UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

THOMAS GAMPER FEITOZA

Patógenos humanos em solo cultivado com eucalipto e tratado com lodo de esgoto classe B: risco, sobrevivência e recrescimento

Piracicaba
2017

THOMAS GAMPER FEITOZA

Patógenos humanos em solo cultivado com eucalipto e tratado com lodo de esgoto classe B: risco, sobrevivência e recrescimento

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior

Piracicaba

2017

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Feitoza, Thomas Gamper

Patógenos humanos em solo cultivado com eucalipto e tratado com lodo de esgoto classe B: risco, sobrevivência e recrescimento / Thomas Gamper Feitoza; Cassio Hamilton Abreu Junior. - - Piracicaba, 2017.

73 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2017.

1. Coliformes 2. Enterovirus 3. Genótipos 4. Helminthes 5. Resíduso urbanos 6. Salmonella 7. Sustentabilidade I. Título.

CDU 631.879.2 (579.63 + 502.131.1)

Für meine Oma, Gisela Gamper

AGRADECIMENTOS

À minha família, que sempre me apoiou incondicionalmente. Gislane, Chagueta, Thabata e Glen, muito obrigado, amo vocês.

À minha amada Mariana, companheira em todos os momentos e um dos meus pilares.

Ao meu orientador, Professor Cassio, por toda a ajuda e aconselhamento.

Aos meus grandes amigos e colegas de mestrado, Deboni e Marcelo, com os quais passei tantos momentos importantes.

A toda a equipe da CETESB, a excelência deste trabalho não seria possível sem a ajuda de vocês. A Maria Inês, Mikaela, Cris, Ana, Hilda, Padula, Solange, Otávio, Zé, Valéria, Gisa, Suzi e Tainá, meus agradecimentos.

A toda a equipe do Laboratório de Sanidade Suína da USP/FMVZ, especialmente à Professora Dra. Andrea Micke Moreno e à Dra. Luísa Moreno, que me acolheram, receberam minhas ideias e depois conduziram magistralmente a parte molecular deste trabalho.

Aos meus amigos Joaquim, Tipóia, Toiço, Mosca, Hard, Pagode, Boi, Castanho, Gustavinho, Rodrigo, Belle, Fred, Júlia, Fábio, todo o pessoal do Rasta e tantos outros, pelos muitos espaços de descontração que fizeram esta caminhada muito mais fácil.

À equipe do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas do CENA, obrigado pela prontidão e prestatividade.

À equipe da pós-graduação do CENA, pela solicitude e calma ao resolver os problemas e burocracias durante o mestrado.

À família Gondo dos Santos, Laurence, Lulu, Patrícia e Carol, que sempre me apoiaram e me deram alegrias e risadas.

Ao Professor Demétrio e ao Grupo Florestal Monte Olimpo, pela ajuda na procura de uma área para o experimento.

À equipe da empresa Águas do Mirante de Piracicaba, pelo fornecimento do lodo para a pesquisa e por abrir as portas para diversas visitas.

Ao Dr. Fernando Carvalho Oliveira da BIOSSOLO, pelo exemplo, pelas conversas e conhecimento compartilhado.

À CAPES e ao CNPQ, pelos recursos financeiros despendidos para a realização desta pesquisa. (CNPQ processo n°. 485205/2012). E à FAPESP pelo projeto que deu origem a esse estudo (processo nº15097-0/2004).

"Quantas aspirações altas e nobres e lúcidas-
Sim, verdadeiramente altas e nobres e lúcidas-,
E quem sabe realizáveis,
Nunca verão a luz do sol real nem acharão ouvidos de gente?
O mundo é para quem nasce para o conquistar
E não para quem sonha que pode conquista-lo, ainda que tenha razão”
Trecho de *Tabacaria*
Álvaro de Campos, Heterônimo de Fernando Pessoa

RESUMO

FEITOZA, T. G. **Patógenos humanos em solo cultivado com eucalipto e tratado com lodo de esgoto classe B:** risco, sobrevivência e recrescimento. 2017. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

O lodo de esgoto é um resíduo inerente a todos os sistemas de tratamento de esgoto. Este resíduo é rico em nutrientes e matéria orgânica e sua aplicação em solos como fertilizante pode ser uma alternativa sustentável comparada às outras formas de disposição praticadas. Mesmo passando por tratamento, o lodo pode conter organismos patogênicos a humanos. Dentre os patógenos, a *Salmonella* possui comportamento errático. Sua persistência no solo pode ser causada por recrescimento ou por colonização por *Salmonella* de origem ambiental. O uso do lodo como adubo em florestas plantadas é potencialmente adequado, dado que o eucalipto não é cultura alimentar, possui ciclos longos e apresenta cultura altamente mecanizada. Ainda assim, algumas atividades são realizadas por operadores em solo. O objetivo deste estudo foi observar o comportamento de quatro grupos de organismos patogênicos (*Salmonella*, Coliformes Termotolerantes, Ovos viáveis de helmintos e *Enterovirus*) provenientes do lodo no solo ao longo de 41 semanas. A fim de separar o efeito do ambiente externo no lodo, foram utilizados dois tratamentos: em Campo e em Estufa. Também foi realizada uma análise de semelhança genética nas cepas de *Salmonella* coletadas ao longo do experimento para inferir sua origem. Por fim, foi realizada uma análise de risco simplificada para a situação de exposição de operadores em diversos cenários à *Salmonella* proveniente do lodo. Os *Enterovirus* desapareceram totalmente em 15 dias após a aplicação. Devido a baixa quantidade de ovos viáveis de helmintos no lodo aplicado, não foi identificado o decaimento. Os coliformes apresentaram decaimento, sendo este mais acentuado em campo do que em estufa devido à maior hostilidade do ambiente aos organismos. *Salmonella* não exibiu decaimento modelável e apresentou picos de crescimento acima do valor inicial após 13 e 40 semanas da aplicação do lodo. As análises de semelhança genética revelaram a capacidade de grupos de *Salmonella* de persistir em solo, exposto ao ambiente, por, ao menos, 34 semanas. Dada a presença de pico nas populações de *Salmonella* em estufa após 40 semanas de experimento, conclui-se que houve recrescimento. A etapa de aplicação do lodo de esgoto como fertilizante é a que apresenta maior risco para o trabalhador, ficando acima do limite estabelecido como tolerável.

Palavras-chave: *Salmonella*. Resolução CONAMA 375/2006. AFLP; Uso Agrícola de Resíduos urbanos

ABSTRACT

FEITOZA, T. G. **Human pathogens in soil cultivated with *Eucalyptus* and amended with class B sewage sludge:** risk, survival and regrowth. 2017. 73 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.

Sewage sludge is a residue inherent to all sewage treatment systems. This residue is rich in nutrients and organic matter. Its amendment to soils as fertilizers is a sustainable alternative to other common methods of disposal. Even passing through sewage treatment, sewage sludge may contain harmful pathogenic organisms. Among them *Salmonella* exhibit an erratic behavior. Its persistence in soils may be caused by regrowth or colonization by environmental strains of *Salmonella*. Usage of sewage sludge as fertilizer in silviculture is potentially adequate due to: *Eucalyptus* not being an edible crop, long-rotation and high level of mechanization. Still, some activities are carried by workers on the ground. The present study aimed to follow the behavior of four groups of pathogens from sewage sludge (*Salmonella*, Thermotolerant Coliforms, Helminth eggs and *Enterovirus*) on soil for 41 weeks. In order to isolate the effect of the external environment, two treatments were used: external, in a farm; and internal, in a greenhouse. A genetic similarity analysis was also made on strains collected along the experiment to infer about its origins. Lastly, a simplified risk analysis was also made for *Salmonella* infection risk to workers in several different scenarios. *Enterovirus* disappeared after 15 days of the date of fertilization. Due to the low concentration of helminth viable eggs in initial sludge, decay could not be observed. Coliforms showed visible decay. Coliform decay on the external treatment was more prominent due to the greater hostility of the environment. *Salmonella* did not showed apparent decay. *Salmonella* peaked in concentration at 13 and 40 weeks after amendment of sewage sludge. The genetic similarity analysis revealed that some groups of *Salmonella* can survive and persist in soils exposed to the environment for at least 34 weeks. Due to presence of a peak of *Salmonella* at closed environment (greenhouse) at 40 weeks it can be concluded that regrowth occurred. The application of sewage sludge on soil by workers is the higher risk activity, with risks standing above tolerable standards.

Keywords: *Salmonella*. CONAMA 375/2006 normative. AFLP. Agricultural Use of Urban Wastes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotos do experimento recém-implantado 32

Figura 2 - Variação no teor de sólidos totais ao longo do experimento. A linha de tendência corresponde ao tratamento ESTUFA 47

Figura 3 - Variação no teor de sólidos totais (CAMPO) x Pluviosidade 48

Figura 4 - Decaimento de *Enterovirus* em CAMPO 49

Figura 5 - Comportamento de Ovos Viáveis de *Ascaris* em CAMPO e ESTUFA 51

Figura 6 - Comportamento dos Coliformes Termotolerantes em CAMPO e ESTUFA 53

Figura 7 - Coliformes Termotolerantes em CAMPO x Teor de Sólidos no Lodo de Esgoto 54

Figura 8 - Comportamento de *Salmonella* em CAMPO e ESTUFA 56

Figura 9 - Análise de similaridade genética entre cepas de *Salmonella*. Mesmas cores indicam mesmo grupo semelhante a 90% 60

Figura 10 - Análise de similaridade genética de *Salmonella* classificado por origem da cepa 61

Figura 11 - Demonstração gráfica dos cenários testados para risco de infeção por *Salmonella* pelo trabalhador 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação dos Lodos de Esgoto segundo sua concentração de patógenos 26

Tabela 2 - Caracterização Preliminar do Lodo proveniente da ETE Piracicamirim quanto à quantidade de patógenos 31

Tabela 3 - Épocas de coleta para o tratamento em CAMPO 31

Tabela 4 - Épocas de coleta para o tratamento ESTUFA 32

Tabela 5 - Sítio de restrição da enzima HindIII e sequências de nucleotídeos dos adaptadores ADH1 e ADH2 e do iniciador HI-G 42

Tabela 6 Cenários para a análise de risco simplificada 45

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19

1.1. Objetivos 21

2 REVISÃO DA LITERATURA 22

2.1. Esgotamento sanitário e produção de lodo de esgoto 22

2.2. Uso agrícola e florestal de lodo de esgoto como fertilizante 23

2.3. Organismos patogênicos presentes no lodo 25

2.4. Risco 28

3. MATERIAIS E MÉTODOS 30

3.1. Informações gerais 30

3.2. Avaliação do decaimento de organismos patogênicos em CAMPO 31

3.3. Avaliação do decaimento de organismos patogênicos em ESTUFA 32

3.4. Técnicas de determinação de patógenos em lodo de esgoto 33

3.4.1. Determinação do teor de sólidos 33

3.4.2. Determinação de coliformes termotolerantes – técnica de tubos múltiplos em meio A1 34

3.4.3. Determinação de *Salmonella spp.* – técnica de tubos múltiplos em meio de cultura semissólido Rappaport-Vassiliadis 35

3.4.4. Determinação de ovos viáveis de *Ascaris* *36*

3.4.5. Determinação de *Enterovirus* *38*

3.5. Caracterização genotípica de *Salmonella* *40*

3.5.1. Escolha e separação dos isolados de *Salmonella* *40*

3.5.2. Identificação de *Salmonella* por espectrometria de massa MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) 40

3.5.3. Extração de DNA 41

3.5.4. Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP) 41

3.5.5. Visualização de produtos amplificados 43

3.5.6. Análise de agrupamento dos fragmentos amplificados 43

3.5.7. Determinação do índice discriminatório (DI) 43

3.6. Risco 44

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO 47

4.1. Teor de sólidos totais 47

4.2. *Enterovirus* *49*

4.3. Helmintos 50

4.4. Coliformes termotolerantes 52

4.5. *Salmonella* *55*

4.6. Risco 63

5 CONCLUSÕES 65

REFERÊNCIAS 67

1. INTRODUÇÃO

A revolução neolítica, marcada pelo advento da agricultura, propiciou a formação de sociedades sedentárias e com população cada vez maior e mais longeva (MAZOYER; ROUDART, 2010). Essa população, antes nômade, caçadora e coletora, passou a se organizar em centros urbanos, vilas e cidades. A concentração de um número crescente de pessoas nesses espaços também fez acumular seus dejetos e resíduos, criando-se assim o problema do saneamento.

Desde a antiguidade, os povos se atentaram a esse problema e vêm criando soluções para a disposição dos dejetos humanos, sendo a mais comum delas o despejo em cursos d'água. Entretanto, nos dias atuais, mais de 54% da população mundial vive em centros urbanos (UN, 2014) e, no Brasil, essa proporção chega a 84% (IBGE, 2010). Com tamanha população urbana, o despejo dos esgotos nos cursos d'água torna-se irracional, pois acarreta poluição de nosso recurso natural mais precioso, a água (SINGH; AGRAWAL, 2008).

Para proporcionar a proteção dos cursos d'água e da saúde da população humana, os esgotos devem ser tratados em estações de tratamento de esgoto (ETE). Os tratamentos mais utilizados melhoram, sobretudo, a qualidade da fase líquida do esgoto para que ele possa ser devolvido aos cursos d'água sem dano ambiental. Já a fase sólida concentrada, considerada resíduo e chamada lodo de esgoto (LE), comumente não passa por tratamento e é destinado a aterros sanitários (TSUTIYA et al, 2002). A destinação a aterros sanitários não é considerada prática sustentável, pois necessita grandes esforços de logística, obras onerosas e extensas áreas para sua construção. Além disso, também há riqueza no lodo de esgoto na forma de nutrientes e matéria orgânica (MO), que pode ser aproveitada de outra maneira.

Contudo, esse resíduo contém quantidades variáveis de água, nutrientes, MO, organismos patogênicos, carga microbiana e elementos inorgânicos e orgânicos potencialmente tóxicos às plantas, aos animais e ao homem (MELO; MARQUES, 2000; ABREU-JUNIOR et al., 2005). A disposição final do LE deve ser gerida para minimizar problemas ambientais como odor e lançamento no ambiente de contaminantes e patógenos (HALLEY; MILLER, 1991).

A reciclagem agrícola do LE como fertilizante é uma das opções mais promissoras para a destinação final desse resíduo orgânico, pois proporciona o fornecimento de matéria orgânica e de nutrientes para o sistema agrícola (BETTIOL; CAMARGO, 2000; ABREU JUNIOR et al., 2005; COSCIONE et al., 2010). No Brasil, a Resolução nº 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA (BRASIL, 2006) define critérios e procedimentos para o uso agrícola de LE.

A presença de organismos patogênicos no lodo de esgoto pode limitar suas aplicações à agricultura. Porém, apenas a presença desses organismos pode não inviabilizar de imediato sua adoção como prática agrícola, visto que, para que haja infecção por algum destes patógenos, é necessário que exista uma rota de exposição, ou seja, que haja contato entre o patógeno e algum possível hospedeiro.

A aplicação do LE como fertilizante em plantios silviculturais se apresenta como uma alternativa interessante para a disposição desse resíduo. Isso porque o plantio de árvores não visa à alimentação humana, possui alto grau de mecanização e, consequentemente, menor exposição dos trabalhadores ao resíduo (KIMBERLEY et al., 2004; WANG et al., 2008). Além disso, as atividades que, porventura, sejam realizadas manualmente seguem protocolos rígidos de segurança do trabalho especialmente no que se refere ao uso obrigatório de equipamentos de proteção individual (EPI's).

A aplicação de lodo de esgoto classe B em plantios florestais pode ser uma alternativa sustentável para a destinação desse resíduo, contrapondo-se à antiquada disposição em aterros sanitários. O LE é um resíduo abundante, rico em nutrientes e condicionador de solos, sendo também uma opção de fertilizante orgânico economicamente viável para os silvicultores. Entretanto, no quesito da aplicação de lodos contendo organismos patogênicos humanos no solo, ainda há controvérsia sobre a segurança de tal prática. Estudos anteriores constataram que alguns dos organismos patógenos podem ter comportamento errático no solo (FARIA, 2015) ou sobreviver por longos períodos após aplicação do resíduo. A presente dissertação abordará a sobrevivência e o comportamento desses organismos em solo cultivado com eucalipto após aplicação de lodo de esgoto contaminado.

Para isso, foram realizadas as seguintes etapas: (i) acompanhamento ao longo do tempo da presença, persistência e decaimento dos organismos patogênicos em solo cultivado com eucalipto e tratado com lodo classe B contaminado; (ii) análises de similaridade genética em cepas de *Salmonella* isoladas ao longo do experimento, com a intenção de investigar a origem e as semelhanças desses sorotipos em comparação com os encontrados no lodo original aplicado, a fim de verificar se houve recrescimento;

e (iii) análise de risco microbiológico simplificada para as atividades realizadas no eucaliptal após e durante a aplicação do lodo como fertilizante. Isso regido sob a hipótese de que, quando o lodo classe B é aplicado ao solo, há decaimento da população de organismos patogênicos e que o recrescimento de *Salmonella*, quando identificado, é proveniente de contaminação externa ao lodo original aplicado.

1.1. Objetivos

1) Avaliar a presença, persistência e decaimento de organismos patogênicos (coliformes termotolerantes, *Salmonella*, ovos viáveis de helmintos e vírus entéricos) no solo aplicado com lodo de esgoto classe B e cultivado com eucalipto.

2) Verificar similaridades genéticas de cepas de *Salmonella* isoladas ao longo do experimento e avaliar semelhanças com os sorotipos do lodo inicialmente aplicado.

