

JULIANA FERREIRA DE OLIVEIRA

**HIGIENIZAÇÃO DE LODO DE ESGOTO POR SECAGEM EM ESTUFA E USO
AGRÍCOLA: CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA E DA
EXPOSIÇÃO HUMANA**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS-BRASIL
2017

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

O48h
2017

Oliveira, Juliana Ferreira de, 1985-

Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa e uso agrícola : caracterização da qualidade microbiológica e da exposição humana / Juliana Ferreira de Oliveira. – Viçosa, MG, 2017.

xvii, 114f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Paula Dias Bevilacqua.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f.87-99.

1. Lodo residual. 2. Lodo residual como fertilizante.
3. Águas residuais - Purificação - Processo de lodo ativado.
4. Comunicação de risco à saúde. 5. Vírus. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 628.3

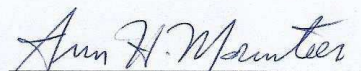
JULIANA FERREIRA DE OLIVEIRA

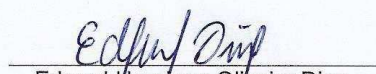
**HIGIENIZAÇÃO DE LODO DE ESGOTO POR SECAGEM EM ESTUFA E
USO AGRÍCOLA: CARACTERIZAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA
E DA EXPOSIÇÃO HUMANA**

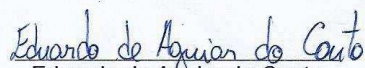
Tese apresentada à Universidade
Federal de Viçosa, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Medicina Veterinária,
para obtenção do título de *Doctor
Scientiae*.

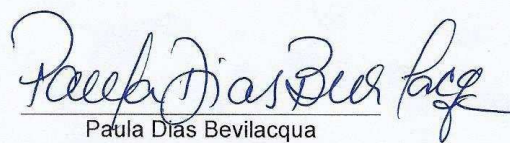
APROVADA: 17 de fevereiro de 2017.


Roberto Sousa Dias


Ann Honor Mounteer


Edgard Henrique Oliveira Dias


Eduardo de Aguiar do Couto


Paula Dias Bevilacqua
(Orientadora)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Daniel e Josélia, pelo amor, dedicação, compreensão, esforço e incentivo à minha formação. À minha irmã Daniela pela amizade e força.

À Profa Paula Bevilacqua pela amizade, por acreditar em minha capacidade e responsabilidade. Pelos 10 anos de orientação na pesquisa e na docência, por me apresentar novas metodologias de ensino e pelo incentivo em ter uma visão mais reflexiva e, ao mesmo tempo, humana e sem preconceitos.

Ao Prof Rafael Bastos pela coorientação, confiança e colaboração.

Ao Prof. Abelardo pela colaboração e suporte com o uso da sala de cultivo celular.

Aos estudantes de iniciação científica, Raquel e Geovane, pela amizade e dedicação às atividades do projeto e espero ter contribuído de forma positiva para a formação de vocês.

Aos amigos David, Otávio e Keyla pela grande amizade construída, paciência e apoio mútuo durante nossos doutorados.

Às/ao amigas/o Livia, Gabriela, Joana, Marília, Fernanda e Paulo pelos valiosos e saudosos anos de convivência em Viçosa.

Aos/as amigos/as do 'Setor da Preventiva', Marina, Thalita, Luana, Mariane, Rodrigo, Valéria, Viviane, Marcus, Nathália, Isis, Magna, Carol, Mariana, Danilo, Fred, pelo convívio diário e troca de experiências.

A todos os funcionários do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública: Batalha, Nívia, Marquinhos, Dagoberto e Élcio pela amizade e pelo suporte laboratorial. Em especial, ao Luiz Carlos, que desde 2006, não mediu esforços em me ensinar a rotina do setor e procedimentos laboratoriais, em atender às minhas solicitações e suportar minhas 'chaturas'. Luiz, agora, você pode aposentar!

Aos/às professores/as do Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública pelos ensinamentos.

À Rosi e Bete, pela torcida, orientações e grande eficiência na resolução das questões burocráticas.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, pela oportunidade de realizar o doutorado.

À Divisão de Água e Esgotos da UFV pela permissão de uso da estufa de secagem para realização dos experimentos de campo do estudo.

Ao CNPq e à FAPEMIG pelo financiamento do estudo e concessão de bolsas de estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível de Superior - CAPES pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao Sistema Autônomo de Água e Esgoto - SAAE por autorizar o uso das instalações da ETE Violeira e pelo fornecimento do lodo de esgoto.

Ao Dr. Edson da Silva, chefe do Laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, por ter cedido culturas de células da linhagem RD e alíquota de vírus de referência.

À Dra. Maria Inês Sato, gerente do Departamento de Análises Ambientais da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo - CETESB, por ter cedido alíquotas de colifagos de referência e de suas respectivas bactérias hospedeiras e pelo treinamento realizado no Laboratório de Virologia.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE QUADROS	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. HIPÓTESE.....	3
3. OBJETIVOS	4
3.1. Objetivo geral	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
4. REVISÃO DE LITERATURA	5
4.1. Lodo de esgoto: produção, terminologia e perigos à saúde humana	5
4.2. Vírus entéricos em lodos de esgoto: densidades e aspectos metodológicos	6
4.3. Colifagos em lodos de esgoto	14
4.4. Tratamento térmico de lodo de esgoto: secagem em estufa de secagem ..	19
4.5. Regulamentação do uso agrícola de lodo de esgoto no Brasil.....	24
5. MATERIAL E MÉTODOS	28
5.1. Local do estudo	28
5.2. Procedência do lodo de esgoto e remoção de umidade.....	29
5.3. Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola	30
5.3.1. Temperatura do ar no interior da estufa	30
5.3.2. Tratamento do lodo	32
5.4. Ensaio de contaminação artificial de lotes de lodo de esgoto com colifago somático e vírus entérico.....	34

5.5. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico durante tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola.....	35
5.6. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico no uso agrícola de lodo de esgoto tratado por secagem em estufa agrícola	36
5.7. Avaliação de técnica para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos de amostras de alface	39
5.7.1. Preparo e contaminação de amostras de alface	39
5.7.2. Descrição dos protocolos	40
5.8. Detecção e quantificação de indicadores bacterianos	41
5.9. Detecção e quantificação de vírus	42
5.9.1. Vírus, células e produção de inóculos	42
5.9.2. Amostras de lodo ou solo+biossólido controle positivo e negativo	43
5.9.3. Eluição e concentração de vírus	43
5.9.4. Quantificação de vírus entéricos	45
5.9.5. Quantificação de colifagos somáticos	45
5.10. Parâmetros físicos-químico	46
5.10.1. Umidade	46
5.10.2. Sólidos totais	46
5.10.3. Determinação do pH.....	47
5.11. Determinação dos coeficientes de decaimento	47
5.12. Análise dos dados	49
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
6. 1. Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola	50
6.1.1. Temperatura do ar no interior da estufa agrícola	50
6.1.2. Caracterização físico-química dos lotes de lodo de esgoto durante secagem em estufa agrícola	54

6.1.2.1. pH.....	54
6.1.2.2. Umidade	55
6.1.2.3. Sólidos totais	57
6.1.3. Caracterização da qualidade microbiológica dos lotes de lodo de esgoto durante secagem em estufa agrícola	59
6.1.3.1. Indicadores bacterianos	59
6.1.3.2. Vírus entéricos e colifagos somáticos	63
6.1.4. Ensaio de contaminação artificial de lotes de lodo de esgoto com enterovírus e colifago somático de referência	68
6.2. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico.....	70
6.2.1. Exposição do trabalhador durante o tratamento do lodo: amostras de água de lavagem das mãos	70
6.2.2. Uso agrícola de lodo esgoto tratado por secagem em estufa agrícola.....	72
6.2.2.1. Exposição do trabalhador: amostras de água de lavagem das mãos ...	73
6.2.2.2. Exposição do trabalhador: amostras de solo+biossólido.....	75
6.2.2.3. Exposição do consumidor: amostras de hortaliças cultivadas com lodo de esgoto tratado	78
6.3. Avaliação de técnica para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos de amostras de alface	81
7. CONCLUSÕES.....	83
8. CONTRIBUIÇÕES PARA O CONHECIMENTO.....	84
9. RECOMENDAÇÕES	85
10. REFERÊNCIAS	87
ANEXOS.....	100
Anexo 1.....	100
Anexo 2.....	101
Anexo 3.....	102
Anexo 4.....	103

Anexo 5.....	104
Anexo 6.....	105
Anexo 7.....	106
Anexo 8.....	107
Anexo 9.....	108
Anexo 10.....	109
Anexo 11.....	110
Anexo 12.....	111
Anexo 13.....	112
Anexo 14.....	113
Anexo 15.....	114

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

ALM - água de lavagem das mãos
APHA - American Public Health Association
ATCC - *American Type Culture Collection*
BGM - *Buffalo Green Monkey Kidney*
CG - cópias genômicas
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
DQO - demanda química de oxigênio
EC - *Escherichia coli*
CTer – coliformes termotolerantes
ICC-PCR - *Integrated Cell Culture-PCR*
ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses*
ISO - *International Organization for Standardization*
Log - logaritmo
MEM - Meio essencial mínimo
NMP - número mais provável
PBS - salina de tampão fosfato
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PNSB - Pesquisa Nacional de Saneamento Básico
qPCR - *quantitative Polymerase Chain Reaction*
SFB – soro fetal bovino
SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento
ST - sólidos totais
TCID₅₀ - *50% Tissue Culture Infectious Dose*
TSB - *Tryptic Soy Broth*
UASB - *Upflow Anerobic Sludge Blanket* TDH
UFF - unidade Formadora de Foco
UFP - unidade Formadora de Placa
US EPA - United States Environmental Protection Agency

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fases da secagem de lodo de esgoto em estufa agrícola (Adaptada de Bennamoun, 2012; Bennamoun <i>et al.</i> , 2013).	21
Figura 2 - (A) Reator UASB e biofiltro aerado submerso da ETE-Violeira. (B) Leito de secagem adjacente ao reator UASB. (C) Quebra e mistura da camada de lodo de esgoto. (D) Transferência do lodo para saco plástico para o transporte.....	30
Figura 3 - Disposição das leiras de lotes de lodo de esgoto durante o tratamento por secagem térmica na estufa.....	33
Figura 4 - Produção dos canteiros de alface e cenoura e plantio de alface pelos voluntários.....	37
Figura 5 - Preparação das amostras de alface (10g) para contaminação artificial com vírus controles.....	40
Figura 6 - Variação horária da temperatura interna da estufa agrícola ao longo dia, março e abril de 2015, Viçosa-MG.....	51
Figura 7 - Modelo de regressão linear entre temperatura média do ar no interior da estufa agrícola (n=215) e temperatura média observada do ar em Viçosa (n=215), no período de maio a novembro de 2016.	52
Figura 8 - Distribuição dos valores de pH para os lotes de lodo de esgoto tratados por secagem térmica em estufa de secagem, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	54
Figura 9 - Comportamento do teor de umidade (%) em lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em função do tempo (dias) de tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	56
Figura 10 - Comportamento da perda de umidade segundo faixas de umidade iniciais ($\leq 60\%$, 60-70% e $\geq 70\%$) no tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	57

Figura 11 - Comportamento do teor de sólidos totais (%) em lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em função do tempo (dias) de tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.....	58
Figura 12 - Decaimento da concentração de coliformes totais (CT) nos lotes de lodo de esgoto L2 a L9, durante o tempo de secagem na estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	60
Figura 13 - Decaimento da concentração de <i>E. coli</i> (EC) nos lotes de lodo de esgoto L2 a L9 durante o tempo de secagem na estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	61
Figura 14 - Decaimento de Poliovírus 1 Sabin (Unidade Formadora de Placa – UFP/mL) e colifago somático Phi X174 (Unidade Formadora de Placa –UFP/mL) inoculados em amostras de lodo de esgoto submetidas à variação de temperatura da estufa de secagem e às temperaturas controladas 30°C e 60°C, outubro de 2015, Viçosa-MG.	69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Contagens de vírus entéricos cultiváveis por técnicas baseadas em cultivo celular em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.	9
Quadro 2 – Contagens do gênero <i>Enterovírus</i> em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.	12
Quadro 3 – Contagens de gêneros ou espécies de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.	13
Quadro 4 - Contagens de colifagos somáticos em amostras de lodo de esgoto ..	17
Quadro 5 – Contagens de colifagos F-específicos em amostras de lodo de esgoto.	18
Quadro 6 – Parâmetros microbiológicos das Classes A e B de lodo de esgoto para uso agrícola no Brasil conforme a Resolução CONAMA n° 375/2006.	24
Quadro 7 – Temperaturas média, mínima e máxima mensais do ar em Viçosa-MG, fevereiro a novembro de 2015.	28
Quadro 8 – Resumo do tempo de tratamento e número de amostras analisadas dos lotes de lodo de esgoto higienizados em estufa agrícola, de fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	32
Quadro 9 – Descrição detalhada dos protocolos avaliados quanto à eficiência em recuperação de Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174 de amostras de alface.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Temperatura e umidade do ar no interior da estufa agrícola aferidas por aparelho tipo datalogger, março e abril de 2015, Viçosa-MG.....	50
Tabela 2 – Temperaturas médias do ar fora da estufa agrícola e temperaturas estimadas para o interior da estufa agrícola, no período de tratamento de cada lote de lodo esgoto, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	53
Tabela 3 – Coeficientes de decaimento de <i>E. coli</i> em cada lote de lodo à temperatura de operação durante a secagem na estufa agrícola e à temperatura padronizada de 20°C.	62
Tabela 4 - Amostras positivas para colifagos somáticos segundo o lote de lodo e a umidade durante tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.	66
Tabela 5 – Níveis de contaminação bacteriana das amostras de água de lavagem das mãos após revolvimento e coleta de amostras das leiras dos lotes de lodo de esgoto L1 a L9 durante tratamento térmico em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015. Viçosa-MG.	71
Tabela 6 - Níveis de contaminação bacteriana das amostras de água de lavagem das mãos do Trabalhador 1 e 2 após a produção de canteiros no plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.....	73
Tabela 7 – Caracterização quanto ao resultado no teste de TCID ₅₀ para vírus entéricos totais cultiváveis das amostras de água de lavagem das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros em dois eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.	74
Tabela 8 – Título para vírus entéricos totais cultiváveis das amostras de água de lavagem das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros em dois eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.	75

Tabela 9 - Título de colifagos somáticos das amostras mistura de solo+biossólido conforme o lote e o tipo de lodo usado na produção dos canteiros no primeiro evento de plantio de alface e cenoura, agosto de 2015, Viçosa-MG.....	77
Tabela 10 – Número de pés de alface existentes no canteiro no momento da colheita e número de amostras originadas dos pés de alface segundo o tipo de lodo utilizado na adubação do canteiro no primeiro plantio de alface, setembro de 2015, Viçosa-MG.	79
Tabela 11 – Estatística descritiva da recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 inoculados em amostras de alface segundo protocolo de recuperação	82
Tabela 12 – Médias percentuais de recuperação de vírus segundo a solução de eluição utilizada na recuperação de vírus de amostras de alface inoculadas com Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174	82
Tabela 13 – Médias percentuais de recuperação de vírus segundo procedimento de concentração para recuperação de vírus de amostras de alface inoculadas com Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174	83

RESUMO

OLIVEIRA, Juliana Ferreira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa e uso agrícola: caracterização da qualidade microbiológica e da exposição humana.** Orientadora: Paula Dias Bevilacqua. Coorientador: Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar o decaimento e a relação entre as concentrações de enterovírus cultiváveis e de colifagos somáticos em lodo de esgoto durante secagem em estufa de secagem, caracterizando a exposição humana a perigo microbiológico no tratamento e no uso agrícola do lodo. O tratamento em estufa consistiu na disposição do lodo de esgoto desaguado em leiras, que foram revolvidas manualmente uma vez por semana, quando também se realizava coleta de amostras para análise de umidade (U), sólidos totais (ST), pH, coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), vírus entéricos infecciosos (VEI) e colifagos somáticos (CS). A exposição de trabalhadores e de consumidores de hortaliças a perigo microbiológico (CT, EC, VEI e CS) foi avaliada por meio da coleta e análise: da água de lavagem das mãos da pesquisadora responsável, representante da figura do trabalhador do serviço de saneamento, após manejo semanal das leiras de lodo ao longo do tratamento; da água de lavagem das mãos de dois voluntários, representantes da figura do trabalhador rural, responsáveis pela montagem de cada canteiro de hortaliça (alface e cenoura), onde foi usado como adubo tanto lodo tratado quanto lodo tratado inoculado com VEI e CS de referência e de amostras da mistura solo+lodo no momento da colheita das hortaliças. A exposição do consumidor foi verificada através da análise de amostras das hortaliças após período de cultivo recomendado. Entre fevereiro e novembro de 2015, nove lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) foram tratados em estufa de secagem, onde permaneceram em média por 13 semanas. As temperaturas médias estimadas do ar dentro da estufa variaram de 28,8 a 33,5°C. O pH se manteve estável na maioria dos lotes com valores entre 5,0-6,0. Após aproximadamente 60 dias de tratamento, todos os lotes apresentavam umidade abaixo de 10%, exceto L3 e L4 (10-25%). O tempo necessário para atingir 90% de

sólidos totais variou entre 40-50 dias (L1 e L7), 55-65 dias (L5 e L6) e 85-100 dias (L2, L3 e L4). Durante a higienização dos lotes de lodo em estufa de secagem, observou-se que L2, L5, L7, L8 e L9 levaram até 20 dias para alcançarem qualidade classe B (coliformes termotolerantes $< 10^6$ NMP/g ST). O tempo de tratamento necessário para que cada lote passasse do tipo Classe B para Classe A ($< 1 \times 10^3$ NMP EC/g ST) foi em média de 50-60 dias para a maioria dos lotes (L2, L3 L6, L7 e L8). A detecção de vírus nas amostras de lodo analisadas durante a secagem do lodo em estufa foi muito baixa, impossibilitando inferir sobre níveis de contaminação e grau de decaimento. Mas colifagos somáticos foram detectados em amostras com menos de 10% de umidade. As amostras de água de lavagem das mãos, da mistura solo+lodo e de alface apresentaram baixas concentrações ou ausência de vírus entéricos infecciosos e colifagos somáticos. Sob as condições testadas no presente estudo, foi possível evidenciar que a secagem de lodo de esgoto em estufa de secagem se apresentou como técnica simples e eficiente na obtenção de produto granulado, seco e com níveis de redução da contaminação bacteriana que atendeu ao padrão de qualidade estabelecido como seguro para uso agrícola conforme a legislação brasileira. Colifagos somáticos persistiram na secagem do lodo em estufa de secagem e no plantio de hortaliças. Sugere-se que trabalhadores do serviço de saneamento, trabalhadores rurais e consumidores de hortaliças estariam expostos a baixos níveis de contaminação bacteriana e virológica.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Juliana Ferreira de, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Sanitation of sewage sludge by drying in greenhouse and agricultural use: characterization of microbiological quality and human exposure.** Adviser: Paula Dias Bevilacqua. Co-adviser: Rafael Kopschitz Xavier Bastos.

The aim of the study was to evaluate the decay and the relationship between the concentrations of infectious enteric viruses (IEV) and somatic coliphages (SC) in sewage sludge dried in an agricultural greenhouse and characterize human exposure to microbiological hazard during treatment and agricultural use of the sludge. The greenhouse treatment consisted of disposing the dewatered sewage sludge in piles which were manually turned once a week, when samples were taken for analysis of: moisture (U) total solids (TS), pH, total coliforms (TC), *Escherichia coli* (EC), infectious enteric virus (IEV) and somatic coliphages (SC). Human exposure (workers and consumers) to microbiological hazard (TC, EC, IEV and SC) was evaluated through the collection and analysis of: handwashing water of the responsible researcher (sanitation service worker) after weekly management of piles of sludge during treatment; handwashing water of the two volunteers (rural workers) responsible for the production of each vegetable (lettuce and carrots), using as fertilizer either treated sludge as inoculated treated sludge with IEV as well as samples of the soil+sludge mixture at harvest time. Consumer exposure was verified by analyzing vegetables samples after the recommended cultivation period for crops. Between February and November 2015, nine batches of sewage sludge (B1 to B9) were treated in a greenhouse, where they remained on average for 13 weeks. The estimated average temperature of the air inside the greenhouse ranged from 28,8 to 33,5°C. In most batches sludge remained pH between 5.0-6.0. After about 60 days of treatment, all batches had less than 10% of the humidity, except B3 and B4 (10-25%). The time required to reach 10% of humidity ranged between 40-50 (B1 to B7), 55-65 (B5, B6) and 85-100 (B2, B3 and B4) days. During sanitation of the sludge batches in a greenhouse, it was observed that L2, L5, L7, L8 and L9 took 20 days to achieve quality Class B ($EC < 10^6$ MPN/g TS). Batches took 50-60 days on average to catch *E. coli* levels $< 1 \times 10^3$ NMP/g TS. The

detection of somatic coliphages in sludge samples was low and sporadic. The detection of virus in sludge samples during sludge drying in a greenhouse was low, which made it impossible to infer about contamination levels and degree of decay, although somatic coliphages were detected in samples with less than 10% moisture. Samples of handwashing water, soil+sludge mixture and lettuce showed low concentrations or absence of infectious enteric virus and somatic coliphages. Drying sewage sludge in an agricultural greenhouse is a simple and effective process for obtaining a dry and granular product and reducing bacterial contamination to levels established to be safe for agricultural use under Brazilian law. Somatic coliphages persisted during the sludge drying in an agricultural greenhouse and in biosolids-amended soil under vegetables cultivation. Also, it's suggested that sanitation service workers, farm workers and consumers of vegetables would be exposed to low levels of bacterial and virological contamination.

1. INTRODUÇÃO

Acredita-se que, no Brasil, a produção de lodo inerente aos processos de tratamento de esgoto tende a aumentar em função do crescimento populacional e das melhorias no setor saneamento mesmo que sejam ainda insuficientes, conforme dados do SNIS - Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (Brasil, 2017), que apontaram discretos aumentos em serviços de esgotamento sanitário, entre 2012 e 2015, como expansão da rede coletora (12,7%), volume de esgoto coletado (0,72%) e volume de esgoto tratado (6,9%). Segundo a PNSB- Pesquisa Nacional de Saneamento Básico do ano 2000 (Brasil, 2000), apenas 2,8% dos municípios realizavam tratamento do lodo gerado em biodigestores, 8,3% realizavam apenas desaguamento do lodo por meio de prensa, centrífuga, filtro ou leito de secagem e 1,5% submetia o lodo a outros processos não explicitados. Em 2008, a PNSB (Brasil, 2008) mostrou que o lodo produzido (tratado ou não) tem sido destinado pelos municípios para incineração (1,56%), terreno baldio (7,97%), rio (13,40%), reaproveitamento (13,89%), aterro sanitário (37,14%) e destino não especificado (26,04%).

Apesar do aumento no volume de esgoto tratado não ter aumentado significativamente nos últimos anos, o setor de saneamento básico tem a responsabilidade de propiciar adequado tratamento e destino ao lodo, principalmente, pelo fato desse resíduo poder causar impactos adversos à saúde pública em função de ser potencial reservatório de enteropatógenos que removidos do esgoto podem se concentrar no lodo durante o tratamento (Viau e Peccia, 2009; Wong *et al.*, 2010). Entretanto, os dados anteriores mostram que a maior parte do lodo gerado no país não passa por tratamento biológico para inativação de patógenos e a ideia de aproveitamento do potencial energético e de reciclagem de nutrientes que esse subproduto oferece é pouco valorizada no país.

Em se tratando da reciclagem de nutrientes, o uso agrícola do lodo de esgoto apresenta-se como uma forma de disposição final com impacto ambiental positivo e vantajoso do ponto de vista agrônômico, na medida em que sua aplicação no solo reincorpora matéria orgânica (carbono orgânico) e diversos nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio), que podem exercer importantes efeitos

favoráveis sobre as propriedades físicas (coesão das partículas, infiltração e retenção da água, porosidade), químicas (troca catiônica, pH) e biológicas (atividade da microbiota constituinte) do solo, além de contribuir para o desenvolvimento das plantas (Nascimento *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2006; Gomes *et al.*, 2007; Barbosa *et al.*, 2007; Chiba *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2008)

Apesar das vantagens do uso agrícola do lodo, os riscos que lodos de esgoto oferecem à saúde da população humana nesse contexto constituem um obstáculo a essa prática. A solução desse entrave consiste, frequentemente, na regulamentação do uso do lodo na agricultura através da implementação de normas, que estabelecem padrões de qualidade, determinam os processos de tratamento e seus parâmetros de desempenho e aplicam restrições relacionadas à execução da prática agrícola com o objetivo de reduzir os perigos à saúde da população exposta (trabalhadores e consumidores).

No Brasil, critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário são estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 375/2006 (Brasil, 2006), a qual define duas 'classes' de lodo, classe A e classe B, cujos parâmetros de qualidade microbiológica são caracterizados por (i) lodo tipo A: coliformes termotolerantes $< 10^3$ NMP /g de sólidos totais (ST); ovos viáveis de helmintos $< 0,25$ ovo / g ST; *Salmonella* ausência em 10g de ST e vírus $< 0,25$ UFP ou UFF/g de ST e (ii) lodo tipo B: coliformes termotolerantes $< 10^6$ NMP/g de ST; ovos viáveis de helmintos < 10 ovos/g de ST.

Contudo, críticas têm sido feitas a esses padrões e aos procedimentos de tratamento e manejo recomendados, os quais são considerados excessivamente rigorosos e restritivos, que acabam por dificultar e desestimular o aproveitamento do lodo de esgoto na agricultura (Bastos *et al.*, 2009; 2013). Desde 2012, está proibida a utilização de lodo Classe B, sendo a autorização para retomada do uso condicionada à proposição de novos critérios ou limites com base em evidência científica, por meio da realização de estudos de avaliação de risco e dados epidemiológicos nacionais, que demonstrem a sua segurança (Brasil, 2006).

Assim, constata-se a preocupação com os riscos à saúde pública relacionados ao uso agrícola do lodo, o que é pertinente, conforme visto

anteriormente, que a maior parte do lodo gerado no país não recebe tratamento biológico adequado. Portanto, torna-se necessário, minimizar os perigos associados ao lodo por meio de adequado tratamento de higienização, possibilitando, assim, fomentar o estímulo ao aproveitamento agrícola desse resíduo.

Nesse sentido, dentre as estratégias existentes para a higienização do lodo, a secagem em estufa agrícola é uma técnica relativamente recente e em fase de avaliação do seu potencial higienizador, mas que pode ser promissora, principalmente, no Brasil que apresenta condições territoriais e climáticas favoráveis ao seu estabelecimento e aprimoramento. No país, estudos têm avaliado o potencial higienizador da secagem do lodo em estufa através do monitoramento de parâmetros microbiológicos, físicos e químicos (Comparini e Sobrinho, 2002; Lima, 2010; Dias, 2012) e, também, avaliado os perigos e riscos à população humana associados ao uso agrícola de lodo de esgoto higienizado por essa técnica de tratamento (Magalhães, 2012). Nesses estudos, a caracterização microbiológica tem apresentado resultados mais consistentes para as densidades e decaimento de indicadores bacterianos e menos evidentes para outros grupos de organismos como vírus.

2. HIPÓTESE

Considerou-se a hipótese de que lodos de esgoto higienizados por secagem em estufa de secagem podem apresentar qualidade microbiológica em conformidade com a legislação brasileira, expondo a população humana a baixos níveis de contaminação microbiológica (indicadores bacterianos, vírus entéricos, colifagos somáticos) no tratamento e no uso agrícola.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o decaimento e a relação entre as concentrações de indicadores bacterianos, enterovírus cultiváveis e colifagos somáticos em lodo de esgoto durante secagem em estufa de secagem, caracterizando a exposição humana no manejo do lodo durante o tratamento e no uso agrícola.

3.2. Objetivos específicos

- Caracterizar lodos de esgoto durante secagem em estufa de secagem quanto às concentrações de coliformes totais, *Escherichia coli*, vírus entéricos cultiváveis e colifagos somáticos e aos parâmetros físico-químicos, sólidos totais, umidade e pH.
- Determinar os coeficientes de decaimento de coliformes totais, *Escherichia coli*, vírus entéricos cultiváveis e colifagos somáticos em lodos de esgoto durante o tratamento de secagem em estufa de secagem.
- Caracterizar a exposição humana durante o manejo do lodo no tratamento e no uso agrícola.
- Caracterizar a exposição de consumidores de hortaliças adubadas com lodo de esgoto tratado por secagem em estufa de secagem.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Lodo de esgoto: produção, terminologia e perigos à saúde humana

Lodo de esgoto é uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos de origem biológica e mineral, que são removidos de águas residuárias e esgotos em estações de tratamento de esgoto (ETE) durante os diferentes processos (primário, secundário) do tratamento (Straub *et al.*, 1993). Logo, lodo de esgoto é um subproduto líquido ou semissólido inerente ao tratamento de águas residuárias, sendo que a quantidade e as características físico-químicas e microbiológicas do lodo produzido dependem do perfil de infecção da população, da composição do esgoto sanitário, do tipo de tratamento usado na ETE e do tipo de tratamento subsequente aplicado ao resíduo (Straub *et al.*, 1993; EPA, 1999; Jordão e Pessôa, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, do inglês United States Environmental Protection Agency – US EPA, define lodo de esgoto como material orgânico rico em nutrientes, resultante do tratamento do esgoto em ETE, que quando tratado e processado pode ter uso benéfico (EPA, 1999). A USEPA usa a denominação bio sólido para designar o lodo tratado e monitorado, que deve ser utilizado de acordo com os requisitos regulatórios (EPA, 1999; 2016). Em suas publicações, USEPA considera os termos lodo e bio sólido como sinônimos, havendo maior preferência pelo uso do nome bio sólido para enfatizar a possibilidade do uso favorável (EPA, 1999). O termo bio sólido foi introduzido e definido, em 1994, por *Water Environment Federation*, para desassociar a conotação negativa do termo lodo e promover melhor aceitação pública do produto (Tchobanoglous *et al.*, 2004). Na literatura científica, lodo de esgoto é mais usual que bio sólido, este aplicado quando a pesquisa envolve o uso benéfico do lodo.

O lodo de esgoto em sua composição apresentará, em virtude da sua natureza de subproduto do tratamento, além dos elementos removidos das águas residuárias, substâncias adicionadas ou produzidas durante o processo. Assim, o lodo pode ser constituído de matéria orgânica, nutrientes, metais pesados, produtos químicos e organismos patogênicos.

Dentre esses constituintes, assim como outros, organismos patogênicos podem caracterizar o lodo de esgoto como um material que oferece risco à saúde humana, principalmente, de trabalhadores dos serviços de saneamento básico que cuidam do manejo e tratamento do lodo na ETE, de trabalhadores rurais que aplicam lodo ao solo e da população consumidora de produtos agrícolas cultivados com biossólido. Diante disso, em diversos países, legislação específica regulamenta a qualidade, o tratamento, o manejo e as condições de uso do lodo a fim de proteger a saúde humana (USEPA, 2003; Brasil, 2006).

Existem evidências de que organismos podem resistir mais ao tratamento do esgoto quando associados a partículas sólidas do que no estado de suspensão (Goyal e Gerba, 1979; Sobsey *et al.*, 1980; Gerba *et al.*, 1981); dessa forma, permanecendo associados aos sólidos, podem ser concentrados no lodo, que acaba por constituir-se em reservatório, principalmente, de organismos patogênicos, primariamente originários de fezes humanas e de transmissão fecal-oral, com representantes dos grupos bactérias, vírus, protozoários e helmintos (Viau e Peccia, 2009; Wong *et al.*, 2010).

