORAIS, A. C. **Estimativa de cargas poluidoras na baía de Vitória com uso de sistemas de informações geográficas e sensoriamento remoto**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências em Engenharia Ambiental, Centro Tecnológico, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2008.

OLIVEIRA, J. P. B.; LOPES, J. C.; ALEXANDRE, R. S.; JASPER, A. P. S.; SANTOS, L. N. S; OLIVEIRA, L. B. Efeito do lodo de esgoto no desenvolvimento inicial de duas cultivares de mamona em dois tipos de solos. *Engenharia Ambiental - Espírito Santo do Pinhal*, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, n. 2, p.174-180, maio 2009.

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**, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p.149-160, jul. 2010.

RANK, J.; NIELSEN, M.H.A modified *Allium* test as a tool in the screening of the genotoxicity of complex mixtures. **Hereditas**, v.18, p.49-53, 1993.

RUSSEL, P.J. Chromosomal mutation. In : CUMMINGS, B. (Ed.). **Genetics**. San Francisco: Pearson Education Inc., 2002. p. 595-621.

SAITO, M. L. **O Uso do Lodo de Esgoto na Agricultura: Precauções com os contaminantes orgânicos**. Embrapa Meio Ambiente Jaguariúna, SP. 2007.

SANTOS, E. R. **Caracterização química, microbiológica e toxicidade do lodo de esgoto da estação Mangueira, Pernambuco, Brasil**. 2009. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Desenvolvimento de Processos Ambientais, Desenvolvimento de Processos Ambientais, Universidade Católica de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, G. M.; WANKE, R.; SANT'ANA, D.C; PEGORETTI, J. M.; GONÇALVES, R. F. Pequenas estações “anaeróbio - aeróbio” de alta taxa para tratamento secundário de esgoto sanitário no Brasil. In: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 28., 2002, Cancún. **Anais...** .Cancún: Congresso Interamericano de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, 2002. p. 1 - 8.

TAQUES, R. C.; COSTA, A. N.; COSTA, A. F. S.; BASSANI, P. D.; BASTOS, F. A.; LIMA, M. F.; ALMEIDA, L. F.; MATTOS, C. N.; GOULART, F. V. B.; CAETANO, L. C. S. Mapeamento de áreas propícias ao aproveitamento de lodo de esgoto doméstico na cultura da bananeira, na região norte do estado do Espírito Santo. In: Congresso Brasileiro De Fruticultura, 1., 2008, Vitória. **Anais...** .Vitória: Congresso Brasileiro de Fruticultura, 2008. p. 1 - 1.

VANZELLA, T. P. **Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical**. 2006. 92 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética e Biologia Celular, Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

VILLAR, L. D.. **Estudo da lixiviação bacteriana de metais presentes em lodo de esgoto sanitário**. 2003. 142 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Araraquara, 2003.

YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* e *Vicia faba*. **Mutation Research**, Amsterdam, v.537, p.109-114, 2003.