3) Construir uma análise de risco microbiológico simplificada para as atividades realizadas no eucaliptal após e durante a aplicação do lodo como fertilizante.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Esgotamento Sanitário e Produção de Lodo de Esgoto

Segundo dados do Sistema Nacional de Informação sobre Saneamento (SNIS), em 2014, a coleta de esgoto atingia 48% da população do Brasil e, desse esgoto coletado, 40% passava por algum tipo de tratamento (BRASIL, 2014). Esses dados mostram uma situação em que apenas 19,2% de todo o esgoto gerado no país é tratado. O restante, ou seja 80,8%, é despejado na natureza. Cálculos baseados em dados disponíveis no SNIS para o ano de 2014 estimam essa quantidade em 564 milhões de m³ de esgoto despejado *in natura* na natureza. Já o Ranking do Saneamento, construído pelo Instituto Trata Brasil (2013), tem uma estimativa mais pessimista, a qual afere que apenas as capitais despejam 1,2 bilhões de m³ de esgoto não tratado na natureza.

Mesmo nesse cenário de baixo volume de esgoto tratado, houve certa evolução na questão do esgotamento em algumas regiões do Brasil. O Estado de São Paulo, por exemplo, registrou um aumento no tratamento de esgoto doméstico de 45 para 60% de 2008 a 2013 (CETESB, 2013). Contudo, o aumento do volume de esgoto tratado tem gerado impasses na destinação do lodo de esgoto (LE), um resíduo sólido do tratamento de esgotos.

O termo “lodo” é utilizado para designar o resíduo sólido ou semissólido resultante do tratamento dos esgotos sanitários. Durante o tratamento, a fase sólida é separada da fase líquida para seguirem processos distintos de tratamento. O tratamento de esgoto mais comumente utilizado no mundo resulta nos chamados lodos ativados (PEDROZA et al., 2010). Esse processo de tratamento conta com uma fase de digestão aeróbia em que os microrganismos trabalham e quebram a matéria orgânica presente nos esgotos e a incorporam à massa microbiana (TSUTIYA, 2002).

O descarte do LE em aterros sanitários ainda é a principal técnica empregada no Brasil. Atualmente, no Estado de São Paulo, a quase totalidade do lodo produzido pela Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (SABESP) é destinada a aterros sanitários. No interior de São Paulo, a geração de LE foi de aproximadamente 10000 toneladas (base seca) em 2012. Os dados referentes à área atendida pela SABESP na região metropolitana de São Paulo, que inclui 27 Estações de tratamento de esgotos (ETE), somaram quase 50.000 toneladas (base seca) de LE em 2013. Já Pedroza et al. (2010) estimam a produção anual de lodo de esgoto no Brasil em 150 a 220 mil toneladas.

É possível perceber que há certa disparidade nas estimativas da produção de lodo no país, havendo a necessidade de uma consolidação dos dados existentes para formar uma estimativa mais consistente.

2.2. Uso Agrícola e Florestal de Lodo de Esgoto como Fertilizante

A produção de lodo de esgoto é inerente a qualquer sistema de tratamento de esgotos. Consequentemente, a disposição final desse resíduo deveria também ser considerada parte do problema e esforços deveriam ser feitos a fim de melhorar essa etapa do processo de tratamento.

Atualmente, a maior parte dos lodos de esgoto produzidos no Brasil são despejados em aterros sanitários (TSUTIYA et al., 2002; GODOY, 2013). Essa técnica de destinação final não é a mais adequada, pois os aterros necessitam grandes esforços de logística, obras onerosas e extensas áreas para sua construção. Além disso, o lodo de esgoto é rico em nutrientes e matéria orgânica (MO) podendo ser melhor reutilizado de outras maneiras. Outro aspecto relevante é a possibilidade da utilização do potencial energético do lodo de esgoto via combustão direta ou pirólise gerando outros materiais combustíveis (VIEIRA et al., 2011).

A destinação final do lodo de esgoto é a etapa mais custosa de todo o processo de tratamento de esgoto podendo alcançar entre 50% e 60% de todo o custo operacional das ETE (TSUTIYA et al., 2002; BETTIOL; CAMARGO, 2006). Desta maneira, apresenta-se como alternativa viável de disposição desse resíduo a sua aplicação em solos agrícolas ou florestais como fertilizante. Essa alternativa alia a questão econômica com a ambiental. Isso porque o uso deste abundante resíduo diminui a necessidade de utilização dos caros fertilizantes minerais em lavouras (WANG; SHAMMAS; HUNG, 2007) e ainda, convenientemente, lida com a questão da disposição final, a última e muitas vezes desprezada fase do tratamento de esgotos sanitários.

Segundo estudo cienciométrico realizado por Castro, Rodrigues e Scalize (2015), dentre as alternativas para disposição final do lodo de esgoto, a sua utilização agrícola é a mais estudada. Entretanto, os estudos não refletem a realidade, pois a utilização agrícola do lodo de esgoto é pouquíssimo praticada no Brasil. Isso se deve à dificuldade do cumprimento da atual legislação que rege o uso agrícola desse resíduo, seja pela má qualidade do lodo gerado ou pela falta de capacidade técnica, logística e de gestão (SAMPAIO, 2013). Além disso, há descrença por parte de agricultores quanto ao uso do lodo de esgoto e receio de profissionais em assinar laudos técnicos.

A legislação que rege o uso agrícola é a Normativa 375 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) de 2006 (BRASIL, 2006). Nela constam os limites máximos de elementos tóxicos, vulgarmente chamados metais pesados, que podem estar presentes em lodos de esgoto que pretendem ser destinados à agricultura. Também constam as diretrizes para cálculo da dose de lodo a ser aplicada em determinado sítio e a carência e intervalo entre aplicações. A resolução CONAMA 375 também classifica os lodos de esgoto em duas classes, A e B, sob o critério de quantidades de organismos patogênicos. Os lodos classe A possuem maior qualidade microbiológica, ou seja, menor quantidade de patógenos, e os lodos classe B apresentam maior presença desses organismos nocivos. Cada classe possui diferentes aptidões e permissões para aplicação em solos agrícolas. Entretanto, desde 2011, a aplicação de lodos classe B em solos agrícolas está vetada, restando pendentes novos estudos que elucidem a questão da segurança ambiental e de saúde pública.

A exceção à regra no Brasil é o estado do Paraná, que viabilizou com políticas públicas a utilização na agricultura do lodo de esgoto gerado no estado (SANEPAR, 2016). A experiência paranaense já foi citada em publicação da Organização das Nações Unidas (ONU) como caso de sucesso no manejo de lodo de esgoto e deveria ser utilizada como modelo para outras políticas em outros estados brasileiros.

Os benefícios da aplicação de lodo de esgoto como fertilizante são muitos e imensamente documentados. A aplicação do LE tem efeitos nas propriedades físicas do solo diminuindo a densidade e aumentando a capacidade de retenção de água, porosidade e estabilidade dos agregados. O aporte de lodo rico em nutrientes e MO também afeta as características químicas, gerando aumento da Capacidade de Troca Catiônica (CTC), condutividade elétrica, teores de Carbono orgânico e disponibilidade de nitrogênio e fósforo (SINGH; AGRAWAL, 2008; BETTIOL; CAMARGO, 2006). O lodo de esgoto contém grande carga orgânica na forma de matéria orgânica e biomassa microbiana e este fato somado à sua riqueza em nutrientes resulta no fato de que sua aplicação afeta também a vida no solo. Diversos autores observaram aumento na atividade microbiana, respiração do solo e atividade enzimática com a aplicação de lodo de esgoto (BANERJEE; BURTON; DEPOE, 1997; KIZILKAYA; BAYRAKLI, 2005; MATTANA et al., 2014). Todos esses fatores culminam em uma maior produtividade em sítios adubados com lodo de esgoto ainda que se compare referido fator com o de sítios bem adubados com fertilizantes minerais (SINGH; AGRAWAL, 2008).

As grandes preocupações quanto à utilização do lodo de esgoto em solos agrícolas vêm dos contaminantes orgânicos e inorgânicos e dos organismos patógenos. A Resolução 375 CONAMA (BRASIL, 2006) propõe limites máximos de contaminantes inorgânicos que, se ultrapassados no lote de lodo de esgoto, inviabilizam a sua aplicação em solos agricultáveis.

A questão dos patógenos é diferente, pois cada classe de qualidade de lodo possui suas permissões e aptidões. O problema é que, raramente, os lodos de esgoto saídos das ETE possuem a classe A, que apresenta menos restrições de uso e, ao mesmo tempo, a aplicação dos lodos classe B está vetada desde 2011. Tal cenário praticamente inviabiliza qualquer utilização de lodo de esgoto sem que haja um tratamento posterior ao realizado nas estações de tratamento.

A alternativa da aplicação de lodo de esgoto em solos florestais, ou seja, plantados com culturas arbóreas visando produção de madeira, celulose ou outros produtos florestais é muito relevante do ponto de vista dos patógenos. Isso porque os produtos florestais não entram na cadeia alimentar humana, sendo então livres do risco de ingestão de alimento contaminado por patógenos provenientes do lodo (KIMBERLEY et al., 2004; WANG et al., 2008). O uso de lodo de esgoto como fertilizante em solos florestais exclui, portanto, uma das mais importantes rotas de exposição dos humanos aos patógenos. Entretanto, ainda há riscos ocupacionais ao trabalhador que manipula o lodo de esgoto e executa tarefas em áreas em que foi aplicado o resíduo (KRZYZANOWSKI JUNIOR et al., 2016).

2.3. Organismos Patogênicos Presentes no Lodo

O tipo mais comum de tratamento de esgotos gera os chamados lodos ativados e reduz a quantidade de organismos patogênicos da fase líquida, possibilitando seu retorno à natureza. Entretanto, esse mesmo processo concentra os mesmos patógenos na fase sólida. Tal concentração ocorre tanto pela multiplicação dos mesmos em ambiente favorável, quanto pelo efeito de adensamento causado pelo desaguamento, uma vez que os patógenos se associam aos sólidos (TSUTIYA et al., 2002; GIBBS et al., 1997).

Segundo Pepper et al. (2006), o lodo de esgoto pode conter diversos agentes patogênicos, como: bactérias, protozoários, vírus, leveduras, fungos e helmintos. Como exposto acima, a legislação brasileira que concerne ao uso agrícola do lodo os classifica em duas classes, A e B, conforme sua qualidade microbiológica (Tabela 1). Tal classificação leva em conta apenas quatro organismos patogênicos: *Salmonella*, Helmintos, Vírus Entéricos e coliformes termotolerantes.

Tabela 1 - Classificação dos Lodos de Esgoto segundo concentração de patógenos

Tipo de Lodo de Esgoto ou produtor derivado	Concentração de Patógenos
A	Coliformes Termotolerantes<10^3 NMP/gST Ovos viáveis de helmintos <0,25 ovo/gST *Salmonella* ausência em 10g de ST Vírus <0,25 UFP ou UFF/gST
B	Coliformes Termotolerantes <10^6 NMP/gST Ovos viáveis de helmintos <10 ovos/gST

NMP: Número mais provável; ST: Sólidos Totais; UFP: Unidade formadora de placa; UFF: Unidade formadora de foco. Fonte: BRASIL (2006)

Dada à dificuldade nas análises laboratoriais de quantificação e enumeração desses patógenos é comum a utilização de organismos indicadores para estudos de patógenos de origem entérica (BASTOS, 2009). Assim, bactérias do grupo Coliforme (coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Escherichia coli*) têm sido empregadas como indicadores da presença de agentes patogênicos em água e águas residuárias. Entretanto, informações sobre a associação de indicadores e patógenos em lodo de esgoto são mais escassas (SIDHU; TOZE, 2009).

Indicadores fecais, como os Coliformes termotolerantes e *E. coli*, são geralmente utilizados para calcular o efeito dos tratamentos para redução de patógenos aplicada ao LE. Essas bactérias de origem intestinal de animais de sangue quente estão presentes em número suficiente para permitir a avaliação do efeito de um tratamento no LE (POURCHER et al., 2007). Dentre as bactérias do grupo dos coliformes, a *Escherichia coli* O157:H7 possui importância médica e é considerada patogênica, podendo infectar humanos (GERBA et al., 2002).

que se refere aos Helmintos, os ovos de *Ascaris lumbricoides* são os mais frequentemente observados em lodo, porém também são encontrados ovos de *Toxocara, Trichuris, Enterobius vermicularis, Ancylostoma spp, Fasciola hepática e Schistosoma mansoni*. A concentração residual de ovos de helmintos no LE está relacionada à sua prevalência e intensidade entre índices de infecção e perfil da população local (PAULINO et al., 2001; THOMAZ-SOCCOL et al., 2010). De maneira geral, quanto maior o acesso à saúde da população contribuinte menor os níveis de ovos de helmintos no esgoto. Isso porque as parasitoses causadas por estes vermes são as mais responsivas às melhoriasda situação de saúde das localidades. Temperatura, secagem e luz ultravioleta são os principais fatores que influenciam sua eliminação, sendo que ovos de helmintos podem sobreviver, em climas tropicais, de 10 a 12 meses após a evacuação e sua posterior inserção em sistemas de esgoto (HECK et al., 2013).

Os vírus entéricos de importância médica encontrados no LE podem ser divididos em dois grupos: o grupo dos *Enterovirus* (*poliovirus; coxsackievirus,* enterovirus e *echovirus*) e um grupo heterogêneo que inclui *rotavirus, calicivirus humanos, astrovirus, adenovírus* e vírus da hepatite A e E. Com exceção dos vírus entéricos e de alguns sorotipos de adenovírus, a maioria dos vírus do segundo grupo não são facilmente cultivados e não estão bem caracterizados, e assim, existe maior dificuldade na sua detecção e quantificação de outros vírus no LE (SIDHU; TOZÉ, 2009). Vale reforçar que, dada a dificuldade nas análises laboratoriais para quantificação de todos os tipos de vírus, este trabalho focará apenas nos *enterovirus*.

Além disso, a resistência viral e adsorção nos compostos orgânicos e em sedimentos são específicas, já que seu comportamento no solo é diferente do comportamento das bactérias (POURCHER et al., 2007). Os vírus são partículas carregadas e, por isso, espera-se que interajam mais com a parte sólida durante o tratamento de esgoto, isto é, espera-se uma concentração maior de vírus nos lodos de esgoto, sua fase sólida, do que em sua fase líquida (SIDHU; TOZÉ, 2009). Bofill-Mas et al. (2006) observaram números similares de *Enterovirus* tanto no esgoto bruto quanto no lodo de esgoto. Por isso, é razoável afirmar que as concentrações de vírus na fase sólida, ou seja, no lodo, serão similares senão maiores do que na fase líquida.

Patógenos de origem bacteriana são a maior causa de gastroenterite no mundo. A vigilância epidemiológica estadunidense relatou que *Salmonella* é a segunda maior causadora de gastroenterites no país (SIDHU; TOZÉ, 2009). *Salmonella* é frequentemente isolada tanto de lodos tratados ou brutos e está presente em números relativamente baixos,

comparado a outros indicadores fecais como os de coliformes (SAHLSTROM et al., 2004). Entretanto, com uma dose infectante baixa equivalente a apenas 25 células ativas, esse patógeno ainda pode ser problemático.

Salmonella spp. são bacilos gram-negativos presentes no intestino humano bem como no de outros animais, como mamíferos e répteis, por exemplo. Seu grupo é formado por mais de 2400 sorotipos ou serovares. Alguns sorotipos causam intoxicação alimentar devido à liberação de enterotoxinas (KRYZANOWSKI, 2016). Também podem causar a febre tifoide, doença grave com mortalidade variando entre 10 a 15%. As bactérias *Salmonella Typhi*, *Salmonella Paratyphi A* e *Salmonella Paratyphi B* são as responsáveis pela febre tifoide e são adquiridas unicamente por contato humano (BROOKS et al., 2009).

Salmonella pode sobreviver até 3 meses em lodos estocados (NICHOLSON et al., 2005). Foi reportado o recrescimento de *Salmonella* em condições favoráveis em lodo estocado, produtos ensacados à base de lodo, lodo compostado e em solos tratados com lodo de esgoto (SIDHU; TOZÉ, 2009; ZALESKI, 2005). *Salmonella*, por sua alta capacidade infectante e imprevisibilidade no comportamento, é o patógeno mais importante elencado pela legislação.

2.4. Risco

A avaliação de risco microbiológico é definida como a estimativa, qualitativa ou quantitativa, dos efeitos ou potenciais efeitos adversos à saúde associados à exposição de um indivíduo ou uma população a microrganismos patogênicos e/ou suas toxinas (HAAS et al., 2014).

Ao contrário dos onerosos estudos epidemiológicos e de acompanhamento clínico, as análises de risco são calculadas a partir de modelos matemáticos, rápidos e baratos. Além disso, há a possibilidade de construção de diversos cenários (VIAU et al., 2011).

Para a elaboração de uma análise de risco devem ser contempladas as quatro etapas a seguir, segundo Haas et al. (2014):

- Identificação do perigo: descrição dos efeitos à saúde relacionados ao organismo alvo específico, levando em conta as vias de transmissão;
- Avaliação da Dose-Resposta: fase experimental de entendimento da relação entre as doses dos patógenos e os efeitos à saúde;

- Avaliação da Exposição: de acordo com os cenários elaborados, estimar o tamanho e a natureza da população exposta, as rotas de contaminação, concentrações às quais esses alvos estarão expostos e a duração da exposição;
- Caracterização do Risco: estimativa, com base nas informações anteriores, da magnitude dos problemas de saúde aos quais certa população estará exposta.

Os resultados das análises de risco servem de substrato para tomadas de decisão e elaboração de políticas públicas. Isso porque seus resultados de fácil interpretação e elaboração de diversos cenários em curto prazo de tempo são ferramentas muito úteis de planejamento. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estabelece o nível aceitável/tolerável de risco em 1 caso a cada 10.000, ou 10^{-4} (WHO, 2006).Tal valor será utilizado nesta pesquisa como norteador.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Informações Gerais

O trabalho foi dividido em quatro partes: avaliação do decaimento de organismos patogênicos em campo; avaliação do decaimento de organismos patogênicos em ambiente controlado (casa de vegetação); análise de similaridade genética por *amplified fragment lenght polymorphism* (AFLP) de cepas isoladas de *Salmonella*; e elaboração de uma *quantitative microbial risk analysis* (QMRA) simplificada para *Salmonella* levando em conta as concentrações encontradas e diversos cenários exposição de trabalhadores ao lodo de esgoto.