4.2. Vírus entéricos em lodos de esgoto: densidades e aspectos metodológicos

Vírus entéricos é uma denominação genérica utilizada para designar um conjunto de gêneros e espécies virais que habitam o trato gastrointestinal de humanos e animais de sangue quente. Existem vírus que apresentam características de patogenicidade, podendo causar doenças em indivíduos susceptíveis, quando não são debelados pelo sistema imune. No geral, as infecções por vírus entéricos estão associadas a doenças diarreicas, no entanto, podem ocorrer também infecções respiratórias, conjuntivite, hepatite e doenças com alta taxa de letalidade como meningite asséptica, encefalite e paralisia em indivíduos imunocomprometidos. Além disso, alguns vírus entéricos estão associados a doenças crônicas como miocardites e diabetes insulínica dependente (Bosh, 1998; Griffin *et al.*, 2003; Fong e Lipp, 2005).

A via de transmissão de enterovírus é fecal-oral, na qual esses vírus são eliminados nas fezes e contaminam o ambiente, principalmente, contribuindo para contaminação dos esgotos sanitários. Como os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, não conseguem se multiplicar no meio ambiente, onde permanecem em uma condição inerte (Wyn-jones e Sellwood, 2001; Fong e Lipp, 2005). Os vírus são eliminados em altas concentrações por indivíduos infectados, que podem excretar cerca de 10^{10} partículas virais por grama de fezes (Leclerc *et al.*, 2002). Além da elevada carga com que são eliminados no ambiente, outras características dos vírus entéricos conferem risco para saúde humana como baixa dose de infecção, da sobrevivência prolongada e resistência à inativação (Rzezutka e Cook, 2004).

Dentro do grupo dos vírus entéricos, a família *Picornaviridae* é uma das maiores e inclui alguns dos mais importantes vírus humanos e animais, que em geral, possuem diâmetro de 20 a 30 nm, apresentam material genético constituído de DNA ou RNA de fita dupla ou simples, capsídeo icosaédrico e não possuem envelope (Wyn-Jones e Sellwood, 2001; Fong e Lipp, 2005; Tavares *et al.*, 2005). Segundo a mais recente classificação do ICTV - *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2015), o grupo dos vírus entéricos é formado pelos seguintes gêneros e suas respectivas espécies: *Enterovirus* (espécies *Enterovirus A, B, C, D, E, F, G, H, J*; *Rhinovirus A, B, C*); *Rotavirus* (espécies *Rotavirus A, B, C, D, E, F, G, H*); *Norovirus* (espécie *Norwalk virus*); *Avastrovirus* - antigo gênero *Astrovirus* (espécies *Avastrovirus 1, 2 e 3*); *Hepatovirus* (espécie *Hepatovirus* - vírus da Hepatite A), *Mastadenovirus* (espécies *Human mastadenovirus A, B, C, D, E, F, G*); *Alphapoliomavirus* (espécies *Human polyomavirus 1, 2, 5, 8, 9, 12, 13*).

Com relação às concentrações e à diversidade de vírus entéricos em lodos de esgoto, os Quadros 1, 2 e 3 mostram, respectivamente, as contagens de vírus entéricos cultiváveis, vírus do gênero *Enterovirus* e de gêneros e espécies virais verificadas em amostras de diferentes tipos de lodo, desde lodo não tratado até lodo digerido (higienizado ou não) em diversos países, inclusive o Brasil (Salvador, 2011; Sato *et al.*, 2011; Prado *et al.*, 2013). As concentrações de vírus detectadas nas amostras de lodo são influenciadas pelo tipo de tratamento do esgoto, pelos

métodos de eluição e concentração de vírus das amostras e pelos métodos de detecção e quantificação utilizados.

Na literatura existem vários trabalhos propondo e avaliando diferentes métodos na busca do melhor protocolo para isolamento de enterovírus de amostras de lodo de esgoto (Straub *et al.*, 1991; Albert e Schwartzbrod, 1991; Soares *et al.*, 1994; Lasobras *et al.*, 1999; Mignotte-Cadiergues *et al.*, 2002; Mocé-Llivina *et al.*, 2003; USEPA, 2003; Arraj *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2007; Gerba *et al.*, 2011). Contudo, foram feitas poucas comparações entre os diferentes estudos considerando os rendimentos de recuperação dos diferentes grupos virais (Mignotte *et al.*, 1999; Belguith *et al.*, 2006; Sidhu e Toze 2009; Murthi *et al.*, 2012) e, em alguns casos, os resultados negativos são atribuídos à ineficiência dos métodos utilizados (Prado *et al.*, 2013).

No laboratório, a recuperação de vírus de amostras de lodo envolve os seguintes passos: eluição, concentração, clarificação e descontaminação. A eluição de vírus das amostras é uma etapa problemática, pois, sabe-se que os vírus encontram-se adsorvidos à matriz sólida (Goyal e Gerba, 1979; Sobsey *et al.*, 1980; Gerba *et al.*, 1981), devido a isso, os métodos de eluição são baseados em tampões de diversas naturezas e concentrações com pH 7 ou 9 que alterem a carga eletrostática dos vírus aumentando ou minimizando a adsorção ao sólidos, dependendo do procedimento de concentração a ser utilizado em seguida.

No Quadro 1, tem-se as concentrações de vírus entéricos cultiváveis, ou seja, foram quantificadas em cultura celular, onde somente vírus viáveis com potencial infeccioso foram enumerados. Existem dois métodos que são regularmente utilizados para detectar e quantificar vírus infecciosos: ensaio de plaqueamento (Dulbecco, 1952; Cooper, 1955, 1961) e o método *Tissue Culture Infectious Dose 50%* (TCID₅₀) ou *Endpoint dilution assay* (método da diluição limitante), ambos os ensaios se baseiam no plaqueamento de cultura de células que poderão ser infectadas e mortas por vírus, cuja expressão na camada celular é denominada como efeito citopático.

Quadro 1 – Contagens de vírus entéricos cultiváveis por técnicas baseadas em cultivo celular em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.

Tipo de lodo	Densidade de vírus entéricos	Referência
Bruto	$3,8 \times 10^2 - 1,1 \times 10^4$ UFP [*] /100mL ^A	Berg e Berman, 1980
	$4,8 \times 10^2 - 2,1 \times 10^3$ UFP/10 g ST ^{#A}	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
	ND-12 UFP/g ^C	Sato <i>et al.</i> , 2011
Primário	$9,2 \times 10^1 - 4,7 \times 10^3$ UFP/L ^A	Williams e Hurst, 1988
Ativado	88-200 UFP/L ^B	Funderburg e Sorber, 1985
	35 - 175 UFP/L ^A	Schwartzbrod e Mathieu, 1986
	1,8-2,03 UFP/g ST ^A	Levantesi <i>et al.</i> , 2014
Misto	$6,4 \times 10^2 - 3,2 \times 10^3$ UFP/L ^A	Schwartzbrod e Mathieu, 1986
	$4,36 \times 10^3 - 7,0 \times 10^5$ NMP ^{\$} /Kg ^A	Soares <i>et al.</i> , 1994
	<3,5-900 NMP/g ^A	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
Desaguado	ND-80 UFP/L ^A	Schwartzbrod e Mathieu, 1986
	18-41 UFP/10 g ST ^A	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
	<1,7-167 NMP/g ^A	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
Não digerido	57,9-67,9 NMP/mL ^A	Straub <i>et al.</i> , 1994
Digerido	ND-130 UFP/L ^A	Schwartzbrod e Mathieu, 1986
Digerido anaeróbio mesofílico	ND-410 UFP/100mL ^A	Berg e Berman, 1980
	<62-2,5x10 ⁵ NMP/Kg ^A	Soares <i>et al.</i> , 1994
	ND-12,7 UFP/g ST ^A	Aulicino <i>et al.</i> , 1998
	<0,2-0,8 NMP/mL ^A	Straub <i>et al.</i> , 1994
	<3,1-220 NMP/g ^A	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
Digerido anaeróbio mesofílico desaguado	$1,1 \times 10^1 - 1 \times 10^2$ UFP/10g ST ^A	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
Digerido anaeróbio termofílico	<1,4-16,7 UFP/100mL ^A	Berg e Berman, 1980
Digerido aeróbio	ND-123 UFP/g ST ^A	Aulicino <i>et al.</i> , 1998
Tratado e desaguado	ND-12,5 UFP/g ST ^C	Salvador, 2011
Pós tratamento térmico	<2,1-3,1 NMP/g ^A	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004

*Unidade Formadora de Placa de Lise. #Sólidos totais. \$Número mais provável. ^ATécnica de plaqueamento em cultivo de células BGM. ^BTécnica de plaqueamento em cultivo de células HeLa. ^CTécnica de plaqueamento em cultivo de células RD.

No ensaio em placa, uma monocamada de células adequadas ao vírus de interesse crescida em frascos de cultivo celular ou em placas (seis, 12 ou 24

poços) é inoculada com diluições específicas de um vírus ou uma amostra. Uma camada semi-sólida de meio de cultura é colocada sobre a monocamada de células para impedir que as partículas se espalhem para além de uma área localizada e mantendo o vírus no local onde ocorrer a infecção e lise celular, produzindo um orifício (ou placa de lise) na monocamada. Após o tempo necessário de contato dos vírus com as células, a monocamada é corada para visualizar as placas de lise e realizar a contagem direta. O título viral pode ser expresso em Unidades Formadoras de Placa (UFP) ou Número Mais Provável (NMP) por volume da amostra (mL).

No ensaio TCID₅₀, em uma placa de microtitulação (96 poços), suspensão de célula adequada ao vírus de interesse é semeada juntamente com diluições decimais do vírus ou da amostra. Cada diluição é inoculada em um determinado número de poços (réplicas). Após o tempo necessário de contato entre vírus e células, os poços são observados e marcados quanto à presença ou ausência de efeito citopático. Calcula-se o percentual de células infectadas (poços positivos) e não-infectadas (poços negativos). O título viral capaz de causar 50% de morte celular pode ser calculado pelo método de Reed e Muench (1938) ou pelo método de Spearman-Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931).

O sucesso do isolamento de enterovírus infecciosos em amostras de lodo depende de alguns fatores como: quantidade de amostra de lodo utilizada, método de extração e concentração de vírus da amostra, tipo celular utilizado e volume da amostra inoculado nas células (Hamparian *et al.*, 1985). Várias linhagens celulares são suscetíveis à infecção por vírus entéricos, sendo as mais comuns: BGM, MRC-5, A549, Hep-2, RD, HeLa, RMK (Johnston e Siegel, 1990; She *et al.*, 2006; Prim *et al.*, 2013). Dessas linhagens, BGM ou BGMK (*Buffalo Green Monkey Kidney*) é a linhagem celular mais utilizada no isolamento de enterovírus cultiváveis de amostras de lodo conforme o Quadro 1, onde se percebe que apenas três dos onze estudos referenciados utilizaram outros dois tipos de células, HeLa (Funderburg e Sorber, 1985) e RD (Sato *et al.*, 2011; Salvador, 2011).

Geralmente, os estudos se restringem ao uso de apenas uma linhagem celular, uma vez que as técnicas baseadas em cultivo celular são muito

trabalhosas. Os vírus podem apresentar suscetibilidade variável às linhagens celulares utilizadas, dessa forma, o tipo de célula utilizado no método de quantificação pode influenciar nas taxas de positividade de amostras bem como nas concentrações detectadas de vírus (Kumar *et al.* (2012), o que pode ser constatado por Hamparian *et al.* (1985), que registrou diferentes percentuais de isolamento ao utilizar as linhagens RD (60%), HeLa (26%), BGM (15%). Wong *et al.* (2010) observaram positividade de 100% das amostras usando células A549 e 50% para BGM. Porém, há tipos de enterovírus que não são cultiváveis como os norovírus (Vashist *et al.*, 2009), ou que se multiplicam em células, mas não produzem efeito citopático ou apresentam multiplicação lenta como vírus da Hepatite A (Graff *et al.*, 1993) e adenovírus humanos (Pina *et al.*, 1998).

Nos Quadros 2 e 3, tem-se as concentrações dos gêneros ou espécies de enterovírus mais importantes. A detecção e quantificação de tipos mais específicos desses vírus foram feitas utilizando-se variações da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), PCR quantitativo (qPCR) e PCR quantitativo utilizando a enzima transcriptase reversa (qRT-PCR). Mais recentemente, vários estudos têm aliado cultivo celular à Reação em Cadeia da Polimerase (ICC-PCR), considerando que essa junção pode proporcionar um sistema de amplificação da concentração de vírus, reduzir os níveis de compostos inibidores da PCR presentes na amostra e melhorar a sensibilidade do ensaio, bem como possibilitar diferenciação entre vírus infecciosos e não infecciosos (Chapron *et al.*, 2000; Schlindwein *et al.*, 2010).

No geral, as concentrações de vírus entéricos infecciosos (Quadro 1) detectados por cultivo celular são bem menores que as detectadas por qPCR ou ICC- (Quadros 2 e 3), sendo 2 a 3 ordens superiores (Lucena *et al.*, 2005; Biofill-Mas *et al.*, 2006). A utilização de diferentes métodos e a falta de padronização dificultam a comparabilidade entre os estudos e o estabelecimento da relação entre partículas virais infecciosas e cópias genômicas (Martín-Díaz *et al.*, 2016).

Nos estudos citados nos quadros, notou-se que o tempo de monitoramento, era limitado, quando não pontual; diante disso, estabelecer relação entre as contagens observadas e a época do ano não foi uma análise contemplada. Porém, nas raras situações em que isso foi evidenciado, observou-se que a recuperação

de vírus foi maior no verão e outono, em países do hemisfério norte (Berg e Berman, 1980; Hamparian *et al.*, 1985), enquanto, que no Brasil, Schlindwein *et al.* (2010) detectaram vírus entéricos durante todo o ano de monitoramento sem padrão de sazonalidade.

Quadro 2 – Contagens do gênero *Enterovírus* em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.

Tipo de vírus	Tipo de lodo	Densidades de gêneros ou espécies de vírus entéricos	Referência
Enterovírus	Bruto	2,8 -5,3 log ₁₀ CG/100mL ^{\$}	Jebri <i>et al.</i> , 2014
	Desaguado	Até 7 log ₁₀ CG [*] /g ^{\$}	Wong <i>et al.</i> , 2010
		7,3x10 ² -4,2x10 ⁴ CG/g ^{\$}	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
	Digerido	Média de 2,9 log ₁₀ vírus/g ^{\$}	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Digerido anaeróbio mesofílico	3-6 log ₁₀ CG/g ^{\$}	Wong <i>et al.</i> , 2010
		9,1x10 ² -3x10 ⁵ CG/g ^{\$}	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
	Pós-caleação	<50 CG/g ^{\$}	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
	Pós-compostagem	<50-200 CG/g ^{\$}	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004
	Pós-tratamento térmico	<62,5-90,9 CG/g ^{\$}	Monpoeho <i>et al.</i> , 2004

* Cópias genômicas. ^{\$} PCR quantitativo.

Observou-se, também, que lodo digerido foi um dos tipos de lodo mais frequentemente estudado. A digestão anaeróbia mesofílica é o processo de estabilização de lodo mais utilizado nas estações de tratamento no mundo (EPA, 1999; Tchobanoglous *et al.*, 2003). No entanto, o desempenho de higienização dessa técnica tem-se mostrado insuficiente para inativação de vírus, sendo a remoção média em torno de 1 - 2 log₁₀ para vírus, sendo que colifagos somáticos têm sido considerados mais resistentes que colifagos F-específicos (Berg e Berman, 1980; Aulicino *et al.*, 1998; Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Viau e Peccia, 2009; Wong *et al.*, 2010; Astals *et al.*, 2012).

Quadro 3 – Contagens de gêneros ou espécies de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto bruto, digerido e higienizado.

Tipo de vírus	Tipo de lodo	Densidades	Referência
Adenovírus	Primário	$8,5 \times 10^2$ - $5,2 \times 10^4$ UFP [§] /L [#]	Williams e Hurst, 1988
	Ativado	10^4 - 10^6 CG [*] /mL [§]	Schindwein <i>et al.</i> , 2010
		70 - 300 UFP/mL [¥]	Schindwein <i>et al.</i> , 2010
	Desaguado	Até 9 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
	Misto	2-5 l log ₁₀ CG/g [§]	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
	Digerido	Média de 4,1 vírus/g [§]	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Digerido anaeróbio mesofílico	4 - 6 log ₁₀ CG/g [§]	Viau e Peccia, 2009
		4 - 7 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
		ND-2,4x10 ³ CG/g [§]	Prado <i>et al.</i> , 2013
	Digerido anaeróbio mesofílico + compostagem	4 - 5 log ₁₀ CG/g [§]	Viau e Peccia, 2009
Vírus da Hepatite A	Ativado	3,1 - 5,4x10 ² CG/mL [§]	Schindwein <i>et al.</i> , 2010
	Misto	1,2 - 5,3 log ₁₀ CG/g [§]	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
	Digerido anaeróbio mesofílico	4,8x10 ³ -2x10 ⁴ CG/g [§]	Prado <i>et al.</i> , 2013
Norovírus Genotipo I	Bruto	2,4 -6,6 log ₁₀ UFP/g	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Desaguado	Até 7 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
	Digerido	2,4 - 6,6 vírus/g [§]	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Digerido anaeróbio mesofílico	3 -7 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2009
		1,4x10 ¹ -5,2x10 ² CG/g [§]	Prado <i>et al.</i> , 2013
Norovírus Genotipo II	Bruto	3,6 - 7,4 log ₁₀ UFP/g [§]	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Desaguado	Até 6 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
	Digerido	3,6 - 7,4 vírus/g [§]	Simmons e Xagorarakis, 2011
	Digerido anaeróbio mesofílico	4 - 7 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
Poliomavírus	Desaguado	Até 6 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
	Digerido anaeróbio mesofílico	3 - 6 log ₁₀ CG/g [§]	Wong <i>et al.</i> , 2010
Rotavírus	Digerido anaeróbio mesofílico	2,5x10 ¹ -1,6x10 ² CG/g [§]	Prado <i>et al.</i> , 2013

[§]Unidade Formadora de Placa. ^{*}Cópias genômicas.. [#]Imunofluorescência em cultivo de células HEp-2. [§]PCR quantitativo. [¥] ICC-qPCR – PCR quantitativo integrado a cultivo de células A549.

A reduzida influência da digestão anaeróbia sobre partículas virais tem sido explicada pelo fato dos vírus se adsorverem às partículas sólidas do lodo, o que parece proporcionar proteção aos vírus durante o processo (Sobsey *et al.*, 1980; Gerba *et al.*, 1981; Monpoeho *et al.*, 2004, Mandilara *et al.*, 2006). Melhor desempenho de higienização tem sido obtido com a digestão anaeróbia termofílica (50-55°C), que reduz indicadores bacterianos em mais de 3 log₁₀ e colifagos somáticos em 2-2,5 log₁₀ (Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Astals *et al.*, 2012).

Existe consenso na comunidade científica quanto às dificuldades para se estabelecer interpretações e comparações entre concentrações de vírus entéricos verificadas em amostras de lodo, pois, os tipos de lodo avaliados variam entre os estudos, que os descrevem de forma superficial quanto à características. Além disso, os métodos utilizados para recuperação e enumeração de vírus em amostras de amostras de lodo são complexos e diversos. Contudo, as contagens de vírus entéricos reportadas em lodos de esgoto não podem ser desconsideradas (Lucena *et al.*, 2005; Lucena e Jofre, 2010; Levantesi *et al.*, 2014; Pascual-Benito *et al.*, 2015; Jofre *et al.*, 2016).

Essa ampla diversidade de gêneros de vírus entéricos presentes no lodo e a ausência de padronização no uso dos métodos mais adequados dentre os disponíveis inviabilizam o monitoramento e a enumeração simultânea desses patógenos. Diante disso, é plausível, o uso de organismos indicadores de fácil detecção e quantificação.

4.3. Colifagos em lodos de esgoto

Bacteriófagos ou fagos são vírus que infectam bactérias. Os fagos são vírus que possuem como ácido nucleico, DNA ou RNA de fita simples ou dupla. Morfologicamente, os fagos podem ser poliédricos, filamentosos ou pleomórficos. Os fagos que possuem cauda representam 96% do grupo e pertencem a ordem *Caudovirales* constituída por três famílias: *Myoviridade* (cauda contrátil), *Siphoviridade* (cauda longa e não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta). Todos os membros dessas três famílias possuem cabeça icosaédrica, DNA fita dupla linear

e capsídeo não envelopado. Os bacteriófagos com forma poliédrica compreendem as famílias *Microviridae* (DNA fita simples, circular), *Corticoviridae* (DNA fita dupla, circular), *Tectiviridae* (DNA fita dupla, linear), *Leviviridae* (RNA fita simples, linear) e *Cystoviridae* (RNA fita dupla, linear, segmentado; com envelope lipídico). Os fagos filamentosos compreendem a família *Inoviridae* e apresentam material genético de DNA fita simples e circular. A família *Plasmaviridae* engloba os fagos pleomórficos de DNA fita dupla, circular, protegido por envelope lipídico sem capsídeo (Ackermann, 2011; ICTV, 2015).

Os bacteriófagos que infectam a espécie bacteriana *Escherichia coli* são denominados de colifagos. Existem dois grandes grupos de colifagos: os somáticos e os F-específicos, que se distinguem pela localização na superfície bacteriana dos receptores utilizados na infecção da célula. Os colifagos somáticos infectam cepas de *E. coli* através da ligação a receptores distribuídos na parede celular da bactéria e podem pertencer às famílias *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Microviridae*. Colifagos F-específicos infectam as células por meio da ligação a receptores presentes no pili sexual, o qual é codificado pelo plasmídeo F e compreendem as famílias *Leviviridae* (RNA F-específicos) e *Inoviridae* (DNA F-específicos) (Grabow, 2001; Ackermann, 2011). Ambos os colifagos, somáticos e F-específicos, têm sido utilizados em estudos científicos por muitos anos como indicadores fecais e virais em diferentes tipos de água (IAWPRC Study Group 1991, Armon e Kott 1996, Grabow, 2001; Jofre, 2007).

A detecção e quantificação dos grupos são realizadas por procedimentos padronizados ISO 10705-1 (ISO, 2001a), ISO 10705-2 (ISO, 2001b), USEPA 1601 (USEPA, 2001a) e USEPA 1602 (USEPA, 2001b) e *Standard Methods* (APHA, 2012), que se diferem em poucos detalhes relacionados ao meio de cultura e em condições de execução do ensaio. Nesses procedimentos, para detecção de colifagos somáticos são usadas as cepas *E. coli* CN13 (ATCC 700609) e WG5 (ATCC 700078) e para detecção de F-específicos se utiliza *E. coli* F-amp (ATCC 700891) e *Salmonella typhimurium* WG49 (NCTC12484).

No ambiente, colifagos somáticos são os mais abundantes com concentrações de 10^6 a 10^7 UFP/100mL, enquanto colifagos F-específicos apresentam valores entre 10^5 a 10^6 UFP/100mL (Grabow *et al.*, 1993; Grabow, 2001; Lucena *et al.*, 2003 e

2005). A replicação de colifagos somáticos no meio ambiente tem sido considerada negligenciável, enquanto que não acontece para os demais bacteriófagos (Muniesa e Jofre, 2004; Jofre, 2009; Pascual-Benito *et al.*, 2015). Os grupos de colifagos apresentam diferente resistência aos tratamentos de higienização de lodos de esgoto, principalmente, os térmicos (Mocé Llivina *et al.*, 2003; Mandilara *et al.*, 2006).

Nos quadros 4 e 5 são apresentadas as contagens, respectivamente, de colifagos somáticos e F-específicos em lodos de esgoto. Colifagos somáticos são mais pesquisados e mais abundantes em amostras de lodo de esgoto que colifagos F- específicos. As concentrações variam conforme o tipo de lodo, mas podem ser comparadas entre os estudos, pelo fato de que a pesquisa é realizada por meio de técnicas padronizadas e baseadas em princípios comuns (ISO 2001a; ISO 2001b; USEPA 2001^a; USEPA 2001b; APHA, 2012). Percebe-se, também, que a pesquisa de colifagos F- específicos foi priorizada em lodos tratados por digestão, principalmente anaeróbia (Quadro 5).

Colifagos somáticos são o grupo de bacteriófagos apontado como o mais apropriado a ser designado e utilizado como indicador auxiliar de contaminação fecal e como indicador da presença de vírus, uma vez que os estudos apontam que colifagos somáticos atendem integral ou parcialmente aos atributos de um organismo indicador (NRC, 2004; USEPA, 2015), pois:

- (i) fazem parte da microbiota de animais de sangue quentes (Kott *et al.*, 1974; Grabow, 2001);
- (ii) apresentam estrutura, morfologia e tamanho similares a de enterovírus (Grabow, 2001);
- (iii) estão presentes em números de partículas viáveis superiores aos vírus entéricos infecciosos ou equivalentes ao número de cópias genômicas de enterovírus (Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010);
- (iv) são detectados por métodos padronizados, rápidos e de fácil execução (ISO, 2001a; USEPA 2001; APHA, 2012);
- (v) não são patogênicos (Grabow, 2001);

Quadro 4 - Contagens de colifagos somáticos em amostras de lodo de esgoto

Tipo de lodo	Densidades de colifagos somáticos	Referência
Bruto	$10^5 - 10^6$ UFP*/g	Mandilara <i>et al.</i> , 2006
	$2,8 \times 10^8 - 3,9 \times 10^8$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
	$4,8 - 6,3 \log_{10}$ UFP/100mL	Jebri <i>et al.</i> , 2014
	$6,5 - 8,4 \log_{10}$ UFP/g ST	Astals <i>et al.</i> , 2012
Primário	$7,1 \times 10^3 - 7,4 \times 10^6$ UFP/L	Williams e Hurst, 1988
Ativado	$3,1 \times 10^4 - 4,6 \times 10^5$ UFP/L	Funderburg e Sorber, 1985
	$7,1 \times 10^5 - 9,7 \times 10^6 \log_{10}$ UFP/g ST	Levantesi <i>et al.</i> , 2014
Misto	$1,2 \times 10^5 - 8,6 \times 10^6$ UFP/100g	Chauret <i>et al.</i> , 1999
	$6,5 - 8,4 \log_{10}$ UFP/g ST	Astals <i>et al.</i> , 2012
	$2,82 \pm 0,84 \log_{10}$ UFP/g ST	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
Desaguado	$1,7 \times 10^7 - 8 \times 10^7$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
	ND - $6 \log_{10}$ UFP/g ST	Wong <i>et al.</i> , 2010
Digerido	$3,8 - 6,3 \log_{10}$ UFP/g ST	Levantesi <i>et al.</i> , 2014
Digerido anaeróbio mesofílico	$10^3 - 10^5$ UFP/g ST	Mandilara <i>et al.</i> , 2006
	$3 - 5 \log_{10}$ UFP/g ST	Wong <i>et al.</i> , 2010
	$4,41 \pm 0,91 \log_{10}$ UFP/g ST	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
Digerido anaeróbio mesofílico desaguado	$2,5 \times 10^5 - 4,3 \times 10^6$ UFP/100g	Chauret <i>et al.</i> , 1999
	$5 - 8 \log_{10}$ UFP/100mL	Mocé-Llivina <i>et al.</i> , 2003
	$3,5 \times 10^7 - 5,2 \times 10^7$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
Digerido anaeróbio termofílico	$1,2 \times 10^4 - 1,4 \times 10^6$ UFP/g ST	Aulicino <i>et al.</i> , 1998
Digerido aeróbio	$5,1 \times 10^2 - 5,1 \times 10^6$ UFP/g ST	Aulicino <i>et al.</i> , 1998

Unidade Formadora de Placa.

(vi) ocorrem simultaneamente com enterovírus patogênicos em diferentes matrizes ambientais como água (Hot *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2011), esgoto sanitário (Sidhu e Toze, 2009); lodo de esgoto (Aulicino *et al.*, 1998; Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010);

(vii) no mínimo, são igualmente resistentes a alguns patógenos virais em processos de tratamento de matrizes ambientais como água (Gantzer *et al.*, 1998; Charles *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2012) e lodo de esgoto (Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2007; Astals *et al.*, 2012; Martín-Díaz *et al.*, 2016);

(viii) apresentam multiplicação limitada ou inexistente no ambiente (Muniesa e Jofre, 2004; Jofre, 2009; Pascual-Benito *et al.*, 2015);

(ix) possuem dois estágios fisiológicos, ativo e inativo, sendo uma característica vantajosa em relação às bactérias quando se avalia desempenho de processos de tratamento (Pascual-Benito *et al.*, 2015).

Quadro 5 – Contagens de colifagos F-específicos em amostras de lodo de esgoto.

Tipo de lodo	Densidades de colifagos F-específicos	Referência
Bruto	$10^4 - 10^5$ UFP ⁺ /g	Mandilara <i>et al.</i> , 2006
	$4,2 \times 10^7 - 2,5 \times 10^8$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
	$3,2 - 4,9 \log_{10}$ UFP/100mL	Jebri <i>et al.</i> , 2014
	$5,2 - 6,4 \log_{10}$ UFP /g ST	Astals <i>et al.</i> , 2012
Misto	$0,88 \pm 1,03 \log_{10}$ UFP/g ST	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
Digerido anaeróbio mesofílico	$3 \times 10^1 - 3,6 \times 10^3$ UFP/g ST	Mandilara <i>et al.</i> , 2006
	$2,5 \log_{10}$ UFP /g ST	Viau e Peccia, 2009
	$2,98 \pm 0,69 \log_{10}$ UFP/g ST	Rhodes <i>et al.</i> , 2015
Digerido anaeróbio mesofílico desaguado	$3 - 5 \log_{10}$ UFP /100mL	Mocé-Llivina <i>et al.</i> , 2003
	$2,6 \times 10^5 - 3,3 \times 10^6$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007
Digerido anaeróbio mesofílico + compostagem	ND - $2 \log_{10}$ UFP/g ST	Viau e Peccia, 2009
Digerido anaeróbio mesofílico + peletização térmica	$1 - 2 \log_{10}$ UFP/g ST	Viau e Peccia, 2009
Digerido anaeróbio termofílico	$1 - 4 \log_{10}$ UFP/g	Viau e Peccia, 2009
Desaguado	$4,9 \times 10^5$ UFP/10g ST	Guzmán <i>et al.</i> , 2007

Unidade Formadora de Placa.

Jofre *et al.* (2016) defendem o uso de colifagos somáticos como organismo modelo e debatem a respeito do fato de alguns pesquisadores argumentarem que o potencial de multiplicação de colifagos somáticos no ambiente invalidaria o seu uso como indicadores. Os autores discordam ao assinalarem a existência de poucos trabalhos que apontam para a possibilidade de replicação de colifagos somáticos no ambiente, e ainda, que essas pesquisas apresentam fragilidades experimentais e conclusões equivocadas. Além disso, Jofre e colaboradores

(2016) expõem vários fatores que reduzem a probabilidade de replicação de colifagos somáticos no ambiente: (i) a necessidade de uma combinação de concentrações mínimas adequadas das populações de colifagos somáticos e de bactérias hospedeiras, caracterizada como densidade limiar conjunta de $7 \log_{10}/\text{mL}$; (ii) o fato de que menos de 3% das cepas de *E. coli* conhecidas de ocorrência natural suportam a replicação de colifagos, concordando com o item anterior de que seja improvável a ocorrência da densidade limiar necessária no ambiente; (iii) as possíveis células hospedeiras presentes no ambiente não possuem atividade metabólica compatível à necessária para permitir a adsorção, penetração do genoma e replicação de colifagos somáticos. Os autores concluem que a replicação de colifagos somáticos no ambiente é improvável, mas que se ocorrer, pode ser considerada insignificante se comparada à contribuição da contaminação fecal no ambiente.

