



Avaliação da persistência de agentes patogênicos em solo agrícola cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário ⁽¹⁾.

Marianne Fidalgo de Faria⁽²⁾; Robert Boyd Harrison⁽³⁾; Iraê Amaral Guerrini⁽⁴⁾; Maria Inês Zanoli Sato⁽⁵⁾; Elayse Maria Hachich⁽⁶⁾; Fernando Carvalho Oliveira⁽⁷⁾.

⁽¹⁾ Trabalho executado com recursos da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB e da Suzano Papel e Celulose S/A.

⁽²⁾ Mestranda, bolsista FAPESP; Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; Botucatu, São Paulo; mariannefidalgo@fca.unesp.br; ⁽³⁾ Professor; University of Washington; ⁽⁴⁾ Professor, Faculdade de Ciências Agrônomicas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP; ⁽⁵⁾ Gerente do Departamento de Análises Ambientais; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB; ⁽⁶⁾ Gerente da Divisão de Microbiologia e Parasitologia; Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB; ⁽⁷⁾ Engenheiro Agrônomo; Biossollo Agricultura e Ambiente Ltda.

RESUMO: Dentro do contexto agrícola, o setor florestal se destaca como candidato em potencial para a utilização de resíduos orgânicos. No Brasil, a Resolução nº 375/2006 do CONAMA surgiu após vários anos de discussão envolvendo os riscos quanto ao uso do lodo de esgoto na agricultura e estabelece limites máximos para concentração de patógenos em lodos a serem aplicados no solo. No presente estudo, foi avaliado o tempo de persistência de ovos viáveis de *Ascaris*, coliformes termotolerantes, *Salmonella spp* e enterovírus em solo cultivado com *Eucalyptus* e fertilizado com lodo de esgoto sanitário em área localizada no município de Avaré - SP, seguindo-se método desenvolvido pela Agência Ambiental Americana (USEPA) e adotado pela Resolução CONAMA nº375/2006. No tratamento A, foi aplicado lodo proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos de Jundiaí e no tratamento B, lodo proveniente da Estação de Tratamento de Esgotos de Taubaté. Os tempos mínimo, médio e máximo estimados para coliformes termotolerantes foram, respectivamente, 33,63; 43,69 e 79, 67 dias para o tratamento A e 69,50; 89,59 e 167,25 dias para o tratamento B. O tempo médio estimado para o limiar de enterovírus foi de 15 dias para o tratamento A, não sendo possível ajustar o modelo para o tratamento B. Não foi possível ajustar um modelo para *Salmonella spp* em nenhum dos tratamentos. O tempo médio estimado para o limiar de ovos viáveis de *Ascaris sp* foi de 89,59 dias para o tratamento B, não sendo possível ajustar o modelo para o tratamento A.

Termos de indexação: biossólidos; patógenos; Resolução CONAMA nº 375/2006.

INTRODUÇÃO

A aplicação agrícola do lodo de esgoto no solo se destaca não só pelos aspectos ambientais e econômicos, mas também pelas vantagens obtidas

por ser uma fonte muito rica de matéria orgânica e nutrientes, conferindo ao solo maior capacidade de retenção de água e resistência à erosão, além de reduzir o uso de fertilizantes químicos (Bettiol & Santos, 2006).

No Brasil, a reciclagem do lodo proveniente de estações de tratamento de esgoto sanitário para uso agrícola é regulamentada pelo Ministério do Meio Ambiente por meio da Resolução nº 375/1996 do Conselho Nacional de Meio Ambiente – CONAMA (Brasil, 2006). O principal empecilho para a aplicação do lodo de esgoto no país tem sido a carga de organismos patogênicos presentes no mesmo, tais como bactérias, protozoários, vírus, leveduras, fungos e helmintos (Bettiol & Santos, 2006).