O experimento de campo foi instalado na Fazenda Demétrio, na cidade de Piracicaba, nas coordenadas 22º43’17’’S e 47º45’16’’O e se encontra nas entrelinhas de um Teste de Uso Múltiplo de Eucaliptos (TUME) contendo clones de diferentes espécies de *Eucalyptus* e *Corymbia*, espaçamento 3m x 2m. O TUME foi colhido aos 10 anos de idade e, em Maio de 2016, foi realizada a talhadia (condução da rebrota) nos tocos remanescentes. A condição de recém-talhadia foi escolhida para este trabalho dada a semelhança dessa situação com a de um plantio de eucalipto recém-implantado, principalmente quanto à exposição à luz do sol e à organização dos resíduos florestais sobre o solo. Além disso, é justamente no início dos ciclos tanto de talhadia quanto de plantio de mudas que a adubação, no caso, fertilização com lodo de esgoto classe, é realizada (SILVEIRA et al., 2000). .

Os experimentos em casa de vegetação (CV) foram realizados no Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (USP/CENA) em Piracicaba, São Paulo. Solo da camada superficial (0-20 cm) proveniente da área experimental da Fazenda Demétrio foi usado como substrato em bandejas de alumínio largas de 30cmx20cm, com 2 L de volume. Esses recipientes foram regados, para manutenção da umidade do solo, em torno de 60 a 70% da capacidade de campo.

O lodo de esgoto utilizado é proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) Piracicamirim, de Piracicaba, e foi classificado como classe B em análises preliminares feitas em Janeiro de 2016 e em Abril de 2016 (Tabela 2), conforme a Resolução nº375 do CONAMA. Um detalhe a se atentar na legislação brasileira de lodo de esgoto é que são sempre citados ovos viáveis de helmintos, entretanto, a técnica recomendada nos anexos, baseada na USEPA (2003), analisa os ovos viáveis de *Ascaris spp.* ou seja, apenas um dos possíveis gêneros de helmintos encontrados.

Tabela 2 - Caracterização Preliminar do Lodo proveniente da ETE Piracicamirim quanto à quantidades de patógenos

Coleta	***Salmonella***	**Coliformes Termotolerantes**	**Ovos viáveis de Helmintos**	***Enterovirus***
	NMP/g ST	NMP/g ST	Ovos viáveis/g ST	UFP/g ST
Janeiro/2016	5,5	$0,76x10^6$	0,43	1
Abril/2016	-	-	0,28	19
Limites Lodo CLASSE B Norma 375	Presença em 10g ST	$> 10^3$	> 0,25	> 0,25

3.2. Avaliação do decaimento de organismos patogênicos em CAMPO

O LE foi coletado na ETE Piracicamirim e, imediatamente, 2kg do resíduo foram colocados em sacos de tule (*litterbags*) e aplicados na entrelinha da plantação de eucalipto (Figura 1, esquerda). Nesse momento, uma quantidade de lodo foi reservada para as análises de tempo 0. Os sacos de tule permitem, ao mesmo tempo, interação do lodo com o solo, facilidade nas coletas e certo isolamento do solo, evitando contaminação com material mineral.

Dada à homogeneidade do solo, o delineamento experimental foi inteiramente casualizado. Foram três repetições em cada tempo de coleta. Devido às particularidades biológicas de cada um dos patógenos analisados e baseado em estudos passados (FARIA, 2015), tempos diferentes de coleta para cada um dos organismos patogênicos alvo foram formulados (Tabela 3).

Tabela 3 - Épocas de coleta para o tratamento em CAMPO

Patógeno	**Épocas de Coleta**
Salmonella Coliformes Termotolerantes	Semanas: 0, 1, 3, 5, 7, 9, 13, 17, 23, 29, 33 e 41
Helmintos	Semanas: 0,1,3,5, 7, 9 e 13
Enterovirus	Dias: 0, 1, 2, 7 e 15

3.3. Avaliação do decaimento de organismos patogênicos em ESTUFA

Analogamente ao tratamento em campo, foram colocados 2kg do lodo de esgoto dentro de sacos de tule. Os sacos com LE foram então aplicados sobre as bandejas com solo (Figura 1, direita). As amostragens foram feitas em intervalos alternados ao tratamento de campo (tabela 4) e, com exceção dos *Enterovirus*, os organismos patogênicos e as técnicas utilizadas foram as mesmas. As coletas foram feitas em três repetições e o delineamento foi inteiramente casualizado.

Tabela 4 - pocas de coleta para o tratamento em ESTUFA

Patógeno	Épocas de Coleta
Salmonella Coliformes Termotolerantes	Semanas: 0, 2, 4, 6, 8, 12, 16, 22, 28, 34 e 40
Helmintos	Semanas: 0, 2, 4, 6, 8, 10 e 12

Figura 1 - Fotos do experimento recém-implantado. Esquerda: tratamento em CAMPO; Direita: tratamento em ESTUFA

O ensaio em ambiente controlado foi elaborado visando isolar todos os aspectos imprevisíveis de um experimento em campo. Assim, foi possível observar, sobretudo, o comportamento dos patógenos sem que houvesse influência de outras comunidades de organismos patogênicos exógenos ao lodo e ao solo, como, por exemplo, microrganismos provenientes de animais silvestres. A ideia foi tornar possível a comparação entreos dados do campo e da casa de vegetação para acessar a questão do recrescimento e da colonização do sistema lodo-solo por patógenos de origem ambiental.

3.4. Técnicas de Determinação de Patógenos em Lodo de Esgoto

A seguir, serão descritos todos os métodos utilizados na determinação de patógenos em lodo de esgoto. As técnicas e métodos utilizados nesta pesquisa são os mesmos indicados nos anexos da resolução CONAMA 375 de 2006 (BRASIL, 2006), normativa vigente sobre o uso agrícola de lodo de esgoto. Foram seguidos os protocolos utilizados usualmente no Departamento de Análises Ambientais, Divisão de Microbiologia e Parasitologia (ELP) da CETESB, os quais são baseados nas normas estadunidenses *da Environmental Protection Agency* (EPA) (USEPA, 2003).

3.4.1. Determinação do Teor de Sólidos

O teor de sólidos ou sólidos totais é definido como o inverso do teor de umidade de uma amostra. Para sua determinação, o Setor de Química Inorgânica (ELAI) da CETESB utilizou a técnica de secagem até massa constante em balança de precisão. Aproximadamente 100g da amostra de lodo de esgoto foi pesada para medição da massa inicial e a amostra foi, então, levada à estufa para secagem. Diariamente, a massa foi aferida até que duas medições consecutivas resultaram em mesmo valor, indicando que a perda de água do lodo atingiu seu ponto máximo.

3.4.2. Determinação de Coliformes Termotolerantes – Técnica de Tubos Múltiplos em Meio A1

A técnica de tubos múltiplos em meio A1, descrita por Clesceri, Greenberg e Eaton (1998) e também na norma da EPA (USEPA, 2003), consiste na inoculação de volumes decrescentes de suspensão bacteriana em meio de cultura seletivo e diferencial chamado A1.

Para a determinação de coliformes termotolerantes foram inoculadas 8 diluições decrescentes de 10^0 a 10^{-7}. Para cada diluição foram inoculados 5 tubos, pipetando-se 1mL por tubo. A diluição -1 consistiu em 30g do lodo coletado, o qual foi diluído em 270mL de água de osmose reversa e misturado em *blender* por 1 minuto em velocidade baixa. A partir da diluição -1, foram feitas diluições sucessivas retirando-se 10mL da mistura anterior, os quais foram colocados em 90mL de água de osmose reversa, caracterizando uma diluição de 1/10. Para a diluição 0, foram inoculados 10mL da solução -1, revertendo-se assim a diluição.

Os tubos inoculados foram, então, colocados em incubação inicial a 35 ± 0,5°C por 3 horas e, depois, incubados a 44,5 ± 0,5°C durante 21 ± 2h. Após esta segunda incubação, as amostras estavam prontas para a leitura.

A leitura consiste na formação de um código que deve ser posteriormente comparado a uma tabela de probabilidade específica e o seu resultado é expresso em Número Mais Provável (NMP) de coliformes termotolerantes. O código é formado contando-se os positivos nos tubos de mesma diluição. Por sua vez, os positivos são caracterizados pela formação de gás no fundo dos tubos de ensaio inoculados.

O cálculo do NMP, por gramas de sólidos totais, é feito utilizando-se a seguinte equação (equação 1):

$$\frac{NMP}{gST} = \frac{\frac{NMP}{100g}}{ST\%} \qquad (1)$$

ST% = Teor de Sólidos Totais em %

NMP/100g = Valor extraído da tabela de NMP correspondente ao código obtido nos tubos múltiplos

3.4.3. Determinação de *Salmonella sp* – Técnica de tubos múltiplos com meio de cultura semissólido Rappaport-Vassiliadis

A técnica de tubos múltiplos utilizando o meio de cultura semissólido Rappaport-Vassialidis é descrita na norma 1682 da EPA (USEPA, 2006). A técnica consiste em séries de incubações em diferentes meios de cultura nutritivos, seletivos e restritivos que, ao final do processo, geram um código de tubos positivos que são comparados com uma tabela de probabilidades em que o número mais provável de *Salmonella* na amostra é obtido.

Primeiramente, 30g do lodo coletado foram diluídas em 270mL de água de osmose reversa e misturadas em *blender* por 1 minuto em velocidade baixa. Utilizando-se essa suspensão em diluição 10^{-1} foram realizadas as seguintes inoculações em meio de cultura de enriquecimento Caldo de Triptona e Soja –(TSB):

- 20mL em 5 tubos contendo 10mL de TSB 3x concentrado;
- 10mL em 5 tubos contendo 5mL de TSB 3x concentrado;
- 1mL em 5 tubos contendo 10mL de TSB 1x concentrado; e
- 0,1mL em 5 tubos contendo 10mL de TSB 1x concentrado.

Essas diluições foram, então, incubadas a 36 ± 1,5°C por 24 ± 2 horas. Os tubos que apresentaram turbidez foram considerados positivos e passaram para a próxima fase do processo. De cada um desses tubos positivos, foram pipetadas com uso de micropipeta 6 gotas de aproximadamente 30µL, as quais foram aplicadas em placas de petri que continham o meio modificado semissólido Rappaport-Vassiliadis (MSRV). As placas foram deixadas por 1 hora em temperatura ambiente para que as gotas fossem absorvidas. Em seguida, as placas foram incubadas a 42 ± 0,5°C por 16 a 18h. As placas que apresentaram motilidade (halos ao redor das gotículas) foram consideradas positivas e passaram para a próxima fase do processo.

Das colônias com halo de motilidade visível foram retirados inóculos com auxílio de uma alça de inoculação flambada, os quais foram, então, estriados em uma nova placa contendo o meio ágar Xilose-Lisina-Desoxicolato (Ágar XLD). As placas estriadas foram, então, incubadas por 18 a 24h a 36 ± 1,5°C. As colônias na placa XLD que apresentaram coloração rosa a vermelho com centros pretos foram consideradas como presuntivas positivas para *Salmonella* e passaram para próxima fase do processo.

Dessas colônias consideradas presuntivas positivas para *Salmonella*, foram selecionadas 5 colônias características por diluição para serem submetidas à confirmação bioquímica, a qual foi realizada em tubos com meio IAL. O meio IAL possui 9 provas bioquímicas que, dada certa combinação, confirmam ou excluem a possibilidade de a amostra ser de *Salmonella*. Com o auxílio de uma alça flambada e esfriada, a inoculação das colônias características em tubo IAL foi feita por meio de picada em profundidade e estrias na superfície. Dessa maneira, os organismos da colônia entraram em contato e participaram de todas as provas bioquímicas. Os tubos IAL foram, então, incubados a 36 ± 1,5°C por 18 a 24 horas.

Os tubos IAL que apresentaram resultado positivo para *Salmonella* foram, ainda, submetidos à confirmação por meio de testes sorológicos, os quais utilizaramos soros anti-*Salmonella* polivalente somático e anti-*Salmonella* polivalente flagelar. Esse teste é realizado em uma superfície de vidro esterilizado sobre a qual um inóculo proveniente dos tubos IAL positivos para *Salmonella* é colocado juntamente com o respectivo soro. Após homogeneização com um palito, se for observada aglutinação, o resultado é positivo.

Para o cálculo do número mais provável de *Salmonella*, primeiramente, deve ser verificado o código gerado pelos tubos IAL confirmados pelos testes sorológicos. Ao se utilizar a tabela de NMP, obtemos um número mais provável correspondente a esse código, que depois é colocado na seguinte equação (equação 2) para cálculo do NMP por gramas de sólidos totais:

$$\frac{NMP}{gST} = \frac{NMP/0{,}1}{\%ST} \qquad (2)$$

NMP = Valor extraído da tabela de NMP correspondente ao código obtido nos tubos múltiplos

%ST = Teor de Sólidos Totais em %

3.4.4. Determinação de Ovos Viáveis de *Ascaris*

A técnica para detecção e quantificação de ovos viáveis de *Ascaris* em lodo de esgoto está descrita na norma da EPA (USEPA, 2003) e consiste, basicamente, em: uma série de processos que visam separar os ovos de *Ascaris* de outras partículas; e incubação para avaliar

a viabilidade. Para isso, são realizados processos de separação por decantação, centrifugação e flotação. Seguem, abaixo, descrição dos passos em maior detalhe:

Utilizando uma balança medidora de umidade foi estimado o teor de sólidos e calculada a quantidade equivalente a 10g de sólidos totais. Essa quantidade foi separada utilizando uma balança convencional e colocada em um béquer de 1L posteriormente completado até 400mL com água de osmose reversa. Esse béquer foi deixado em repouso *overnight* a 4-10°C. Essa mistura de aproximadamente 400mL foi, então, homogeneizada em *blender* por 1 minuto em velocidade baixa.

A mistura homogeneizada foi, então, separada em 4 béqueres de 1L e o volume completado com 900mL de solução detergente 7X 0,1%. Após esse procedimento, os béqueres foram novamente deixados em repouso *overnight* a 4-10°C para sedimentação. O sobrenadante foi, então, aspirado usando uma bomba de vácuo e o volume recompletado com 900mL de solução 7X 0,1%. A mistura foi novamente deixada *overnight* a 4-10°C e o sobrenadante mais uma vez aspirado.

Nesse ponto, os sedimentos dos 4 béqueres foram reunidos em apenas um béquer de 1L com adição de aproximadamente 300mL de solução 7X 0,1%. Essa suspensão foi, então, passada em uma peneira umedecida de malha 50 e todo o material retido foi descartado. A mistura que passou pela peneira foi, novamente, deixada *overnight* a 4-10°C. Após essa sedimentação, foi aspirado todo o líquido sobrenadante até a camada dos sedimentos no fundo do béquer. Esse sedimento foi recolhido e transferido para tubos cônicos de centrífuga de 50mL, os quais foram completados com água de osmose reversa até 40mL e colocados para centrifugar por 10 minutos a 2300 rpm. Mais uma vez, o sobrenadante dos tubos foi aspirado com bomba de vácuo.

Ao sedimento nos tubos de centrífuga foi, então, adicionada solução de sulfato de magnésio ($MgSO_4$, gravidade específica = 1,2) até um volume de 40ml. Tal mistura foi centrifugada por 5 a 10 minutos a 2300 rpm sem emprego de desaceleração. O sobrenadante resultado dessa centrifugação foi, então, passado por uma peneira umedecida de malha 400 e todo o material retido foi transferido para um tubo cônico 50mL. Foi completado o volume com água de osmose reversa, o qual, mais uma vez, foi centrifugado a 2300 rpm por 5 minutos. O sobrenadante dessa vez foi descartado. Todo o material sedimentado no fundo do tubo cônico foi, então, ressuspendido em 4mL de solução de formalina 0,5% e transferido para um frasco de cintilação de 25mL. Por fim, esse frasco foi incubado a 26 ± 1°C por 3 a 4 semanas, quando, então, a leitura pôde ser iniciada.

A leitura foi realizada por um técnico treinado da CETESB em microscópio com a utilização de 4mL da solução do frasco de cintilação colocada em uma câmara Sedgewick-Rafter para contagem dos ovos viáveis. A diferenciação entre ovos viáveis e não-viáveis é visual e são considerados viáveis os ovos que estão, visivelmente, embrionados. Nessa fase de contagem, o técnico também identificou outros ovos viáveis e não-viáveis nas amostras lidas que não pertencem a espécie *Ascaris*, como *Toxocara*, *Trichuris*, *Taenia* e *Hymenolepsis.*

Para o cálculo da quantidade de ovos viáveis de *Ascaris* por gramas de sólidos totais, apenas dividiu-se o número de ovos viáveis na contagem pelo teor de sólidos totais analisado.

3.4.5. Determinação de *Enterovirus*

O método para determinação de *Enterovirus* descrito por Clesceri, Greenberg e Eaton (1998) e também nas normas estadunidenses nº625 (USEPA, 2003) consiste em duas etapas: eluição e concentração de *Enterovirus* nas amostras, em que as partículas virais são separadas dos sólidos; e a detecção e quantificação dos *Enterovirus* pela técnica de plaqueamento em cultura de células, em que os vírus concentrados da etapa anterior são aplicados a uma monocamada de células de rabdomiosarcoma humano (RD) ou *Buffalo Green Monkey* (BGM) e as zonas celulares lesionadas por infecção viral são contadas. Com o auxílio de um corante, é possível verificar onde ocorreu lise celular devido à infecção viral, dado que as células mortas perdem a capacidade de fixar o corante.