Mais recentemente, o grupo de pesquisa coordenado em parceria por Francisco Lucena e Juan Jofre, do Departamento de Microbiologia da Universidade de Barcelona, da Espanha, por meio de duas publicações – Astals *et al.* (2012) Lavantesi *et al.* (2014) – propõem uma possível relação entre as densidades de vírus entéricos e colifagos somáticos para lodo de esgoto, de forma que concentrações de colifagos somáticos menores que 10^4 UFP/g ST corresponderiam a ausência ou à presença muito limitada de enterovírus no lodo com base na proporcionalidade indicada por estudos prévios (Berman *et al.*, 1981; Gantzer *et al.*, 1998; Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Monpoeho *et al.*, 2004; Lucena *et al.*, 2005; Guzmán *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2010; Astals *et al.*, 2012; Martín-Díaz *et al.*, 2016). No entanto, os autores dessa tese reconhecem que a confiabilidade do limite proposto para relação entre colifagos somáticos e vírus entéricos deve ser confirmada por mais estudos.

4.4. Tratamento térmico de lodo de esgoto: secagem em estufa de secagem

O lodo resultante do tratamento de esgoto apresenta alto teor de umidade, geralmente, acima de 90%, o que dificulta o manuseio e o transporte para a disposição final. Quando o lodo for usado de forma benéfica, por exemplo, como

adubo na agricultura; além da redução de seu teor de umidade, o lodo terá que ter seu potencial de reservatório de organismos patogênicos minimizado a níveis que o qualifiquem como seguro para o uso na agricultura.

Portanto, é desejável a aplicação de um processo de tratamento que possibilitasse em conjunto a remoção de umidade e a higienização do lodo. A escolha do tipo de tratamento a ser utilizado depende de fatores como o tipo e volume de lodo produzido, o custo da disposição, as exigências de qualidade do lodo seco e a área disponível para implantação da estrutura de tratamento. Para remoção da umidade existe uma variedade de sistemas: leito de secagem, lagoa de lodo, filtro prensa, filtro de esteiras, centrífugas, incineração e secagem térmica (Jordão e Pessoa, 2011).

Desses sistemas, a secagem térmica pode proporcionar tanto remoção da umidade quanto a inativação de organismos patogênicos, tendo em vista que consiste na exposição do lodo a uma fonte de calor de forma direta ou indireta, o que promove a perda de água pelo material. A transferência de calor para a massa de lodo pode ser feita por convecção, por condução ou por radiação. (USEPA, 1999; Song *et al.*, 2014).

A secagem do lodo é fortemente afetada pela temperatura e varia com o tempo de exposição à fonte de calor, caracterizando a taxa de secagem, que segundo Bennamoun *et al.* (2012; 2013), varia por quatro fases (Figura 1): na primeira, a taxa de secagem é constante (A-B), quando ocorre evaporação da água livre; na segunda (B-C), a perda da água intersticial representa o primeiro e mais abrupto decaimento na taxa; na terceira (C-D), a remoção da água de superfície configura o segundo decaimento; na quarta (D), tem-se a evaporação da água ligada à matéria em um curto intervalo, no qual o equilíbrio da umidade é atingido. Durante a secagem, proporcional ao decaimento da umidade do lodo, ocorre a redução do volume da massa e o aparecimento de rachaduras (Bennamoun, 2012; Bennamoun *et al.*, 2013).

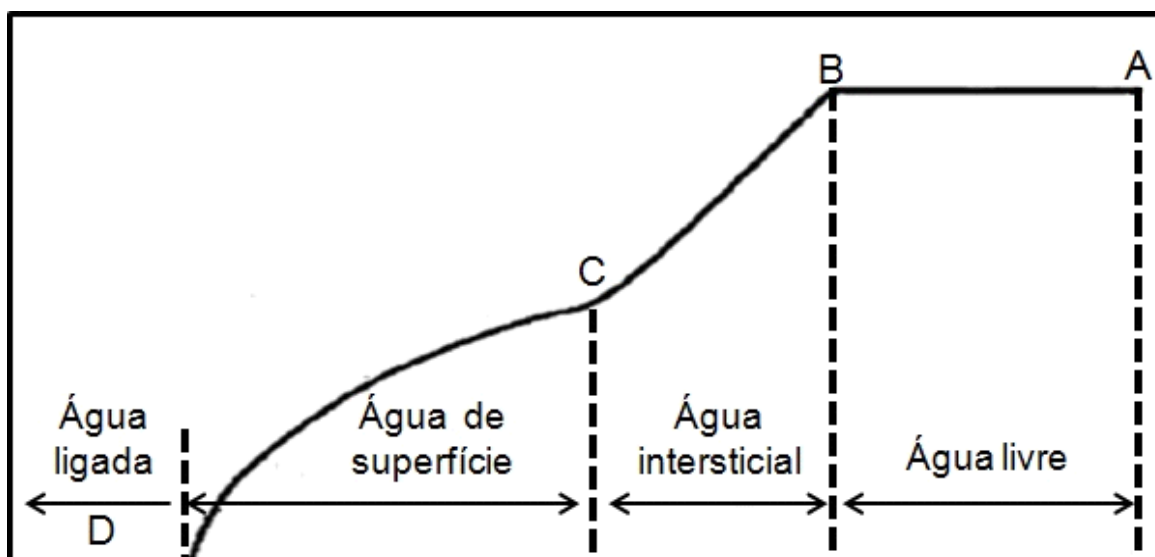


Figura 1 - Fases da secagem de lodo de esgoto em estufa agrícola (Adaptada de Bennamoun, 2012; Bennamoun *et al.*, 2013).

A secagem térmica por meio de equipamentos (secadores) possui elevada capacidade de tratamento do lodo, ocupando pequena extensão de área. Contudo, os secadores apresentam um alto custo de aquisição e de operação em decorrência do elevado uso de energia elétrica, que pode variar de 700 a 1400 kWh/tonelada de lodo (Jordão e Pessoa, 2011; Bennamoun *et al.*, 2013). Ao contrário da higienização do lodo em secadores térmicos, o tratamento usando energia solar tem um custo operacional extremamente reduzido, permite tratar significativas quantidades de lodo e conceber um produto seco, consumindo pouca energia elétrica (30 a 200 kWh/tonelada de lodo), quando necessária (Bennamoun *et al.*, 2013).

Por outro lado, tem - se apontado como desvantagens do uso de energia solar: (i) o tempo de secagem mais prolongado, devido à dependência das condições climáticas; (ii) necessidade de áreas com tamanhos expressivos; (iii) menor eficiência na inativação de organismos patogênicos (Romdhana *et al.*, 2009; Bennamoun *et al.*, 2013). Entretanto, sabe-se que a inativação de microrganismos patogênicos e indicadores em lodo de esgoto depende de uma série de fatores, cujo grau de influência na sobrevivência pode variar conforme a natureza desses organismos, o tipo de lodo de esgoto e o tipo de tratamento

empregado (Mocé-Llivina et al., 2003; Mandilara *et al.*, 2006; Gúzman *et al.*, 2007; Astals *et al.*, 2012).

Das opções de tratamento baseadas em energia solar, a secagem em estufa de secagem tem sido empregada em diversos países como Alemanha (Bux *et al.*, 2001), Turquia (Salihoglu, *et al.*, 2007), Austrália (Shanahan *et al.*, 2010), Polônia (Sypula *et al.*, 2013), Grécia (Mathioudakis *et al.*, 2013), Estados Unidos e México (Song *et al.*, 2014) e no Brasil (Comparini e Sobrinho, 2002; Lima, 2010; Dias, 2012). O princípio básico desse tratamento é a disposição do lodo (líquido, semi-sólido ou sólido) em camada ou leira, sobre o solo ou dentro de leito de secagem, situados dentro de estufa de secagem. Esta pode ter arquitetura variável, mas sempre constituída por material plástico transparente para possibilitar a captação da energia solar incidente e promover a elevação da temperatura do ar da estufa (efeito estufa) que, por sua vez, ocasiona perda de umidade da massa de lodo.

A taxa de secagem do lodo de esgoto em estufa de secagem é influenciada pela localização geográfica, época do ano e condições operacionais do tratamento (Bennamoun, 2012; Bennamoun *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2014). Geralmente, menores tempos de secagem são registrados em condições climáticas favoráveis, como elevadas temperatura ambiente e incidência de radiação solar. Quanto às condições operacionais, diversos dispositivos podem ser instalados com a finalidade de aumentar a taxa de secagem, aumentando a eficiência do sistema. Dentre os dispositivos empregados tem-se: na camada inferior ao piso, tubulações de aquecimento ou camada drenante; no ar, lâmpadas de infra-vermelho ou sistema de controle da ventilação do ar; na massa de lodo, equipamentos eletrônicos (robôs) para revolvimento constante ou mais frequente da massa de lodo (Bennamoun, 2012; Bennamoun e tal., 2013).

No geral, essas estratégias têm sido empregadas em diferentes países como Alemanha (Bux *et al.*, 2001); Turquia (Salihoglu *et al.*, 2007); Austrália (Shanahan *et al.*, 2010); Polônia (Sypula *et al.*, 2013); Grécia (Mathioudakis *et al.*, 2013), Estados Unidos e México (Song *et al.*, 2014). No Brasil, em escala experimental, a secagem do lodo de esgoto tem sido realizada em estufas agrícolas desprovidas de sistema de controle da ventilação do ar interno, havendo

a disposição da massa de lodo desaguado (60-80% de umidade) em camada ou leira, sendo revolvida manualmente com frequência de uma a três vezes por semana (Comparini e Sobrinho, 2002; Lima, 2010; Dias, 2012).

Em estufa de secagem, o tempo necessário para obtenção de lodo de esgoto seco varia conforme as condições climáticas do local e as condições operacionais do tratamento. Em estudos em que a ventilação do ar interno foi controlada e/ou o revolvimento do lodo era mecânico e frequente, o tempo necessário para obtenção de lodo seco (teor de sólidos totais entre 80-90%) foi em torno de 20 dias no verão, na Alemanha (Bux *et al.*, 2001) e na Austrália (Shanahan *et al.*, 2010), enquanto que no outono/inverno, foi superior a 30 dias (Salihoglu *et al.*, 2007; Mathioudakis *et al.*, 2013). Em experimentos realizados em localidades de clima quente e com a execução de revolvimento manual e menos frequente, o tempo necessário para que a massa de lodo atingisse menos de 20% de umidade foi maior e, variou em média, entre 45-55 dias (Dias, 20012; Song *et al.*, 2014) e 70 dias (Comparini e Sobrinho, 2002; Lima, 2010).

Nos estudos citados anteriormente, o desempenho da secagem em estufa de secagem quanto à higienização do lodo de esgoto tem sido avaliado, principalmente, por meio das reduções das densidades de indicadores bacterianos e/ou ovos de helmintos, exceto nos trabalhos desenvolvidos por Shanahan *et al.* (2010) na Austrália e, no Brasil, por Lima (2010), que também verificaram a presença de vírus. No Brasil, lodo de esgoto Classe A em termos de coliformes termotolerantes ($< 10^3$ NMP/g ST) foi obtido nos seguintes tempos de tratamento: 28 dias em Vitória-ES por Lima (2010), 45 dias em Viçosa-MG por Dias (2012) e 70 a 98 dias em Franca-SP Comparini e Sobrinho (2002).

Quanto ao decaimento de vírus, na Austrália, Shanahan *et al.* (2010) detectaram baixas densidades de vírus entéricos no início do tratamento, menores que 100 UFP/10 g de lodo. No Brasil, em Vitória-ES, Lima (2010) analisou a presença de vírus da Hepatite A, *Adenovírus* e *Rotavírus* em três momentos do tratamento, totalizando a análise de 30 amostras, das quais em 11 (37%) foi constatada ausência de vírus. Três amostras foram positivas para vírus da Hepatite A utilizando PCR. Adenovírus foram detectados em 13 de 18 amostras analisadas por PCR; essas mesmas amostras também foram submetidas a teste

de infectividade (passagem da amostra em cultivo de células), no qual seis amostras foram positivas e 12 amostras foram sugestivas para a presença de vírus infecciosos. O gênero Rotavírus foi detectado em todas as amostras em títulos muito baixos, que variaram de <0,3 a 2,8 UFP/g ST.

Percebe-se que novos estudos são necessários para melhor entendimento dos efeitos da secagem do lodo em estufa agrícola sobre a inativação de vírus entéricos e sobre potenciais indicadores como colifagos somáticos, os quais são reconhecidos por sua resistência à inativação térmica em diferentes tipos de matrizes (Bertrand *et al.*, 2012).

4.5. Regulamentação do uso agrícola de lodo de esgoto no Brasil

No Brasil, a Resolução CONAMA nº 375/2006 define critérios e procedimentos para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados (Brasil, 2006). A Resolução determina os parâmetros microbiológicos que caracterizam duas classes de lodos de esgoto, Classe A e Classe B, para uso agrícola conforme apresentado no Quadro 6.

Quadro 6 – Parâmetros microbiológicos das Classes A e B de lodo de esgoto para uso agrícola no Brasil conforme a Resolução CONAMA nº 375/2006.

Organismos indicadores ou patógenos	Classe B	Classe A
Coliformes termotolerantes	< 10 ⁶ NMP / g de ST*	< 10 ³ NMP / g de ST
Ovos de helminto	< 10 ovos / g de ST	< 0,25 ovo / g de ST
Salmonella spp.	-	ausência em 10 g de ST
Vírus	-	< 0,25 UFP [#] ou UFF ^{\$} / g de ST

Sólidos totais; [#] Unidade Formadora de Placa; ^{\$} Unidade Formadora de Foco

O bio sólido Classe A deve satisfazer todos os requisitos apresentados anteriormente (parâmetros e respectivos limites), significando, portanto, que o monitoramento deve abranger todos os organismos especificados (indicadores e patógenos). Com relação aos vírus, é estabelecido que o monitoramento devesse

incluir preferencialmente *Adenovirus* e *Enterovirus*, mas que sob circunstâncias específicas (endêmicas ou epidêmicas), as análises de outros vírus, como rotavírus e vírus de hepatite A, podem ser requeridas.

Para a produção de biossólidos Classe A e Classe B, a Resolução Conama estabelece que o lodo deve ser submetido aos processos de tratamento, respectivamente, de 'Redução Significativa de Patógenos' (digestão aeróbia e anaeróbia, leito de secagem, compostagem) e de 'Redução Adicional de Patógenos' (Compostagem, digestão aeróbia termofílica, secagem térmica, irradiação com raios beta ou gama, pasteurização). Além disso, a legislação estabelece nos artigos 12 e 13, que:

Art 12. É proibida a utilização de qualquer classe de lodo de esgoto ou produto derivado em pastagens e cultivo de olerícolas, tubérculos e raízes, e culturas inundadas, bem como as demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo.

§ 1º Em solos onde for aplicado lodo de esgoto ou produto derivado, as pastagens poderão ser implantadas após um período mínimo de 24 meses da última aplicação.

§ 2º Em solos onde for aplicado lodo de esgoto ou produto derivado, somente poderão ser cultivadas olerícolas, tubérculos, raízes e demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo bem como cultivos inundáveis, após um período mínimo de 48 meses da última aplicação.

Art. 13. Lodos de esgoto ou produto derivado enquadrados como classe A poderão ser utilizados para quaisquer culturas, respeitadas as restrições previstas nos arts. 12 e 15 desta Resolução.

Art. 14. A utilização de lodo de esgoto ou produto derivado enquadrado como classe B é restrita ao cultivo de café, silvicultura, culturas para produção de fibras e óleos, com a aplicação mecanizada, em sulcos ou covas, seguida de incorporação, respeitadas as restrições previstas no art. 15 e no inciso XI, do art. 18 desta Resolução.

No artigo 15, tem-se as restrições quanto a locais e situações em que não será permitida a aplicação de lodo de esgoto, enquanto que o artigo 18 pontua as exigências sobre as quais a Unidade Gerenciadora de Lodo deverá informar ao proprietário, arrendatário, operadores e transportadores, que deverão obedecer para o manuseio e na aplicação do lodo de esgoto e seus produtos derivados.

Como se percebe, a norma brasileira assume uma abordagem de dupla barreira de proteção à saúde: o tratamento do lodo e restrições de uso dos biossólidos, sendo que para as duas classes de biossólidos são estabelecidas diferentes restrições de aplicação. Tais restrições variam desde a proibição ou restrição de aplicações específicas em diferentes tipos de culturas até o estabelecimento de limitações para colheita, pastagem e acesso público. Essas restrições se baseiam no entendimento de que os patógenos ainda presentes nos biossólidos tratados apresentam um tempo necessário para ocorrer decaimento natural no solo.

Bastos *et al.* (2013), avaliando comparativamente a legislação brasileira e a Norma 503 dos Estados Unidos (USEPA, 1993), apontam que a categoria brasileira Classe A claramente reproduz a da USEPA, por isso, é ainda mais rigorosa, por indicar a necessidade de atendimento simultâneo dos limites de coliformes termotolerantes e de *Salmonella*; enquanto que na Norma 503, está estabelecido o atendimento ao limite de um dos dois microrganismos (coliformes termotolerantes ou *Salmonella*). Além disso, na regulamentação brasileira, a ausência de vírus entéricos e ovos de helmintos também deve ser demonstrada pelo monitoramento do produto final, e diferentemente da abordagem da 'Norma 503', a eficiência de tratamento, demonstrada por meio dos parâmetros de controle operacional, não pode ser usada no lugar do monitoramento dos patógenos. Os autores concluem que as exigências brasileiras para biossólidos Classe A aparentam ser extremamente conservadoras.

Para biossólidos Classe B, Bastos *et al.* (2009; 2013) analisam que a Resolução CONAMA nº 375/2006 estabelece um padrão de coliformes termotolerantes bem similar ao da USEPA ($< 10^6$ CTer / g ST) e um limite de ovos de helmintos bastante flexível (< 10 ovos viáveis / g ST). O padrão de coliformes é entendido como indicador de alguma remoção de outros microrganismos (vírus

entéricos e bactérias) por meio dos Processos de Redução Significativa de Patógenos, mas não aplicável a ovos de helmintos. Além disso, a qualidade de biossólidos Classe B não pode ser assegurada com base na eficiência de tratamento.

Considerando as restrições de uso de biossólidos, Bastos *et al.* (2009; 2013) aponta que a legislação brasileira estabelece restrições mais rigorosas para o uso de biossólidos Classe A que a Norma 503. A Resolução CONAMA nº 375/2006 impõe intervalos maiores entre a aplicação do biossólido no solo e o cultivo de culturas comestíveis ingeridas cruas ou não (48 meses) e pastagens (24 meses). Para biossólido Classe B, Bastos *et al.* (2013) apontam que as restrições fixadas para os diferentes usos desse tipo de biossólido são similares às das legislações dos EUA.

Assim, questionamentos têm sido levantados a respeito da real efetividade dessas restrições, uma vez que não existem exigências para confirmação com base em pesquisa de campo. Outra preocupação é que as exigências para o tratamento de biossólidos e seus usos levam em consideração apenas a proteção de consumidores de alimentos e a exposição *in-situ* dos trabalhadores agrícolas (no momento da colheita) e do público geral, mas não considera riscos aos trabalhadores no manejo e no momento da aplicação do biossólido (Jenkins *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2009, 2013).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local do estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Viçosa (20°45'14" e 42° 52' 54"), localizado na Mesorregião Zona da Mata do estado de Minas Gerais, a aproximadamente 230 km da capital Belo Horizonte. Viçosa possui extensão territorial de 299.418 Km² e 93,2% da população reside na zona urbana (IBGE, 2011). Para 2015, a população foi estimada em 77.318 habitantes (IBGE, 2015).

O clima da região onde se localiza Viçosa é marcado por dois períodos distintos: primavera e verão com temperaturas mais quentes, concentrando maiores médias pluviométricas nos meses de dezembro e janeiro; enquanto que as estações outono e inverno, entre os meses de maio e agosto, caracterizam-se por serem períodos secos e de temperaturas mais amenas (Census, 2010). Segundo dados do Instituto Nacional de Meteorologia (INMET), no período de realização do estudo, entre fevereiro e novembro de 2015, a temperatura média variou de 17,2°C (junho) a 23,7°C (novembro), conforme Quadro 7.

Quadro 7 – Temperaturas média, mínima e máxima mensais do ar em Viçosa-MG, fevereiro a novembro de 2015.

Temperatura (°C)	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV
Média	23,2	22,7	20,9	18,4	17,2	17,3	17,9	20,9	22,5	23,7
Mínima	17,0	16,5	13,2	11,5	8,5	9,2	9,2	11,0	13,6	17,3
Máxima	32,2	31,8	30,8	28,6	28,6	29,0	30,4	35,6	37,0	36,0

De modo geral, Viçosa apresenta boas condições de saneamento, em que 90,7% dos domicílios têm acesso água tratada pelo sistema público de abastecimento do município, 86,5% dos domicílios encontram-se conectados à rede geral ou pluvial de esgotamento sanitário (IBGE, 2011). Contudo, apenas o esgoto sanitário do bairro Violeira recebe tratamento.

5.2. Procedência do lodo de esgoto e remoção de umidade

Os lotes de lodo de esgoto utilizados eram provenientes da Estação de Tratamento de Esgoto, situada no bairro Violeira, em Viçosa-MG. A ETE Violeira é operada pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE Viçosa) em parceria com a Universidade Federal de Viçosa-UFV e trata o esgoto proveniente do bairro em que se localiza, com população de aproximadamente 1.000 habitantes, contribuindo com vazão de cerca de 100 m³/dia.

A estação é composta por reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo, do inglês *Upflow Anerobic Sludge Blanket Reactor* - Reator UASB e biofiltro aerado submerso (UASB + BF), ambos em escala real (Figura 2-A), pré-fabricados em aço. O reator UASB apresenta as seguintes dimensões: volume = 48m³; altura = 5,70m; e TDH = 7h. Para o desaguamento do lodo excedente descartado do reator UASB, a estação possui um leito de secagem (Figura 2-B), que é composto por tanques em paralelo, com 2,0 m de largura e 4,0 m de comprimento cada (8,0 m²), e estrutura metálica que se encontra sem cobertura de lona plástica transparente no período de realização do presente estudo.

O lodo de esgoto excedente do reator UASB era descartado com frequência mensal e direcionado para uma das células do leito de secagem, onde permanecia por duas semanas (14 dias) para redução de volume e umidade conforme Dias (2012). Quando a massa de lodo apresentava consistência sólida que permitisse seu transporte, a camada era desfeita (Figura 2-C) com auxílio de ferramentas adequadas (pá e enxada), o lodo era transferido para sacos plásticos (Figura 2-D) e transportado para realização do tratamento.



Figura 2: (A) Reator UASB e biofiltro aerado submerso da ETE-Violeira. (B) Leito de secagem adjacente ao reator UASB. (C) Quebra e mistura da camada de lodo de esgoto. (D) Transferência do lodo para saco plástico para o transporte.

5.3. Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola

A secagem do lodo de esgoto foi realizada em estufa agrícola instalada nas dependências da Divisão de Água e Esgoto (DAG), da Universidade Federal de Viçosa (UFV), com as seguintes características: 9,0 m de comprimento por 6,0 m de largura (54,0 m²); cobertura, partes laterais, posterior e frontal em lona plástica transparente fixada à estrutura metálica; ausência de sistema de ventilação; piso não impermeabilizado e porta na parte frontal da estufa.

5.3.1. Temperatura do ar no interior da estufa

A temperatura do ar dentro da estufa foi monitorada utilizando equipamento Datalogger Akrom KR420, o qual foi configurado para realizar registro da variável a cada 30 minutos e instalado no interior da estufa no dia 17/03/2015 com previsão de retirada no fim de novembro/2015, quando se encerraria o experimento de secagem do lodo na estufa.

Porém, o aparelho apresentou uma falha de funcionamento e registrou dados na memória somente até o dia 23/04/2015. Mas acredita-se que ao longo do tempo de uso dentro da estufa, o equipamento realizou as medições de temperatura e umidade normalmente, pois, no visor do aparelho sempre foi possível constatar registros de temperaturas mínimas e máximas aferidas em datas posteriores ao dia 23/04/2015, o que apontava para o funcionamento correto.

Diante do exposto, a caracterização da temperatura do ar no interior da estufa consistiu: (i) estatística descritiva da variação horária da temperatura aferida pelo aparelho datalogger nos meses de março e abril de 2015; (ii) estimativa da temperatura média diária do ar dentro da estufa através de modelo de regressão em função da temperatura média diária do ar em Viçosa.

O modelo foi determinado a partir de análise de regressão linear entre médias diárias de dados de temperatura do ar no interior da estufa agrícola aferidos por aparelho datalogger e dados secundários de temperaturas médias diárias para Viçosa. Os dados secundários de temperaturas médias diárias para Viçosa foram obtidos a partir de dados horários aferidos por estação meteorológica convencional localizada na Estação Climatológica Principal de Viçosa, localizada no campus da Universidade Federal de Viçosa-UFV. Esses dados foram coletados diariamente na Estação, analisados e disponibilizados através de boletim meteorológico, que são publicados na página do Programa de Pós-Graduação em Meteorologia Aplicada da UFRV (UFRV, 2017).

Os dados primários e secundários de temperatura utilizados para gerar o modelo de regressão compreenderam o período de 16/05/2016 a 23/11/2016. No ano 2016, outros experimentos do grupo de pesquisa foram realizados na mesma estufa agrícola do presente estudo e, por isso, novos dados da temperatura do ar na estufa foram coletados.

Após obtenção do modelo, este foi utilizado para estimar as temperaturas médias diárias durante o período de tratamento (fevereiro a novembro de 2015) de cada lote de lodo na estufa.

5.3.2. Tratamento do lodo

A secagem do lodo de esgoto foi realizada entre fevereiro e novembro de 2015 (10 meses), sendo higienizados nove lotes de lodo (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 e L9). No Quadro 8 (Anexo 1), tem-se para cada lote, a data de início e término do tratamento, tempo de tratamento e número de amostras coletadas durante o monitoramento do lodo. Todos os lotes permaneceram na estufa por, no mínimo, sete semanas (49 dias); média de 13 semanas (91 dias) e máximo de 17 semanas (Lotes 4 e 5). O lote 9 foi tratado por menos tempo devido à finalização do trabalho de campo no fim do mês de novembro. Uma amostra de lodo foi coletada a cada semana para análise de parâmetros físicos, químico e microbiológico até que a leira de lodo atingisse umidade menor que 10%.

Quadro 8 – Resumo do tempo de tratamento e número de amostras analisadas dos lotes de lodo de esgoto higienizados em estufa agrícola, de fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote de lodo de esgoto	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Início do tratamento	19/02	16/03	13/04	18/05	02/07	03/08	25/08	28/09	22/10
Fim do tratamento	27/04	13/07	13/07	28/09	10/11	23/11	23/11	23/11	16/11
Tempo de tratamento (dias)	61	119	90	133	131	112	90	56	25
Número de amostras analisadas	11	17	13	18	19	16	13	8	4

No Quadro 8, observa-se um intervalo de tempo maior no início de tratamento entre L4 e L5, se comparado aos outros lotes. Isso se deve ao fato de que na segunda quinzena de abril, o registro de abertura e fechamento da válvula, que controla a passagem do lodo do reator para o leito de secagem, apresentou problema, ocasionando o vazamento de elevadas quantidades de lodo de esgoto

do reator. Tal incidente pode ter afetado a manta de lodo, a qual é indispensável para o bom funcionamento do mesmo. Então, para que a manta fosse recuperada, o descarte de lodo não foi realizado no mês de maio. Após o vazamento, a eficiência de remoção de DQO (demanda química de oxigênio) reduziu para 30-55%, considerada baixa se comparada com o funcionamento normal do reator em torno de 70%. O lodo que vazou do reator e permaneceu no leito de secagem foi coletado e identificado como lote 4.

O protocolo de tratamento foi realizado de maneira que para cada lote de lodo de esgoto formou-se uma leira de 30 a 40 cm de altura (Figura 3), a qual foi mantida no interior da estufa e revolvida semanalmente utilizando-se uma enxada. A coleta de amostras para análise de parâmetros físicos-químico e microbiológicos foi efetuada com frequência semanal. Para cada leira, sempre após o revolvimento, coletavam-se, com auxílio de pá para jardinagem, seis amostras simples de diferentes pontos e profundidades da massa de lodo, totalizando em torno 2.000g de lodo. Essa amostra era submetida ao procedimento de quebra dos torrões com auxílio de um compactador manual de solo, homogeneizada, colocada (700g) em saco plástico, acondicionada sob refrigeração e encaminhada para análise.



Figura 3 - Disposição das leiras de lotes de lodo de esgoto durante o tratamento por secagem térmica na estufa.

Os parâmetros monitorados foram: teores de sólidos totais (ST), umidade, pH e contagens de coliformes totais, *Escherichia coli*, colifagos somáticos e vírus entéricos, cujos procedimentos de análise estão descritos detalhadamente nos itens 5.8, 5.9 e 5.10. As análises laboratoriais foram realizadas no Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária (SMVPSP/DVT/UFV).

5.4. Ensaio de contaminação artificial de lotes de lodo de esgoto com colifago somático e vírus entérico

Para verificar a relação entre o decaimento de colifagos somáticos e vírus entéricos em lodo de esgoto e a resistência desses vírus ao tratamento térmico, foi realizado experimento de contaminação artificial de lodo com colifago somático Phi X174 (ATCC®13706-B1™) e cepa vacinal de Poliovírus tipo 1 (Poliovírus 1 Sabin).

Para isso, três temperaturas foram avaliadas: temperatura variável do ar dentro da estufa agrícola e as temperaturas 30°C e 60°C, sendo que a temperatura 30°C foi considerada controle. Em cada temperatura, foram monitoradas amostras de lotes de lodo contaminadas artificialmente, uma amostra controle negativo e uma amostra controle positivo (testemunha). O ensaio foi realizado em outubro de 2015.

No ensaio, foram utilizadas amostras de quatro lotes de lodo de esgoto que estavam em tratamento na estufa com as respectivas umidades: L5 (U = 3,72%), L6 (U = 9,65%), L7 (U = 15,77%) e L8 (U = 3,50%). Para cada um desses lotes, três amostras de cinco litros foram retiradas, acondicionadas em potes plásticos e submetidas à descontaminação por calor úmido a 121°C por 30 minutos. Posteriormente, à temperatura ambiente, sob homogeneização com auxílio de espátula estéril, essas amostras foram contaminadas com volumes de suspensões dos vírus que resultassem na concentração final entre 10^5 - 10^7 TCID₅₀/mL para Poliovírus 1 Sabin e 10^5 - 10^7 UFP/mL para colifago somático Phi X174.

Seis amostras adicionais foram coletadas do lote L8, sendo que três foram descontaminadas por calor úmido a 121°C por minutos e não foram inoculadas

conformando o controle negativo; as outras três amostras não foram autoclavadas e permaneceram naturalmente contaminadas funcionando como controle positivo (testemunha).

Após o preparo das amostras, as mesmas foram separadas conforme o delineamento do ensaio e colocadas no interior da estufa agrícola e de duas estufas do tipo B.O.D em laboratório, cujas temperaturas foram ajustadas para 30°C e 60°C. O decaimento dos títulos dos vírus nas amostras de lodo de esgoto foi monitorado por 21 dias com amostragem a cada 3-4 dias.

5.5. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico durante tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola

Em uma ETE, a secagem do lodo de esgoto em estufa agrícola demandaria um trabalhador encarregado dessa função, o qual estaria exposto a possível contaminação microbiológica. No delineamento da pesquisa, a figura desse trabalhador foi representada pela pesquisadora responsável pelo manejo do lodo no tratamento, sendo a exposição a perigo microbiológico avaliada através dos níveis de contaminação das mãos.