No exterior, estudos envolvendo a aplicação de biossólidos municipais em solos florestais vêm sendo realizados há mais de 30 anos e estudos sobre a permanência de agentes patogênicos em solos fertilizados com lodo de esgoto mostraram que o tempo de sobrevivência de ovos de *Ascaris* pode variar de 15 meses a até 15 anos em alguns solos, sob condições específicas (Carrington, 2001; Kowal, 1986; Munger, 1983 apud Edmonds, 2000).

Há muitos debates e questionamentos sobre a norma adotada no Brasil devido à sua elevada rigidez referente à contaminação do solo por organismos patogênicos quando comparada com às legislações americana e europeia (Bastos et al, 2009). Além disso, as condições de clima, temperatura, solo e saneamento de um país tropical em desenvolvimento como o Brasil devem ser analisadas a parte, devido às suas peculiaridades (Thomas-Soccol et al, 2010).

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

Sendo assim, objetivou-se avaliar, durante o período de 28 semanas, a persistência da viabilidade

de ovos de *Ascaris sp* e a sobrevivência de coliformes termotolerantes, *Salmonella spp* e enterovírus em solo fertilizado com lodo de esgoto sanitário e cultivado com eucalipto.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi instalado e conduzido no município de Avaré-SP, em área de plantio florestal de *Eucalyptus* pertencente à empresa Suzano Papel e Celulose S/A.

Foram utilizados dois diferentes lodos de esgoto sanitário, sendo um fornecido pela Companhia de Saneamento de Jundiaí (Tratamento A) e o outro fornecido pela Estação de Tratamento de Esgotos de Taubaté (Tratamento B).

O experimento possui delineamento casualizado em blocos com parcelas de dimensão 13,2m x 9m, sendo quatro repetições.

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

A disposição dos sacos de lodo em cada parcela está representada na **figura 1**.

A aplicação do lodo de esgoto em campo foi controlada de acordo com o cálculo para aplicação máxima anual, em ton ha⁻¹, disposto no art. 17 das Res. CONAMA n° 375/2006, onde a taxa não deve exceder o quociente entre a quantidade de nitrogênio (kg ha⁻¹) recomendada para o eucalipto e o teor de nitrogênio disponível (kg ton⁻¹) (Brasil, 2006).

Antes da implantação do experimento, amostras dos dois lodos utilizados foram enviadas para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da CETESB/São Paulo para caracterização inicial das concentrações de ovos de *Ascaris sp* viáveis, coliformes termotolerantes, *Salmonella sp* e enterovírus, estabelecidas pela Resolução n° 375/2006 do CONAMA (Brasil, 2006).

Após a instalação do experimento, uma equipe foi a campo realizar a coleta das amostras de lodo de acordo com a frequência apresentada na **tabela 1**, em um período de 28 semanas.

Após coletadas em campo, as amostras de lodo foram acondicionadas em sacos plásticos esterilizados e encaminhadas, em um intervalo máximo de quatro horas, para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia da CETESB/São Paulo, onde foram realizadas as determinações dos

indicadores microbiológicos e patógenos presentes no material.

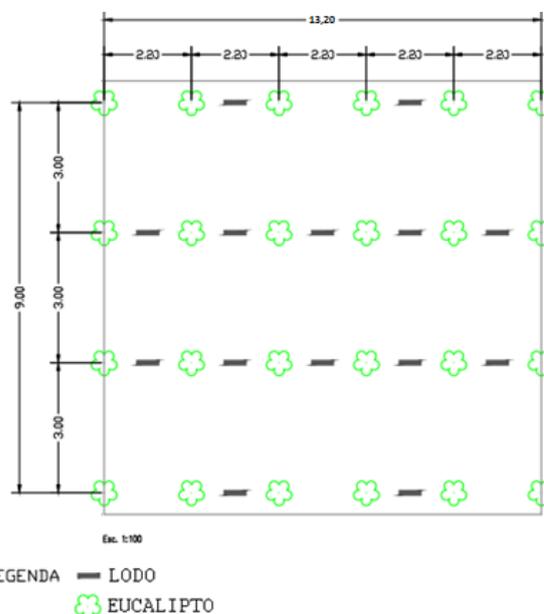


Figura 1 - Detalhe da parcela experimental com esquema de disposição do lodo nas linhas de cultura.