Primeiramente, foi estimado o teor de sólidos das amostras de lodo de esgoto utilizando uma balança aferidora de umidade. Pesou-se o equivalente a 12g de sólidos totais e o lodo foi transferido para um béquer de 1L completado com 200mL de água de osmose reversa e homogeneizado com barra magnética. A essa mistura de lodo e água, foi adicionado 500mL de extrato de carne dessecado 3% a pH 7. Após isso, a mistura foi novamente homogeneizada com barra magnética por 30 minutos.

Essa mistura foi, então, transferida para um frasco cônico e centrifugada a 2500G/4000rpm a 4°C por 30 minutos. O sobrenadante foi transferido para um béquer de 1L e o seu pH foi lentamente ajustado para 3,5 utilizando HCl 6N sob agitação constante. A amostra foi, então, centrifugada novamente a 2500G/4000rpm a 4°C por 15 minutos. Dessa vez, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspendido em 20mL de fosfato de sódio

dibásico 0,15M e pH 7. O pH, quando necessário, foi ajustado novamente para a faixa neutra entre 7 e 7,5. As amostras foram divididas em quantos tubos de centrífuga de 15 mL foram necessários.

Na capela de segurança química, foram adicionados 20mL de clorofórmio para cada tubo e, posteriormente, o tubo tampado foi vigorosamente agitado. A tampa foi aberta para escape dos vapores de clorofórmio. Nova centrifugação foi realizada a 3000G/5500rpm a 4°C por 15 minutos. Em uma cabine de segurança biológica, com auxílio de um micropipetador, o sobrenadante foi cuidadosamente transferido para um béquer de 1L. Este béquer foi deixado em banho de gelo para a evaporação completa do clorofórmio. A esse sobrenadante foi, então, adicionado 300µL de gentamicina 10mg/mL. Nessa fase, parte da amostra, chamada agora de amostra concentrada, foi imediatamente estocada em freezer a -25 ± 5°C para a próxima fase da análise e outra alíquota de 500µL foi separada para realização do teste de esterilidade.

O teste de esterilidade é um simples teste para comprovar a eficiência do antibiótico gentamicina e do clorofórmio na erradicação de todos os outros organismos não-virais. A alíquota retirada para o teste foi inoculada em um tubo com caldo TSB e incubada a 36,5 ± 0,5°C por no mínimo 48 horas. Havendo turbidez no tubo, está constatada a contaminação microbiana do concentrado viral e os passos citados anteriormente devem ser repetidos para obtenção de um concentrado livre de contaminações.

Para a fase de leitura e quantificação, primeiramente, a amostra concentrada vinda do freezer foi estabilizada a 37°C. Em uma cabine de segurança microbiológica devidamente esterilizada, uma alíquota de 1 a 2mL da amostra concentrada foi inoculada em garrafas de 75cm² contendo a monocamada de células à temperatura ambiente e deixada por 80 minutos antes da aplicação do meio gelificado para adsorção e penetração dos vírus nas células. Após esse período, foi aplicado entre 20 e 30 mL de meio gelificado estabilizado a 44 ± 2°C no lado oposto à monocamada de células. Esse procedimento foi realizado à baixa luminosidade para não danificar as substâncias fotossensíveis no meio gelificado. As garrafas hermeticamente fechadas foram, então, armazenadas em superfície plana e estável a temperatura ambiente com o lado da monocamada para baixo por 30 minutos. Após os 30 minutos, os frascos foram invertidos e incubados a 36,5 ± 0,5°C.

As leituras foram realizadas nos 4 dias seguintes, observando-se o aparecimento de lise celular. Após esse período, também foram realizadas checagens no sexto, oitavo, décimo segundo e décimo sexto dias. A contagem de unidades formadoras de placa (UFP) foi devidamente anotada e utilizando as equações (equações 3 e 4) a seguir foi calculado o resultado final em UFP/gST.

$$Nº\ de\ UFP\ no\ volume\ final\ = \frac{Nº\ de\ UFP\ no\ volume\ inoculado\ x\ volume\ final}{Volume\ inoculado} \quad (3)$$

$$\frac{UFP}{gST} = \frac{Nº\ de\ UFP\ no\ volume\ final}{Peso\ seco\ analisado} \quad (4)$$

3.5. Caracterização genotípica de *Salmonella*

3.5.1 Escolha e Separação dos Isolados de *Salmonella*

Durante o processo de análise para quantificação de *Salmonella*, na fase do ágar XLD, foram selecionadas, para cada repetição, três colônias características que foram, então, transferidas, com auxílio de alça flambada, para um ágar de estocagem. Do lodo inicial, coletado no tempo 0, foram selecionadas 25 colônias características a fim de formar um *pool* de *Salmonella* para posterior comparação com os genótipos que apareceram em outros tempos de coleta.

Uma alíquota de cada um desses cultivos bacterianos de estoque foi separadaa e enviada para confirmação de identificação como *Salmonella* em *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry* (MALDI-TOF), pois na identificação fenotípica podem ocorrer enganos.

3.5.2. Identificação de *Salmonella* por espectrometria de massa MALDI-TOF (MALDI-TOF MS)

Uma alíquota de 1 mL do cultivo bacteriano foi centrifugada a 5.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi descartado; o pélete recebeu 300 µl de água ultrapura e 900 µl de etanol, foi agitado e em seguida os tubos foram centrifugados a 13.000xg por 2 minutos. Após descarte do sobrenadante, os sedimentos foram secos em temperatura ambiente. Aos sedimentos, foram adicionados 50 µl de ácido fórmico (70%), e 50 µl de acetonitrila (100%). A mistura foi novamente centrifugada a 13.000xg por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido a um microtubo novo e armazenado a -20°C.

Para leitura pelo MALDI-TOF MS foi utilizado o espectrofotômetro de massa Microflex™ (Bruker Daltonik) da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, com o auxílio técnico da Dra. Maria Inês Zanoli Sato e sua equipe. Para leitura, 1 uL de suspensão proteica foi transferido para a placa de aço inox de 96 poços. Após secagem em temperatura ambiente, foi adicionado sobre a amostra 1 uL da matrix (ácido α-ciano-4-hidróxido-cinamico). Cada estirpe foi distribuída em dois poços (triplicata) e para cada placa foram realizadas duas leituras, totalizando a captura de quatro espectros proteicos por estirpe. Para captura dos espectros proteicos foi utilizado o programa FlexControl™ (Bruker Daltonik) pelo método MTB_autoX. O espectrofotômetro foi externamente calibrado através da utilização de proteínas ribossômicas de *Escherichia coli (*BTS - Bruker Daltonik*).*

Para a identificação bacteriana pelo espectro proteico foi utilizado o programa BioTyper™ (MALDI Biotyper CA Systems) 3.0 (Bruker Daltonik) a partir do qual foi realizada uma comparação dos espectros capturados para cada estirpe com a biblioteca do fabricante. Os critérios para interpretação dos padrões da fabricante Bruker Daltonik foram utilizados neste estudo como segue: escores ≥ 2.0 foram aceitos para atribuição de espécie, e escores ≥ 1.7 e < 2.0 foram utilizados para identificação de gênero.

3.5.3. Extração de DNA

Os isolados foram submetidos à extração de DNA segundo o protocolo descrito por Boom et al. (1990), com tratamento enzimático prévio com lisozima (100 mg) e proteinase K (20mg) (US Biological) a 37°C por 60 minutos.

3.5.4. Polimorfismo do Comprimento de Fragmentos Amplificados (AFLP)

O AFLP foi realizado segundo protocolo descrito por McLauchlin et al. (2000) utilizando a endonuclease de restrição *Hin*dIII. A técnica consiste em três etapas:

1- Restrição do DNA bacteriano pela enzima HindIII

Em um microtubo contendo 10 µL do DNA bacteriano extraído foram adicionados 24 U *Hind* lIl, 2 µL tampão da enzima *Hind*IIl e 5,6 µL de H_20 *overnight.* A posição reativa ao sítio de restrição da enzima *Hind*III é apresentada no Quadro 1. MilliQ®, perfazendo um volume total de 20 µL. Incubou-se esta reação a 37°C.

2- Ligação de adaptadores de ao DNA digerido

Em um novo microtubo foram adicionados 5 µL do DNA digerido, 4 µL tampão de T4 DNA-ligase, 0,2 µL de cada adaptador (ADH1 / ADH2), 1 U T4 DNA ligase e H_20 MiliQ® para o volume final de 15 µL. Esta reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Ao final deste período, o DNA ligado aos adaptadores foi aquecido a 80°C por 10 minutos para inativação da enzima T4 DNA ligase. As sequências dos adaptadores ADH1 e ADH2 estão descritas na Tabela 5.

3- Amplificação seletiva dos fragmentos de restrição

Os fragmentos de restrição foram submetidos a uma amplificação utilizando o iniciador HI-G (Quadro 1). A PCR foi realizada utilizando-se 5 µL do DNA ligado, 2,5 mM de $MgCI_2$, 300 ng do iniciador (HI-G), 1 U de Taq DNA polimerase, 1 X tampão de PCR e H_20 MiliQ® até o volume final de 50 µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos seguida por 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1,5 minuto a 60°C e 2,5 minutos a 72°C, com extensão final de 5 minutos a 72°C .

Tabela 5 - Sítio de restrição da enzima HindIII e sequências de nucleotídeos dos adaptadores ADH1 e ADH2 e do iniciador HI-G

1. Sítio de restrição *Hind*III	5´ AGCTT----//----A 3´ 3´ A----//----TTCGA 5´
2. Adaptadores	ADH 1 5´ ACGGTATGCGACAG 3´ ADH 2 3´ GAGTGCCATACGCTGTCTCGA 5´
3. Iniciador	HI-G 5’ GGTATGCGACAGAGCTTG 3’

(1) Sítios de restrição da endonuclease *Hind*III; (2) sequência dos oligonucleotídeos complementares que serão os adaptadores que se ligam às extremidades dos fragmentos de restrição; (3) sequência do iniciador utilizado na amplificação dos fragmentos de restrição.

3.5.5. Visualização dos produtos amplificados

A detecção dos produtos de amplificação foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, utilizando-se tampão TBE 0,5X (Tris-base 45 mM, ácido bórico 45 mM e EDTA 1 mM, pH 8) e voltagem de 30 V durante 26 horas. Os fragmentos amplificados foram vizualizados no sistema de fotodocumentação Gel Doc XR (Bio Rad), sendo os fragmentos corados com BlueGreen® (LGC Biotecnologia) e comparados ao marcador 100 pb DNA Ladder (New England Biolabs).

3.5.6. Análise de agrupamento dos fragmentos amplificados

Para a análise de agrupamento dos perfis de fragmentos amplificados foi utilizado o programa Bionumerics 7.6 (Applied Maths). Um dendrograma foi construído utilizando o coeficiente de Dice e o método de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). O ponto de corte de 90% de similaridade genética foi utilizado para determinação e análise dos agrupamentos obtidos (VAN BELKUM et al., 2007).

3.5.7. Determinação do Índice Discriminatório (DI)

Os resultados da caracterização genotípica foram analisados segundo o método numérico descrito por Hunter e Gaston (1988), sendo possível calcular o Índice Discriminatório a partir da seguinte fórmula:

$$DI = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^{S} nj(nj-1) \qquad (5)$$

Onde N é o número de amostra da população teste, *s* é o número de diferentes tipos e *nj* é o número de amostras representando cada tipo. O valor DI indica a probabilidade de dois isolados selecionados ao acaso em uma população teste serem alocados em diferentes grupos.

3.6. Risco

Foi realizada uma análise de risco microbiológico para *Salmonella* com base no método aplicado por Magalhães (2012), Krzyzanowski et al. (2016), Bastos et al. (2009), Gale (2002) e Gerba et al. (2002). O método foi modificado para não levar em conta as flutuações nas populações de *Salmonella* no solo ao longo do tempo. Em outras palavras, foi calculado o risco estático para determinada quantidade-dose de *Salmonella* aplicada ao solo via LE como fertilizante.

A equação utilizada para cálculo do risco estático por evento individual foi a do modelo Beta-Poisson (equação 6). Essa equação leva em consideração: a dose de *Salmonella* proveniente das análises laboratoriais; a dose infectante média, encontrada em literatura; e um parâmetro do modelo dose-resposta específico para cada patógeno. Esses parâmetros e índices de literatura foram encontrados em documento da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 2002). Após o cálculo do risco por evento individual, foi aplicada a equação 7 para cálculo do risco anual.

$$P_I = 1 - \left(1 + \frac{d}{N_{50}}\left(2^{1/\alpha} - 1\right)\right)^{-\alpha} \quad (6)$$

Onde, P_I é o risco por evento individual; d é a dose; N50 é a dose infectante média; e α é o parâmetro do modelo dose-resposta que representa a interação patógeno-hospedeiro, o qual é característica de cada patógeno.

$$P_A = 1 - ((1 - P_I)^t) \quad (7)$$

Onde, P_A é o risco anual e t é o período de exposição em dias.

Os cenários utilizados estão exibidos na tabela 6. Foram levados em conta, quanto à exposição, a aplicação e três cenários de regime de trabalho ao longo do ano. Cada um desses regimes de trabalho representa uma atividade recorrente e real no manejo de cultivos de eucalipto. A exposição de 60 dias ao solo onde foi aplicado o LE representa uma atividade de pouca intensidade ao longo do ano, como vistorias e um eventual controle de formigas; 120 dias de exposição para o trabalhador representa uma atividade de média intensidade anual, como a fertilização de cobertura ou mesmo a aplicação do fertilizante de base na forma de LE. A exposição de 120 dias para trabalhadores em cultivos agrícolas e florestais é a mais

utilizada por representar a situação mais próxima da real (MAGALHÃES, 2012). Por fim, o cenário de 260 representa a situação de jornada de trabalho completa, isto é, a situação de máxima exposição anual. Vale ressaltar que a exposição em jornada semanal completa não acontece com frequência na realidade dos cultivos de eucalipto. Esse cenário foi concebido como uma situação hipotética de exposição máxima, ou seja, como *worst case scenario*.

Tabela 6 - Cenários para a análise de risco simplificada

	Dose			
Atividade	**Tempo de Exposição**	**Concentração Salmonella**	**Ingestão Involuntária**	**Fator de Diluição**
	dias	NMP/gST	g/dia	-
Aplicação	120	0,17 3,53 8,84 31,82	2 0,556	-
Vistoria/Controle de Formigas	60	0,17 3,53 8,84 31,82	0,01 0,02 0,05 0,1	0,0002 0,0018 0,0121
Fertilização de Cobertura	120	0,17 3,53 8,84 31,82	0,01 0,02 0,05 0,1	0,0002 0,0018 0,0121
Jornada Semanal Completa	260	0,17 3,53 8,84 31,82	0,01 0,02 0,05 0,1	0,0002 0,0018 0,0121

As concentrações de *Salmonella* utilizadas provêm dos próprios resultados encontrados nessa pesquisa. Ajustadas com a taxa de recuperação de 28,28% proveniente do ensaio de *Spike* para *Salmonella*. Foram utilizados quatro valores para as concentrações: 0,17 NMP/gST como o valor mínimo encontrado; 3,53 NMP/gST como o valor médio encontrado; 8,84 NMP/gST como o valor no LE aplicado no t0; e 31,82 NMP/gST como o maior valor encontrado. Utilizando essa amplitude de concentrações, espera-se contemplar todo o espectro de possibilidades mesmo quando calculando apenas o risco estático.

Outro componente do fator “dose”, além da concentração, é a ingestão de partículas pelo operador. Nesse fator diferem a aplicação e os momentos após a aplicação. No cenário de aplicação, a ingestão é maior, pois o trabalhador está lidando com o resíduo diretamente. Nos outros cenários, ao valor de ingestão de particulados multiplica-se um fator de diluição, isso porque quando o LE já se encontra aplicado ao solo considera-se que ocorre a ingestão de uma mistura de lodo+solo.

Para o cenário de aplicação, foram utilizados dois valores para ingestão acidental pelos trabalhadores: 2g/dia de trabalho (WESTRELL, 2004); e 0,556g/dia, calculado utilizando o índice de 100mg/1000kg de LE aplicado (EISENBERG, 2008) para a quantidade de 5,6Mg de lodo aplicado por hectare no presente experimento.

Para os cenários pós-aplicação, em que se assume a mistura do lodo com o solo antes da ingestão, foram utilizados os seguintes valores: 10mg/dia como utilizado por Bastos (2009); 20mg/dia assumindo apenas a ingestão de solo segundo o *Exposure Factors Handbook* (EFH) da Agência Americana de Proteção Ambiental (2011); 50mg/dia, também seguindo o EFH, mas agora considerando a ingestão acidental de solo+particulados; e 100mg/dia segundo manual da OMS (WHO, 2006). Utilizou-se um gradiente crescente de ingestão também visando alcançar a amplitude possível de resultados, considerando apenas o risco estático.

Para o fator de diluição, foram utilizados três valores: 0,0002 e 0,0128 são os valores mínimo e máximo utilizados por Magalhães (2012) em sua pesquisa com culturas anuais; e 0,0018 foi calculado considerando a mistura de 5,6Mg de lodo com um volume de solo até 20cm de profundidade.

Todas as combinações entre todos os fatores foram calculadas seguindo o modelo Beta-Poisson e os resultados foram plotados em um gráfico para posterior análise. Foi considerado o risco aceitável/tolerável de 1 evento por 10000, como recomendado por documentos da OMS (WHO, 2004; 2006).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Teor de Sólidos Totais

Os teores de sólidos do lodo aplicado sobre o solo ao longo do experimento se comportaram de maneira distinta nos dois tratamentos (Figura 2). No tratamento em casa de vegetação, a secagem foi gradual e constante devido ao isolamento da variável climática nesse tratamento. Rorat et al (2015), em estudo de incubação de lodo de esgoto em solo em situação de laboratório, também verificou a secagem gradual do lodo e o aumento no teor de sólidos com o passar do tempo. Já no tratamento em campo, como esperado, a umidade no lodo de esgoto esteve sujeita às variações climáticas (Figura 3).