Portanto, protegendo-se as mãos com luvas de procedimento de látex e descartáveis, realizava-se o revolvimento de todas as leiras em tratamento e a coleta das amostras para análise. Em seguida, realizava-se lavagem das mãos com 250mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) refrigerada e armazenada em frasco reagente (Schott®). Com a ajuda de um dos colaboradores da pesquisa, o procedimento de lavagem das mãos consistia em verter o volume da solução de PBS sobre as mãos mantidas em movimento típico de lavagem das mãos, enquanto que o volume da solução de PBS resultante da lavagem era coletado por meio do conjunto estéril de funil e frasco reagente (Schott®). O frasco contendo a amostra de água de lavagem das mãos (ALM) era tampado e encaminhado sob-refrigeração para análise de coliformes totais, *Escherichia coli*, de vírus entéricos e colifagos somáticos.

5.6. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico no uso agrícola de lodo de esgoto tratado por secagem em estufa agrícola

Para caracterização da exposição humana a perigo microbiológico no uso agrícola de lodo, foram realizados plantios de hortaliças utilizando lotes de lodo tratados por secagem em estufa agrícola. Os plantios foram realizados na mesma estufa agrícola utilizada para tratamento do lodo.

As culturas de hortaliças escolhidas para a pesquisa foram alface (*Lactuca sativa*) e cenoura (*Daucus carota* subsp. *sativus*), porque apresentam formas distintas de contato com o solo durante o crescimento, que resultariam em diferentes níveis de contaminação da planta: a alface cresce sobre e rente ao solo e a cenoura cresce sob o solo.

O plantio das hortaliças foi realizado com os lotes de lodo de esgoto em tratamento, quando os mesmos atingiram concentrações de coliformes termotolerantes (estimada pela concentração de *E. coli*) equivalentes às estipuladas para classificação do lodo em Classe B (10^3 - 10^6 NMP/g de S.T) e em Classe A ($< 10^3$ NMP/g de S.T) conforme a Resolução CONAMA 375/2006.

Para cada lote com determinada qualidade (classe A ou B), foi realizado o plantio de dois canteiros para alface e dois canteiros para cenoura, sendo que para cada cultura, em um dos canteiros, foi adicionado biossólido previamente contaminado com volume de suspensões dos vírus que resultassem em concentrações finais de 10^4 - 10^5 TCID₅₀/mL de Poliovírus 1 Sabin e 10^4 - 10^5 UFP/mL de colifago somático Phi X174. Durante o plantio, as suspensões dos vírus foram mantidas sob refrigeração, em banho de gelo em caixa térmica, até o momento de contaminação dos biossólidos. No total foram produzidos 24 canteiros (Figura 4), sendo 12 de alface (6 contaminados artificialmente) e 12 de cenoura (6 contaminados artificialmente).

Cada canteiro foi produzido conforme Magalhães (2012) em experimento de plantio das mesmas hortaliças, que para obter níveis iniciais de contaminação das misturas solo + biossólido mais elevados, utilizou 100g de biossólido por dm³ de solo, constituindo uma mistura de aproximadamente 10% (m/m). Assim, foram montados canteiros de 24dm³ constituídos de 2.400g de biossólido. Previamente,

à montagem dos canteiros, as quantidades necessárias de biofóssido de cada lote e de solo foram pesadas e mantidas separadas em sacos plásticos até o momento de mistura (tratado ou artificialmente contaminado) ao solo.

O solo utilizado nos plantios foi obtido da área no entorno da estufa. No plantio das hortaliças, foram utilizadas mudas de alface e sementes de cenoura adquiridas no comércio da cidade. Cada canteiro era composto por 12 plantas, sendo três fileiras com quatro plantas, e irrigados por aspersão aérea, diariamente, no início da manhã ou no fim da tarde.

No uso agrícola do biofóssido como adubo, consumidores das culturas agrícolas e trabalhadores rurais são os grupos de indivíduos que podem ser expostos ao risco de contaminação por patógenos ainda presentes no biofóssido, na mistura biofóssido+solo e nos alimentos. Assim, para representar os trabalhadores rurais, o plantio das hortaliças foi realizado por dois voluntários com experiência nesse tipo de atividade (Figura 4), os quais foram denominados de Trabalhador 1 (T1) e Trabalhador 2 (T2).



Figura 4: Produção dos canteiros de alface e cenoura e plantio de alface pelos voluntários.

Para avaliar a possibilidade de contaminação por ingestão durante o plantio das hortaliças, que necessita do contato direto das mãos com o solo, os dois trabalhadores tiveram lavadas as mãos protegidas com luvas utilizadas desde a mistura do biofossólido ao solo até a finalização da montagem de cada canteiro. Entre um canteiro e o seguinte, as mãos de cada trabalhador foram lavadas realizando-se o mesmo procedimento para lavagem das mãos após manejo das leiras de lodo de esgoto conforme detalhado no item 5.5, sendo utilizado 120mL de solução salina de tampão fosfato (PBS). O frasco era tampado e encaminhado sob-refrigeração para análise de coliformes totais, *Escherichia coli*, vírus entéricos e colifagos somáticos.

O volume de 120mL de PBS justifica-se pelo fato do número de amostras coletadas nos dois eventos de plantio ser grande, demandando uma quantidade de frascos reagente (Schott®) e, além disso, essas amostras seriam armazenadas para posterior análise de vírus entéricos. Logo, a utilização de grande quantidade desses frascos prejudicaria outros procedimentos do experimento. Em virtude disso, foram utilizados outro tipo de frasco existente no laboratório com capacidade máxima de 150mL e que poderiam ser retirados da rotina laboratorial sem prejuízo.

Após o plantio, o próximo evento de exposição do trabalhador rural é a colheita, quando entraria em contato novamente com o solo e com a cultura. Assim, considerando o tempo para colheita das culturas, foi realizada amostragem do solo+biofossólido dos canteiros e colheita das plantas de todos os canteiros. As plantas foram colocadas em sacos plásticos estéreis; enquanto, que em cada canteiro, o solo foi revolvido, amostra de aproximadamente 700g coletada, acondicionada em saco plástico e encaminhada para análise.

A avaliação da exposição do consumidor a possíveis perigos microbiológicos presentes nas hortaliças cultivadas foi efetuada através da verificação do nível de contaminação por vírus nas plantas quando o tempo de colheita para a cultura foi atingido. Cada planta foi colhida, colocada em saco plástico estéril, armazenada sob refrigeração e conduzida para análise.

5.7. Avaliação de técnica para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos de amostras de alface

A escolha dos procedimentos testados foi baseada em materiais e equipamentos existentes no laboratório e de custo razoável. Os protocolos foram delineados de forma que compreendessem as três etapas prioritárias para recuperação de vírus: eluição, concentração e descontaminação da amostra concentrada.

Com base nos estudos de Lukasik *et al.* (2000), Dubois *et al.* (2006) e Butot *et al.* (2007), na etapa de eluição dos vírus da superfície das folhas de alface, foram testados como eluentes as soluções de extrato de carne dessecado a 1% (Dubois *et al.*, 2007; Blaise-Boisseau *et al.*, 2010) e 3% (Love *et al.*, 2008; De Paula *et al.*, 2010) pH 9,0, ambas acrescidas de glicina (50mM) e cloreto de magnésio-MgCl₂ (50mM).

A concentração dos vírus foi realizada empregando-se floculação orgânica (Katzenelson *et al.*, 1976) e filtração à vácuo com membrana de ésteres de celulose (membrana HA) de 0,45µm de porosidade. Optou-se por efetuar a descontaminação da amostra com clorofórmio em vez de filtração em membrana com porosidade de 0,22µm, devido ao alto custo dos filtros em relação ao clorofórmio e pela rápida saturação dos poros, o que demandaria o uso de um número elevado de filtros por amostra.

5.7.1. Preparo e contaminação de amostras de alface

Alface foi obtida no comércio da cidade de Viçosa-MG e, gradualmente, utilizada conforme o desenvolvimento do experimento. Em cada experimento, quantidade suficiente de folhas de alface foi vigorosamente lavada em água corrente e descontaminada em solução de hipoclorito de sódio durante 15 minutos, seguida de lavagem em água destilada e secas com auxílio de papel toalha estéril. Amostras de 10g de alface foram pesadas, cortadas em pedaços de aproximadamente 9cm² distribuídos sobre folha de papel alumínio (Figura 5).

Cada amostra de alface, fracionada em pedaços sobre uma folha de alumínio, recebeu uma alíquota de 1mL de Poliovírus 1 ($3,58 \times 10^7$ TCID₅₀/mL) e

uma alíquota de 1mL do colifago Phi X174 ($1,24 \times 10^8$ UFP/mL). Cada uma das alíquotas das suspensões de vírus foi distribuída na superfície dos pedaços de alface, em sua totalidade e de forma aleatória, através de gotículas de 10µL com auxílio de pipeta monocalal ajustada para tal volume. Aguardou-se a secagem das amostras por 30 minutos em capela de fluxo laminar e, posteriormente, os fragmentos de alface foram transferidos para sacos plásticos estéreis (500mL) e deu-se início à execução dos protocolos. O procedimento de contaminação das amostras foi realizado a temperatura de 21-23°C



Figura 5 - Preparação das amostras de alface (10g) para contaminação artificial com vírus controles

5.7.2. Descrição dos protocolos

No Quadro 9, consta o a descrição dos protocolos testados na recuperação de Poliovírus e Phi X174 de amostras de alface. Os vírus foram quantificados nas pelos métodos descritos nos itens 5.9.4 e 5.9.5. O percentual de recuperação de Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174 para cada amostra foi calculado conforme a Equação 1:

$$\text{Recuperação de vírus (\%)} = \frac{\text{concentração recuperada}}{\text{concentração inoculada}} \times 100 \quad (1)$$

Quadro 9 – Descrição detalhada dos protocolos avaliados quanto à eficiência em recuperação de Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174 de amostras de alface.

Protocolo 1	Protocolo 2	Protocolo 3	Protocolos 4
Homogeneização manual com 50 mL de extrato de carne 1% pH 9 + glicina (50 mM) + MgCl ₂ (50 mM)	Homogeneização manual com 50mL de extrato de carne 3% pH 9 + glicina (50 mM) + MgCl ₂ (50 mM)	Homogeneização manual com 50 mL de extrato de carne 1% pH 9 + glicina (50 mM) + MgCl ₂ (50 mM)	Homogeneização manual com 50 mL de extrato de carne 3% pH 9 + glicina (50 mM) + MgCl ₂ (50 mM)
Centrifugação a 2.500g a 4°C por 15 minutos		Se necessário, ajuste do pH para 7,0	
Floculação orgânica do eluído com redução lenta do pH a 3,5 sob agitação constante e vagarosa por 30 minutos		Filtração do eluído vácuo utilizando membrana HA de porosidade de 0,45µm e 47 mm de diâmetro	
Centrifugação a 3.000g a 4°C por 15 minutos		Raspagem da superfície da membrana com 10mL da solução de eluição até a completa retirada da camada superficial	
Suspender o sedimento com 10 mL de Na ₂ HPO ₄ (0,15M) e acertar o pH para 7,0		Se necessário, ajuste do pH para 7	
Homogeneização lenta com clorofórmio 1:1 por 5 minutos			
Centrifugar a 2.500g a 4°C por 15 minutos			
Evaporação por no mínimo três horas do clorofórmio em banho de gelo			
Adição de 150 µL de gentamicina (10mg/mL)			
Congelamento a -80°C			

5.8. Detecção e quantificação de indicadores bacterianos

Para pesquisa de coliformes totais e *E. coli*, as amostras de lodo de esgoto foram preparadas conforme Agência Ambiental do Reino Unido (*Environment Agency*, 2003): em um béquer, eram pesados 20g da amostra e colocados 180mL de PBS (diluição 10⁻¹), a mistura era homogeneizada em agitador magnético com velocidade moderada por cinco minutos. Posteriormente, realizavam-se diluições decimais sucessivas até a diluição mais apropriada para detecção de acordo com resultados anteriores para a amostra em análise.

Das amostras de água de lavagem das mãos (aproximadamente 250mL) coletadas após manejo do lodo no tratamento, utilizou-se 100mL para determinação direta dos indicadores bacterianos.

Das amostras de água de lavagem das mãos (aproximadamente 100mL), coletadas para cada um dos dois trabalhadores (T1 e T2), retirou-se 1 mL e procedeu-se a diluição de 1:100 com PBS para análise de indicadores bacterianos.

A identificação e quantificação da concentração dos indicadores foi realizada pelo método cromogênico-fluorogênico, utilizando cartela Quanti-Tray® 2000 (IDEXX®) e meio Colilert®.

As concentrações dessas bactérias nas amostras de água de lavagem das mãos do tratamento e do plantio das hortaliças foram expressas, respectivamente, por NMP/100mL e NMP/mL da amostra

A concentração desses indicadores em amostras de lodo de esgoto do tratamento foi calculada conforme a Equação 2:

$$\text{NMP/g ST} = \frac{(\text{NMP tabelado}) \times (\text{fator de diluição}) \times 100}{(\% \text{ sólidos totais})} \quad (2)$$

5.9. Detecção e quantificação de vírus

5.9.1. Vírus, células e produção de inóculos

Como controle positivo para vírus entéricos foi utilizado Poliovirus 1 Sabin, gentilmente cedido pelo laboratório de Enterovírus do Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz/RJ. A linhagem celular utilizada é derivada de um rabdomiosarcoma humano (células RD) e foi obtida do Instituto Adolfo Lutz-IAL/SP.

As células RD foram cultivadas em meio constituído de volumes iguais de Meio Mínimo Essencial (MEM) e Leibovitz (L-15) suplementado com glutamina 2% (200mM), solução de gentamicina (50µg/mL) e soro fetal bovino (SFB) a 15%.

Foram realizados subcultivos de 1:3 a cada 72 horas.

Suspensões do vírus Poliovirus 1 Sabin foram produzidas a partir da inoculação de 500µL de MEM com vírus em cultura de 24h de células (RD) com 90 a 100% de confluência. O inóculo era mantido em contato com a cultura de células por uma hora com homogeneização do inóculo sobre camada celular a cada 15 minutos. Em seguida, o inóculo era retirado e acrescentado MEM com 15% de

SFB. A cultura celular era incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por até 72 horas para replicação do vírus e aparecimento de efeito citopático. Posteriormente, a suspensão era centrifugada e filtrada em membrana de porosidade de 0,22µm.

A cepa Phi X174 (ATCC#13706-B1) foi utilizada como controle positivo para colifagos somáticos e como bactéria hospedeira, *E. coli* CN13 (ATCC#15597-B1). As suspensões do colifago Phi X174 foram produzidas a partir da inoculação desse vírus em cultura da bactéria hospedeira na fase log de crescimento na proporção 1:2. Essa mistura era incubada em estufa a 37°C por 4 horas para multiplicação do vírus. Posteriormente, essa suspensão era centrifugada a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C e, em seguida, filtrada em membrana de porosidade 0,22 µm.

5.9.2. Amostras de lodo ou solo+biossólido controle positivo e negativo

Com base no teor de sólidos de totais da amostra, uma quantidade de lodo de esgoto ou da mistura solo+biossólido equivalente a 12g de sólidos totais foi autoclavada por 30 minutos a 121°C, contaminada com um volume da suspensão estoque de Poliovírus 1 Sabin e de colifago somático Phi X174 equivalente a 1×10^3 UFP/mL, conformando a amostra controle de recuperação/positivo.

As amostras de controle negativo foram preparadas da mesma forma que os controles positivos, porém, não foram inoculadas com vírus.

5.9.3. Eluição e concentração de vírus

Para a detecção de vírus entéricos e colifagos somáticos, foram processadas as seguintes quantidades das amostras teste:

- (i) quantidade equivalente a 12g de sólidos totais de lodo em tratamento;
- (ii) 100mL de água de lavagem das mãos pós manejo e coleta do lodo em tratamento;
- (iii) 100mL (diluição 1:100 da amostra original) de água de lavagem das mãos após plantio das hortaliças;

(iv) quantidade equivalente a 12g de sólidos totais para mistura solo+biossólido;

(v) alface: plantas de tamanho pequeno foram divididas no número de amostras de 10g possíveis até a utilização total da planta; já plantas de tamanho maior derivaram duas amostras de 10g a partir de folhas externas e internas.

As amostras de lodo, água de lavagem das mãos e de solo+biossólido eram colocadas em béqueres e homogeneizadas com solução de 200mL de extrato de carne dessecado a 3% em pH 7, sob agitação moderada constante por 30 minutos a temperatura ambiente.

Já as amostras de alface eram colocadas em saco plásticos estéreis, adicionava-se 50mL de extrato de carne 1% pH 9,5 com glicina (50mM) e $MgCl_2$ (50mM) e realizava-se homogeneização manual por 15 minutos.

Após a etapa de eluição, para todos os tipos de amostras, a suspensão era centrifugada a 2.500 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante era concentrado por floculação orgânica (Katzenelson *et al.*, 1976), ajustando-se o pH para 3,0 - 3,5 sob agitação lenta mantida por 30 minutos para formação dos flocos.

Posteriormente, a amostra era centrifugada a 2.500 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante descartado. O sedimento era suspenso com 20 mL de tampão fosfato (0,15M) sob agitação lenta até a completa dissolução. Se necessário, o pH era ajustado para 7,0 - 7,5.

A amostra concentrada era descontaminada com clorofórmio na proporção de 1:1, durante homogeneização lenta e manual por 10 minutos; em seguida, a amostra era centrifugada a 3.000g por 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, a fase superior da amostra era transferida para um béquer e mantida em banho de gelo por no mínimo três horas para completa evaporação do clorofórmio.

Posteriormente, adicionava-se 500µL de gentamicina (10mg/mL). As amostras processadas foram armazenadas à temperatura de - 80°C.

O teste de esterilidade da amostra consistiu na inoculação de uma alíquota de 100 µL em 5mL de caldo de Triptona e Soja (TSB), incubado a 37°C e monitorado por sete dias quanto a evidência de crescimento bacteriano.

5.9.4. Quantificação de vírus entéricos

Vírus entéricos foram quantificados pela técnica *50% Tissue Culture Infectious Dose* (TCID₅₀) em placas de 96 poços, onde se inoculou suspensão celular na concentração de $1-2 \times 10^5$ células/mL a 15% de SFB com diluições decimais da suspensão do vírus controle ou da amostra, sendo oito poços (réplicas) por diluição. As placas foram incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ e observadas por sete dias quanto ao aparecimento de sinais de destruição da camada de células (efeito citopático). O título viral foi calculado segundo método descrito por Spearman-Kärber (Hierholzer e Killington, 1996). O título em TCID₅₀/mL foi multiplicado pelo fator de conversão 0,69 (Daelemans *et al.*, 2011) para Unidades Formadoras de Placa (UFP) e o resultado expresso por UFP/mL para as amostras de água de lavagem das mãos e alface. Para as amostras de lodo e solo+biossólido o resultado foi expresso pela Equação 3:

$$\text{UFP/g ST} = \frac{(\text{UFP/mL}) \times (\text{volume recuperado da amostra}) \times 100}{(\% \text{ sólidos totais})} \quad (3)$$

5.9.5. Quantificação de colifagos somáticos

A enumeração de colifagos somáticos foi realizada pelo ensaio de plaqueamento em dupla camada de ágar (USEPA, 2001). Primeiramente, realizava-se diluição decimal da suspensão estoque ou da amostra. Em banho-maria, à temperatura de 46,5°C, 500µL de cada diluição era inoculada em duplicata de meio TSA 0,7% (5mL) suplementado com ácido nalídixico; em seguida, adicionava-se 100 µL da bactéria hospedeira em fase *log* de crescimento. Cada duplicata era homogeneizada, vertida sobre ágar de TSA 1,5% e incubada a 37°C por 18-24 horas. O cálculo do título em Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mL foi obtido pela razão entre a soma do número de UFP das duplicatas que apresentaram número de UFP entre 0-300 e a soma dos respectivos volumes da amostra não diluída inoculados nas duplicatas referentes a cada diluição e o resultado expresso por UFP/mL para as amostras de água de

lavagem das mãos e alface. Para as amostras de lodo e solo+biossólido o resultado foi expresso pela Equação 4:

$$\text{UFP/g ST} = \frac{(\text{UFP/mL}) \times (\text{volume recuperado da amostra}) \times 100}{(\% \text{ sólidos totais})} \quad (4)$$

5.10. Parâmetros físicos-químico

5.10.1. Umidade

A umidade do lodo foi determinada conforme Andreoli (1999): (i) colocar uma cápsula de porcelana em estufa a 103°C durante 1 hora; (ii) esfriar a cápsula até a temperatura ambiente em dessecador; (iii) pesar o recipiente que receberá amostra; (iv) acrescentar à cápsula 200 g do lodo; (v) secar em estufa a 65 °C por 24 a 30 horas; (vi) esfriar em dessecador; (vii) pesar novamente a cápsula contendo o lodo.

A diferença de peso antes e após a incubação do lodo na estufa representa a umidade perdida. Para o cálculo da porcentagem da umidade do lodo, utilizou-se a Equação 5:

$$U (\%) = \frac{PU-PS}{PU} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

U= umidade (%)

PU= peso úmido (g)

PS= peso seco (g)

5.10.2. Sólidos totais

A determinação do teor de sólidos totais no lodo foi realizada utilizando os procedimentos descritos no *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA, 2012), conforme as etapas a seguir: (i) colocar uma cápsula de porcelana em estufa a 103°C durante 1 hora; (ii) esfriar a cápsula até a

temperatura ambiente em dessecador; (iii) pesar inicialmente o recipiente que receberá a amostra de lodo; (iv) acrescentar 50 g da mostra de lodo ao recipiente e pesar novamente; (v) secar em estufa a 103-105 °C por 12h; (vi) esfriar em dessecador e pesar a cápsula contendo o lodo; (vii) se a diferença entre o peso úmido e o peso seco for maior que 4% do peso da amostra úmida, repetir o procedimento de secagem em estufa por 1h a 103-105°C, até que a perda de peso por parte da amostra seja menor 4% do peso da amostra imediatamente anterior. O teor de sólidos totais, em porcentagem, foi obtido através da Equação 6:

$$ST (\%) = \frac{(A-B)}{(C-B)} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

ST= sólidos totais (%);

A= peso da amostra seca + recipiente (g)

B= peso do recipiente (g)

C= peso da amostra úmida + recipiente (g)

5.10.3. Determinação do pH

A etapa de determinação do pH seguiu as recomendações descritas em *Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods* (USEPA, 2004): (i) em um béquer, pesar 20g da amostra; (ii) adicionar 100mL de água destilada; (iii) homogeneizar por cinco minutos com auxílio de um bastão de vidro; (iv) manter em repouso por 15 minutos; (v) preceder à leitura equipamento peagâmetro (Hanna®).

5.11. Determinação dos coeficientes de decaimento

O cálculo do coeficiente de decaimento microbiano foi realizado no programa Microsoft® Excel e iniciado a partir da obtenção da população remanescente) em um dado instante (t). Os dados de população remanescente

foram plotados em gráficos de dispersão, sendo o eixo constituído pelos dados de populações remanescentes e o eixo pelo tempo. O teste de regressão linear foi realizado de forma que a reta passasse pela origem ($X;Y = 0;0$), obtendo-se equação do tipo e respectivo coeficiente de determinação (R^2). Considerando o decaimento microbiano como cinética de primeira ordem (Equação 7), o coeficiente angular da equação obtida corresponde ao coeficiente de decaimento microbiano à temperatura de operação T (K_T).

$$N_t = N_0 \cdot e^{-K_T \cdot t} \quad (7)$$

Onde:

N_t = contagem de microrganismos num instante t ;

N_0 = contagem inicial de microrganismos;

K_T = coeficientes de decaimento microbiano à temperatura de operação T.

t = tempo

Para os indicadores bacterianos, os coeficientes de decaimento calculados com base nas temperaturas de operação (K_T) foram convertidos para 20°C (K_{20}) utilizando a Equação 8. Devido a inexistência, até o momento, de um valor de coeficiente de temperatura (θ) para lodo de esgoto, utilizou-se valor de θ igual a 1,07, o qual é citado na literatura para o decaimento de bactérias em corpos d'água (von SPERLING, 2005).

$$K_T = K_{20} \cdot \theta^{(T-20)} \quad (8)$$

Onde:

K_{20} = coeficiente de decaimento microbiano a 20°C (d^{-1});

K_T = coeficiente de decaimento microbiano à temperatura de operação T (d^{-1});

θ = coeficiente de temperatura (adimensional);

T = temperatura de operação (°C).

5.12. Análise dos dados

Os dados foram tratados por estatística descritiva, no programa Microsoft® Excel, de forma que os resultados pudessem ser apresentados através de medidas de tendência central, de variabilidade ou dispersão.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6. 1. Higienização de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola

6.1.1. Temperatura do ar no interior da estufa agrícola

A variação da temperatura do ar real no interior da estufa nos meses de março e abril está apresentada na Tabela 1, que mostra um resumo dos dados de temperatura registrados por equipamento datalogger entre 17/03 e 23/04/15, totalizando 1777 combinações de dados de temperatura e umidade, sendo 689 no mês de março e 1079 no mês de abril. As temperaturas e umidades médias, mínimas e máximas foram próximas nos meses de março e abril.

Tabela 1 – Temperatura e umidade do ar no interior da estufa agrícola aferidas por aparelho tipo datalogger, março e abril de 2015, Viçosa-MG.

Medidas	Temperatura		Umidade	
	Março	Abril	Março	Abril
n	698	1079	698	1079
Média	26,9	24,7	77,7	79,5
Mínimo	15,7	13,4	20,9	25,1
Máximo	52,5	50,6	100,0	100,0

Na Figura 6, apresenta-se a variação horária da temperatura no interior da estufa ao longo do dia nos meses de março e abril. Observa-se um perfil na variação da temperatura durante o dia marcado por duas fases: a primeira compreende o início da noite (18 horas) até as primeiras horas da manhã (5-6 horas) em que a variação da temperatura se mantém praticamente constante entre mínima próxima a 15° C e máxima em torno de 20-25°C; já na segunda fase, entre sete horas da manhã e às 17 horas (período do dia), a variação da temperatura é maior, quando as temperaturas mínimas permaneceram próximas de 20°C, enquanto as temperaturas máximas aumentaram gradativamente podendo atingir valores superiores a 50°C entre onze e treze horas, e posteriormente, decaíram até o início da noite, quando atingem,

novamente, valores entre 20-25°C. Lima (2010) e Dias (2012) também relataram esse comportamento da variação diária da temperatura no interior de estufa agrícola, destacando, principalmente, que a temperatura máxima pode ser próxima ou superior a 50°C em estações climáticas mais quentes.

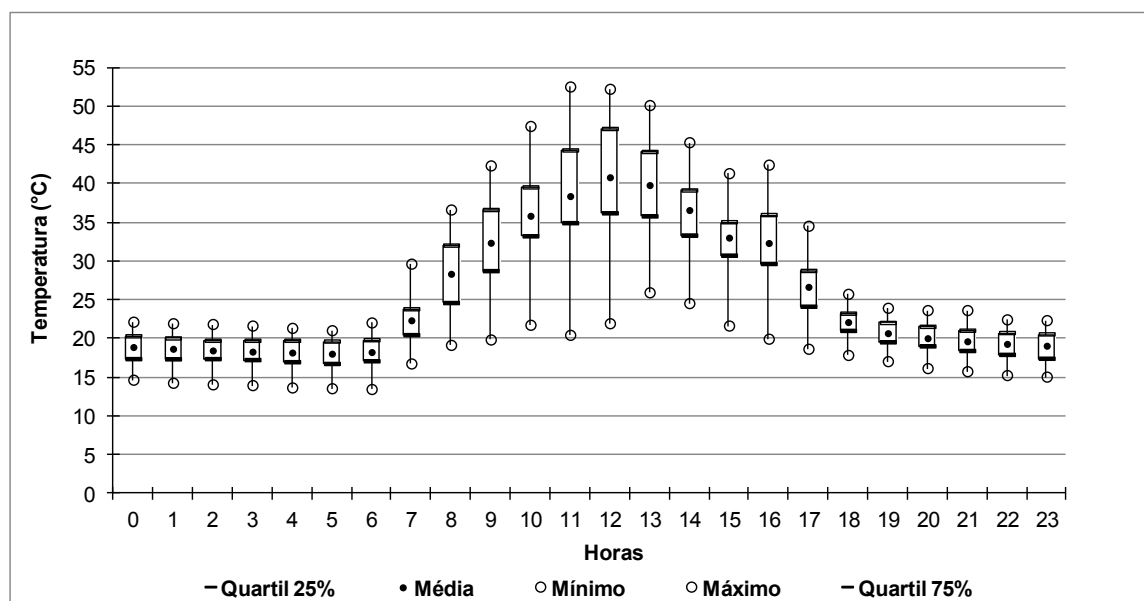


Figura 6 – Variação horária da temperatura interna da estufa agrícola ao longo dia, março e abril de 2015, Viçosa-MG

A temperatura média do ar no interior da estufa durante a secagem a dos lotes de lodo foi estimada a partir do modelo (Equação 9 e Figura 7) obtido após teste de regressão entre dados coletados da temperatura do ar na estufa em função da temperatura média do ar de Viçosa (externa à estufa), totalizando 215 pares de dados, no período de 16/05 a 23/11/2016.

$$T_{\text{média estufa}} = 1,1926 (T_{\text{média ar de Viçosa}}) + 0,2284 \quad (R^2 = 0,8096) \quad (9)$$

Onde:

$T_{\text{média estufa}}$ = temperatura média estimada do ar no interior da estufa (°C);

$T_{\text{média ar de Viçosa}}$ = temperatura média do ar de Viçosa (°C).

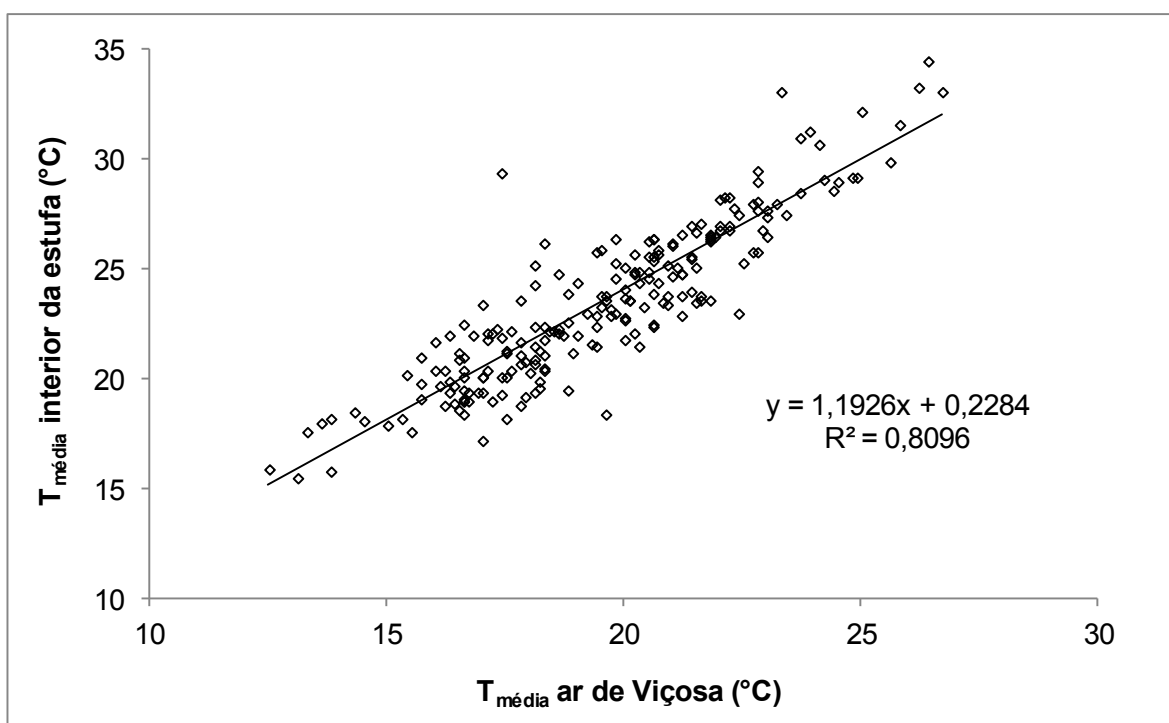


Figura 7 - Modelo de regressão linear entre temperatura média do ar no interior da estufa agrícola (n=215) e temperatura média observada do ar em Viçosa (n=215), no período de maio a novembro de 2016.