Tabela 1 - Frequência de coleta de amostras em campo para análises.

Variável microbiológica	Coleta de amostra (semanas)
Enterovírus	0, 1, 2
Ovos viáveis de <i>Ascaris</i>	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28
Coliformes termotolerantes	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28
<i>Salmonella sp</i>	0, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20, 28

Os ovos viáveis de *Ascaris spp* foram detectados e quantificados segundo método da Agência Ambiental Americana (USEPA, 2003), modificado. Os resultados foram expressos em n° de ovos viáveis g⁻¹ de sólidos totais.

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

A determinação de enterovírus no lodo de esgoto foi realizada segundo os procedimentos estabelecidos por metodologia da Agência Ambiental Americana (USEPA, 2003), modificado por USEPA (2007b). Os resultados finais foram expressos em UFP (unidades formadoras de placa) por grama de sólidos totais analisados.

Os coliformes termotolerantes foram analisados pela técnica de tubos múltiplos com o meio de cultura A1, segundo metodologia descrita no "Standard Methods" (APHA, 2012). O número mais provável foi estimado utilizando-se a Tabela de Tubos Múltiplos



(APHA, 2012). Os resultados foram expressos em 100g de sólidos totais.

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

Após o ajuste dos modelos, foram obtidas as expressões para determinação do tempo médio para o qual o valor de y seja igual ao valor da densidade de patógenos no solo, ou seja, para $\hat{y} = y_{solo}$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a realização das análises microbiológicas no lodo de esgoto proveniente de Jundiá (Tratamento A) e no lodo de esgoto proveniente de Taubaté (Tratamento B) foram estabelecidos ajustes de modelos de regressão não-linear (Seber & Wild, 2003) e então estimado o tempo de sobrevivência de cada microrganismo no solo.

Coliformes termotolerantes

Os tempos mínimo, médio e máximo estimados para o limiar de coliformes termotolerantes foram, respectivamente, 33,63; 43,69 e 79, 67 dias para o tratamento A e 69,50; 89,59 e 167,25 dias para o tratamento B.

Sendo assim, estima-se que após a aplicação no campo, sob as condições de temperatura e umidade analisadas, o nível de coliformes termotolerantes presentes no lodo levaria no máximo aproximadamente 78 dias para atingir o índice encontrado no solo previamente à aplicação, no tratamento A e 167 dias no tratamento B.

Tal diferença entre os dois lodos em relação ao tempo de sobrevivência já era esperada uma vez que as análises iniciais mostraram que os índices de coliformes termotolerantes eram expressivamente maiores no tratamento B, o que, conseqüentemente, demandaria mais tempo para que os níveis observados no solo fossem alcançados.

Enterovírus

O tempo médio estimado para o limiar de enterovírus foi de 0,15 dias para o tratamento A. Os valores constantes não permitiram a determinação dos tempos mínimo e máximo, uma vez que estatisticamente possuem o mesmo valor.

Sendo assim, estima-se que após a aplicação no campo, sob as condições de temperatura e umidade analisadas, o nível de enterovírus presentes no lodo levou em média 0,15 dias para atingir o índice encontrado no solo previamente à aplicação, no tratamento A.

Mesmo não sendo possível ajustar o modelo para o tratamento B, notou-se que houve uma queda bruta

no limiar de enterovírus logo nos primeiros dias após a aplicação em campo.

Os pequenos valores obtidos em número de dias indicam que o tempo de amostragem em semanas não foi adequado para este patógeno, sendo necessárias amostragens em um período menor, em dias ou horas, para que o tempo de sobrevivência no solo possa ser abordado de maneira mais eficiente.