Figura 2 - Variação no teor de sólidos totais ao longo do experimento. A linha de tendência corresponde ao tratamento ESTUFA

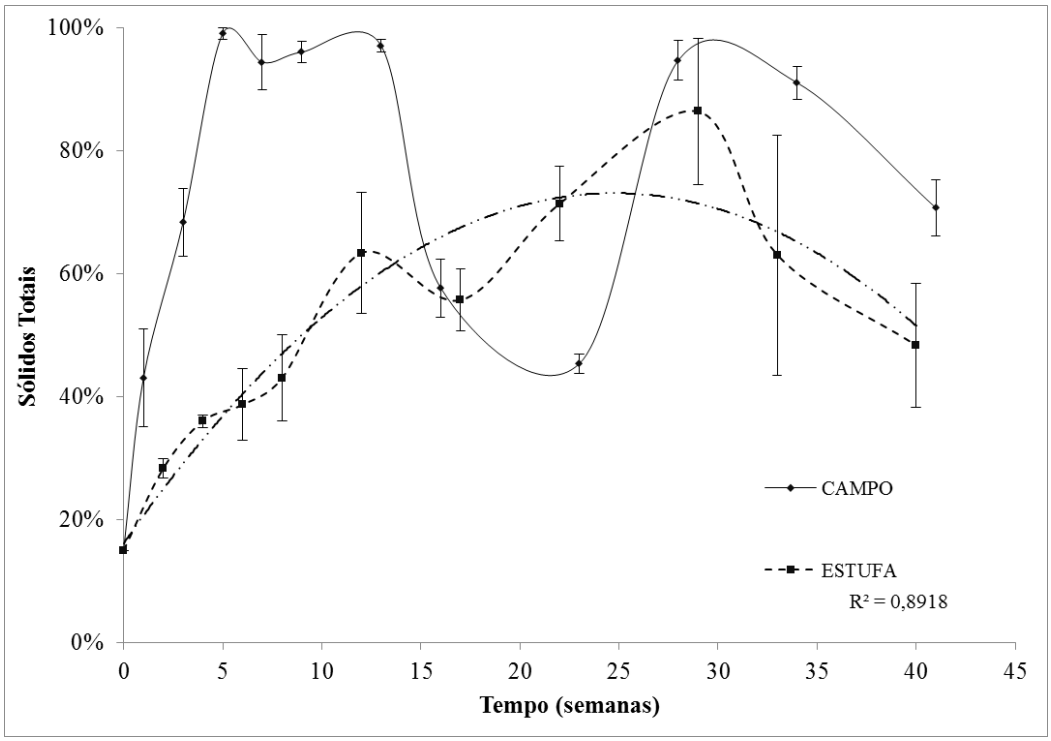
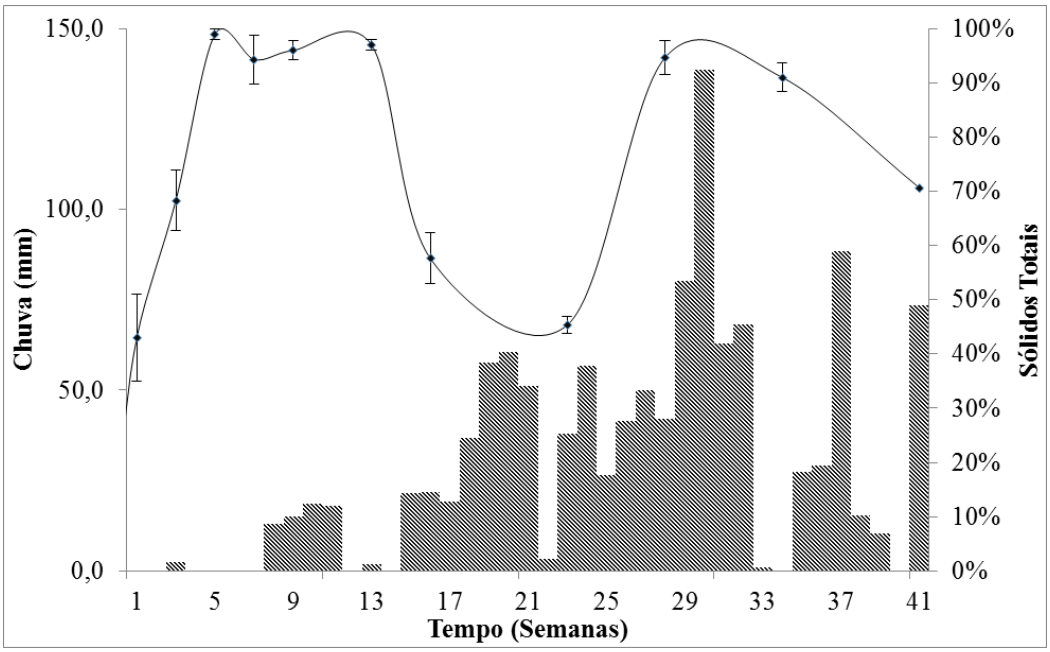


Figura 3 - Variação no teor de sólidos totais (CAMPO) x Pluviosidade



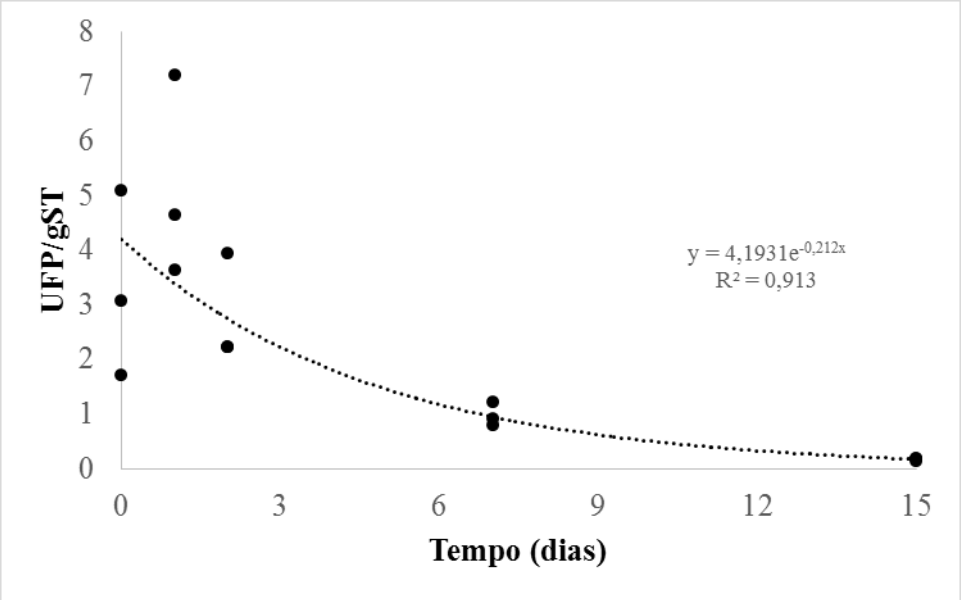
No LE do tratamento em campo, verificou-se um padrão de secagem e (re)umedecimento em três fases. Primeiramente, até a semana 13, ocorreu intensa perda de umidade do material sobre o solo. Isso se deveu, sobretudo, à época do ano e às condições climáticas relacionadas. O experimento foi implantado no inverno seco de Piracicaba, e, por isso, a baixa umidade relativa do ar, a exposição direta do material ao sol sobre o solo e a falta de chuvas dessa época contribuíram para a rápida secagem do LE. Entre as semanas 13 e 25, com a volta das chuvas na primavera, houve um reumedecimento das amostras sobre o solo, representando a segunda fase no padrão de secagem. Por fim, a partir da semana 26, mesmo com as chuvas intensas e frequentes no verão, as amostras voltaram a apresentar alto teor de sólidos. Isso se deveu, provavelmente, ao aumento das temperaturas médias e máximas no verão quente piracicabano, que, mesmo na presença de água pluvial e umidade do ar elevada, conseguiram evaporar a umidade contida no lodo.

4.2. *Enterovirus*

Os *Enterovirus* presentes no LE aplicado ao solo apresentaram decaimento (Figura 4). Faria (2015) utilizou a escala de tempo em semanas para a análise dos *Enterovirus* em solo tratado com LE e verificou que, a partir da segunda semana, esses vírus entéricos não eram mais encontrados. Na presente pesquisa, com a escala de tempo em dias, foi possível verificar de maneira mais precisa o comportamento dos *Enterovirus* no LE em contato com o solo.

Os *Enterovirus* apresentaram decaimento e resultado abaixo do limite de detecção no 15º dia de amostragem (Figura 4). Pourcher et al (2007) e Yeager e O'Brien (1979) encontraram resultados semelhantes de inativação de *Enterovirus* em solos, com a inativação ocorrendo em 14 e 15 dias, respectivamente.

Figura 4 - Decaimento de *Enterovirus* em CAMPO



Mondal et al (2015) relatam que a presença de proteases provenientes da comunidade de microrganismos do próprio LE pode cumprir um papel importante na inativação dos vírus entéricos. Essas proteases agem no capsídeo dos *Enterovirus* expondo o material genético ao ambiente, onde é prontamente degradado. Nos solos também há grande presença de proteases provenientes de sua diversa microbiota, de forma que é possível afirmar a possibilidade de o

mesmo processo ocorrer de maneira análoga, isto é, com as proteases do solo agindo na inativação dos *Enterovirus* que encontram-se em contato com o solo. Vale ressaltar que Nasser, Glozman e Nitzan (2002) observaram que alguns tipos de *Enterovirus*, notadamente o *Coxsackievirus*, são mais vulneráveis à ação proteolítica, enquanto outros, como os *Poliovirus*, são mais resistentes. Esses resultados indicam que a completa inativação de *Enterovirus* no solo pode ser explicada apenas em parte pela ação das proteases, havendo, portanto, outros mecanismos de inativação ocorrendo em paralelo.

Além da ação das proteases, a interação dos vírus com as partículas do solo é estudada como outro mecanismo de inativação, uma vez que o RNA dos vírus pode se ligar quimicamente aos sítios de trocas dos coloides e perder sua função. Ademais, as características eletrostáticas dos coloides alteram a maneira como os vírus interagem e se fixam às partículas (ZHUANG e JIN, 2002). Nesse sentido, partículas mais reativas quimicamente, como óxidos de ferro e alumínio e as substâncias húmicas da matéria orgânica do solo, parecem ter papel mais importante do que partículas inertes, como a areia (CHU et al, 2001). Além dessas características químicas dos solos, Hurst, Gerba e Cech (1980), citam também temperatura, teor de umidade, teor de fósforo, alumínio trocável e pH como fatores relevantes à sobrevivência de *Enterovirus* em solos.

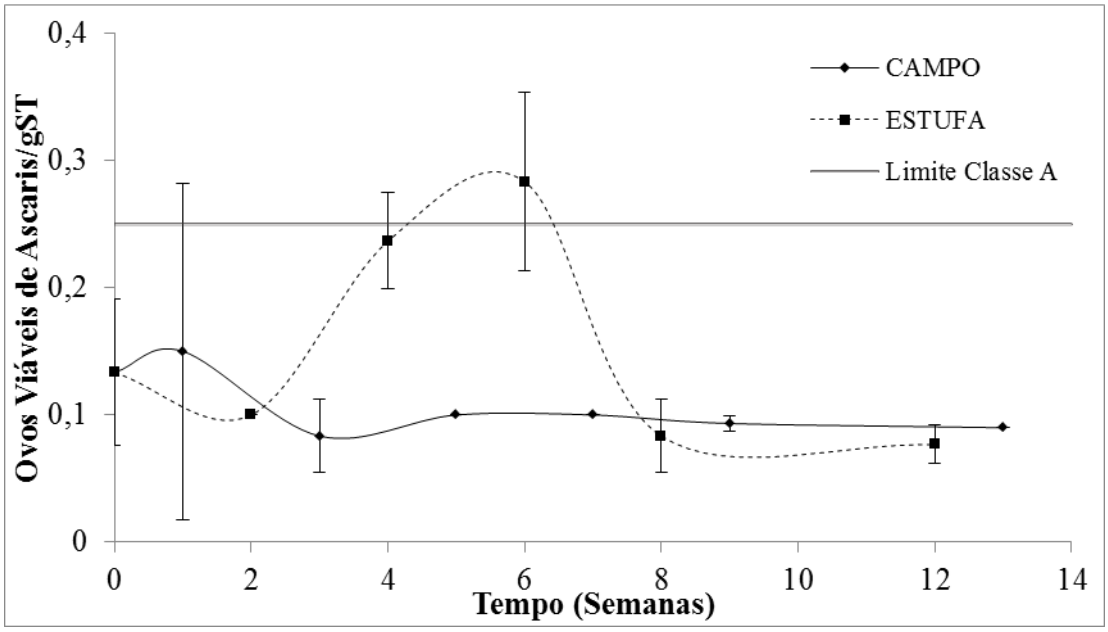
4.3. Helmintos

Os ovos viáveis de helmintos apresentaram comportamentos diferentes em cada tratamento (Figura 5). No tratamento em estufa, logo na semana 2 de amostragem, os resultados ficaram abaixo do limite de detecção, sendo que depois, nas semanas 4 e 6, voltaram a aparecer fora do limite de detecção. Esse comportamento sugeriu um aumento na quantidade de ovos viáveis de helmintos após a semana 2. Entretanto, dado o ciclo de vida de *Ascaris*, tal hipótese não é possível, pois não havia hospedeiro intermediário para completar o ciclo de reprodução. No tratamento em campo, logo na semana 3, a segunda amostragem, os resultados já ficaram abaixo do limite de detecção, indicando, portanto, o rápido desaparecimento dos ovos viáveis de *Ascaris* quando em contato com o solo. Os resultados para ovos viáveis de helmintos apresentaram caráter inconclusivo, já que os ovos viáveis de helmintos se encontravam abaixo do limite de detecção logo nas primeiras coletas. A inconclusividade pode ter tido as seguintes causas: primeiramente, a pouca quantidade de

ovos viáveis de *Ascaris* no lodo inicial aplicado sobre o solo; ou problemas de coleta, transporte, preparo de amostras e/ou análise laboratorial das amostras de lodo, os quaispodem ter atrapalhado a qualidade final dos dados.

Faria et al (2017), em estudo similar, com o lodo de esgoto aplicado em solo tropical em plantio de eucalipto, relataram o desaparecimento dos ovos viáveis de *Ascaris* na semana 7 após a aplicação do resíduo. Além desse recente estudo, há poucos estudos de sobrevivência de ovos de helmintos em solos tropicais devido à escassez de laboratórios capazes de realizar os ensaios laboratoriais de quantificação demandados pela legislação. Dentre esses poucos, Thomas-Soccol et al (1999) e Souza et al (2008) estudaram a sobrevivência de ovos de *Ascaris* e relataram a presença de ovos viáveis após 25 e 3 semanas, respectivamente. Importante notar que esses estudos foram realizados em climas diferentes, o que explica a grande amplitude entre os resultados, os quais dependem da hostilidade do ambiente ao patógeno.

Figura 5 - Comportamento de Ovos Viáveis de *Ascaris* em CAMPO e ESTUFA



Em outras localidades, como Estados Unidos e Europa, alguns estudos encontraram viabilidade de ovos muito superior aos estudos de clima tropical, com presença de ovos viáveis após 15 meses a até 15 anos (EDMONDS, 2000; KOWAL, 1986). Willians, Pepper e Gerba (2012), em análise de risco, calcularam um risco aceitável de 1:10000 de se contaminar com *Ascaris* mediante consumo de alfaces plantadas em solo desértico onde foi aplicado LE como fertilizante.

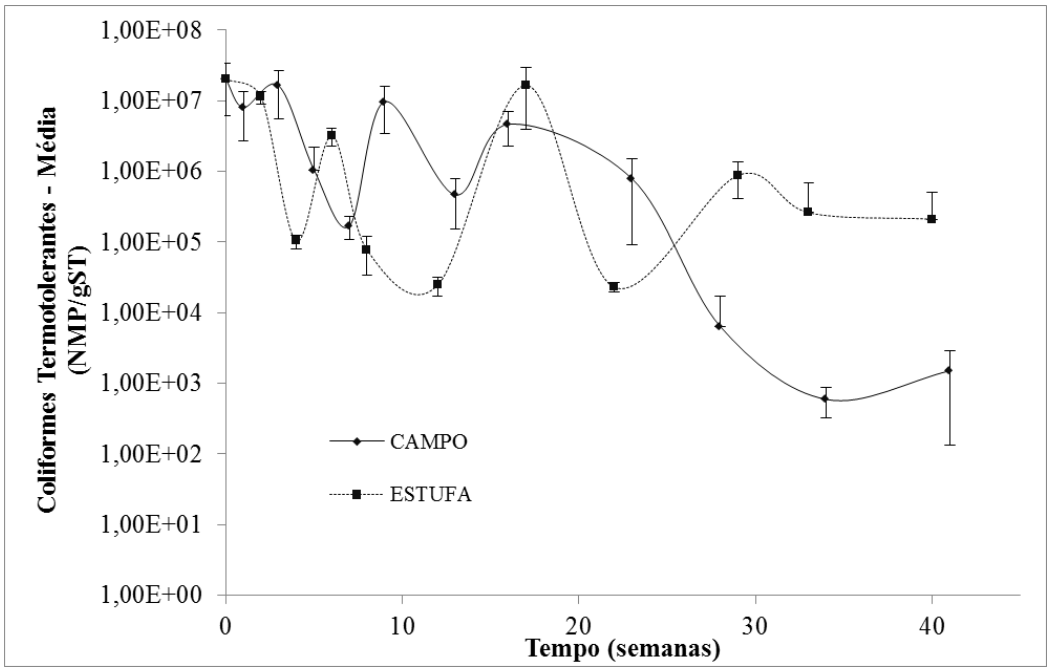
Além de *Ascaris*, ovos viáveis e não-viáveis de outros parasitos importantes foram encontrados durante as análises. Foram identificados, em nível de gênero, os seguintes parasitos: *Toxocara canis, Trichuris, Hymenolepsis, Taenia, Ancylostoma e Enterobius.* Dentre os resultados mais importantes dessa análise extra, temos : ovos viáveis de *Toxocara canis* e *Trichuris* encontrados até a semana 6 no tratamento em estufa; ovos não-viáveis de *Hymenolepsis* encontrados até a semana 8 no tratamento em estufa; ovos não-viáveis de *Ancylostoma* presentes até a semana 6.