Com base no modelo obtido (Equação 9), foram estimadas as temperaturas médias do ar no interior da estufa para o período de tratamento de cada lote de lodo. Essas temperaturas segundo o lote de lodo estão apresentadas na Tabela 2, onde nota-se que as temperaturas médias estimadas variaram, de 22,1 a 28,1°C. Os lotes 2, 3, 4 e 5 foram tratados em temperatura média menor que 25°C e os demais lotes (L1, L6, L7, L8 e L9) foram submetidos à secagem durante períodos em que as temperaturas médias situaram-se entre 25 e 29°C. As temperaturas médias estimadas mostraram certa relação com a estação climática predominante no período do tratamento, sendo que em L2, L3 e L4 predominou as estações mais frias, outono e inverno, enquanto que os lotes L1, L6, L7, L8 e L9 foram submetidos à secagem em períodos que abrangeram as estações quentes do ano, primavera verão. O lote 5 foi tratado em período que mesclou inverno e primavera. As temperaturas médias estimadas para o interior da estufa foram de 3,7 (lote 3) a 4,8°C (lote 9) mais elevadas que as temperaturas médias do ar fora da estufa.

Tabela 2 – Temperaturas médias do ar fora da estufa agrícola e temperaturas estimadas para o interior da estufa agrícola, no período de tratamento de cada lote de lodo esgoto, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote de lodo de esgoto	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Temperatura média (°C) do ar em Viçosa*	22,1	19,2	18,4	18,3	20,0	21,2	22,1	23,2	23,6
Temperatura média (°C) estimada do ar no interior da estufa**	26,6	23,1	22,1	22,1	24,1	25,6	26,6	27,9	28,1

* Dados obtidos pela Estação Climatológica Principal de Viçosa (UFV, 2016). ** Temperaturas médias estimadas com a Equação 9.

As temperaturas médias estimadas (22,1°C a 28,1°C) para o período de secagem de cada lote foram um pouco menores que às temperaturas reportadas em outros estudos conduzidos no país: em Viçosa, Dias (2012) também obteve temperaturas estimadas, a partir de modelo de regressão, nos períodos de tratamento dos lotes de lodo tratados, que variaram 25,3° a 30, 2°C; em Franca-SP, as temperaturas observadas variaram de 26,6° a 31,8°C (Comparini e Sobrinho, 2002); em Vila Velha-ES, Lima (2010) observou temperaturas médias entre 27,5° a 29,4°C.

O fato dos lotes de lodo terem sido tratados, possivelmente, em temperaturas médias menores que as relatadas em estudos realizados, também, na região Sudeste, pode estar relacionado com o clima de Viçosa, que é mais ameno, em função da cidade estar localizada em região de serra. Além disso; a estufa agrícola e estação meteorológica, da qual foram utilizados dados de temperatura do ar de Viçosa situam-se no campus da UFV, que é bem arborizado e possui uma lagoa, tais aspectos podem contribuir para as temperaturas do ar no campus serem mais amenas que as registradas no centro da cidade.

6.1.2. Caracterização físico-química dos lotes de lodo de esgoto durante secagem em estufa agrícola

Os lotes de lodo de esgoto tratados em estufa de secagem foram caracterizados semanalmente, quanto às variáveis pH, umidade e teor de sólidos totais.

6.1.2.1. pH

O pH se manteve ácido e estável com valores entre 5,0-6,0 para a maioria dos lotes (Figura 8 e Anexo 2). Apenas os lotes 1 e 7 apresentaram maiores variações nos valores de pH entre 5,0-8,0. Durante a secagem do lodo em estufa sem caleação, o pH tende a se manter próximo da neutralidade (Shanahan *et al.*, 2010; Sypula *et al.*, 2013) ou se acidificar levemente (Lima, 2010; Dias, 2012).

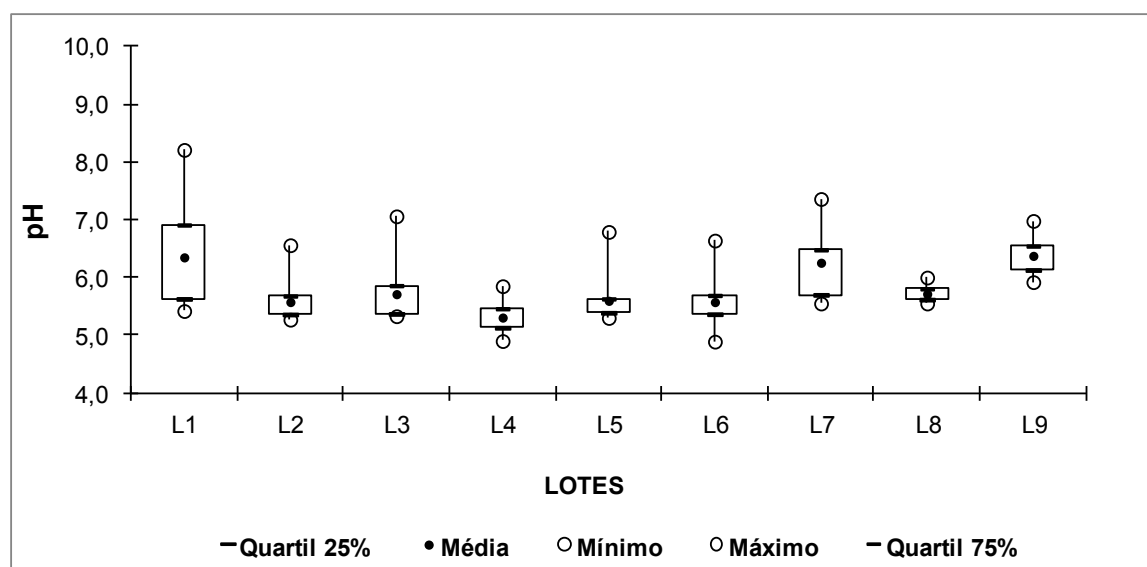


Figura 8 - Distribuição dos valores de pH para os lotes de lodo de esgoto tratados Por secagem térmica em estufa de secagem, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

6.1.2.2. Umidade

A maioria dos lotes foi transferida para estufa de secagem com teor de umidade em torno de 60-80% (exceto lote 8 com menos de 30%). Teores de umidade menores que 20% foram alcançados com três semanas (25 dias) em L9, cinco semanas (32-34 dias) em L1 e L7, sete semanas (46-49 dias) em L2, L5 e L6, nove semanas (62 dias) em L3 e doze semanas (91 dias) em L4. Ao longo do tratamento, à medida que transcorreu o tempo de secagem, pode-se observar gradativa perda de umidade nas massas de lodo, os coeficientes de determinação (R^2) que variaram de 0,823 (L2) a 0,976 (L3) mostram o bom ajuste dos modelos exponenciais aos dados (Figura 9 e Anexo 3).

Em Viçosa-MG, Dias (2012) constatou, também, que em 45 dias de tratamento, a umidade foi reduzida para 20% em todos os lotes de lodo tratados. Assim, depreende-se que, em Viçosa, 50 dias de secagem em estufa de secagem parecem ser suficientes para reduzir teores de umidade iniciais de 60-80% para 20% de lodos de esgoto. Já Comparini e Sobrinho (2002), em Franca-SP, reportaram média de 70 dias de tratamento para se alcançar teores de umidade menores que 10%, o que também foi constatado por Lima (2010) em experimentos sucedidos em Vila Velha-ES.

O expressivo declínio da umidade até teor de 20% com subsequente tendência à estabilidade também foi destacado por Comparini e Sobrinho (2002). Esse comportamento é comum ao lodo de esgoto durante processos de tratamento térmico, quando significativa redução da umidade ocorre em função da remoção das águas intersticial e de superfície constituintes da massa de lodo (Bennamoun, 2012).

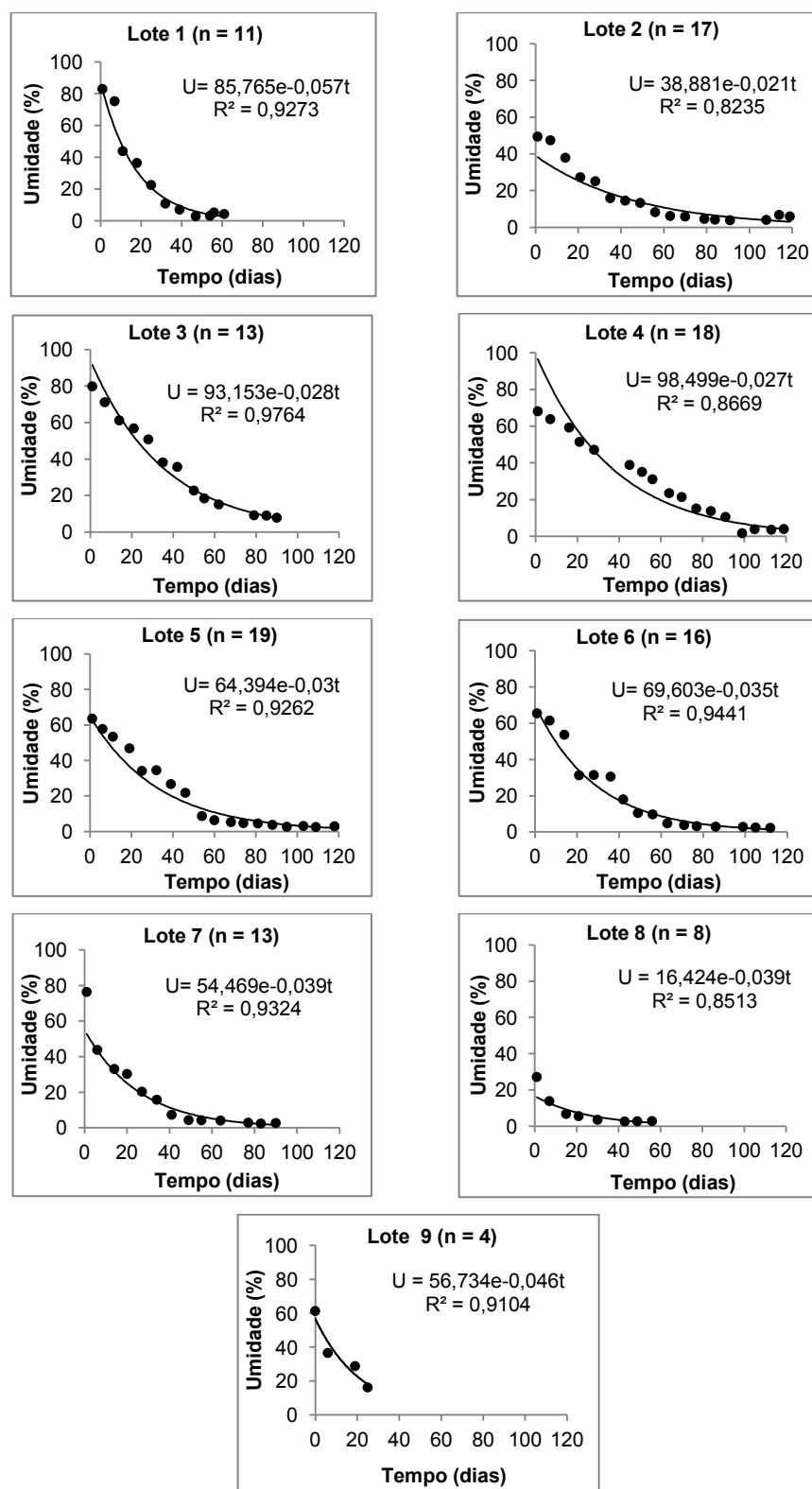


Figura 9 – Comportamento do teor de umidade (%) em lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em função do tempo (dias) de tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Com intuito avaliar melhor o comportamento da perda de umidade, os lotes de lodo foram avaliados segundo faixas de umidade iniciais no tratamento, de forma que foram agrupados em três faixas de umidade (Figura 10): menor ou igual 60% (L2 e L8; n=25), entre 60-70% (L4,L5, L6 e L9; n=32) e maior ou igual a 70% (L1, L3 e L7; n=19). Foram considerados dados de umidade até 10%, pois, após esse teor, a perda de umidade é menos evidente e constante (Bennamoun, 2012; Bennamoun *et al.*, 2013). Contudo, os modelos gerados segundo as faixas de umidade inicial da massa do lodo no tratamento não se ajustaram tão bem ($R^2_{U \leq 60\%} = 0,4683$; $R^2_{U_{60-70\%}} = 0,6645$; $R^2_{U \geq 70\%} = 0,634$) aos dados de umidade das amostras analisadas quanto os modelos gerados ($R^2 = 0,8235$ a $0,9764$) individualmente para cada lote de lodo de esgoto.

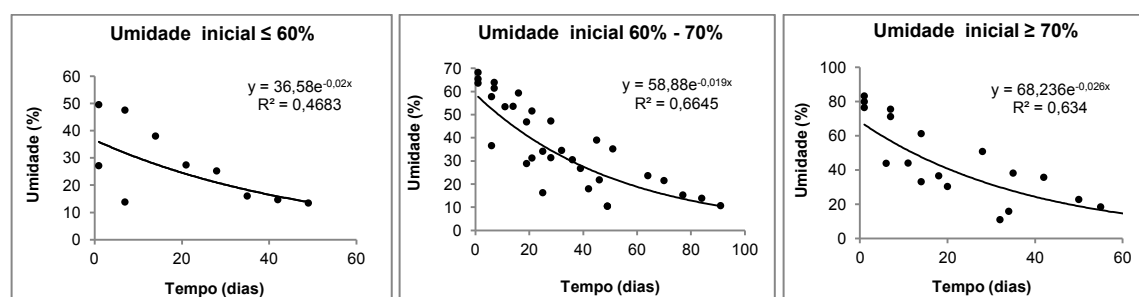


Figura 10 - Comportamento da perda de umidade segundo faixas de umidade iniciais ($\leq 60\%$, 60-70% e $\geq 70\%$) no tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

6.1.2.3. Sólidos totais

Obviamente, a perda de umidade, correspondeu ao aumento esperado dos níveis de sólidos totais (Figura 11 e Anexo 4). No início do processo de secagem, os lotes de lodo apresentaram teores de ST em torno de 25-40%, com exceção do lote 8 (70,92%). Em todos os lotes, os teores de sólidos totais permaneceram em progressiva elevação na medida em que se perdurava o tempo de secagem, até atingirem valores próximos de 90%. Essa relação positiva foi expressa nos coeficientes determinação que variam de 0,800 a 0,965 e o tempo de secagem variou entre 40-50 dias (L1 e L7), 55-65 dias (L5, L6) e 85-100 dias (L2, L3 e L4).

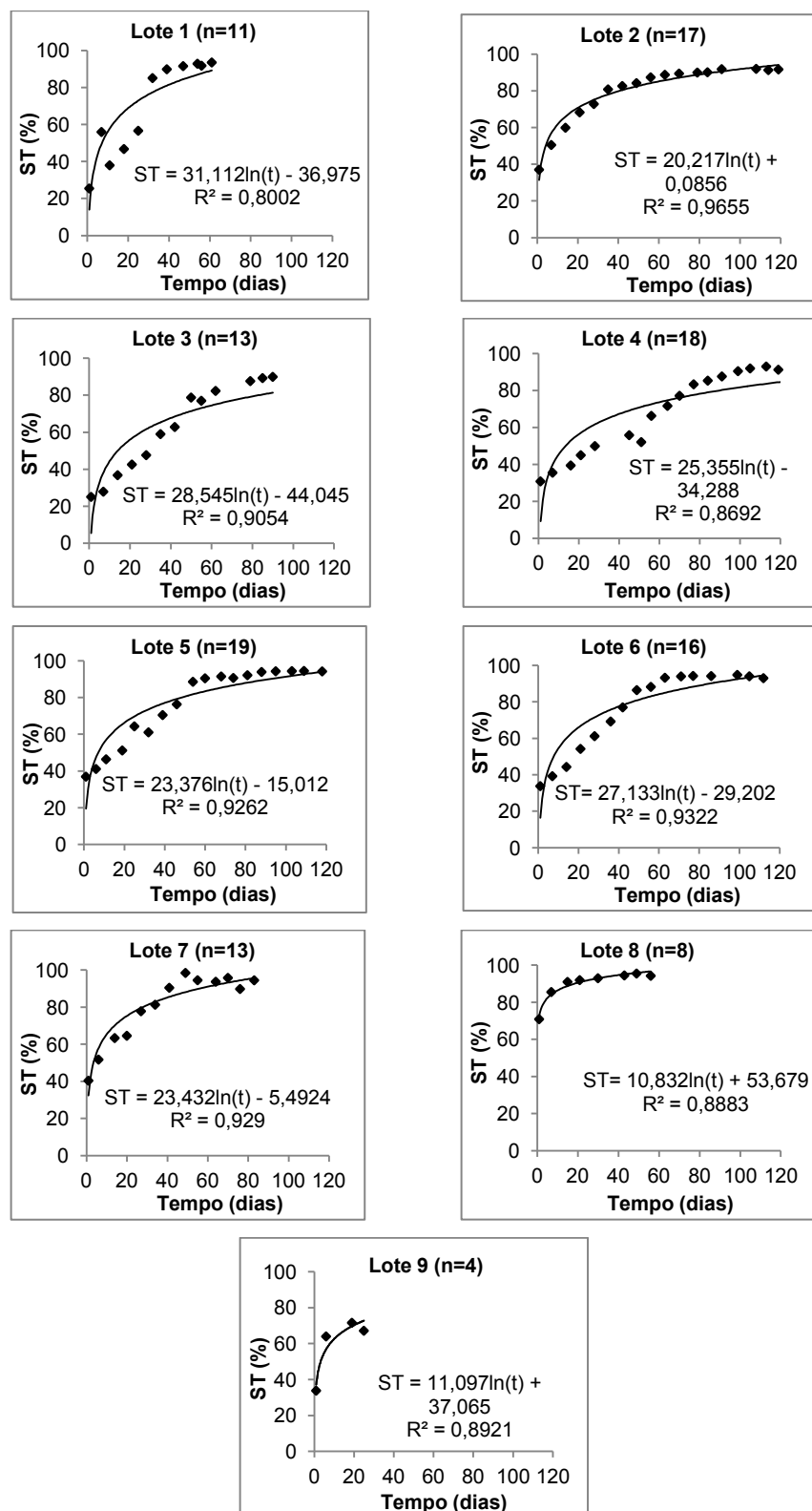


Figura 11 – Comportamento do teor de sólidos totais (%) em lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em função do tempo (dias) de tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

A redução do teor de umidade e elevação do teor de sólidos foi visivelmente percebida na aparência e no volume ocupado pela massa de lodo. Quando a umidade é elevada, a operação de revolvimento manual é dificultada pelo peso da água incorporada à massa. À medida que a secagem transcorre, devido ao contato direto com o ambiente, a parte superficial da leira perde água mais facilmente que as partes do fundo e interior da massa. Diante disso, sempre foi realizado criterioso revolvimento para completa homogeneização do material. A perda de água e a concentração de sólidos culminam na redução do volume ocupado pela massa de lodo e no fracionamento da massa em porções (torrões) de variados tamanhos, enrijecidas e com rachaduras, as quais eram, muitas vezes, difíceis de serem quebradas durante a coleta de amostras.

6.1.3. Caracterização da qualidade microbiológica dos lotes de lodo de esgoto durante secagem em estufa agrícola

6.1.3.1. Indicadores bacterianos

Sobre a qualidade bacteriológica dos lotes de lodo de esgoto durante a higienização em estufa de secagem, conforme mostram as Figuras 12 e 13 (Anexos 5 e 6), altas concentrações de coliformes totais (10^6 e 10^8 NMP g/ST) e *E. coli* (10^5 e 10^7 NMP/g ST) foram verificadas em todos os lotes, exceto em L1 que apresentou problemas nas diluições. Os lotes L3, L4 e L6 foram transportados para estufa apresentando níveis bacterianos que caracterizavam lodo classe B ($<1 \times 10^6$ NMP EC /g ST), enquanto que L2, L5, L7, L8 e L9 levaram até 20 dias para alcançarem qualidade classe B. Ao longo do tratamento, em todos os lotes, notou-se decaimento com tendência exponencial de CT e EC, sendo que L2, L3, L5, L6 e L8 tiveram redução de 2-3 $\log_{10}$ para EC em 40-60 dias.

O tempo de tratamento necessário para que cada lote passasse do tipo Classe B para Classe A ($<1 \times 10^3$ NMP EC/g ST) foi, no mínimo, 28 dias para o lote 4 e, no máximo, 80 dias para o lote L5; os demais lotes L2, L3 L6, L7 e L8 demoraram entre 50-60 dias para terem redução dos níveis de *E. coli* que qualificasse o lodo como classe A. Em estudo na mesma localidade, Viçosa-MG, Dias (2012) reportou que lodo Classe A foi obtido para quatro lotes em 45 dias e

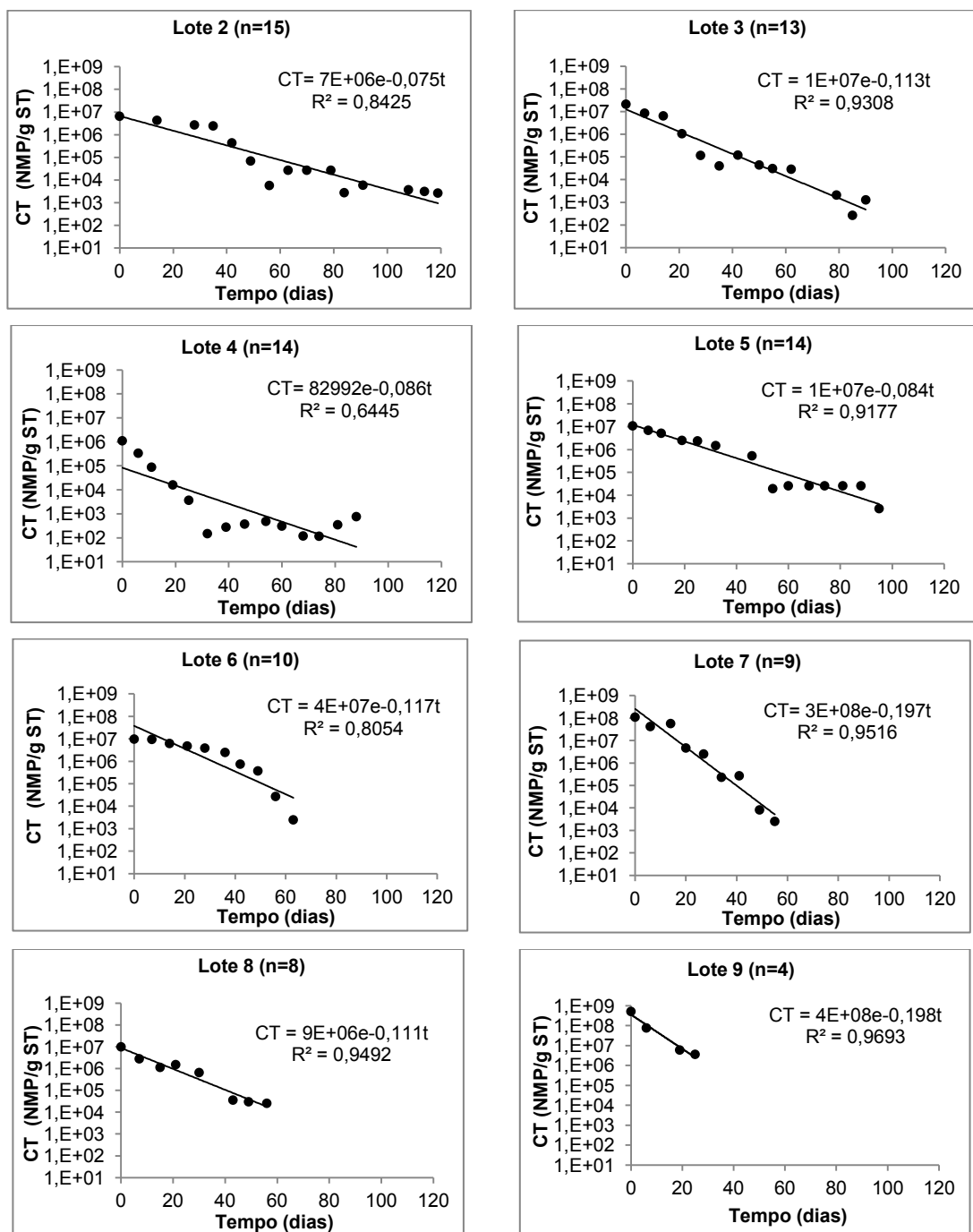


Figura 12 - Decaimento da concentração de coliformes totais (CT) nos lotes de lodo de esgoto L2 a L9, durante o tempo de secagem na estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

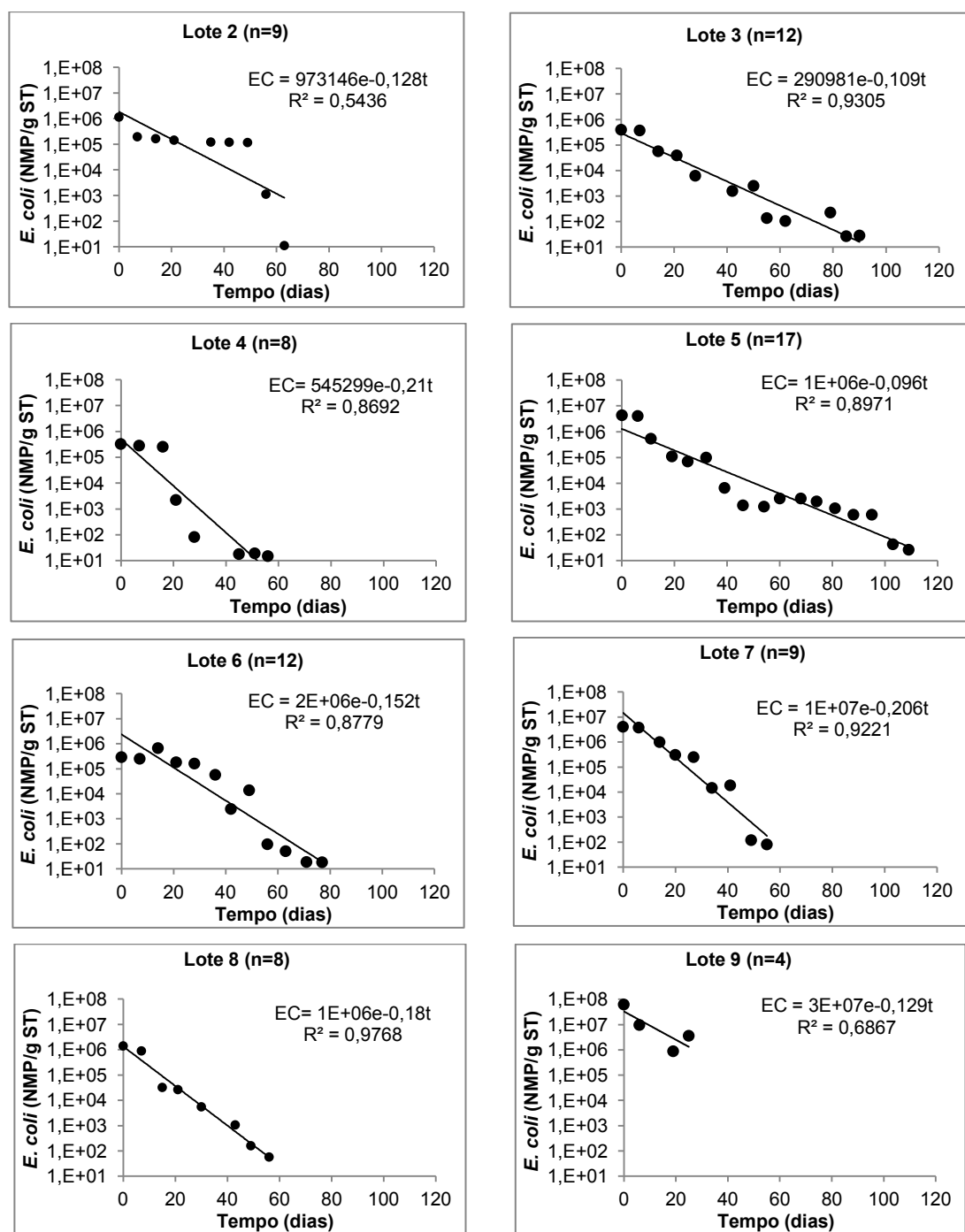


Figura 13 - Decaimento da concentração de *E. coli* (EC) nos lotes de lodo de esgoto L2 a L9 durante o tempo de secagem na estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

para outros três lotes, o tempo foi igual ou superior a de 75 dias. Em Franca-SP, Comparini e Sobrinho (2001) alcançaram concentração de *E. coli* correspondente ao padrão classe A, em período superior a 60 dias (70 a 98 dias). Em Vitória-ES,

Lima (2010), conseguiu obter lodo Classe A em 28 dias na etapa 1 quando tratou lodo digerido, adensado e desaguado; na segunda etapa, no tratamento de lodo apenas adensado e desaguado, tempos superiores foram necessários, chegando a 56 dias.

A Tabela 3 apresenta os coeficientes de decaimento de *E. coli* durante o tratamento à temperatura de operação (K_{bT}) e à temperatura padronizada de 20°C (K_{b20}). De modo geral, observou-se entre os lotes a mesma tendência de variação dos coeficientes K_{bT} e K_{b20} e valores não discrepantes. Percebeu-se influência da temperatura do tratamento sobre o decaimento da população de *E. coli*, pois, o aumento da temperatura de operação de um lote para outro foi acompanhado de aumento no valor do coeficiente de decaimento (K_{bT}).

Tabela 3 – Coeficientes de decaimento de *E. coli* em cada lote de lodo à temperatura de operação durante a secagem na estufa agrícola e à temperatura padronizada de 20°C.

Lote	Temperatura média externa à estufa (°C)	Temperatura média estimada (temperatura de operação) dentro da estufa (°C)	K_{bT} (d ⁻¹)	K_{b20} (d ⁻¹)
L2	19,2	23,1	0,070	0,057
L3	18,4	22,1	0,113	0,098
L4	18,3	22,1	0,197	0,171
L5	20,0	24,1	0,112	0,085
L6	21,2	25,6	0,113	0,077
L7	22,1	26,6	0,173	0,111
L8	23,2	27,9	0,181	0,106
L9	23,6	28,1	0,159	0,090

Assim, excetuando-se o lote L4 que foi resultante de problema técnico no reator, notou-se que os coeficientes dos lotes L2 a L6 apresentaram valores de coeficientes próximos para ambas as temperaturas, de operação (0,070 a 0,113) e 20°C (0,057 a 0,077), enquanto que nos lotes L7 a L9, vê-se nítido aumento dos valores dos coeficientes à temperatura de operação (0,159 a 0,181) e à 20°C (0,090 a 0,111). Nesse sentido, torna-se importante lembrar, que o tratamento dos lotes L2 a L9 foi realizado ao longo de um ano, perpassando pelas quatro estações. O tratamento dos lotes L2 a L6 compreendeu as estações outono,

inverno e primavera, já os lotes L7 a L9 foram tratados, prioritariamente, na primavera e no verão, quando as temperaturas do ambiente são mais elevadas ao longo do dia.