Salmonella spp

Os resultados analíticos para *Salmonella* spp mostram-se atípicos para a espécie uma vez que a contagem de unidades formadoras de placas por grama de sólidos totais (UFP gST⁻¹) não apresentou, em nenhum dos lodos, curvas de decaimento mas sim picos de acréscimo e decréscimo na contagem ao longo do tempo. Sendo assim, não foi possível ajustar um modelo para este patógeno em nenhum dos tratamentos.

Tal comportamento já foi observado anteriormente em estudo similar realizado por empresas parceiras deste projeto em plantio de cana-de-açúcar fertilizado também com lodo de esgoto sanitário.

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

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

Outra possível razão seria a mudança de comportamento da espécie quando exposta aos fatores ambientais impostos pela aplicação no solo, o que necessitaria maiores estudos em ambientes controlados para melhor esclarecimento da relação entre a *Salmonella* spp e fatores ambientais como temperatura, umidade e radiação solar.

Ovos viáveis de Ascaris sp

O tempo médio estimado para o limiar de ovos viáveis de *Ascaris* sp foi de 89,59 dias para o tratamento B, não sendo possível ajustar o modelo



para o tratamento A, que apresentou pequenos valores quanto ao número de ovos viáveis de *Ascaris* sp desde o início do experimento.

No tratamento B, os valores constantes não permitiram a determinação dos tempos mínimo e máximo, uma vez que estatisticamente possuem o mesmo valor.

Sendo assim, estima-se que após a aplicação no campo, sob as condições de temperatura e umidade analisadas, o nível de ovos viáveis de *Ascaris* sp presentes no lodo levou em média 15 dias para atingir o índice encontrado no solo previamente à aplicação, no tratamento B.

CONCLUSÕES

Os tempos de sobrevivência mínimo, médio e máximo estimados para coliformes termotolerantes foram, respectivamente, 33,63; 43,69 e 79, 67 dias para o tratamento A e 69,50; 89,59 e 167,25 dias para o tratamento B.

O tempo médio de sobrevivência estimado para o limiar de enterovírus foi de 15 dias para o tratamento A, não sendo possível ajustar o modelo para o tratamento B.

Não foi possível ajustar um modelo para *Salmonella* sp em nenhum dos tratamentos, sendo necessária a realização de maiores estudos para que se possa elucidar o comportamento atípico da espécie nesta ocasião.

O tempo médio estimado para o limiar de ovos viáveis de *Ascaris* sp foi de 89,59 dias para o tratamento B, não sendo possível ajustar o modelo para o tratamento A, uma vez que, desde o início, apresentou valores semelhantes ao do solo.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, à Companhia Ambiental do Estado de São Paulo – CETESB, à Suzano Papel e Celulose S/A e à Biossolo Agricultura e Ambiente Ltda.

REFERÊNCIAS

APHA - American Public Health Association. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Section 9221. Multiple tube fermentation technique for members of the coliform group. APHA, AWWA, WEF, 22 st ed., Washington DC, 2012.

BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P. D.; DIAS, G. M. F.; ASSIS, F. J. Análise crítica da legislação brasileira para uso agrícola de lodos de esgotos na perspectiva da avaliação quantitativa de risco microbiológico. Revista AIDIS, 22(1):143-159, 2009. ISSN 0718-378X.

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

BRASIL. Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006. Diário Oficial da União, Brasília, DF, n.167, p. 141-146, 30 ago. 2006. Seção 1.

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

EDMONDS, R. L. Microbial aspects of residuals use in forest ecosystems. In: HENRY, C. L. et al. The forest alternative: Principles and practice of residuals use. Seattle: University of Washington, 2000. p. 39-44.

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

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

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

USEPA - United States Environmental Protection Agency. Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge In: Environmental Regulations and Technology. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge. EPA/625/R-092/013. Jul. 2003.

USEPA - United States Environmental Protection Agency 2006. Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) Medium. EPA 821-R-016-14. Jul 2006.

USEPA - United States Environmental Protection Agency 2007. Preliminary comparative study of methods to extract virus from raw and processed sewage sludge. EPA/600/R-07/118/Sept 2007b.