Esses resultados não programados em nosso método devem ser analisados com cautela, entretanto, os dados evidenciam que existe alguma sobrevivência de outros parasitos presentes no lodo no solo. Assim como para os outros patógenos, a interação com o solo é chave para a inativação desses organismos. Pecson et al (2007) elencou temperatura e pH do resíduo como parâmetros importantes na sobrevivência de *Ascaris* no lodo. Smith et al (1999) reiteram a informação e consideram a temperatura o fator mais importante na viabilidade de ovos de *Ascaris* em solos. Vale lembrar que solos brasileiros possuem, em sua maioria, pH ácido. Além disso, temperaturas altas na região tropical contribuem para uma rápida inativação dos parasitos.

4.4. Coliformes Termotolerantes

Os coliformes termotolerantes apresentaram comportamentos distintos em cada um dos tratamentos (Figura 6). No tratamento em estufa, com ambiente mais controlado, umidade mais abundante e certo isolamento da hostilidade do ambiente externo, o decaimento ocorreu de forma menos pronunciada, com uma queda de 2 log em 40 semanas de experimento. Já no tratamento em campo, com o LE aplicado exposto às intempéries, o decaimento foi mais pronunciado, com queda de 4 log em 41 semanas de ensaio.

Figura 6 - Comportamento dos Coliformes Termotolerantes em CAMPO e ESTUFA



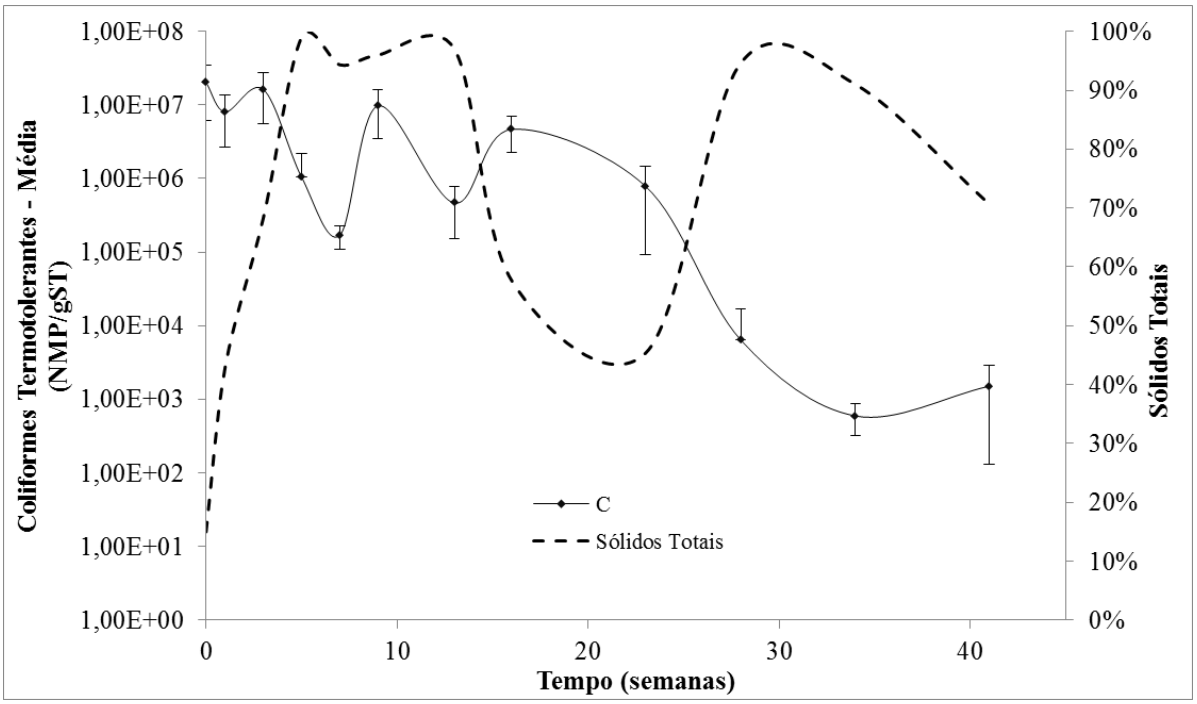
O decaimento de coliformes termotolerantes em campo seguiu um modelo exponencial, com equação $Y=2.10^{7}.e^{-0,236X}$, com $R^2=0,7752$. Segundo esse modelo, os coliformes termotolerantes demorariam por volta de 70 semanas para desaparecer por completo. Para o tratamento em estufa, o tempo para desaparecimento total dos coliformes termotolerantes foi estimado em aproximadamente 230 semanas, entretanto, o modelo exponencial com equação $Y=2,10^{6}.e^{-0,62X}$ possui um coeficiente de determinação muito baixo, com $R^2=0,109$.

Estrada et al (2004) registraram decaimento de coliformes fecais a níveis estáveis de 10^3UFC/gST em 80 dias após a aplicação do LE como fertilizante. Lang et al (2003) observou uma redução de 2-3 log nas populações de coliformes após 56 dias da aplicação de lodo de esgoto Classe A. Já Gondim-Porto (2016) encontraram uma diminuição de 4-5 log após 24 meses de aplicação. Esses autores, ao contrário de Estrada et al (2004), observaram um decaimento mais rápido de coliformes quando a dose inicial foi mais baixa, sugerindo que uma população inicial menor de patógenos é mais facilmente suprimida. Gibbs et al (1997), em acompanhamento de lodo aplicado em solo por 37 semanas, relatou decaimento de coliformes fecais abaixo de níveis detectáveis em 4 a 12 semanas, com posterior reaparecimento e flutuação na população.

Foi possível identificar flutuação nas populações de coliformes termotolerantes com as variações de umidade no material, expressas em teor de sólidos totais (Figura 7). Percebeu-se que, quando havia um aumento no teor de sólidos totais das amostras ou diminuição de umidade, sempre havia uma diminuição dos coliformes. O inverso também era verdadeiro, isto é, quando o teor de sólidos da amostra diminuía, ou seja, aumentava sua umidade, os coliformes voltavam a se multiplicar. Em analogia às fases de secagem mencionadas anteriormente, foram identificadas também três fases de crescimento e decrescimento coincidentes com as variações na umidade do LE aplicado sobre o solo.

Edmonds (1976) também relacionou a dinâmica dos coliformes presentes em LE aplicado como fertilizante com a temperatura e a umidade, além de fatores, como o pH e a competição com micróbios do solo. Os resultados de Pepper et al (2008) são concordantes e relatam aumento na sobrevivência de *Streptococcus* fecais, coliformes fecais e coliformes totais em solos conforme há aumento de sua umidade e de seu teor de argila. Esses autores também relataram relação inversa da sobrevivência com a temperatura, ou seja, quanto mais amena a temperatura da superfície, maior a sobrevivência desses organismos indicadores fecais. Esses resultados reiteram que, quanto maior a exposição à hostilidade do ambiente, maior a dificuldade de sobrevivência para os microrganismos estudados.

Figura 7 - Coliformes Termotolerantes em CAMPO x Teor de Sólidos no Lodo de Esgoto



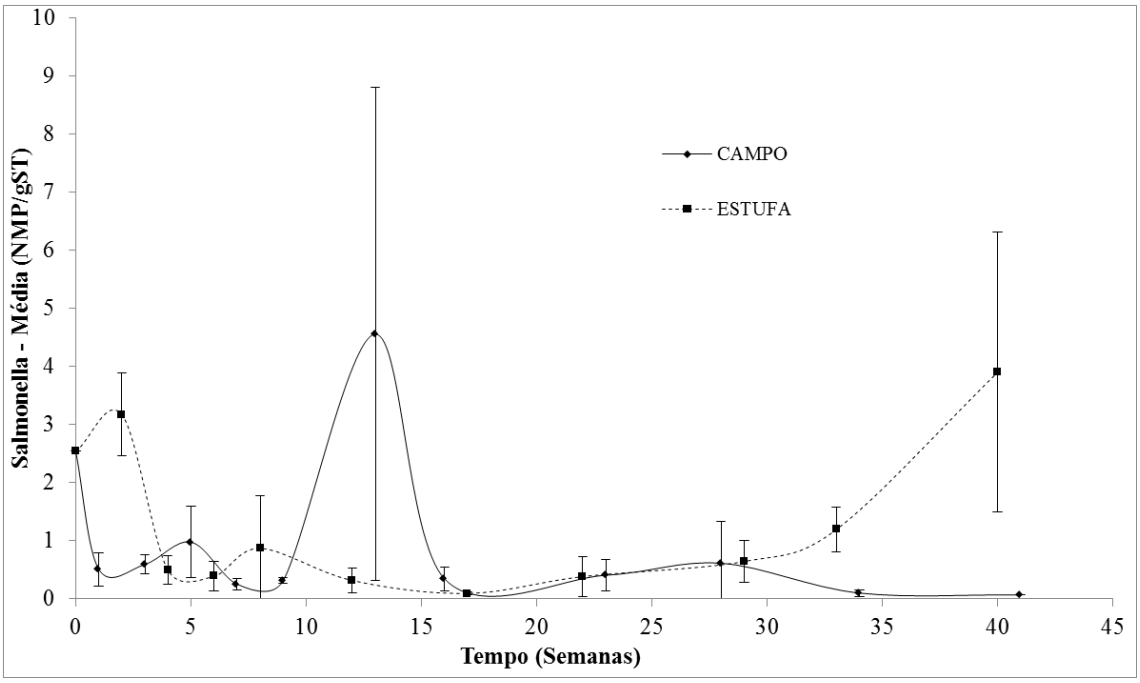
Pepper et al (2008) e Gibbs et al (1997), assim como no presente estudo, também observaram a relação entre o recrescimento de coliformes e a diminuição da hostilidade das condições ambientais. Além desses estudiosos, a extensa revisão feita por Zaleski et al (2005) indica que os coliformes termotolerantes ou fecais estão sujeitos a recrescimento quando a umidade do solo aumenta, normalmente após chuvas. Ademais, tal revisão também consolida a informação de que solos de textura mais fina proporcionam maior interação com os organismos e aumentam sua sobrevivência.

Os resultados do presente trabalho, ao contrário de muitos outros em literatura, não apresentaram eliminação total ou supressão abaixo dos limites de detecção para coliformes termotolerantes no período estudado. A escassez de trabalhos realizados em situação tropical torna difícil traçar paralelos. A melhor qualidade microbiológica dos LE utilizados nos trabalhos realizados em outras localidades, retratando sistemas de tratamentos de esgoto mais eficientes em países estrangeiros, pode ser outro fator a se considerar. Isso porque, como mencionado por Gondim-Porto (2016), uma menor dose inicial parece proporcionar uma mais fácil inativação de coliformes.

4.5. *Salmonella*

A *Salmonella* quantificada no LE aplicado sobre o solo não decaiu de maneira acentuada e regular (Figura 8). Houveflutuação das populações de *Salmonella* ao longo do experimento. Em alguns tempos de coleta, foi observada população com valores muito baixos e até inferiores ao limite de detecção; em outros tempos posteriores, foi observada população com valores até mesmo superiores aos presentes no LE aplicado inicialmente. Notadamente, na semana 13 para o tratamento em campo e na semana 40 para o tratamento em estufa, foi observado um pico nas contagens de *Salmonella*.

Figura 8 - Comportamento de *Salmonella* em CAMPO e ESTUFA



Esse tipo de comportamento era esperado e já foi relatado em outras pesquisas realizadas com *Salmonella* em solos (HERNÁNDEZ et al 2017; GIBBS et al 1997; ZALESKI et al 2007). A presente pesquisa foi construída exatamente para entender tal fenômeno, que, segundo a hipótese levantada, pode ser causado por uma colonização do LE aplicado sobre o solo por *Salmonella* provenientes de animais silvestres, daqui para frente chamadas de *Salmonella* de origem ambiental. Outra proposição que também será explorada é referente à capacidade de recrescimento de *Salmonella* presente no LE aplicado inicialmente.

A presente pesquisa não observou decaimento de *Salmonella.* Entretanto, outros, como Schwarz et al (2014), observaram decaimento de 90% de *Salmonella* entre 4 a 54 dias após a aplicação do LE. Hernández et al (2017) considerou o solo ausente de *Salmonella* após 8 semanas de aplicação, embora os microrganismos tenham reaparecido após 1 ano. Outros autores observaram que *Salmonella sp*. pode sobreviver por alguns dias a até 332 dias em solos onde foi aplicado esterco (HOLLEY et al 2006; ISLAM et al., 2004; YOU et al., 2006). Thomaz-Soccol et al. (2010), em material sobre a realidade do uso agrícola de LE no Brasil, afirmam que o tempo de sobrevivência da *Salmonella* no solo pode variar de menos de uma semana a até seis meses.

Murray (1991), em trabalho seminal sobre *Salmonella* no ambiente, expõe diversos exemplos de contaminação cruzada por *Salmonella* proveniente de diferentes reservatórios.

Alguns exemplos são: *Salmonella* de granjas vizinhas que contaminam umas as outras; transporte de *Salmonella* de origem aviária por insetos; e, em uma anedota impressionante, a história de *Salmonella* de origem humana que viajam em *Gulls* (um tipo de gaivota) de uma estação de tratamento de esgoto a granjas a quilômetros de distância, realizando contaminação. Além dessa revisão histórica, Savariz et al (2017), em estudo realizado em âmbito nacional, identificaram *Salmonella* em 10% das aves silvestres amostradas, sendo que algumas delas apresentaram até mesmo *Salmonella Typhimurium,* serotipo causador de doenças em seres humanos. Esses trabalhos demonstram que o transporte e sobrevivência de *Salmonella* são possíveis em uma diversidade de hospedeiros e situações.

Diversos autores já identificaram o recrescimento de *Salmonella* em LE (HERNÁNDEZ et al 2017; GIBBS et al 1997; ZALESKI et al 2007). Assim como os outros patógenos estudados, a facilidade do estabelecimento, sobrevivência e recrescimento de *Salmonella* em LE aplicado sobre o solo está inversamente relacionada à hostilidade do ambiente a esses organismos. Schwarz et al (2014) identificaram umidade e temperatura do solo como fatores importantes para a sobrevivência de *Salmonella* em solos. Os mesmos autores observaram que o LE como substrato é benéfico ao estabelecimento de *Salmonella* nos solos, visto que essas bactérias tiveram inativação mais rápida quando inoculadas em solo sem LE. Neste trabalho, não foi identificada relação da contagem de *Salmonella* com a pluviosidade ou teor de sólidos nas amostras.

Gibbs et al (1997) identificaram recrescimento de *Salmonella* em LE estocado. Tal identificação decorreu da observação de que essas bactérias ficaram indetectáveis pelo período mais hostil do ano e, quando as condições se tornaram favoráveis novamente, os organismos reapareceram, e ,inclusive, se reproduziram alcançando níveis mais altos que os inicialmente registrados. Nesta pesquisa, também foi registrado um período indetectável e posterior crescimento acima dos valores iniciais registrados.

Zaleski et al (2007), em revisão, concluiu que é possível o recrescimento de *Salmonella* em substratos estéreis. Então, unindo as duas hipóteses, a da colonização por *Salmonella* de origem ambiental e a do recrescimento, é possível que ambos os processos aconteçam concomitantemente, isto é, com as *Salmonella* de origem do LE aplicado sobrevivendo e também com *Salmonella* de origem ambiental colonizando tal substrato.

Foi observado pico de *Salmonella* após 40 semanas da fertilização. Como o ambiente fechado da estufa não proporciona trocas com o ambiente nem possibilita a contaminação por cepas de origem ambiental, conclui-se que houve recrescimento.

Esse estado indetectável no qual as *Salmonella* são capazes de entrar é chamado VBNC – *Viable but not culturable*, viável mas não culturável. Como o termo sugere, é um estado em que as *Salmonella* estão ativas e viáveis, entretanto os métodos por cultivo falham em quantificá-las. Fu et al (2015) identificaram esse estado VBNC em *Salmonella* presente em LE digerido anaerobicamente e, posteriormente, estocado. Esses autores foram capazes de ressuscitar os patógenos com sucesso, sugerindo que o sistema de tratamento estudado induziu a *Salmonella* ao estado VNBC em lugar de inativá-las por completo.

Zeng et al (2012), estudando esse estado VBNC em *Salmonella typhi*, foi capaz de induzir as bactérias ao estado VBNC utilizando temperatura e exposição à sulfato de cobre, e, depois ressuscitá-las,. Esses autores também relataram mudança no formato das células quando nesse estado e, sobre tal ponto, sugerem que é possível que a *Salmonella* mantenha sua patogenicidade mesmo após passar por essa transformação. Entender esse estado indetectável, mas ainda ativo de *Salmonella*, é importante porque o método recomendado pela normativa para quantificação deste patógeno é um meio por cultura de células, o que pode levar a enganos e aumentar riscos de infecção. É preciso pensar uma transição para métodos moleculares, como propõe Jiang et al (2013), ou um método misto entre cultura e molecular.