Comportamento semelhante também foi observado por Dias (2012), em Viçosa-MG em experimentos realizados entre 2010 e 2011, quando decaimento mais acentuado e coeficientes mais elevados foram detectados para lotes de lodo, L1, L2, L6 e L7, que foram tratados nas estações de temperaturas mais elevadas, primavera e verão.

6.1.3.2. Vírus entéricos e colifagos somáticos

O controle de qualidade da recuperação e identificação de vírus em amostras de lodo de esgoto foi realizado por meio da submissão ao protocolo utilizado na pesquisa de amostras de lodo de esgoto esterilizadas por calor úmido a 121°C por 30 minutos e contaminadas artificialmente com suspensão de vírus entérico (Poliovírus 1 Sabin) e colifago somático (Phi X 174) de referência. Amostras estéreis de lodo de esgoto não inoculadas com vírus de referência foram utilizadas como controle negativo para avaliar a citotoxicidade da amostra de lodo processada para as células RD utilizadas na técnica de quantificação do título viral na amostra.

Assim, na análise das amostras de lodo de esgoto durante o tratamento de secagem e estufa agrícola, foram analisadas 32 amostras controle, 16 positivo e 16 negativo. Os percentuais de recuperação nas 16 amostras controle positivo variaram de 7,2% a 53,4% para Poliovírus 1 Sabin e de 8,4% a 55,6% para colifago Phi X174. A avaliação da citotoxicidade (teste de citotoxicidade) das 16 amostras controle negativo para as células RD mostrou que a forma não diluída e a menor diluição da amostra utilizada (1:10) não apresentaram efeitos citotóxicos para a célula na técnica de microtitulação (TCID₅₀), pois, observou-se monocamada confluyente e íntegra após sete dias de leituras diárias.

A detecção de vírus nas amostras de lodo analisadas durante o monitoramento da secagem do lodo de esgoto em estufa de secagem foi muito baixa, impossibilitando inferir sobre níveis de contaminação e grau de decaimento.

Todas amostras (n=119) foram negativas para vírus entéricos, sendo esse resultado confirmado através de inoculação de 100µL do volume recuperado não diluído pós-processamento de cada amostra em monocamada de células RD (25cm²), monitorada por 72 horas durante incubação em estufa com 5% CO₂ a 37°C. Observou-se monocamada íntegra, sem presença de morte celular (efeito citopático) para todas as amostras, exceto para três amostras, que apresentaram, em 24 horas, 90-100% de destruição do tapete celular. Essas amostras apresentaram no meio resultante da inoculação os seguintes títulos virais de TCID₅₀/mL 1,77x10³ (L6); 7,49x10³ (L6) e 2,37x 10³ (L7).

A negatividade das amostras de lodo para presença de enterovírus divergiu profundamente da reconhecida positividade das amostras de lodo oriundas de digestão anaeróbia (Guzmán *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009; Viau e Peccia, 2009); cuja eficiência na inativação de vírus é relativamente baixa (Aulicino *et al.*, 1998; Monpoeho *et al.*, 2004, Mandilara *et al.*, 2006).

Essa ausência de vírus entéricos infecciosos nas amostras de lodo durante a secagem pode estar relacionada ao fato das densidades de vírus encontradas em amostras de lodo serem influenciadas pela variação da ocorrência de vírus na população humana produtora do esgoto sanitário e pelas diferentes eficiências de tratamento ou ainda ser atribuída à quantidade da amostra analisada e aos métodos analíticos empregados (Hamparian *et al.*, 1985).

Cabe registrar que o esgoto tratado no reator UASB é produzido por pequena população residente do bairro Violeira, constituído por, no máximo, 1.500 habitantes, que, possivelmente, apresentava bom nível de saúde com relação às viroses produzindo água residuária com baixo índice de contaminação viral, a qual foi, portanto, eventualmente, inativada pela digestão anaeróbia no reator UASB, restando concentrações muito baixas ou inexistência de vírus remanescente no lodo excedente do processo de tratamento.

Mesmo com os controles positivos apontando recuperação de Poliovírus 1 Sabin, a influência dos métodos analíticos empregados no estudo deve ser considerada e abrange: a redução do volume utilizado do eluente extrato de carne de 500mL para 200mL; necessidade de repetir o processo de descontaminação das amostras com clorofórmio, que exige longo período de exposição das

amostras à banho de gelo; o uso de somente uma linhagem celular, sendo que as linhagens celulares apresentam variados níveis de suscetibilidade aos diferentes tipos de vírus (Johnston e Siegel, 1990; She *et al.*, 2006; Prim *et al.*, 2013); e o uso de diluições em base 10 na quantificação das amostras.

No Brasil, outros estudos realizados em grandes centros urbanos, obtiveram melhores percentuais de positividade para vírus infecciosos isolados por técnicas baseadas em cultivo celular em amostras de lodo de esgoto, porém, as densidades relatadas foram baixas. Em Vila Velha-ES, Lima (2010) avaliou 30 amostras, das quais 11 (36,7%) foram negativas; *Rotavírus* foram detectados com título variando de $<0,3$ a $2,8$ UFP/g ST e o teste de infectividade com cultura de células HEp-2 foi sugestivo para *Adenovírus* em 12 (40%) amostras. No estado de São Paulo, Salvador (2011) avaliou amostras de lodo de seis ETEs, utilizou a técnica de plaqueamento em cultura de células RD e verificou 29 (83%) das 35 amostras positivas para vírus totais cultiváveis com títulos de até $12,5$ UFP/g ST. Ainda em São Paulo, Sato *et al.* (2012) tiveram 28 (77,8%) amostras positivas de 36 analisadas por plaqueamento em cultura de RD, com concentração média de $2,23$ UFP/g ST.

Com relação à detecção de colifagos somáticos, a Tabela 4 e o Anexo 7 mostram que os lotes L1, L3, L6, L7, L8 e L9 apresentaram amostras positivas, totalizando 18 (15,1%) amostras das 119 analisadas. Os lotes L1, L7 e L8 tiveram de quatro a cinco amostras sequenciais positivas com títulos semelhantes aos relatados em amostras de lodo de esgoto digerido anaerobicamente (Chauret *et al.*, 1999; Mandilara *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2010).

A Tabela 4 mostra a variação dos títulos e da umidade nas poucas amostras positivas conforme o lote de lodo: (i) no lote 1, as cinco amostras positivas se referem às quatro primeiras semanas do tratamento, quando colifagos somáticos foram detectados em concentrações que variaram de $5,6 \times 10^4$ para $9,1 \times 10^2$ a UFP/g ST em amostras com umidade de 83,15 a 22,64%; (ii) no lote 7, as amostras já possuíam umidade inferior a 10% e apresentaram concentração de colifagos entre $1,53 \times 10^5$ UFP/g ST (41° dia) e $8,0 \times 10^3$ UFP/g ST (70° dia); (iii) no lote 8, do sétimo ao 49° dia, a densidade de colifagos variou de $1,9 \times 10^5$ a $2,2 \times 10^4$ UFP/g ST e a umidade caiu de 13,8% para 2,66%.

Tabela 4 - Amostras positivas para colifagos somáticos segundo o lote de lodo e a umidade durante tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote de lodo de esgoto (amostras analisadas)	Número de amostras positivas (%)	Colifagos somáticos (UFP/g ST)*	Umidade (%)
L1 (11)	5 (45,5)	$5,6 \times 10^4$ - $9,1 \times 10^2$ -	83,15 – 22,64
L3 (13)	2 (15,4)	$2,1$ - $6,7 \times 10^3$	79,84 – 71,11
L6 (16)	1 (6,3)	$1,1 \times 10^4$	4,69
L7 (13)	4 (30,8)	$1,5 \times 10^5$ - $8,0 \times 10^3$	7,33 – 2,90
L8 (8)	5 (62,5)	$1,9 \times 10^5$ - $2,2 \times 10^4$	13,8 – 2,66
L9 (4)	1(25,0)	$1,0 \times 10^5$	16,24
Total	18/119 (15,0%)	-	-

* Unidade Formadora de Placa/ grama de sólidos total.

Ao caracterizar as amostras positivas para colifagos somáticos quanto à qualidade do lodo em termos do padrão da resolução CONAMA 375/2006 para *E. coli*, observou-se que L1 e L8 possuíam qualidade Classe B (*E. coli* $<10^6$ NMP/s ST) e o lote 7 tinha padrão Classe A (*E. coli* $<10^3$ NMP/g ST). Independentemente, em quais eram as concentrações de *E. coli*, níveis de colifagos somáticos encontravam-se superiores a 10^3 UFP/ g ST em todos os três lotes, exceto para uma amostra de L1 que tinha título inferior.

Esses resultados apontam para a resistência de colifagos somáticos naturais, os quais têm sido amplamente sugeridos como candidatos a serem indicadores da presença de vírus durante tratamento de lodo. Na literatura, colifagos somáticos são apontados como o grupo de bacteriófagos mais resistente, principalmente, em processos de tratamento térmico (Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Martín-Díaz *et al.*, 2016). No presente estudo, não foi possível presumir a influência da temperatura no decaimento de colifagos somáticos, uma vez que a temperatura das leiras não foi monitorada e a temperatura média do ar no interior da estufa foi estimada.

A detecção pontual de colifagos somáticos em amostras, tanto com elevada umidade (superior a 70%) quanto reduzida (< 5%), não permitiu sugerir efeito da umidade na inativação desses bacteriófagos na secagem do lodo. Mas, é provável, que essa detecção errática para colifagos somáticos possa estar relacionada à tendência à agregação dos vírus a partículas sólidas, que na massa de lodo durante a secagem tornam-se cada vez mais volumosas, enrijecidas e secas, definindo torrões, que, por sua vez, podem proteger vírus em seu interior, favorecendo uma distribuição irregular dos mesmos e dificultando a detecção. Pourcher *et al.* (2007) também relataram problemas de irregularidade na detecção de amostras positivas na área do experimento que o lodo era mais seco e havia a presença de torrões.

No Brasil, Comparini e Sobrinho (2002) monitoraram concentrações de bacteriófagos F-específicos em lodo de esgoto durante secagem em estufa de secagem, em três experimentos seguidos, nos quais, respectivamente, as concentrações iniciais de colifagos detectadas foram $1,26 \times 10^4$, $2,90 \times 10^2$ e $1,54 \times 10^4$ UFP/g ST. Após 14, 42 e 56 dias de tratamento foi detectada ausência desses colifagos, quando a umidade das respectivas amostras eram 24,1%, 46,3% e 71,2%, o que confirma a menor resistência de colifagos F-específicos à temperatura.

A caracterização da qualidade e do decaimento virológicos nos lotes de lodo ficou impraticável, devido à totalidade de amostras negativas para vírus entéricos e às enumerações pontuais de colifagos somáticos entre os lotes, sendo assim, o estabelecimento de uma relação entre as concentrações de enterovírus e colifagos somáticos durante secagem de lodo de esgoto em estufa de secagem ainda se mantém pendente.

Contudo, estudos recentes, que avaliaram a relação entre as densidades de vírus entéricos e colifagos somáticos em amostras de lodo de esgoto em processos de higienização do lodo, sugerem que vírus entéricos infecciosos podem estar ausentes ou em concentrações muito baixas, sendo inferiores aos limites de detecção das técnicas, quando a concentração de colifagos somáticos é menor que 10^4 UFP/g ST (Astals *et al.*, 2012; Levantesi *et al.*, 2014; Martín-Díaz *et al.*, 2016; Jofre *et al.*, 2016). Assim, baseando-se nesse apontamento, na presente

pesquisa, o resultado obtido para enterovírus e colifagos somáticos possa, talvez, não ser considerado tão inconsistente.

6.1.4. Ensaio de contaminação artificial de lotes de lodo de esgoto com enterovírus e colifago somático de referência

A avaliação do decaimento de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático PhiX174 em amostras de lotes de lodo de esgoto submetidas a três condições de temperatura (estufa de secagem, 30°C e 60°C) foi realizada entre os dias 02/10 a 23/10/15. Os lotes de lodo de esgoto em tratamento na estufa e utilizados no ensaio foram L5 (U = 3,72%), L6 (U = 9,65%), L7 (U = 15,77%) e L8 (U = 3,50%), sendo que amostras naturalmente contaminadas não autoclavadas do lote L8 funcionaram como controle positivo (testemunha) e amostras dos lotes de lodo autoclavadas não inoculadas compreenderam o controle negativo.

A Figura 14 mostra que Poliovírus 1 Sabin foi detectado por até sete dias nos lotes 5, 7 e 8 na temperatura de estufa e a 30°C. No lote 6, Poliovírus foram detectados somente após inoculação na estufa e até o sétimo dia de amostragem à 30°C. Na temperatura de 60°C, nos lotes 6 e 7, Poliovírus foram isolados somente na amostra pós-inoculação; no lote 5, apresentou um aparente aumento na concentração da amostra pós-inoculação para a amostra subsequente (quatro dias); enquanto que no lote 8, foi detectado até sete dias. Nos potes testemunhas, enterovírus cultiváveis de ocorrência natural foram recuperados em diferentes densidades na amostragem antes da incubação nas três temperaturas.

Colifagos somáticos de ocorrência natural foram recuperados até quatro dias nos potes testemunhas submetidos à estufa de secagem e a 30°C; já o pote colocado a 60°C foi negativo para colifagos somáticos naturais (Figura 14). Na estufa de secagem, colifago Phi X174 foi detectado até sete dias em L8 e até nove dias em L5 e L6 e não foi detectado no lote 7. Na temperatura de 30°C, Phi X174 foi detectado até 4 dias em L6, sete dias em L8 e nove dias em L5 e L7. À temperatura de 60°C, o colifago de referência foi detectado somente após inoculação em L7, até quatro dias em L6, até nove dias em L5 e L8.

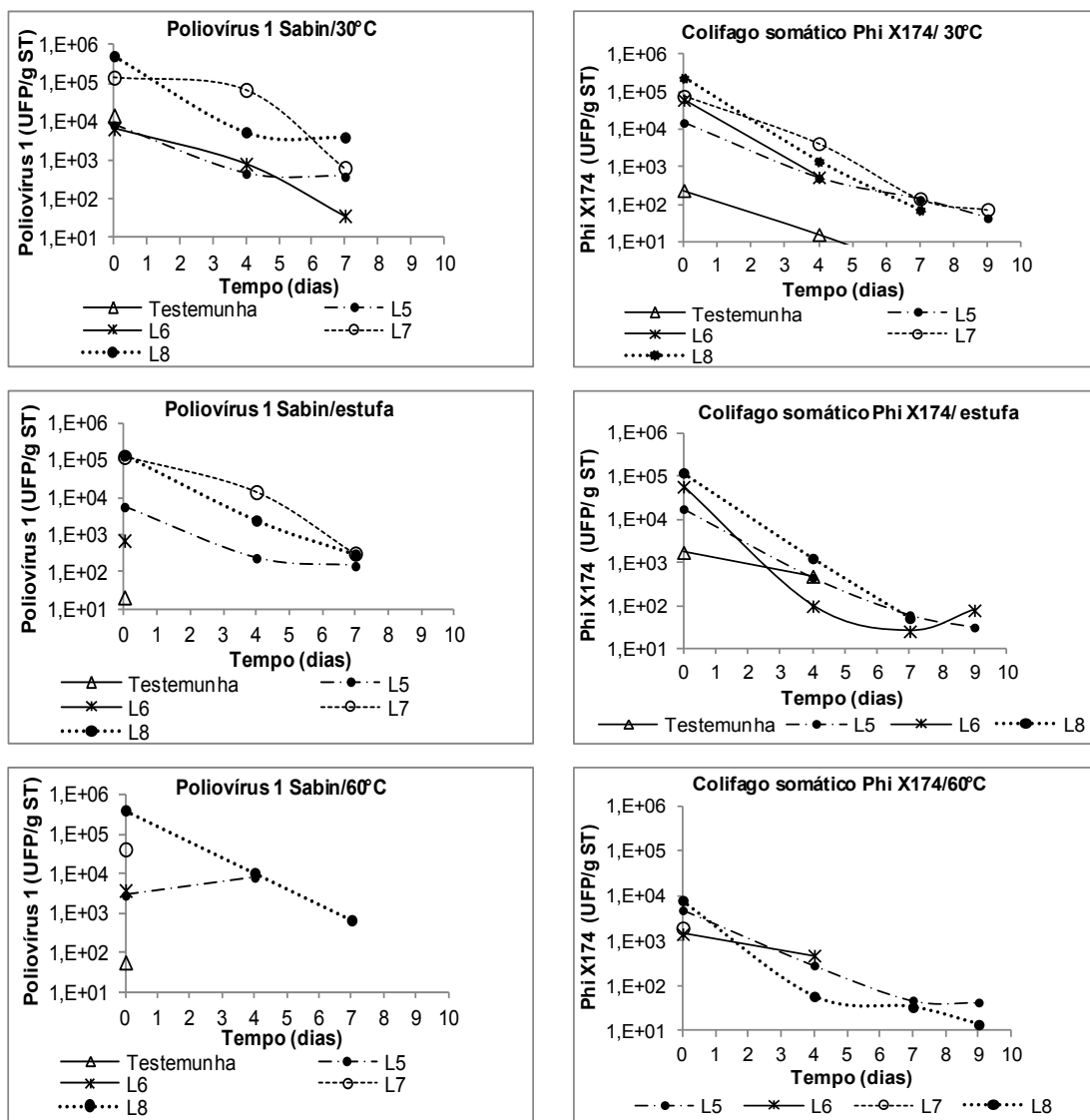


Figura 14- Decaimento de Poliovírus 1 Sabin (Unidade Formadora de Placa –UFP/mL) e colifago somático Phi X174 (Unidade Formadora de Placa –UFP/mL) inoculados em amostras de lodo de esgoto submetidas à variação de temperatura da estufa de secagem e às temperaturas controladas 30°C e 60°C, outubro de 2015, Viçosa-MG.

A detecção de vírus entéricos de ocorrência natural foi inesperada, já que o lote 8 de lodo de esgoto utilizado nos potes testemunhas não apresentou nenhuma amostra positiva durante o monitoramento da secagem em estufa de secagem.

Esperava-se que o decaimento dos vírus na estufa de secagem fosse um pouco mais proeminente que o esperado a 30°C, pelo fato da temperatura no

interior da estufa aumentar muito, podendo chegar a 50°C, entre o fim da manhã e início da tarde. Contudo, os perfis de decaimento de Poliovírus e Phi X174 foram muitos similares na estufa de secagem e a 30°C, provavelmente, devido ao fato da média da temperatura em estufas agrícolas localizadas na região sudeste Brasil ser próxima de 30°C (Comparini e Sobrinho, 2001; Lima, 2010; Dias, 2012).

O rápido decaimento da concentração de Poliovírus e do colifago Phi X174, que, no geral, foram detectados até sete e nove dias pós-inoculação, respectivamente, à temperatura da estufa e à 30°C, pode ser em parte devido ao efeito da temperatura, mas também, pode estar associada ao fato de serem vírus de referência, cultivados e mantidos em laboratório, os quais são considerados menos resistentes que organismos de ocorrência natural e que não refletiriam a real resistência das cepas de ocorrência natural (Mocé-Llivina *et al.*, 2003, Arraj *et al.*, 2005; Bertrand *et al.*, 2012). Essa rápida redução na concentração após inoculação tem sido associada também ao efeito de matriz que é maior em vírus de laboratório do que em vírus do ambiente (Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Arraj *et al.*, 2005; Popat *et al.*, 2010). No caso, a baixa umidade do lodo inoculado proporcionou maior efeito de matriz, de forma que os vírus podem ter associado mais fortemente às partículas sólidas do que se a matriz tivesse mais umidade.

Colifago somático Phi X174 se mostrou mais resistente que Poliovírus, ao ser detectado por mais tempo nas três condições e, principalmente, à 60°C, em três dos quatro lotes inoculados. A elevada resistência térmica de colifagos somáticos tem sido apontada por diversos estudos, que os têm sugerido como indicadores da ocorrência de vírus durante tratamento térmico (Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Mandilara *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Bertrand *et al.*, 2012; Astals *et al.*, 2012; Martín-Díaz *et al.*, 2016).

6.2. Caracterização da exposição humana a perigo microbiológico

6.2.1. Exposição do trabalhador durante o tratamento do lodo: amostras de água de lavagem das mãos

A exposição do trabalhador a perigo microbiológico (bacteriano e viral) foi analisada com base dos níveis de contaminação das mãos. No total, foram

analisadas 33 amostras de água de lavagem das mãos quanto à concentração de indicadores bacterianos (CT e *E.coli*), colifagos somáticos e vírus entéricos.

Não foi possível fazer apontamentos sobre a contaminação virológica das amostras, pois, todas as amostras foram negativas para enterovírus e colifagos (Anexo 8), o que era esperado visto que as amostras de lodo coletadas durante o tratamento também foram negativas.

Com relação a contaminação bacteriana, conforme a Tabela 5 (Anexo 8), 42,5% e 63,7% das amostras apresentaram concentrações entre $\geq 10^3$ - $< 10^4$ e $\leq 10^2$ por 100mL da amostra para coliformes totais e *E. coli*, respectivamente. No cenário de exposição avaliado, revolvimento manual das leiras de lodo com auxílio de enxada, aparentemente, pouco determinou a contaminação das mãos, pois, não havia contato direto das mesmas com o lodo.

Tabela 5 – Níveis de contaminação bacteriana das amostras de água de lavagem das mãos após revolvimento e coleta de amostras das leiras dos lotes de lodo de esgoto L1 a L9 durante tratamento térmico em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015. Viçosa-MG.

Intervalos de NMP/100 mL *	Número de amostras positivas para coliformes totais (%)	Número de amostras positivas para <i>E.coli</i> (%)
$\leq 10^2$	3 (9,1)	21(63,7)
$>10^2$ - $< 10^3$	5 (15,1)	5 (15,1)
$\geq 10^3$ - $< 10^4$	14 (42,5)	7 (21,2)
$\geq 10^4$ - $< 10^5$	7 (21,2)	0 (0,0)
$\geq 10^5$ - $< 10^6$	4 (12,1)	0 (0,0)
Total	33 (100,0)	33 (100,0)

*Número mais provável

Diante disso, a baixa contaminação das mãos por *E. coli* ocorreu prioritariamente no momento da coleta e homogeneização das amostras das leiras com auxílio de pá para jardinagem, sendo que uma única luva era usada para o evento de coleta de amostras das leiras. Portanto, a possibilidade de contaminação via ingestão de patógenos bacterianos em virtude do manuseio do lodo com auxílio de ferramentas durante secagem em estufa de secagem não foi relevante. No momento do revolvimento, talvez, a exposição mais importante seja

a inalação da névoa de aerossóis que se formava com o revolvimento e se tornava mais substancial à medida que o lodo perdia umidade e ficava mais seco.

6.2.2. Uso agrícola de lodo esgoto tratado por secagem em estufa agrícola

Os lotes de lodo de esgoto tratados por secagem em estufa de secagem utilizados como adubo no plantio de alface e cenoura com a respectiva qualidade bacteriológica que apresentavam no momento do plantio foram: L3 classe A (L3-A), L4 classe A (L4-A), L5 classe A (L5-A), L6 classe B (L6-B), L6 classe A (L6-A) e L7 classe B (L7-B). Cada lote foi utilizado na produção de quatro canteiros: dois de alface e dois de cenoura, sendo que para cada hortaliça, um dos canteiros recebeu lodo tratado e outro canteiro recebeu lodo tratado inoculado com vírus de referência. O plantio das hortaliças foi realizado em dois momentos: no primeiro, foram utilizados os lotes L3-A, L4-A, L5-A e L6-B; no segundo, foi realizado plantio com os lotes L6-A e L7-B.

O trabalhador rural pode se expor a perigo microbiológico durante os eventos de plantio e de colheita das hortaliças. Dessa forma, no evento plantio, após a montagem de cada canteiro, os dois colaboradores (Trabalhador 1 e Trabalhador 2) tiveram as mãos lavadas e amostra de água de lavagem das mãos (ALM) foi coletada para análise de indicadores bacterianos, vírus entéricos totais cultiváveis e colifagos somáticos. No evento colheita, amostras da mistura solo + bio sólido de cada canteiro foram analisadas somente quanto à contaminação por vírus.

6.2.2.1. Exposição do trabalhador: amostras de água de lavagem das mãos

As amostras de ALM de ambos os trabalhadores tiveram concentrações variáveis de coliformes totais conforme apresentado na Tabela 6 (Anexo 9). Já as concentrações de *E. coli* foram baixas, menores que 10^2 NMP/mL em 70,8% das amostras do Trabalhador 1 e 75% das amostras do Trabalhador 2 (Tabela 6).

Tabela 6 - Níveis de contaminação bacteriana das amostras de água de lavagem das mãos do Trabalhador 1 e 2 após a produção de canteiros no plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.

Intervalos de NMP*/mL [#]	Trabalhador 1		Trabalhador 2	
	Coliformes totais (%)	<i>E. coli</i> (%)	Coliformes totais (%)	<i>E. coli</i> (%)
$\leq 10^2$	5 (20,8)	17 (70,8)	3 (12,5)	18 (75,0)
$>10^2$ e $< 10^3$	5 (20,8)	4 (16,7)	4 (16,7)	3 (12,5)
$\geq 10^3$ e $< 10^4$	4 (16,7)	3 (12,5)	7 (29,2)	3 (12,5)
$\geq 10^4$ e $< 10^5$	7 (29,2)	0 (0,0)	9 (37,5)	0 (0,0)
$\geq 10^5$ e $< 10^6$	3 (12,5)	0 (0,0)	1 (4,2)	0 (0,0)
Total	24 (100,0)	24 (100,0)	24 (100,0)	24 (100,0)

*Número mais provável; # Diluição 1:100 da amostra.

Todas as amostras de ALM foram negativas para colifagos somáticos. O teste de TCID₅₀ para quantificação de vírus entéricos infecciosos em monocamada de células RD foi realizado inoculando-se desde a forma não diluída da amostra até a diluição 1:10.000 e com 8 réplicas (poços) para cada diluição. Foram obtidos três padrões de resultados para as amostras de ALM (Anexo 10): amostras negativas, amostras consideradas positivas qualitativamente (sem título) e amostras positivas com título viral.

A Tabela 7 mostra os resultados para enterovírus das amostras de ALM coletadas nos dois eventos de plantio. Foram analisadas 46 amostras, pois, duas amostras do Trabalhador 1 foram perdidas. As amostras consideradas negativas

(23,9%) não evidenciaram a presença de efeito citopático na monocamada de células RD, ou seja, todos os poços com inóculos da amostra não diluída e com inóculos das diluições apresentaram tapete celular intacto igual a dos poços do controle negativo, que continham somente células e meio de cultura. As 27 (58,7%) amostras julgadas qualitativamente positivas exibiram efeito citopático restrito somente em poços da forma não diluída, impossibilitando o cálculo do título viral e evidenciando baixa concentração de vírus nas amostras e não detectável pelo teste TCID₅₀. No total, oito (17,4%) amostras foram consideradas positivas, pois, apresentaram efeito citopático nas diluições, permitindo o cálculo do título viral.

Tabela 7 – Caracterização quanto ao resultado no teste de TCID₅₀ para vírus entéricos totais cultiváveis das amostras de água de lavagem das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros em dois eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Trabalhador 1		Trabalhador 2		Total	%
	Lodo tratado (%)	Lodo inoculado (%)	Lodo tratado (%)	Lodo inoculado (%)		
Negativa*	6 (60,0)	0 (0,0)	4 (33,4)	1 (8,3)	11,0	23,9
Positiva sem título [#]	4 (40,0)	6 (50,0)	8 (66,6)	9 (75,0)	27,0	58,7
Positiva com título ^{\$}	0 (0,0)	6 (50,0)	0 (0,0)	2 (16,7)	8,0	17,4
Total	10	12	12	12	46,0	100,0

*Amostra negativa: no teste TCID₅₀, réplicas da forma não diluída e das diluições da amostra não apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD; # Amostra positiva sem título: no teste TCID₅₀, somente réplicas da forma não diluída da amostra apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD; \$ Amostra positiva com título: no teste TCID₅₀, réplicas da forma não diluída e das diluições ≥ 1 da amostra apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD.

Ao se comparar a positividade de amostras entre os trabalhadores segundo o tipo de lodo usado nos canteiros, a Tabela 7 mostra que para lodo tratado, nenhum dos dois Trabalhadores apresentou amostras positivas com título, sendo que 60% das amostras do Trabalhador 1 foram negativas e 66,6% das amostras do Trabalhador 2 foram positivas sem título. Para o lodo inoculado, observou-se que as amostras do Trabalhador 2 manteve o percentual elevado de 75% de

amostras positivas qualitativamente, enquanto que o Trabalhador 1 teve 50% das amostras positivas com título.

A Tabela 8 apresenta os títulos das oito amostras positivas entre ambos os Trabalhadores segundo o lote e a hortaliça plantada. Todas as amostras positivas com título foram referentes a canteiros produzidos com lodo inoculado. Na Tabela 8, nota-se que para o Trabalhador 1, das seis amostras positivas, cinco eram de canteiros onde foi plantado alface e com relação aos títulos, quatro amostras tiveram título inferior a 10 UFP/mL, uma amostra com título igual 97,3 UFP/mL e uma amostra com título de 307,0 UFP/mL. O Trabalhador 2 teve duas amostras com título, oriundas da produção de canteiro de cenoura, cujos títulos foram 9,7 e 409,2 UFP/mL

Tabela 8 – Título para vírus entéricos totais cultiváveis das amostras de água de lavagem das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros em dois eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.

Trabalhador 1		Trabalhador 2	
Amostra	UFP*/mL	Amostra	UFP/mL
Lote 3 - A inoculado (Alface)	307,0	Lote 5 - A inoculado (Cenoura)	409,17
Lote 4 - A inoculado (Alface)	7,2	Lote 6 - A inoculado (Cenoura)	9,73
Lote 6 - B inoculado (Alface)	5,4		
Lote 6 - B inoculado (Cenoura)	5,4		
Lote 6 - A inoculado (Alface)	97,3		
Lote 7 - B inoculado (Alface)	3,0		

* Unidade Formadora de Placa.

6.2.2.2. Exposição do trabalhador: amostras de solo+biossólido

No cenário de exposição avaliado, foram utilizados bio-sólidos tratados com inexistente ou baixa carga viral e bio-sólidos tratados e inoculados com elevada carga viral, tal que, após a mistura ao solo permanecessem com concentrações

finais de 10^4 - 10^5 TCID₅₀/mL de Poliovírus 1 Sabin e 10^4 - 10^5 UFP/mL de colifago somático Phi X174. Considerando que 40-60% das amostras de lodo foram positivas, ainda que sem título, pode-se depreender que foi baixa a exposição a bio sólidos tratados, e que bio sólidos com elevada carga viral de enterovírus infecciosos são necessários para oferecerem contaminação expressiva nas mãos de trabalhadores rurais durante a aplicação manual de bio sólidos.