Visando compreender a questão da colonização por *Salmonella* de origem ambiental, utilizamos a ferramenta AFLP para análise de similaridade genética das cepas de *Salmonella* coletadas ao longo do experimento. Por meio dessa técnica, foi possível identificar quais grupos de *Salmonellae* são semelhantes, inferir sua origem e verificar sua persistência ao longo do estudo.

O presente trabalho é pioneiro no uso desta técnica para acompanhamento da origem de *Salmonella* a partir de um ponto de origem no LE inicialmente aplicado. Por este motivo, não foram encontrados muitos trabalhos em literatura para realização de comparações. Verifica-se, contudo, a existência de diversos trabalhos em epidemiologia em que os autores foram bem sucedidos em traçar as origens de surtos de *Salmonella* em animais e alimentos (MIKASOVÁ et al, 2005; KUNZ, 2013; NODA et al, 2010; ARTS; Van LITH; KEIJER, 1998).

Foram identificados 21 grupos distintos com 90% de similaridade genética (Figura 9), os quais foram considerados grupos similares (ROSS e HEUZENROEDER, 2005). Na figura 9, cada um dos grupos similares está identificado pela mesma cor na segunda coluna após o dendrograma. A escala acima do dendrograma identifica a porcentagem de similaridade. Observou-se o grupo P1 como o maior, englobando 48 das 181 amostras retiradas ao longo do experimento. Também observaram-se vários grupos contendo apenas um exemplar, como, por exemplo P2, P3, P6, P13 e P15. Esses grupos solitários podem ser realmente grupos de *Salmonella* que não se encontram no *pool* inicial, ou então, podem indicar problemas relacionados a um tamanho insuficiente na amostragem do LE, o que pode ter impossibilitado a verificação de outras cepas similares ao longo do ensaio..

Figura 9 - Análise de similaridade genética entre cepas de *Salmonella*. Mesmas cores indicam mesmo grupo semelhante a 90%

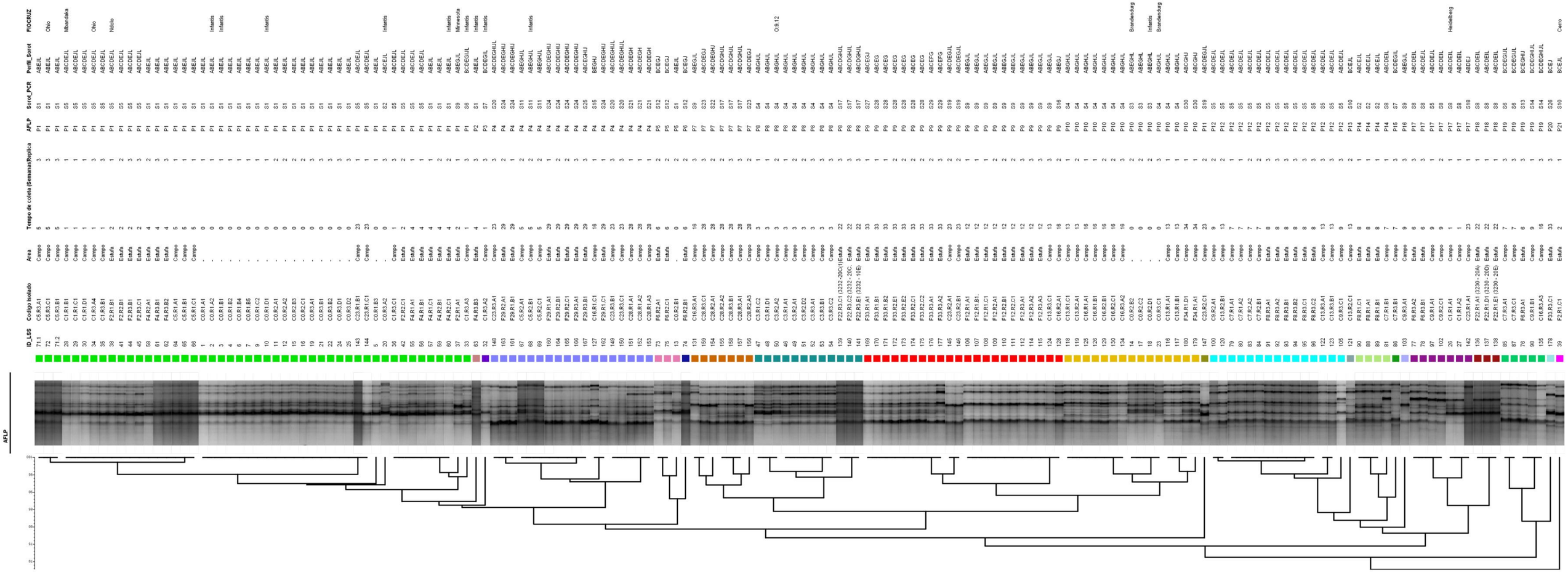
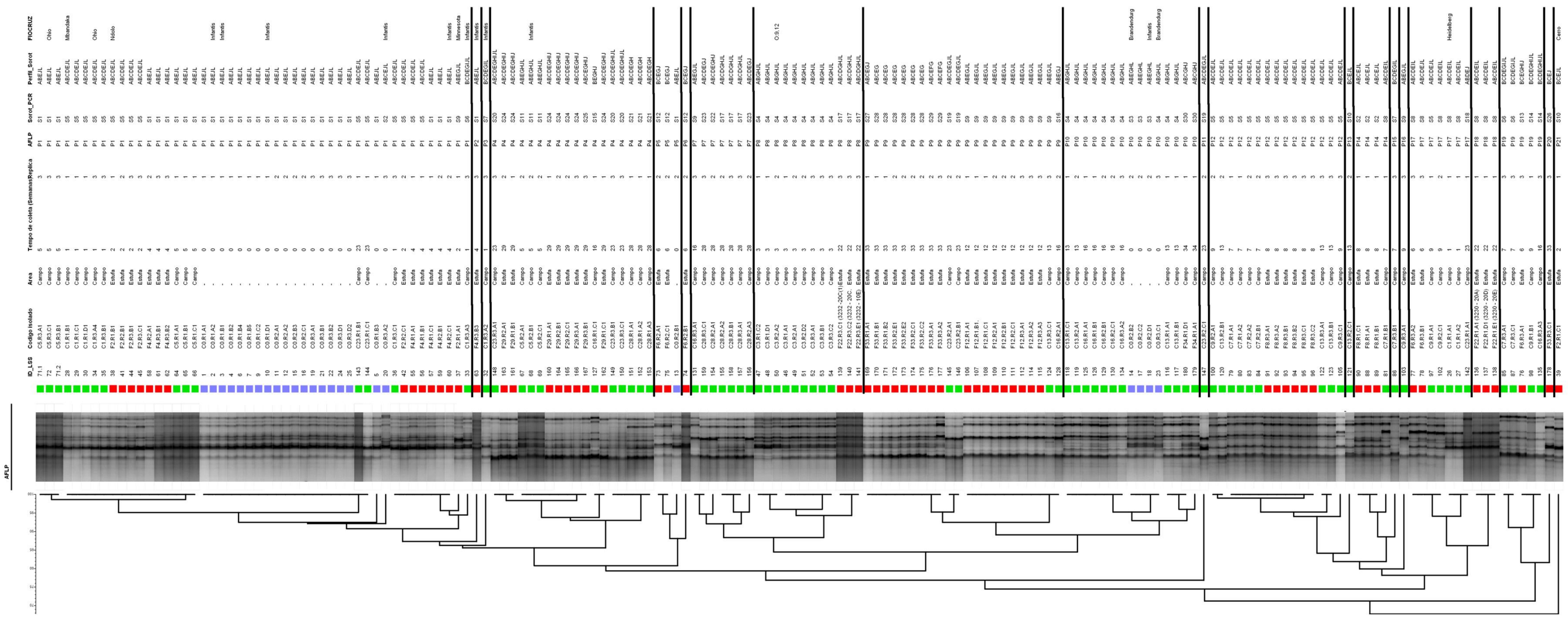


Figura 10 - Análise de similaridade genética de *Salmonella* classificado por origem da cepa. Os riscos delimitam os grupos como na Figura 9. Cores indicam origem: Azul: lodo inicial t0; Verde: CAMPO; e Vermelho: ESTUFA



A figura 10 mostra, por meio das cores na segunda coluna após o dendrograma, a origem de cada um dos pontos de *Salmonella* amostrados: o verde indica os dados referentes ao tratamento em campo; o vermelho, o tratamento em estufa; e o azul, as *Salmonella* provenientes do LE inicialmente aplicado. Os traços perpendiculares à tabela separam os grupos, como os mostrados anteriormente na Figura 9.

O exercício que deve ser feito no estudo da figura 10 é o de comparação dos tempos de amostragem para grupos de *Salmonella* com 90% de similaridade genética. Dessa maneira, constatamos que esses grupos similares persistem no LE aplicado no solo. Por exemplo: no primeiro grupo P1, temos grupos similares tanto no *pool* inicial quando no tempo de amostragem t23, 23 semanas após a aplicação. Isso significa que esse grupo foi se reproduzindo e persistindo no resíduo aplicado no solo no tratamento em campo por ao menos 23 semanas. Outro exemplo, no grupo P4, encontramos o mesmo grupo similar tanto no tratamento em campo quanto no tratamento em estufa nos tempos de coleta t28 e t29, respectivamente. Como não havia contato do LE em estufa com o ambiente externo, assume-se que esse grupo, que também está presente no campo, é proveniente do LE inicialmente aplicado. Como não há contaminação externa no ambiente protegido, essa seria a única origem possível. Essa análise também indica que o grupo similar P4 sobreviveu desde a aplicação até 29 semanas após a fertilização.

No grupo similar P8, nota-se outro exemplo claro de sobrevivência desse grupo ao longo do tempo do experimento. Cepas similares foram encontradas tanto em t3 em campo como em t22 em estufa. Seguindo a lógica anteriormente aplicada ao grupo P4, entende-se que esse grupo similar se manteve presente desde a aplicação por ao menos 22 semanas no resíduo.

Para o grupo P17, foi constatada a presença na primeira semana em campo e depois na 23ª semana também em campo. Como esse mesmo grupo também ocorreu em t6 em estufa, a análise indica que esse grupo é proveniente do LE inicialmente aplicado. Em suma, P17 sobreviveu por ao menos 23 semanas em campo após aplicação.

O exemplo mais emblemático de todo o estudo é o do grupo P10. Esse grupo de *Salmonella* foi identificado no *pool* inicial, em tempo 0, e também em t34, o último dos tempos de coleta amostrado. Ou seja, esse grupo esteve presente por todo o experimento, sobrevivendo no resíduo e persistindo no solo pelas 34 semanas de duração do ensaio. Importante salientar que tal grupo foi identificado também no tempo 13 semanas, tempo este

que exibiu um pico nas populações de *Salmonella*. Isso pode indicar que ess grupo recresceu neste período.

P3, P11, P13, P15 e P16 são grupos solitários que apareceram apenas no tratamento em campo não constando no *pool* inicial do tempo 0. Por existirem esses grupos apenas no tratamento em campo, ou seja, expostos ao ambiente, não está descartada a hipótese de que possa ter havido colonização por *Salmonella* de origem ambiental. Outra explicação para esses grupos solitários é a falta de um esforço amostral maior no *pool* inicial, ou seja, esses grupos poderiam estar presentes no lodo t0 mas a amostragem insuficiente falhou em captá-los.

Os exemplos citados acima deixam claro que os grupos de *Salmonella* presentes no LE inicialmente aplicado são capazes de sobreviver e persistir no resíduo sobre o solo após a fertilização por, ao menos, 34 semanas. Por fim, a análise realizada indica que ambos os processos podem estar ocorrendo concomitantemente.

4.6. Risco

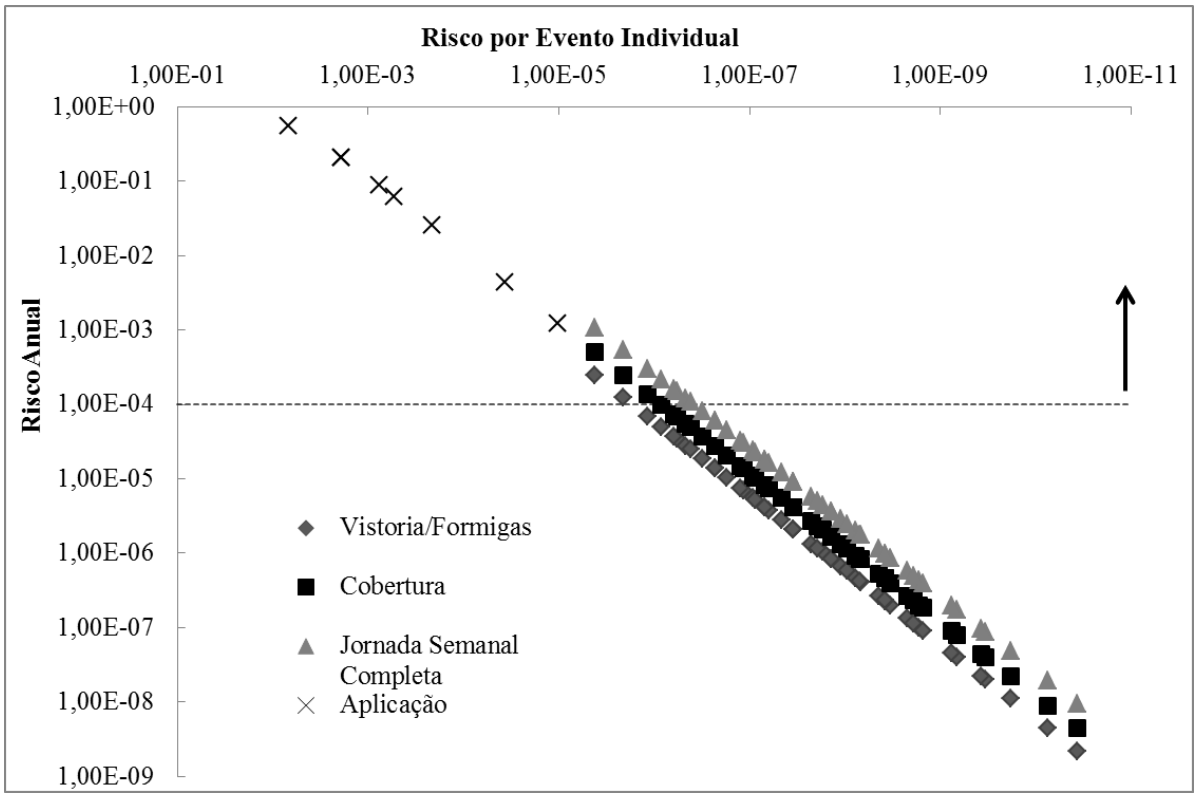
A análise de risco simplificada para *Salmonella* demonstrou que o momento da aplicação do LE no solo como fertilizante é o momento de maior risco para o trabalhador (Figura 11). Todos os cenários avaliados para esse momento ficaram acima do risco aceitável de 1:10000, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2001; WHO, 2004; WHO 2006). Para os cenários que não envolveram aplicação, mas apenas o trânsito de trabalhadores no solo onde foi aplicado o resíduo, apenas alguns cenários ficaram acima do limite tolerável (tabela x).

Embora rudimentar, a análise de risco realizada no presente trabalho encontrou resultados similares a Krzyzanowski et al (2016), Magalhães (2012) e Bastos (2009). Esses autores, realizando análises quantitativas de risco microbiológico mais refinadas, também concluíram que o momento da aplicação é o momento de maior risco, sendo este acima do tolerado.

O fator dose de *Salmonella* no resíduo foi o que mais impactou o resultado final do risco estático. Após esse fator, a exposição, em dias do ano, foi o fator que mais influenciou o

risco ao qual os trabalhadores seriam expostos. Vale ressaltar que a exposição em jornada semanal completa não acontece com frequência na realidade dos cultivos de eucalipto. Tal cenário foi concebido como uma situação hipotética de exposição máxima, isto é, *worst case scenario*.

Figura 11 - Demonstração gráfica dos cenários testados para risco de infeção por *Salmonella* pelo trabalhador. A linha pontilhada representa o limiar de risco aceitável e a seta indica a direção a qual os cenários presentes estão acima do risco tolerado



Outro ponto a se considerar é que a análise de risco realizada não leva em conta a utilização de Equipamento de Proteção Individual (EPI), isto é,considerou-se a inexistência de barreiras físicas entre os trabalhadores em operação e o LE. Numa situação real, levando-se em conta as questões de segurança do trabalho, muito visadas no setor florestal, todos os trabalhadores utilizariam tais equipamentos de proteção, os quais, certamente, atenuam os riscos.

5. CONCLUSÕES

Enterovirus decaíram para limites abaixo dos de detecção em 15 dias de experimento.

Coliformes termotolerantes apresentaram decaimento em ambos os tratamentos. O decaimento foi mais acentuado em campo, onde os organismos estão submetidos a maior hostilidade do meio. O tempo calculado, segundo modelo exponencial para desaparecimento dos coliformes em campo, foi de 70 semanas.

Foi observada a persistência de grupos geneticamente semelhantes de *Salmonella* no solo ao longo do experimento. Um dos grupos foi capaz de persistir desde a aplicação até a última amostragem, a qual foi realizada após 34 semanas. Esse mesmo grupo ocorreu no tempo 13 semanas, ponto em que houve um pico nas populações de *Salmonella*, indicando recrescimento do grupo presente também no lodo aplicado no tempo 0.

Em estufa foi observado pico de *Salmonella* após 40 semanas da fertilização. Como o ambiente fechado da estufa não proporciona trocas com o ambiente nem possibilita a contaminação por cepas de origem ambiental, concluiu-se que houve recrescimento.

A etapa de aplicação do LE como fertilizante é a que apresenta maior risco para os trabalhadores, apresentando risco acima do limite estabelecido como tolerável.