A exposição do trabalhador rural no momento da colheita foi verificada pelo nível de contaminação viral das amostras de solo+bio sólido dos canteiros após a colheita das hortaliças. Somente foram analisadas amostras em duplicata dos 16 canteiros (n = 32 amostras) do primeiro evento de plantio. Todas as amostras foram negativas para vírus entéricos, sendo que a forma não-diluída das amostras controle negativo e das amostras teste foram citotóxica para as células RD. Por outro lado, colifagos somáticos persistiram no solo, sendo detectados no momento da colheita, 52 dias após o plantio. De acordo com a Tabela 9, os canteiros de alface apresentaram maior número de amostras negativas independente do tipo de lodo utilizado como adubo, se tratado ou inoculado. Todas as amostras referentes a canteiros de cenoura foram positivas. Os títulos das amostras tanto em canteiros de alface quanto de cenoura foram baixos independente do tipo de lodo utilizado (tratado ou inoculado) e variaram entre 6 a 100 UFP/mL (Tabela 9).

A sobrevivência de vírus em solo adubado ou não com bio sólido é influenciada por vários parâmetros, dentre os quais a adsorção às partículas do solo, a temperatura e a umidade são apontados como os mais importantes (Goyal e Gerba, 1979; Yeager e O' Brien, 1979; Hurst *et al.*, 1980; Bitton *et al.*, 1984; Hurst, 1988; Pourcher *et al.*, 2007 e Schwarz *et al.*, 2014). Poliovírus 1 pode ser detectado por duas semanas em solos mais secos e sob temperaturas mais elevadas (Tierney *et al.*, 1977; Pouchet *et al.*, 2007). Nesse sentido, as condições ambientais dentro da estufa de secagem podem ter propiciado a inativação de enterovírus e colifagos no solo, na medida em que a temperatura elevada favorecia a perda de umidade do solo dos canteiros, mesmo com a irrigação diária dos pés de alface. Além disso, a absorção de água do solo pelos pés de alface contribuiu ainda mais com a redução da umidade do solo nos canteiros, tornando o ambiente mais seco e desfavorável à sobrevivência dos vírus.

Tabela 9 - Título de colifagos somáticos das amostras mistura de solo+biossólido conforme o lote e o tipo de lodo usado na produção dos canteiros no primeiro evento de plantio de alface e cenoura, agosto de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Alface		Cenoura	
	Amostra 1 (UFP ⁺ /mL)	Amostra 2 (UFP/mL)	Amostra 1 (UFP/mL)	Amostra 2 (UFP/mL)
Lodo tratado				
L3 classe A	20	70	10	50
L4 classe A	N.D [#]	N.D	20	40
L5 classe A	N.D	N.D	160	70
L6 classe B	N.D	330	50	20
Lodo inoculado				
L3 classe A	N.D [#]	10	10	80
L4 classe A	20	N.D	20	6
L5 classe A	80	N.D	30	100
L6 classe B	10	N.D	140	10

*Unidade Formadora da Placa; # Não detectado.

O comportamento e decaimento de colifagos no solo ainda são incertos, contudo Campos *et al.* (2013) afirmaram o uso potencial de colifagos somáticos como indicadores ao observarem menor decaimento desses vírus em cinco experimentos combinando diferentes tipos de solo com diversas proporções de lodo. Mais recentemente, Schwarz *et al.* (2014) reportaram que o tempo de decaimento para colifagos F- específico MS2 variou de 22 a 36 dias, porém, devido ao fato desse fago ser mais sensível a temperaturas superiores a 25°C (Mocé-Llivina *et al.*, 2003; Guzmán *et al.*, 2007), os autores o apontaram como não sendo o melhor indicador para avaliar sobrevivência de enterovírus no solo.

A caracterização da exposição de trabalhadores rurais no uso agrícola do lodo indicou, de forma geral, baixa exposição a perigos microbiológicos, sendo assim, as ações manuais de aplicação do lodo Classe A ou B ao solo e de colheita da cultura não seriam atividades perigosas para o trabalhador rural a ponto do mesmo se contaminar com patógenos via ingestão. A exposição do trabalhador no uso agrícola do lodo é negligenciada pela Resolução CONAMA n°375/2006, pelo

Artigo 18, encarrega a Unidade de Gerenciamento do Lodo (UGL) a responsabilidade de informar, sobre o manuseio e aplicação do lodo, as exigências: deve-se evitar fazer aplicação manual de biossólido Classe A; aplicação obrigatoriamente mecanizada de biossólido B; e sobre a colheita da cultura, que se a mesma for manual, lodo Classe B deverá ser aplicado seis meses antes do plantio.

6.2.2.3. Exposição do consumidor: amostras de hortaliças cultivadas com lodo de esgoto tratado

A exposição do consumidor foi avaliada através do nível de contaminação das hortaliças cultivadas em solo adubado com lodo. No total, foram produzidos 24 canteiros com 12 plantas que, a princípio, resultariam em 144 unidades de alface e 144 unidades de cenoura. Entretanto, as sementes de cenoura não se desenvolveram em nenhum dos canteiros do primeiro plantio. Em alguns canteiros, após aproximadamente 10 dias do plantio, foi observado desenvolvimento inicial com discreto aparecimento do ramo apical da planta, que cresce sobre o solo, mas esses ramos apresentaram cortes, provavelmente, causados por insetos e, definitivamente, não se desenvolveram. Em virtude desse acontecimento, no segundo plantio, outra marca de sementes de cenoura foi utilizada. No entanto, essa estratégia não apresentou efeito positivo, repetindo-se o problema de não desenvolvimento das sementes, portanto, houve perda de 100% da produção.

No primeiro plantio de alface também houve perdas relacionadas ao não desenvolvimento das mudas em alguns canteiros e ao adoecimento das plantas, as quais apresentaram nas folhas externas sintomas como amolecimento e manchas escuras, culminando no apodrecimento da folha. Segundo Lopes e Quezado-Duval (1998), esses sintomas são comuns em plantações de alface e são causados por fungo ou bactéria, contaminantes do solo ou das mudas utilizadas, que se proliferam com a presença de fatores desencadeantes como a temperatura e a umidade do ar no local do cultivo.

Para o primeiro plantio, esperava-se a colheita de 96 pés de alface, todavia, foram colhidos 73 pés, havendo uma perda de 24%. Já no segundo plantio, não se teve desenvolvimento das mudas de alface, cuja causa pode estar associada à presença do agente patogênico da doença no ambiente e sua disseminação pode ter sido reforçada pelo processo de molhar as plantas por aspersão com auxílio de uma mangueira de jardim.

Assim, a colheita da primeira parcela de alface plantada foi realizada 52 dias após o plantio. Na Tabela 10, tem-se a quantidade de pés de alface por tipo de canteiro no momento da colheita foi de: L3-A lodo tratado (11) e inoculado (2), L4-A tratado (6) e inoculado (8), L5-A tratado (12) e inoculado (12), L6-B tratado (11) e inoculado (11). Os canteiros adubados com lodo dos lotes L3-A inoculado e L4 foram os mais acometidos pela doença, sendo assim, tiveram maior proporção de perda total de plantas. Em todos os canteiros, à medida que os sintomas eram detectados nas folhas, as mesmas eram descartadas, o que causou a redução no tamanho do pé de alface e impossibilitou a análise do pé de alface de forma mais efetiva, uma vez que as folhas mais externas eram as que apresentavam maior contato com o solo e com as plantas adjacentes, e por isso, teriam maior probabilidade de estarem contaminadas.

Tabela 10 – Número de pés de alface existentes no canteiro no momento da colheita e número de amostras originadas dos pés de alface segundo o tipo de lodo utilizado na adubação do canteiro no primeiro plantio de alface, setembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote de lodo de esgoto	Número de pés de alface remanescentes		Número de amostras	
	Tratado	Inoculado	Tratado	Inoculado
L3 classe A	11	2	20	3
L4 classe A	6	8	12	18
L5 classe A	12	12	23	23
L6 classe B	11	11	21	23
Total	40	33	76	67

Devido aos problemas mencionados, os pés de alface remanescentes passaram a ter tamanhos diferentes caracterizados como: pequeno, intermediário e normal. No preparo das amostras para análise, primeiramente, os pés de alface foram separados e identificados conforme o canteiro de origem e separados pelos tamanhos observados. A amostragem de cada planta de acordo com o tamanho se deu da seguinte forma: planta de tamanho pequeno conformou uma amostra ou foi fracionada em duas amostras de 10g; planta de tamanho intermediário deu origem a uma amostra de 10g composta por folhas externas e internas; já planta de tamanho normal teve duas amostras de 10 g formadas por folhas externas e internas. O número de amostras por tipo de canteiro está apresentado na Tabela 10, sendo que no total foram produzidas 143 amostras de alface, 76 de canteiros com lodo tratado e 67 de canteiros com lodo inoculado.

A estratégia de realizar o cultivo das hortaliças em estufa de secagem com intuito de protegê-los do acesso de animais e de variações climáticas adversas não foi bem sucedida e pode ter interferido de maneira negativa nos resultados do experimento, na medida em que temperaturas máximas diárias poderiam chegar a 50°C, as quais são inadequadas à germinação de sementes de cenoura, que deve ocorrer de forma rápida e uniforme sob 20° a 30°C. Posteriormente, o alongamento e pigmentação da raiz acontecem sob 18 e 25°C; ou seja, temperaturas superiores a 30°C comprometem o ciclo vegetativo da planta (Vieira *et al.*, 1999).

Enfim, a variação da temperatura e da umidade do ar dentro da estufa ao longo do dia foi um evento desfavorável para o desenvolvimento das plantas, além de propício ao aparecimento da doença observada nas plantas de alface e oportuno a um decaimento microbiano superior ao que normalmente possa ocorrer em cultivo realizado ao ar livre.

Conforme os resultados apresentados no item 6.3, a recuperação de vírus das amostras de alface foi realizada com aplicação do Protocolo 1, eluição com solução de extrato de carne 1% pH 9 suplementada com glicina (50 mM) e MgCl₂(50 mM) seguida de concentração por floculação orgânica). Todas as amostras de alface foram negativas para colifagos somáticos. Já para vírus entéricos cultiváveis, apenas sete amostras (38,9%) do canteiro L4-A inoculado foram consideradas positivas sem possibilidade de cálculo do título viral, porque

foi verificado efeito citopático somente na monocamada de células RD das réplicas (1 a 8 poços) da menor diluição (1:10) utilizada no teste.

Considerando as condições de plantio e o tempo de cultivo de 52 dias da hortaliça, esse resultado evidencia a baixa possibilidade contaminação de alface cultivada em solo adubado com lodo de esgoto Classe A ou B ou ainda com concentrações de vírus entre 10^4 a 10^5 UFP/ g ST. Isso contraria as recomendações presentes no Artigo 12 da Resolução CONAMA nº375/2006, o qual proíbe a utilização de qualquer Classe de lodo de esgoto no cultivo de plantas cuja parte comestível entra em contato com o solo; além de ainda restringir o plantio desse tipo de hortaliça em solo que tenha recebido lodo de esgoto para somente após um período mínimo de 48 meses da última aplicação. Assim, evidencia-se que essa restrição da Resolução que é incoerente, principalmente, com relação ao tempo mínimo de espera entre a aplicação do lodo ao solo e à realização do plantio de diferentes tipos de culturas, pois, sabe-se que a sobrevivência de microrganismos patogênicos no solo adubado com lodo varia de dias a alguns poucos meses (Straub *et al.*, 1993; Zaleski *et al.*, 2005; Poucher *et al.*, 2007; Campos *et al.*, 2013; Schwarz *et al.*, 2014).

6.3. Avaliação de técnica para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos de amostras de alface

Para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos a partir de amostras de alface foram testados quatro protocolos baseados em etapas de eluição e de concentração. A ordem decrescente de recuperação de Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174 entre os protocolos foi: protocolo1 > protocolo 2 > protocolo 4 > protocolo 3 (Tabela 11 e Anexos 12 a 15). As recuperações de Poliovírus foram mais bem sucedidas que as observadas para Phi X174, principalmente, utilizando-se flocculação orgânica como técnica de concentração (Protocolos 1 e 2).

Tabela 11 – Recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 inoculados em amostras de alface segundo protocolo testado

Protocolo	Número de testes	Recuperação (%)			
		Poliovírus 1 Sabin		Phi X174	
		Média	Mínimo - Máximo	Média	Mínimo - Máximo
1 [#]	9	21,38	0,93 - 52,23	4,04	0,29 - 6,94
2 ^{\$}	9	19,13	3,94 - 39,39	2,19	0,40 - 3,75
3 [¥]	9	0,41	0,04 - 1,24	0,24	0,07 - 0,75
4 [§]	9	1,09	0,07 - 3,94	0,45	0,10 - 1,59

(Eluente com extrato de carne 1% pH 9 + concentração por floculação); \$ (Eluente com extrato de carne 3% pH 9 + concentração por floculação); ¥ (Eluente com extrato de carne 1% pH 9 + concentração por filtração); § (Eluente com extrato de carne 3% pH 9 + concentração por filtração).

Na Tabela 12, observa-se pouca diferença na média de recuperação para cada tipo de vírus com relação à concentração do extrato de carne (1% e 3%). De acordo com a Tabela 13, houve nítida diferença entre enterovírus e colifagos somáticos conforme a técnica de concentração utilizada, de forma que floculação orgânica apresentou melhor desempenho que a filtração ($p < 0,001$).

Tabela 12 – Médias percentuais de recuperação de vírus segundo a solução de eluição utilizada na recuperação de vírus de amostras de alface inoculadas com Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174.

Vírus	Extrato de carne 1% + glicina (50mM) + MgCl ₂ (50mM)		Extrato de carne 3% + glicina (50mM) + MgCl ₂ (50mM)	
	n	Média (Mínimo – Máximo)	n	Média (Mínimo – Máximo)
Poliovírus 1 Sabin	18	10,89 (0,04 - 52,23)	18	10,11 (0,07 - 39,39)
Colifago somático Phi X174	18	2,14 (0,07 - 6,94)	18	1,37 (0,10 - 3,75)

Tabela 13 – Médias percentuais de recuperação de vírus segundo procedimento de concentração para recuperação de vírus de amostras de alface inoculadas com Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174.

Vírus	Floculação		Filtração	
	n	Média (Mínimo – Máximo)	n	Média (Mínimo – Máximo)
Poliovírus 1 Sabin	18	20,25 (0,93 -52,23)	18	0,75 (0,04 – 3,94)
Colifago somático Phi X174	18	3,12 (0,29 – 6,94)	18	0,33 (0,07 – 1,59)

7. CONCLUSÕES

O tratamento por secagem em estufa de secagem se mostrou eficiente como processo de higienização de lodo de esgoto, proporcionando a obtenção, em aproximadamente 50 a 60 dias de tratamento, de um produto estável, seco, granulado, com reduzido volume e em conformidade com o padrão Classe A para *E. coli* conforme a Resolução CONAMA 375/2006.

A caracterização virológica das amostras de lodo de esgoto durante a secagem em estufa de secagem foi insatisfatória. Enterovírus cultiváveis não foram detectados e as contagens de colifagos somáticos foram erráticas, não permitindo avaliar o decaimento desses vírus no lodo. No entanto, a detecção de colifagos somáticos em concentrações superiores a 10^3 UFP/g ST em amostras com baixo teor de umidade de lotes de lodo com qualidade Classe A ou B aponta para a possível resistência desses bacteriófagos às condições de tratamento por secagem em estufa de secagem. O ensaio de contaminação dos lotes de lodo de esgoto com enterovírus e bacteriófago de referência apontou para maior persistência de colifagos somáticos em relação a enterovírus à temperatura variável da estufa de secagem e à 60°C.

A caracterização da exposição ao lodo durante o tratamento na estufa e no uso agrícola do lodo mostrou que a exposição à qual trabalhadores do serviço de saneamento, trabalhadores rurais e consumidores estariam sujeitos não é relevante, visto os baixos níveis de contaminação por *E. coli* e/ou vírus

constatados nas amostras de água de lavagem das mãos, solo+biossólido e de alface. Portanto, sugere-se que as restrições quanto ao uso agrícola de lodo de esgoto impostas pela legislação brasileira são muito rigorosas, principalmente, com relação ao uso do lodo classe A. Destaca-se a importância do uso de equipamentos de proteção individual (jaleco, óculos, máscara e luvas) por trabalhadores em cenários iguais ou próximos aos que foram avaliados, nos quais o indivíduo exposto estaria protegido por mais uma barreira, esta que não é valorizada e nem orientada de forma sistemática aos trabalhadores pela legislação brasileira.

8. CONTRIBUIÇÕES PARA O CONHECIMENTO

O presente trabalho foi o primeiro a tentar pesquisar ao mesmo tempo vírus entéricos infecciosos e colifagos somáticos com objetivo de estabelecer o perfil de decaimento e da relação das concentrações desses vírus em lodo de esgoto submetido à secagem em estufa agrícola. E, além disso, caracterizou a exposição humana (trabalhadores e consumidores) em cenários de manejo e utilização agrícola do lodo tratado.

Com base nos cenários avaliados, é exequível a recuperação de vírus de amostras de lodo de esgoto com diferentes teores de umidade, no entanto, o isolamento de vírus entéricos infecciosos, que ocorre por meio cultivo celular, mostrou-se trabalhoso e limitado quando se utiliza somente uma linhagem de células. Demonstrou-se, mais uma vez conforme outras pesquisas, a facilidade na detecção e quantificação de colifagos somáticos em amostras de lodo de esgoto e de forma inovadora de amostras de solo+biossólido.

O tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola, com revolvimento manual da leira de lodo uma vez por semana, durante 50-60 dias, realizado em localidades com condições climáticas semelhantes às encontradas em Viçosa-MG, é praticável e eficiente ao proporcionar redução das concentrações de bactérias indicadoras a níveis não significativos, elevada redução do volume e obtenção de produto seco granulado. Portanto, para o Brasil,

que recebe intensa radiação solar, a secagem em estufa agrícola pode ser recomendada como processo de tratamento para redução adicional de patógenos.

Na secagem do lodo em estufa, o uso de ferramentas como enxada ou pá reduz o contato das mãos com a massa do lodo durante o revolvimento da mesma, que somada ao uso de luvas, reduzem muito a contaminação das mãos e, conseqüentemente, a exposição do indivíduo durante esse manejo. Contudo, à medida que o lodo perde umidade e fica seco, proporcionalmente, forma-se uma névoa de poeira fina, que demanda a utilização de máscara confeccionada com material resistente e com a presença de filtros para garantir proteção das vias aéreas do indivíduo. Assim, nessa forma de tratamento do lodo, por secagem, a exposição aérea é mais importante que a por ingestão.

Com relação à exposição humana no uso agrícola, novamente, a contaminação das mãos parece não ser significativa, mesmo havendo contato direto das mãos com a mistura solo adubado com biossólido durante o plantio de hortaliças como alface e cenoura. O período de cultivo da planta contribui para o decaimento de vírus e colifagos somáticos foram resistentes, sendo recuperados 52 dias após o plantio, contudo, em concentrações muito reduzidas. O estudo compactuou com outras pesquisas, que apontaram a resistência de colifagos somáticos à temperaturas superiores a 40°C e demonstrou a capacidade de sobrevivência desse bacteriófago em lodo de esgoto seco (teor de umidade menor que 20%).

9. RECOMENDAÇÕES

Ainda persistem as indagações iniciais quanto à eficiência de inativação desse processo de higienização sobre as densidades de vírus entéricos e colifagos somáticos, além da relação entre as contagens desses vírus e, também, destes com as densidades de indicadores bacterianos. Para afirmar que amostras são livres de vírus, sugere-se a utilização de métodos de biologia molecular em conjunto com os de cultivo celular. Além disso, a passagem das amostras em outros tipos celulares, principalmente, em células A549, que tem sido apontada como a linhagem mais apropriada para isolamento e quantificação de enterovírus.

Orienta-se, também, realizar monitoramento das amostras em intervalos de tempo menores e utilizar a menor diluição não tóxica das amostras nas técnicas de quantificação.

Sabe-se que a população viral em amostras de lodo pode oscilar em função de diversos fatores, podendo dificultar a obtenção de resultados consistentes, sendo assim, acredita-se que a execução, paralela à pesquisa de campo, de experimentos de contaminação artificial de amostras de lodo com vírus de referência possa garantir a efetiva coleta de dados para avaliação do comportamento desses organismos.

Por último, uma vez consolidado amplo banco de dados em diferentes cenários, é importante o exercício de aplicação da metodologia Avaliação Quantitativa de Risco (AQRM) para dimensionar os riscos à saúde associados ao tratamento do lodo por secagem em estufa agrícola e ao uso do lodo tratado como adubo orgânico alternativo na agricultura.

10. REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, H.W. Bacteriophage taxonomy. *Microbiology Australia*, p.90-94, 2011.
- ARRAJ, A.; BOHATIER, J.; LAVERAN, H.; TRAORE, O. Comparison of bacteriophage and enteric virus removal in pilot scale activated sludge plants. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.516-524, 2005.
- ASTALS, S.; VENEGAS, C.; PECES, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; MATA-ALVAREZ, J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, v.46, p.6218-6227, 2012.
- AULICINO, F. A.; COLOMBI, A.; CALCATERRA, E.; CARERE, M.; MASTRANTONIO, A.; ORSINI, P. Microbiological and chemical quality of sludges from domestic wastewater plants. *International Journal of Environmental Health Research*, v.8, n.2, p.137-144, 1998.
- ANDREOLI, C.V. *Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura*. 1a ed. Curitiba: Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), BR, 1999, 98p.
- APHA. AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. AWWA - AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION. WPCF - WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 22.ed. Washington, DC.2012, 1360p.
- AWPRC Study Group on Health Related Water Microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Water Research*, v.25, p.529-545, 1991.
- BARBOSA, G.M.C.; FILHO, J.T.; BRITO, O.R.; FONSECA, I.C.B. Efeito residual do lodo de esgoto na produtividade do milho safrinha. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.31, p.601-605, 2007.
- BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; DIAS, G.M.F.; BARONY, F. J. A. 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*, v.2, p.143-159, 2009.
- BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; MARA, D.D. Análise crítico-comparativa das normas brasileira, estadunidense, e britânica de qualidade microbiológica de biossólidos para uso agrícola. *Revista DAE*, v.191, p. 10-20, 2013.
- BELGUITH, K.; HASSEN, A.; AOUNI, M. Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge. *Bioresource Technology*, v.97, p.414-419, 2006.

BENNAMOUN, L. Solar drying of wastewater sludge: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.16, p.1061–1073, 2012.

BENNAMOUN, L.; ARLABOSSE, P.; LÉONARD, A. Review on fundamental aspect of application of drying process to wastewater sludge. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v.28, p.29-43, 2013.

BERG, G.; BERMAN, D. Destruction by Anaerobic Mesophilic and Thermophilic Digestion of Viruses and Indicator Bacteria Indigenous to Domestic Sludges. *Applied and Environmental Microbiology*, v.39, n.2, p.361-368, 1980.

BERTRAND, I.; SCHIJVEN, J. F.; SÁNCHEZ, G., WYN-JONES, P.; OTTOSON, J.; MORIN, T.; MUSCILLO, M.; VERANI, M.; NASSER, A.; RODA HUSMAN, A. M.; MYRMEL, M.; SELLWOOD, J.; COOK, N.; GANTZER, C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *Journal of Applied Microbiology*, v.112, p.1059–1074, 2012.

BIOFILL-MAS, S.; ALBINANA-GIMENEZ, N.; CLEMENTE-CASARES, P.; HUNDESA, A.; RODRIGUEZ-MANZANO, J.; ALLARD, A. Quantification and stability of human adenovirus and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices. *Applied and Environmental Microbiology*, v.72, n.12, p.7894–6, 2006.

BITTON, G.; PANCORBO, C.; FARRAH, S.R. Virus transport and survival after land application of sewage sludge. *Applied and Environmental Microbiology*, v.47, n.5, p. 905-909, 1984.

BLAISE-BOISSEAU, S.; COLLETTE, C.H.; GUILLIER, L.; PERELLE, S. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *Journal of Virological Methods*, v.166, p.48–53, 2010.

BOSCH, A. Human enteric viruses in the water environment: a minireview. *International Microbiology*, v.1, p.191-196, 1998.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro, 2000, 397p.

BRASIL. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (2006). Resolução CONAMA-2006, Diário Oficial da União, 30 de agosto de 2006.

BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Pesquisa Nacional de Saneamento Básico. Rio de Janeiro, 2008, 219p.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico Anual dos Serviços de Água e Esgotos. Brasília: SNSA/MCIDADES. Disponível em: < <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>>. Acesso em: 21 fevereiro 2017.

BUTOT, S.; PUTALLAZ, T.; SANCHEZ, G. Procedure for rapid concentration and detection of enteric viruses from berries and vegetables. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.186–192, 2007.

BUX, M.; BAUMANN, R.; QUADT, S.; PINNEKAMP, J.; MÜHLBAUER, W. Volume reduction and biological stabilization of sludge in small sewage plants by solar drying. *Drying Technology*, v. 20, p.829-837, 2002.

CAMPOS, C.; BELTRÁN, M.; DUARTE, M.; MEDINA, L.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Abatement of helminth eggs and bacterial and viral Indicators in soil after land application of treated sludges. *Journal of Water Resource and Protection*, v.5, p.1155-1164, 2013.

CENSUS. Centro de Promoção do Desenvolvimento Sustentável. Retrato de Viçosa 3. Viçosa, MG: CENSUS, 2010.100p.

CHAPRON, C. D.; BALLESTER, N. A.; MARGOLI, A.B. The detection of astroviruses in sludge biosolids using an integrated cell culture nested PCR technique. *Journal Applied and Microbiology*, v.89, p.11–5, 2000.

CHARLES, K.J.; SHORE, J.; SELLWOOD, J.; LAVERICK, M., HART, A.; PEDLEY, S. Assessment of the stability of human viruses and coliphage in groundwater by PCR and infectivity methods. *Journal of Applied Microbiology*, v.106, n.6, p.1827-1837, 2009.

CHAURET, C.; SPRINGTHROPE, S.; SATTAR, S.. Fate of *Cryptosporidium* oocysts, *Giardia* cysts and microbial indicators during wastewater treatment and anaerobic sludge digestion. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 45, p.257-262, 1999.

CHIBA, M.K.; MATTIAZZO, M.E.; OLIVEIRA, F.C. Cultivo de cana-de-açúcar em argissolo tratado com lodo de esgoto. II- Fertilidade do solo e nutrição da planta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p.653-662, 2008.

COMPARINI, J.B; SOBRINHO, P.A. Decaimento de patógenos em bio sólidos submetidos à secagem em estufa de secagem. In: Congresso Interamericano de Engenharia Sanitária e Ambiental, 28, Anais... México (Cancún), p.1-8, 2002.

COOPER, P.D. A method for producing plaques in agar suspensions of animal cells. *Virology*, v.1, p.397-401, 1955.

COOPER, P.D. The plaque assay of animal viruses. *Advances in virus research*, v.8, p.319-378, 1962.

DIAS, E.H.O. Tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa: higienização e produção de biossólidos para uso agrícola. 2012. 160f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

DAELEMANS, D.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E.D.; PANNECOUQUE, C. A time-of-drug addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nature Protocols*, v.6, n.6, p.925-93, 2011.

DE PAULA, V.S.; GASPAR, A.M.C.; VILLAR, L.M. Optimization of methods for detecting hepatitis A virus in food. *Food and Environmental Virology*, v.2, p.47-52, 2010.

DUBOIS, E.; HENNECHART, C.; DEBOOSÉRE, N.; MERLE, G.; LEGEAY, O.; BURGER, C.; LE CALVE, M.; LOMBARD, B.; FERRE, V.; TRAORE, O. Intra-laboratory validation of a concentration method adapted for the enumeration of infectious F-specific RNA coliphage, enterovirus, and hepatitis A virus from inoculated leaves of salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*, v.108, p.164-171, 2006.

DUBOIS, E.; HENNECHART, C.; MERLE, G.; BURGER, C.; HMILA, N.; RUELLE, S.; PERELLE, S.; FERRE, V. Detection and quantification by real-time RT PCR of hepatitis A virus from inoculated tap waters, salad vegetables, and soft fruits: characterization of the method performances. *International Journal of Food Microbiology*, v.117, p.141-149, 2007.

DULBECCO, R. Production of plaques in monolayer tissue cultures by single particles of an animal virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.*, v.38, p.747-752, 1952.

ENVIRONMENT AGENCY. *The Microbiology of Sewage Sludge (2003) - Part 3 - Methods for the isolation and enumeration of Escherichia coli, including verocytotoxigenic Escherichia coli*. UK, 2003, p.44.

FONG, T.; LIPP, E. K. Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: Health risks, detection and potential water quality assessment tools. *Microbiology and molecular microbiology reviews*, n 2, p. 357-371, 2005.

FUNDBERG, S. W.; SORBER, C. A. Coliphage as indicators of enteric viruses in activated sludge. *Water Research*, v.19, n.5, p-547-555, 1985.

GANTZER, C.; MAUL, A.; AUDIC, J.M.; SCHWARTZBROD, L. Detection of infectious enteroviruses, phages in treated wastewater coliphages, and

Bacteroides fragilis enterovirus genomes, somatic. Applied and Environmental Microbiology, v.64, n.11, p.4307-4312, 1998.

GERBA, C. P.; GOYAL, S. M.; CECH, I.; BOGDAN, G. F. Quantitative assessment of the adsorptive behavior of viruses to soils. Environmental. Science and Technology, v.15, p.940-944, 1981.

GERBA, C. P.; ROSS, A.; TAKIZAWA, K.; PEPPER, I. L. Efficiency of ASTM method D4994-89 for recovery of enteric viruses from biosolids. Food Environmental Virology, v.3, p.43-45, 2011.

GOMES, S.B.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; BIONDI, C.M. Produtividade e composição mineral de plantas de milho em solo adubado com lodo de esgoto. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v.11, n.5, p.459-465, 2007.
GOYAL, S. M.; GERBA, C. P. Comparative adsorption of human enteroviruses, simian rotavirus, and selected bacteriophages to soils. Applied Environmental Microbiology, v.38, p.241-247, 1979.

GRABOW, W, HOLTZHAUSEN, C. S.; DE VILLIERS, J. C. Research on Bacteriophages as Indicators of Water Quality. WRC Report No 321/1/93, Water Research Commission, Pretoria. p.147, 1993.

GRABOW, W. Bacteriophages: Update on application as models for viruses in water. Water South African, v.27, n.2, p. 251-268, 2001.

GRAFF, J.; TICEHURST, J.; FLEHMIG, B. Detection of hepatitis a virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, v.59, n.10, p.3165-3170, 1993.

GRIFFIN, D. W.; DONALDSON, K. A.; PAUL, J. H.; ROSE, J. B. Pathogenic human viruses in coastal waters. Clinical Microbiology Reviews. n 16, p 129-143, 2003.

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

GUZMÁN, C.; JOFRE, J.; MONTEMAYOR, M.; LUCENA, F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolid. Journal Applied Microbiology, v.103, p.2420-2429, 2007.

HAMPARIAN, V.V.; OTTOLENGHI, A.C.; HUGHES, J.H. Enteroviruses in Sludge: Multiyear Experience with Four Wastewater Treatment Plants. Applied and Environmental Microbiology, v.50, n.2, p. 280-286, 1985.

HIERHOLZER, J.C.; KILLINGTON, R.A. Virus isolation and quantitation. In: MAHY, B.W.J; KANGRO, H.O (Eds.) Virology Methods Manual, 1a ed., Academic Press, UK, 1996, p. 25-45.

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

HURST, C.J. Influence of aerobic microorganisms upon virus survival in soil. Canadian Journal of Microbiology, v.34, p.696-699, 1988.