REFERÊNCIAS

AARTS, H. J. M.; VAN LITH, L. A. J. T.; KEIJER, J. High-resolution genotyping of Salmonella strains by AFLP-fingerprinting. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 2, p. 131-135, 1998.

ABREU JUNIOR, C. H. et al. Uso agrícola de resíduos orgânicos: propriedades químicas do solo e produção vegetal. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4, p. 391-479, 2005.

ALVARENGA, P. et al. Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. **Waste Management**, New York, v. 40, p. 44-52, 2015.

BANERJEE, M. R.; BURTON, D. L.; DEPOE, S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 66, n. 3, p. 241-249, 1997.

BASTOS, R. K. X. et al. Análise crítica da legislação brasileira para uso agrícola de lodos de esgotos na perspectiva da avaliação quantitativa de risco microbiológico. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, Desarrollo y Práctica**, México, DF, v. 2, n. 1, p. 143-159, 2009.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do LE**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. 312 p.

BETTIOL, W.; DE CAMARGO, O. A. A disposição de lodo de esgoto em solo agrícola. In: BETTIOL, W.; DE CAMARGO, O. A. (Ed.). **Lodo de esgoto**: impactos ambientais na agricultura. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006. cap. 2, p. 25-36.

BOFILL-MAS, S. et al. Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 12, p. 7894-7896, 2006.

BOOM, R. C. J. A. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.

BRASIL. Ministério das Cidades. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento - SNIS. Brasília, DF, 2014. Disponível em: http://www.snis.gov.br/. Acesso em: 11 jun. 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N°. 375 de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, nº 167, de 30 ago. 2006. Seção 1, p. 141-146.

BROOKS, G. F. et al. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg**. 26. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2014.

BRANDON, J. R.; BURGE, W. D.; ENKIRI, N. K. Inactivation by ionizing radiation of Salmonella enteritidis serotype montevideo grown in composed sewage sludge. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 33, n. 4, p. 1011-1012, 1977.

CASTRO, A. L.; RODRIGUES, F. G.; SCALIZE, P. S. Cenário da disposição do lodo de esgoto: uma revisão das publicações ocorridas no Brasil de 2004 a 2014. **Multi-Science Journal**, Urutaí, GO, v. 1, n. 2, p. 66-73, 2015.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Relatórios de Qualidade das Águas Superficiais no Estado de São Paulo do ano de 2013**. São Paulo, 2013. 443 p. Disponível em: http://cetesb.sp.gov.br/aguas-interiores/publicacoes-e-relatorios/. Acesso em: 15 jan. 2017.

CLESCERI, A. D.; GREENBERG, A. E.; EATON, A. D. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington DC: APHA; AWWA; Water Environment Federation, 1998.

COMPANHIA DE SANEAMENTO DO PARANÁ - SANEPAR. **ONU divulga trabalho da SANEPAR sobre uso de lodo na agricultura**. Curitiba, 2016. Disponível em: http://site.sanepar.com.br/noticias/onu-divulga-trabalho-da-sanepar-sobre-uso-de-lodo-na-agricultura. Acesso em: 26 ago. 2017.

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

CHU, Y. et al. Mechanisms of virus removal during transport in unsaturated porous media. **Water Resources Research**, Washington, DC, v. 37, n. 2, p. 253-263, 2001.

CHU, Y. et al. Effect of soil properties on saturated and unsaturated virus transport through columns. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, n. 6, p. 2017-2025, 2003.

EDMONDS, R. L. Survival of coliform bacteria in sewage sludge applied to a forest clearcut and potential movement into groundwater. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 32, n. 4, p. 537-546, 1976.

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

EISENBERG, J. N. S. et al. Microbial risk assessment framework for exposure to amended sludge projects. **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park v. 116, n. 6, p. 727, 2008.

ESTRADA, I. B. et al. The survival of Escherichia coli, faecal coliforms and enterobacteriaceae in general in soil treated with sludge from wastewater treatment plants. **Bioresource Technology**, Barking, v. 93, n. 2, p. 191-198, 2004.

FARIA, M. F. **Avaliação da persistência de microrganismos patogênicos em solo cultivado com eucalipto e fertilizado com lodo de esgoto sanitário**. 2015. 74 p. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 2015.

FARIA, M. F. et al. Persistence of spp. Ova in Tropical Soil Cultivated with Eucalyptus and Fertilized with Municipal Biosolids. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 46, n. 3, p. 522-527, 2017.

FU, B. et al. Quantification of viable but nonculturable Salmonella spp. and Shigella spp. during sludge anaerobic digestion and their reactivation during cake storage. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 119, n. 4, p. 1138-1147, 2015.

GALE, P. Using event trees to quantify pathogen levels on root crops from land application of treated sewage sludge. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 94, n. 1, p. 35-47, 2003.

GERBA, C. P.; PEPPER, I. L.; WHITEHEAD, L. F. A risk assessment of emerging pathogens of concern in the land application of biosolids. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 225-230, 2002.

GIBBS, R. A. et al. Regrowth of faecal coliforms and salmonellae in stored biosolids and soil amended with biosolids. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 35, n. 11-12, p. 269-275, 1997.

GODOY, L. C. A logística na destinação do lodo de esgoto. **Revista Científica on-line-Tecnologia, Gestão e Humanismo**, Guaratinguetá, v. 2, n. 1, 2013. Disponível em: http://www.fatecguaratingueta.edu.br/revista/index.php/RCO-TGH/article/view/43/27. Acesso em: 08 mar. 2017.

GONDIM-PORTO, C. et al. Fate of classical faecal bacterial markers and ampicillin-resistant bacteria in agricultural soils under Mediterranean climate after urban sludge amendment. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 565, p. 200-210, 2016.

HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. **Quantitative microbial risk assessment**. New York: John Wiley & Sons, 1999.

HAAS, C. N.; ROSE, J. B.; GERBA, C. P. **Quantitative microbial risk assessment**. 2. ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2014.

HALLEY, E.; MILLER, G. A. "Backward" approach to sludge management. **Water Engineering & Management**, Des Plaines, v. 9, p. 36-39, 1991.

HECK, K. et al. Temperatura de degradação de resíduos em processo de compostagem e qualidade microbiológica do composto final. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 1, p. 54-59, 2013.

HERNÁNDEZ, J. R. R. et al. Environmental consequences from the use of sewage sludge in soil restoration related to microbiological pollution. **Journal of Soils and Sediments**, Landsberg, 2017. DOI 10.1007/s11368-017-1721-5.

HOLLEY, R. A. et al. Survival in manure-treated soils during simulated seasonal temperature exposure. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 35, n. 4, p. 1170-1180, 2006.

HUNTER, P. R.; GASTON, M. A. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, DC, v. 26, n. 11, p. 2465-2466, 1988.

HURST, C. J.; GERBA, C. P.; CECH, I. Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 40, n. 6, p. 1067-1079, 1980.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Censo Demográfico - 2010**. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: https://censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=8. Acesso em: 15 jul. 2017.

INSTITUTO TRATA BRASIL. **Ranking do Saneamento de 2014**. 2014. Disponível em: http://www.tratabrasil.org.br/datafiles/estudos/ranking/relatorio-completo-2014.pdf. Acessado em: 25 fev. 2017.

ISLAM, M. et al. Fate of Salmonella enterica serovar Typhimurium on carrots and radishes grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 70, n. 4, p. 2497-2502, 2004.

JIANG, Q. et al. Quantification of viable but nonculturable bacterial pathogens in anaerobic digested sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 97, n. 13, p. 6043-6050, 2013.

KIMBERLEY, M. O. et al. Economic analysis of growth response from a pine plantation forest applied with biosolids. **Forest Ecology and Management,** Amsterdam, v. 189, p. 345-351, 2004.

KIZILKAYA, R.; BAYRAKLI, B. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 30, n. 3, p. 192-202, 2005.

KOWAL, N. E. Health considerations in applying minimum treated wastewater to land. In: WORKSHOP ON UTILIZATION, TREATMENT, AND DISPOSAL OF WASTE ON LAND, 1985, Chicago, IL. **Proceedings…** Madison: Soil Science Society of America, 1986. p. 27-54.

KRZYZANOWSKI, F. et al. Assessing the probability of infection by Salmonella due to sewage sludge use in agriculture under several exposure scenarios for crops and soil ingestion. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 568, p. 66-74, 2016.

KUNZ, S. **Evaluation of amplified fragment length polymorphism (aflp) analysis as a method for tracking salmonella enterica in a foodborne outbreak**. 2013. 64 p. Thesis (M.Sc.) - Faculty of the Graduate College, Oklahoma State University, St. Louis, 2013.

LANG, N. L. et al. Decay of Escherichia coli in soil following the application of biosolids to agricultural land. **Water and Environment Journal**, Heltford, v. 17, n. 1, p. 23-28, 2003.

MAGALHÃES, T. B. **Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação quantitativa de risco microbiológico**. 2012. 202 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Viçosa, Viçosa, 2012.

MATTANA, S. et al. Sewage sludge processing determines its impact on soil microbial community structure and function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 75, p. 150-161, 2014.

MAZOYER, M.; ROUDART, L. **História das agriculturas no mundo.** São Paulo: Editora da Unesp, 2010.

MCLAUCHLIN, J. et al. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of Clostridium perfringens for epidemiological typing. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 56, n. 1, p. 21-28, 2000.

MELO, W. J.; MARQUES, M. O. Potencial do LE como fonte de nutrientes para as plantas. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto do uso agrícola do lodo de esgoto**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000. cap. 5, p. 109-142.

MIKASOVÁ, E. et al. Characterization of Salmonella enterica serovar Typhimurium strains of veterinary origin by molecular typing methods. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 109, n. 1, p. 113-120, 2005.

MONDAL, T. et al. Factors affecting decay of Salmonella Birkenhead and coliphage MS2 during mesophilic anaerobic digestion and air drying of sewage sludge. **Journal of Water and Health**, London, v. 13, n. 2, p. 459-472, 2015.

MURRAY, C. J. Salmonellae in the environment. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, Paris, v. 10, n. 3, p. 765-785, 1991.

NASSER, A. M.; GLOZMAN, R.; NITZAN, Y. Contribution of microbial activity to virus reduction in saturated soil. **Water Research**, Oxford, v. 36, n. 10, p. 2589-2595, 2002.

NICHOLSON, F. A.; GROVES, S. J.; CHAMBERS, B. J. Pathogen survival during livestock manure storage and following land application. **Bioresource Technology**, Barking, v. 96, n. 2, p. 135-143, 2005.

NODA, T. et al. Chicken meat is an infection source of Salmonella serovar Infantis for humans in Japan. **Foodborne Pathogens and Disease**, Larchmont, v. 7, n. 6, p. 727-735, 2010.

PAULINO, R. C.; CASTRO, E. A.; THOMAZ-SOCCOL, V. Tratamento anaeróbio de esgoto e sua eficiência na redução da viabilidade de ovos de helmintos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 34, n. 5, p. 421-428, 2001.

PECSON, B. M. et al. The effects of temperature, pH, and ammonia concentration on the inactivation of Ascaris eggs in sewage sludge. **Water Research**, Oxford, v. 41, n. 13, p. 2893-2902, 2007.

PEDROZA, M. M. et al. Produção e tratamento de LE–uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 11, n. 16, p. 149-160, 2010.

PEPPER, I. L. et al. Survival of indicator organisms in Sonoran Desert soil amended with sewage sludge. **Journal of Environmental Science & Health Part A**, New York, v. 28, n. 6, p. 1287-1302, 1993.

POURCHER, A. M. et al. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 35, n. 3, p. 473-479, 2007.

RORAT, A. et al. Interactions between sewage sludge-amended soil and earthworms—comparison between Eisenia fetida and Eisenia andrei composting species. **Environmental Science and Pollution Research**, Landsberg, v. 23, n. 4, p. 3026-3035, 2016.

ROSS, I.L.; WILLMORE, R.; HEUZENROEDER, M.W. A fluorescent amplified fragment length polymorphism study of Salmonella enterica serovar Sofia, the major Salmonella serovar isolated from chickens in Australia. **International Journal of Medical Microbiology**, Jena, v. 293, n. 5, p. 371-375, 2003.

ROSS, I. L.; HEUZENROEDER, M. W. Use of AFLP and PFGE to discriminate between Salmonella enterica serovar Typhimurium DT126 isolates from separate food-related outbreaks in Australia. **Epidemiology & Infection**, Cambridge, v. 133, n. 4, p. 635-644, 2005.

SAMPAIO, A. Afinal, queremos ou não viabilizar o uso agrícola do lodo produzido em estações de esgoto sanitário? Uma avaliação crítica da Resolução CONAMA 375. **Revista DAE**, São Paulo, n. 193, p. 16-27, 2013.

SAVARIZ, A; D'AGOSTINI, F.M.; DEGENHARDT, R. Presença de Salmonella spp. em aves silvestres: revisão de literatura. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 23., SEMINÁRIO INTEGRADO DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO, 10., MOSTRA UNIVERSITÁRIA, 8., 2017, Joaçaba, SC. **Pesquisa e internacionalização**. Joaçaba, SC: Editora UNOESC, 2017.

SCHWARZ, K. R. et al. Decay of enteric microorganisms in biosolids-amended soil under wheat (Triticum aestivum) cultivation. **Water Research**, Oxford, v. 59, p. 185-197, 2014.

SIDHU, J. P. S.; TOZE, S. G. Human pathogens and their indicators in biosolids: a literature review. **Environment International**, Oxford, v. 35, n. 1, p. 187-201, 2009.

SILVEIRA, R. L. V. et al. Avaliação do estado nutricional do Eucalyptus: diagnose visual, foliar e suas interpretações. In: GONÇALVES, J. L. M.; BENEDETTI, V. **Nutrição e fertilização florestal**. Piracicaba: IPEF, 2000. p. 79-104.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Management**, New York, v. 28, n. 2, p. 347-358, 2008.

SMITH, H. V.; GRIMASON, T. M.; HOLLAND, C. Ascaris lumbricoides. In: AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. **Waterborne pathogens**. Denver, 1999. cap. 24. p. 171-180.

SOUZA, C. A. et al. Sobrevivência de ovos de helmintos na reciclagem agrícola do lodo de esgoto no Distrito Federal. **Simpósio Internacional de Savana Tropical**, v. 2, 2008.

THOMAZ-SOCCOL, V. T. et al. Organismos patogênicos presentes em lodo de esgoto a ser aplicado no solo e a Resolução nº375 do CONAMA. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto**: avaliação após a Resolução nº375 do CONAMA. Botucatu: FEPAF, 2010. p. 83-112.

TSUTIYA, M. T. et al. **Biossólidos na agricultura**. 2. ed. São Paulo: SABESP, 2002.

UNITED NATIONS. **World Urbanization Prospects**: The 2014 Revision highlights. New York: Department of Economic and Social Affairs. Population Division, 2014.

USEPA. **Environmental Regulations and Technology**. Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge. Cincinnati, OH: USEPA; Office of Research and Development; National Risk Management Research Laboratory; Center for Environmental Research Information, 2003. (EPA/625/r-92/013).

USEPA. **Environmental Regulations and Technology**. Method 1682: Salmonella in Sewage Sludge (Biosolids) by Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadi (MSRV) Medium. Washington, DC, 2006. (EPA-821-R-06-14).

USEPA. **Exposure factors handbook 2011 edition (Final Report).** Washington, DC, 2011.

VAN BELKUM, A. et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clinical Microbiology and Infection**, Paris, v. 13, n. s3, p. 1-46, 2007.

VIAU, E. et al. Toward a consensus view on the infectious risks associated with land application of sewage sludge. **Environmental Science & Technology**, Washington, DC, v. 45, n. 13, p. 5459-5469, 2011.

VIEIRA, G. E. G. et al. O processo de pirólise como alternativa para o aproveitamento do potencial energético de lodo de esgoto–uma revisão. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 12, n. 17, p. 81-95, 2011.

WANG, L. K.; SHAMMAS, N. K.; HUNG, Y. T. **Biosolids treatment processes**. Totowa, NJ: Humana Press, 2007.

WANG, X. et al. Studies on land application of sewage sludge and its limiting factors**.** **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 160, p. 554–558, 2008.

WESTRELL, T. et al. QMRA (quantitative microbial risk assessment) and HACCP (hazard analysis and critical control points) for management of pathogens in wastewater and sewage sludge treatment and reuse. **Water Science and Technology**, Oxford, v. 50, n. 2, p. 23-30, 2004.

WILLIAMS, D. L.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P. Survival of Ascaris ova in desert soils: a risk assessment. **Journal of Residuals Science & Technology**, Lancaster, v. 9, n. 4, p. 151-157, 2012.

WHO. **Risk assessments of Salmonella in eggs and broiler chickens**. Geneva, 2002.

WHO. **Guidelines for drinking-water quality**. Geneva, 2004.

WHO. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater**. Geneva, 2006.

YEAGER, J. G.; O'BRIEN, R. T. Enterovirus inactivation in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 38, n. 4, p. 694-701, 1979.

YEAGER, J. G.; O'BRIEN, R. T. Structural changes associated with poliovirus inactivation in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 38, n. 4, p. 702-709, 1979.

YOU, Y. et al. Survival of Salmonella enterica serovar Newport in manure and manure-amended soils. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 72, n. 9, p. 5777-5783, 2006.

ZALESKI, K. J. et al. Survival, growth, and regrowth of enteric indicator and pathogenic bacteria in biosolids, compost, soil, and land applied biosolids. **Journal of Residuals Science and Technology**, Lancaster, v. 2, n. 1, p. 49-63, 2005.

ZENG, B. et al. Formation and resuscitation of viable but nonculturable Salmonella typhi. **BioMed Research International**, New York, v. 2013, art. ID 907170, 7 p. 2012. http://dx.doi.org/10.1155/2013/907170

ZHUANG, J.; JIN, Y. Virus retention and transport as influenced by different forms of soil organic matter. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 32, n. 3, p. 816-823, 2003.