HOT, D.; LEGEAYB, O.; JACQUESA, J.; GANTZERC, C.; CAUDRELIERB, Y.; GUYARDB, K.; LANGE, M.; ANDREOLETTI, L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. Water Research, v.37, p. 4703–4710, 2003.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estimativas populacionais para os municípios e para as Unidades da Federação brasileiros em 01.07.2015. Disponível em <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/estimativa2015/default.shtm>>. Acesso em: 23 fevereiro 2017.

ISO - INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 1: Enumeration of Somatic Coliphages; ISO-10705-1; International Standardization Organization: Geneva, Switzerland, 2001a.

ISO - INTERNATIONAL STANDARDIZATION ORGANIZATION. Water Quality - Detection and Enumeration of Bacteriophages - Part 2: Enumeration of Somatic Coliphages; ISO-10705-2; International Standardization Organization: Geneva, Switzerland, 2001b.

INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES. Virus Taxonomy: 2015 Release. EC 47, Londres, UK, Julho, 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp>>. Acesso em: 05 setembro 2016.

JEBRI, S.A.; HMAIEDA, F.; LUCENA, F.; SAAVEDRAB, M.E.; YAHYAA, M.; HAMDIC, M. A comparison of two extraction methods for the detection of Enteroviruses in raw sludge. Journal of Virological Methods, v200, p.1–5, 2014.

JOFRE, J. Is the replication of somatic coliphages in water environments significant? Journal of Applied Microbiology, v.106, p.1059-1069, 2009.

JOFRE, J.; LUCENA, F.; BLANCH, A.R.; MUNIESA, M. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. Water, v. 8, n.199, p.1-21, 2016.

JOHNSTON, S.L.; SIEGEL, C.S. Presumptive identification of enteroviruses with RD, HEp-2, and RMK cell lines. *Journal of Clinical Microbiology*, v.28, n.5, p.1049-1050, 1990.

JORDÃO, E.P.; PESSÔA, C.A. Tratamento de Esgotos Domésticos. 6.ed. Rio de Janeiro: ABES, 2011, 1050p.

KATZENELSON, E.; FATTAL, B.; HOSTOVESKY, T. Organic flocculation: na e efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water. *Applied Environmental Microbiology*, v.32, n.4, p.638-639, 1976.

KOTT, Y.; ROZE, N.; SPERBER, S.; BETZER, N. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Research*, v.8, p.165-171, 1974.

KUMAR, A.; WONG, K.; XAGORARAKI, I. Effect of Detection Methods on Risk Estimates of Exposure to Biosolids-Associated Human Enteric Viruses. *Risk Analysis*, v.32, n.5, p-916-929, 2012.

LASOBRAS, J.; DELLUNDE, J.; JOFRE, J.; LUCENA, F. Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *Journal of Applied Microbiology*, v.86, p.723-729, 1999.

LEVANTESI, C.; BEIMFOHR, C.; BLANCH, A. R.; CARDUCCI, A.; GIANICO, A.; LUCENA, F.; TOMEI, M. C.; MININNI, G. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n.10, p.7237–7247, 2014.

LIMA, M.R.P. Uso de estufa de secagem para secagem e higienização de lodo de esgoto. 2010. 284f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2010.

LOPES, C.A.; QUEZADO-DUVAL, A.M. Doenças da alface. Circular Técnica Da Embrap Hortaliças. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1998, p-20.

LOVE, D.C.; CASTEEL, M.J.; MESCHKE, J.S.; SOBSEY, M.D. Methods for recovery of hepatitis A virus (HAV) and other viruses from processed foods and detection of HAV by nested RT-PCR and TaqMan RT-PCR. *International Journal of Food Microbiology*, v.126, p.221–226, 2008.

LUCENA, F.; MENDEZ, X.; MORON, A.; CALDERON, E.; CAMPOS, C.; GUERRERO, A.; CARDENAS, M.; GANTZER, C.; SHWARTZBROOD, L.; SKRABER, S. Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America *Journal of Applied Microbiology*, v.94, p.808-815, 2003.

LUCENA, F.; BLANCH, A.R.; JOFRE, J. Critical review on Methods for bacteriophages (and viruses) to be monitored in EU in sludges, soils and treated biowastes. University of Barcelona – HORIZONTAL-HYG, DL 2/4.2 Report. p. 1-62, 2005.

LUCENA, F.; JOFRE, J. Potential use of bacteriophages as indicators of water quality and wastewater treatment processes. In: SABOUR, P.M.; MANSEL, W. GRIFFITHS, M.W. Bacteriophages in the Control of Food and Waterborne Pathogens. Washington DC: ASM Press, 2010. cap. 6, p. 103-118.

LUKASIK, J.; SCOTT, T.M.; ANDRYSHAK, D.; FARRAH, S.R. Influence of salts on virus adsorption to microporous filters. Applied and Environmental Microbiology, v.66, n.7, p. 2914-2920, 2000.

MAGALHÃES, T.B. Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da Resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico. 2012. 180f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2012.

MANDILARA, G.D.; SMETI, E.M.; MAVRIDOU, A.T.; LAMBIRI, M.P. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. FEMS Microbiology Letters, v.263, 2006, p.119-126.

MARTÍN-DÍAZ, J.; CASAS-MANGAS, R.; GARCÍA-ALJARO, C.; BLANCH, A.R.; LUCENA, F. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. Water Science e Technology, v.73, n.9, p.2182-2188, 2016.

MATHIOUDAKIS, V.L.; KAPAGIANNIDIS, A.G.; ATHANASOULIA, E.; DIAMANTIS, V.I.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. Extended Dewatering of Sewage Sludge in Solar Drying Plants. Desalination, v. 248, 2009, p.733-739.

MIGNOTTE-CADIERGUES, B.; GANTZER, C.; SCHWARTZBROD, L. Evaluation of bacteriophages during the treatment of sludge. Water Science and Technology, v.46, n.10, p.189-94, 2002.

MOCE-LLIVINA, L.; MUNIESA, M.; PIMENTA-VALE, H.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Survival of bacterial Indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. Applied and Environmental Microbiology, v. 69, n.3, 2003, p.1452-1456.

MONPOEHO, S.; MAUL, A.; BONNIN, C.; PATRIA, L.; RANARIJAONA, S.; BILLAUDEL, S.; FERRÉ, V. Clearance of Human-Pathogenic Viruses from Sludge: Study of Four Stabilization Processes by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Cell Culture. Applied and Environmental Microbiology, v. 70, n. 9, p. 5434-5440, 2004.

MUNIESA, M.; JOFRE, J. Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment. *Antonie Van Leeuwenhoek*, v.86, p.65-76, 2004.

MURTHI, P.; PRAVEEN, C.; JESUDHASAN, P.R.; PILLAI, S.D. Comparing extraction buffers to identify optimal method to extract somatic coliphages from sewage sludges. *Bioresource Technology*, v.118, p.407-411, 2012.

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

NOGUEIRA, T.A.R.; OLIVEIRA, L.R.; MELO, W.; FONSECA, I.M.; MELO, G.M.P.; MELO, V.P.; MARQUES, M.O. Cádmio, cromo, chumbo e zinco em plantas de milho e em latossolo após nove aplicações anuais de lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v.32, p.2195-2207, 2008.

NRC - National Research Council. Indicators for Waterborne Pathogens. Washington, D.C: The National Academies Press, 2004. 332p.

PRADO, T.; GUILAYN, W.C.P.B.; GASPAR, A.M.; MIAGOSTOVICH, M.P. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.108, n.1, p.77-83, 2013.

PASCUAL-BENITO, M.; GARCÍA-ALJARO, C.; CASANOVAS-MASSANA, S.; BLANCH, A.R.; LUCENA, F. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology*, v.118, n.2, p. 412-418, 2015.

PINA, S.; PUIG, M.; LUCENA, F.; JOFRE, J.; GIRONES, R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 0099-v.64, n.9, p. 3376–3382, 1998.

POPAT, S.C., YATES, M.V., DESHUSES, M.A. Kinetics of inactivation of indicator pathogens during thermophilic anaerobic digestion. *Water Research*, v.44, p.5665-5972, 2010.

POURCHER, A. N.; BONNAUD, FRANCOISE, P.B.; VIRGINIE, F.; AGNIESZKA, G.; VASILICA, S.; GÉRARD, M. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, v.35, p.473-479, 2007.

PRIM, N.; RODRIGUEZ, G.; MARGALL, N.; DEL CUERPO, M.; TRALLERO, G.; RABELLA, N. Combining Cell Lines to Optimize Isolation of Human Enterovirus From Clinical Specimens: Report of 25 Years of Experience. *Journal of Medical Virology*, v.85, p.116-120, 2013.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. American Journal of Hygiene, v.27, p.493-497, 1938.

RHODES, E. R.; BOCZEK, L.A.; WARE, M.W.; MCKAY, M.; HOELLE, J.M.; SCHOEN, M.; VILLEGAS, D. N. Determining pathogen and indicator levels in class B municipal organic residuals used for land application. Journal Environmental Quality, v.44, p.265-274, 2015.

RZEZUTKA, A.; COOK, N. Survival of human enteric viruses in the environment and food. FEMS Microbiology Reviews, v.28, p.441-453, 2004.

ROMDHANAA, M.H.; LECOMTEA, D.; LADEVIEA, B.; SABLAYROLLES, C. Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. Process Safety and Environmental Protection, v.87, p.377-386, 2009.

SALIHOGU, N. K.; PINARLI, V.; SALIHOGU, G. Solar drying in sludge management in Turkey. Renewable Energy, v.32, p.1661-1675, 2007.

SALVADOR, R.M. Detecção e quantificação de Enterovírus em lodo de esgoto proveniente de estações de tratamento de esgoto com potencial uso na agricultura do estado de São Paulo. 2011.72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, 2011.

SATO, M.I.Z.; HACHICH, E.M.; RAZZONOLI, M.T.P.; NARDOCCI, A.C.; LAURETTO, M.S.; MEHNERT, D.U. Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico como Instrumento de Tomada de Decisão na Área de Saneamento. Documento Básico da Rede Prosab Microbiologia para o Saneamento Ambiental. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2012.46p.

SCHWARZ, K.R.; SIDHU, J.P.S.; PRITCHARD, D.L.; LI, Y.; TOZE, S. Decay of enteric microorganisms in biosolids amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) Cultivation. Water Research, v.59, p.185-197, 2014.

SHANAHAN, E.F.; ROIKO, A.; TINDALE, N.W.; THOMAS, M.P.; WALPOLE, R.; KURTBÖKE, D.I. Evaluation of pathogen removal in a solar sludge drying facility using microbial indicators. Environmental Research and Public Health, v. 7, p.565-582, 2010.

SHE, R.C.; CRIST, G.; BILLETDEAUX, E.; LANGER, J.; PETTI, C.A. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective. Journal of Clinical Virology, v.37, p.151-155, 2006.

SCHLINDWEIN, A. D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES C. M. O.; BARARDI, C. R. M. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. Water Science e Technology, v. 61, n.2, p. 537-544, 2010.

SCHWARTZBROD, L.; MATHIEU, C. Virus recovery from wastewater treatment plant sludges. Water Research, v. 20, n.8, p.1011-1013, 1986.

SCHWARZ, K.R.; SIDHU, J.P.S.; PRITCHARD, D.L.; LI, Y.; TOZE, S. Decay of enteric microorganisms in biosolids amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) Cultivation. Water research, 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, v.35, p.187-201, 2009.

SIMMONS, F.J.; XAGORARAKI, I. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. Water Research, v.45, p.3590-3598, 2011.

SOARES, A. C.; STRAUB, T. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.. Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses and Giardia cysts in sewage sludge. Journal of Environmental Science and Health, v. 29, p.1887-1897, 1994.

SOBSEY, M.D.; DEAN, C. H.; KNUCKLES, M. E.; WAGNER, R.A. Interactions and survival of enteric viruses in soil materials. Applied and Environmental Microbiology, v.40, p.92-101, 1980.

SONG, I.; DOMINGUEZ, T.; CHOI, C. Y.; KANG, M.S. Impact of tilling on biosolids drying and indicator microorganisms survival during solar drying process, Journal of Environmental Science and Health, v.49, n.14, p.1701-1709, 2014.

STRAUB, T. M.; PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.. Hazards from pathogenic microorganisms in land disposed sewage sludge. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, v. 132, p.55-91, 1993.

STRAUB, T.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Detection of naturally occurring enteroviruses and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. Canadian Journal of Microbiology, v.40, p.884-888, 1994.

SYPUŁA, M.; PALUSZAK, Z.; LIGOCKA, A.; SKOWRON, K. Effects of spring season solar drying process on sanitation indicators in sewage sludge and potential as a method for fertilizer production. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, v.20, n.1, p.8-12, 2013.

TARTERA, C.; JOFRE, J. Bacteriophages Active against Bacteroides fragilis in Sewage-Polluted Waters. Applied and Environmental Microbiology, v.53, n.7, p.1632-1637, 1987.

TAVARES, T. M.; CARDOSO, D. D. P.; BRITO, W. M. E. D. Vírus entéricos veiculados por água: aspectos microbiológicos e de controle de qualidade da água. Revista de Patologia Tropical, n. 2, p. 85-104, 2005.

TCHOBANAGLOUS, G.; BURTON, F.L.; STENSEL, H.D. Wastewater Engineering Treatment and Reuse. 4.ed. Boston: Metcalf & Eddy, Inc., 2003, 1846p.

TIERNEY, J. T.; SULLIVAN, R.; LARKIN, E. P. Persistence of Poliovirus 1 in soil and on vegetables grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluent. Applied and Environmental Microbiology, v.33, n.1, p. 109-113, 1977.

UFV. UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. Departamento de Engenharia Agrícola. Estação Climatológica Principal de Viçosa. Boletim meteorológico 2017. Viçosa, 2017. Disponível em: http://www.posmet.ufv.br/?page_id=1253>. Acesso em: 23 fevereiro 2017.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Biosolids Generation, Use, and Disposal in the United States. Washington, 1999. 81 p.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1601: Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in Water by Two-step Enrichment Procedure; EPA 821-R-01-030; Washington, DC, USA, 2001a.p.40

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 1602 - Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in water by Single Ágar Layer (SAL) procedure .EPA 821-R-01-029. Washington, D.C. 2001b. p.38.

USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. The standards for the use or disposal of sewage sludge. Washington, DC: Federal Register, Code of Federal Regulations [CFR], Title 40, Part 503. 1993.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Environmental Regulations and Technology - Control of Pathogens and Vector Attraction in Sewage Sludge (Including Domestic Septage). Under 40 CFR Part 503. Appendix H - Method for the recovery and assay of total culturable viruses from sludge, p. 150, EPA/625/R-92/013, 2003.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guidelines for water reuse. Washington, 2004. 28 p.

USEPA: UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods. 3ª ed. Washington, DC. 2004. 910 p.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Preliminary comparative study of methods to extract virus from raw and processed sewage sludge. Washington, D.C. 2007. p.30.

USEPA, UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Review of coliphages as possible indicators of fecal contamination for ambient water quality. Washington, D.C. 2015. p.129.

VASHIST, S.; BAILEY, D.; PUTICS, A.; GOODFELLOW, I. Model systems for the study of human norovirus biology. *Future Virology*, V.4, n.4, p.353–367, 2009.

VIAU, E.; PECCIA, J. Survey of Wastewater Indicators and Human Pathogen Genomes in Biosolids Produced by Class A and Class B Stabilization Treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v.75, n.1, p.164-174, 2009.

VIEIRA, J.D.; PESSOA, H.B.S.V.; MAKISHIMA, N. A cultura da cenoura. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 1999. 77p.

VON SPERLING, M. Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos. 3. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2005. p. 452.

WARD, R. L.; ASHLEY, C.S. Inactivation of Enteric Viruses in Wastewater Sludge Through Dewatering by Evaporation. *Applied and Environmental Microbiology*, v.34, n.5, p. 564-570, 1977.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Volume 2: Wastewater use in agriculture. Geneva: WHO, 2006. 213 p.

WILLIAMS JR, F. P.; HURST, C. J. Detection of environmental viruses in sludge: enhancement of enterovirus plaque assay titers with 5-iodo-2'-deoxyuridine and comparison to adenovirus and coliphage titers. *Water Research*, v. 22, n. 7, p.847-851, 1988.

WONG, K.; ONAN, B.M.; XAGORARAKI, I. Quantification of Enteric Viruses, Pathogen Indicators, and *Salmonella* Bacteria in Class B Anaerobically Digested Biosolids by Culture and Molecular Methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v.76, n.19, p. 6441-6448, 2010.

WU, J.; LONG, S.C.; DAS, D.; DORNER, S.M. Are microbial indicators and pathogens correlated? A statistical analysis of 40 years of research. *Journal of Water and Health*, v.9,n.2, p.265-278, 2011.

WYN-JONES A. P., SELLWOOD J. Enteric viruses in aquatic environment. *Journal of Applied Microbiology*, n. 91, p. 945-962, 2001

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

ZALESKI, K. J.; KAREN, I. J.; GERBA, C. P.; PEPPER, I. L.. Potential regrowth and recolonization of *Salmonellae* and indicators in biosolids and biosolid-amended soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v.71, n.7, p.3701-3708, 2005.

ANEXOS

ANEXO 1

Anexo 1 – Cronograma executado quanto aos dias de coleta de amostras das leiras de lodo de esgoto para análise de parâmetros químico, físicos e microbiológicos conforme o tempo (dias) de secagem dos lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em estufa de secagem, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

LOTE	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	02/02/2015		02/03/2015		30/03/2015		20/04/2015		16/06/2015		20/07/2015		10/08/2015		08/09/2015		16/10/2015	
Descarte do lodo do reator	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias	Data coleta	Dias
Transporte do lodo para estufa de secagem	19/02	0	16/03	0	13/04	0	18/05	0	02/07	0	03/08	0	25/08	0	28/09	0	22/10	0
Tratamento	26/02	7	23/03	7	20/04	7	25/05	7	08/07	6	10/08	7	31/08	6	05/10	7	28/10	6
	02/03	11	30/03	14	27/04	14	03/06	16	13/07	11	17/08	14	08/09	14	13/10	15	10/11	19
	09/03	18	06/04	21	04/05	21	08/06	21	21/07	19	24/08	21	14/09	20	19/10	21	16/11	25
	16/03	25	13/04	28	11/05	28	15/06	28	27/07	25	31/08	28	21/09	27	28/10	30		
	23/03	32	20/04	35	18/05	35	02/07	45	03/08	32	08/09	36	28/09	34	10/11	43		
	30/03	39	27/04	42	25/05	42	08/07	51	10/08	39	14/09	42	05/10	41	16/11	49		
	07/04	47	04/05	49	03/06	50	13/07	56	17/08	46	21/09	49	13/10	49	23/11	56		
	13/04	56	11/05	56	08/06	55	21/07	64	25/08	54	28/09	56	19/10	55				
	20/04	54	18/05	63	15/06	62	27/07	70	31/08	60	05/10	63	28/10	64				
	27/04	61	25/05	70	02/07	79	03/08	77	08/09	68	13/10	71	10/11	77				
			03/06	79	08/07	85	10/08	84	14/09	74	19/10	77	16/11	83				
			08/06	84	13/07	90	17/08	91	21/09	81	28/10	86	23/11	90				
			15/06	91			25/08	99	28/09	88	10/11	99						
			02/07	108			31/08	105	05/10	95	16/11	105						
			08/07	114			08/09	113	13/10	103	23/11	112						
			13/07	119			14/09	119	19/10	109								
							28/09	133	28/10	118								
									10/11	131								
Tempo de tratamento (dias)	61		119		90		133		131		112		90		56		25	
Número de amostras	11		17		13		18		19		16		13		8		4	

ANEXO 2

Anexo 2 - Resultados obtidos do parâmetro pH para as amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH	Tempo (dias)	pH
0	0	6,90	0	5,86	0	5,75	0	4,90	0	6,10	0	6,09	0	6,23	0	5,82	0	6,98
1	7	8,21	7	6,56	7	7,06	7	5,30	6	6,79	7	6,64	6	7,36	7	6,00	6	6,40
2	11	7,12	14	5,48	14	6,23	16	5,20	11	5,46	14	5,51	14	7,20	15	5,80	19	5,92
3	18	5,94	21	5,53	21	5,98	21	5,10	19	5,34	21	5,54	20	7,04	21	5,61	25	6,20
4	25	6,56	28	5,68	28	5,44	28	5,02	25	5,56	28	5,63	27	6,48	30	5,66		
5	32	6,92	35	5,77	35	5,86	45	5,13	32	5,39	36	5,68	34	6,46	43	5,62		
6	39	5,56	42	5,63	42	5,37	51	5,13	39	5,57	42	5,90	41	6,30	49	5,55		
7	47	5,42	49	5,82	50	5,33	56	5,09	46	5,42	49	5,72	49	5,70	56	5,68		
8	56	5,60	56	5,55	55	5,33	64	5,85	54	5,58	56	5,56	55	5,75				
9	54	5,95	63	5,32	62	5,42	70	5,46	60	5,63	63	5,45	64	5,67				
10	61	5,66	70	5,36	79	5,59	77	5,63	68	5,66	71	5,41	77	5,70				
11			79	5,30	85	5,37	84	5,45	74	5,64	77	5,27	83	5,55				
12			84	5,34	90	5,53	91	5,54	81	5,47	86	5,32	90	5,89				
13			91	5,27			99	5,46	88	5,39	99	5,21						
14			108	5,48			105	5,27	95	5,47	105	4,89						
15			114	5,39			113	5,40	103	5,38	112	5,38						
16			119	5,45			119	5,29	109	5,30								
17							133	5,02	118	5,34								
18									131	5,38								

ANEXO 3

Anexo 3 – Resultados obtidos do parâmetro umidade (U) para as amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)	Tempo (dias)	U (%)
0	0	83,15	0	49,52	0	79,84	0	68,21	0	63,59	0	65,40	0	76,39	0	27,13	0	61,39
1	7	75,42	7	47,52	7	71,11	7	63,90	6	57,75	7	61,42	6	43,81	7	13,80	6	36,57
2	11	43,95	14	38,00	14	61,16	16	59,33	11	53,41	14	53,57	14	33,07	15	6,74	19	28,83
3	18	36,51	21	27,40	21	56,79	21	51,55	19	46,84	21	31,23	20	30,28	21	5,51	25	16,24
4	25	22,64	28	25,21	28	50,73	28	47,23	25	34,13	28	31,37	27	20,32	30	3,50		
5	32	10,90	35	16,00	35	38,09	45	38,98	32	34,52	36	30,49	34	15,77	43	2,54		
6	39	7,14	42	14,65	42	35,64	51	35,17	39	26,72	42	17,93	41	7,33	49	2,66		
7	47	3,00	49	13,43	50	22,68	56	31,15	46	21,79	49	10,42	49	4,32	56	2,77		
8	56	5,30	56	8,36	55	18,35	64	23,60	54	8,68	56	9,65	55	4,24				
9	54	3,23	63	6,31	62	15,04	70	21,48	60	6,35	63	4,69	64	4,07				
10	61	4,36	70	6,00	79	9,11	77	15,24	68	5,27	71	3,79	77	2,90				
11			79	4,70	85	8,94	84	13,83	74	4,74	77	3,15	83	2,41				
12			84	4,30	90	7,76	91	10,63	81	4,54	86	2,90	90	2,70				
13			91	3,99			99	1,81	88	3,72	99	2,78						
14			108	4,16			105	3,92	95	2,68	105	2,43						
15			114	6,88			113	3,69	103	3,08	112	2,24						
16			119	6,07			119	4,05	109	2,52								
17							133	4,08	118	2,93								
18									131	2,49								

ANEXO 4

Anexo 4 – Resultados obtidos do parâmetro sólidos totais (ST) para as amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)	Tempo (dias)	ST (%)
0	0	25,50	0	37,00	0	25,00	0	30,82	0	36,97	0	33,85	0	40,42	0	70,92	0	33,78
1	7	56,00	7	50,48	7	27,83	7	35,53	6	41,16	7	39,30	6	51,77	7	85,56	6	64,00
2	11	38,00	14	59,88	14	36,73	16	39,44	11	46,42	14	44,36	14	63,38	15	91,01	19	71,60
3	18	46,80	21	68,24	21	42,51	21	44,99	19	51,24	21	54,26	20	64,61	21	91,98	25	67,16
4	25	56,67	28	72,79	28	47,58	28	49,91	25	64,36	28	61,23	27	77,83	30	93,00		
5	32	85,13	35	80,76	35	58,97	45	55,82	32	61,10	36	69,28	34	81,34	43	94,50		
6	39	89,89	42	82,59	42	62,81	51	52,08	39	70,52	42	77,02	41	90,46	49	95,52		
7	47	91,59	49	84,17	50	78,74	56	66,26	46	76,37	49	86,48	49	98,46	56	94,30		
8	56	91,82	56	87,32	55	77,00	64	71,64	54	88,64	56	88,25	55	94,52				
9	54	92,89	63	88,71	62	82,33	70	77,13	60	90,54	63	93,26	64	93,72				
10	61	93,57	70	89,37	79	87,63	77	83,32	68	91,54	71	94,00	70	95,80				
11			79	89,92	85	89,28	84	85,30	74	90,72	77	94,26	76	89,81				
12			84	90,08	90	89,94	91	87,57	81	92,22	86	94,18	83	94,48				
13			91	91,78			99	90,44	88	94,00	99	94,82						
14			108	91,93			105	91,90	95	94,38	105	94,06						
15			114	91,27			113	92,94	103	94,47	112	93,04						
16			119	91,64			119	91,20	109	94,56								
17							133	93,08	118	94,30								
18									131	94,42								

ANEXO 5

Anexo 5 – Níveis de coliformes totais (CT) das amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento (T), fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)	T (dias)	CT (NMP/g ST)
0	0	-	0	6,5x10 ⁶	0	2,1x10 ⁷	0	1,1x10 ⁶	0	1,1x10 ⁷	0	9,8x10 ⁶	0	1,1x10 ⁸	0	1,0x10 ⁷	0	5,1x10 ⁸
1	7	4,3x10 ⁶	7	8,6x10 ⁷	7	8,6x10 ⁶	7	3,4x10 ⁵	6	7,0x10 ⁶	7	9,4x10 ⁶	6	4,2x10 ⁷	7	2,8x10 ⁶	6	7,6x10 ⁷
2	11	6,3x10 ⁶	14	4,3x10 ⁶	14	6,5x10 ⁶	16	8,8x10 ⁴	11	5,2x10 ⁶	14	6,2x10 ⁶	14	5,7x10 ⁷	15	1,1x10 ⁶	19	5,9x10 ⁶
3	18	-	21	6,3x10 ⁷	21	1,0x10 ⁶	21	1,6x10 ⁴	19	2,5x10 ⁶	21	4,8x10 ⁶	20	4,7x10 ⁶	21	1,5x10 ⁶	25	3,6x10 ⁶
4	25	4,2x10 ⁶	28	2,7x10 ⁶	28	1,1x10 ⁵	28	3,7x10 ³	25	2,4x10 ⁶	28	3,9x10 ⁶	27	2,5x10 ⁶	30	6,5x10 ⁵		
5	32	3,5x10 ⁶	35	2,4x10 ⁶	35	4,1x10 ⁴	45	1,5x10 ²	32	1,5x10 ⁶	36	2,5x10 ⁶	34	2,3x10 ⁵	43	3,6x10 ⁴		
6	39	7,0x10 ⁵	42	4,3x10 ⁵	42	1,2x10 ⁵	51	2,8x10 ²	39	-	42	7,5x10 ⁵	41	2,7x10 ⁵	49	3,0 x10 ⁴		
7	47	5,5 x10 ⁶	49	6,9x10 ⁴	50	4,5x10 ⁴	56	3,7x10 ²	46	5,3x10 ⁵	49	3,7x10 ⁵	49	8,2x10 ³	56	2,5x10 ⁴		
8	56	1,5x10 ⁵	56	5,7x10 ³	55	3,1x10 ⁴	64	4,8x10 ²	54	1,9x10 ⁴	56	2,7x10 ⁴	55	2,5x10 ³				
9	54	3,5x10 ⁵	63	2,7x10 ⁴	62	2,9x10 ⁴	70	3,1x10 ²	60	2,6x10 ⁴	63	2,5x10 ³	64	2,5x10 ³				
10	61	6,2x10 ⁴	70	2,7x10 ⁴	79	2,1x10 ³	77	1,2x10 ²	68	2,6x10 ⁴	71	2,5x10 ³	70	2,5x10 ³				
11			79	2,7x10 ⁴	85	2,7x10 ²	84	1,1x10 ²	74	2,6x10 ⁴	77	2,5x10 ³	76	2,5x10 ³				
12			84	2,7x10 ³	90	1,3x10 ³	91	3,5x10 ²	81	2,6x10 ⁴	86	2,5x10 ³	83	2,5x10 ³				
13			91	5,9x10 ³			99	7,6x10 ²	88	2,6x10 ⁴	99	2,5x10 ³						
14			108	3,7x10 ³			105	1,8x10 ³	95	2,6x10 ³	105	2,5x10 ³						
15			114	3,1x10 ³			113	2,6x10 ³	103	2,6x10 ³	111	2,5x10 ³						
16			119	2,6x10 ³			119	2,6x10 ³	109	2,6x10 ³								
17				6,5x10 ³			133	2,1x10 ²	118	2,6x10 ³								
18									131	2,6x10 ³								

ANEXO 6

Anexo 6 – Níveis de *E. coli* (EC) das amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante tratamento térmico em estufa de secagem segundo tempo de tratamento (T), fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC	(dias) T	(NMP/g ST) EC
0	0	4,7x10 ⁵	0	1,1x10 ⁶	0	4,0x10 ⁵	0	3,2x10 ⁵	0	4,3x10 ⁶	0	2,9x10 ⁵	0	4,1x10 ⁶	0	1,4x10 ⁶	0	6,2x10 ⁷
1	7	1,8x10 ⁴	7	1,9x10 ⁵	7	3,7x10 ⁵	7	2,8x10 ⁵	6	4,1x10 ⁶	7	2,5x10 ⁵	6	3,80 x10 ⁶	7	8,8x10 ⁵	6	9,6x10 ⁶
2	11	1,2x10 ⁴	14	1,6x10 ⁵	14	5,7x10 ⁴	16	2,5x10 ⁵	11	5,4x10 ⁵	14	6,7x10 ⁵	14	1,0x10 ⁶	15	3,2x10 ⁴	19	8,8x10 ⁵
3	18	4,3x10 ⁵	21	1,4x10 ⁵	21	3,9x10 ⁴	21	2,2x10 ³	19	1,1x10 ⁵	21	1,8x10 ⁵	20	3,0x10 ⁵	21	2,63 x10 ⁴	25	3,6x10 ⁶
4	25	1,5x10 ⁵	28	1,3x10 ³	28	6,3x10 ³	28	8,2x10 ¹	25	7,0x10 ⁴	28	1,6x10 ⁵	27	2,5x10 ⁵	30	5,4x10 ³		
5	32	2,6x10 ⁶	35	1,2x10 ⁵	35	-	45	1,7x10 ¹	32	1,0x10 ⁵	36	5,8x10 ⁴	34	1,4x10 ⁴	43	1,0x10 ³		
6	39	4,1x10 ⁵	42	1,2x10 ⁵	42	1,5x10 ³	51	1,9x10 ¹	39	6,6x10 ³	42	2,5x10 ³	41	1,8x10 ⁴	49	1,5x10 ²		
7	47	6,0x10 ⁵	49	1,1x10 ⁵	50	2,5x10 ³	56	1,5x10 ¹	46	1,4x10 ³	49	1,4x10 ⁴	49	1,2x10 ²	56	5,6x10 ¹		
8	56	1,1x10 ⁵	56	1,1x10 ³	55	1,3x10 ²	64	5,6x10 ¹	54	1,2x10 ³	56	9,7x10 ¹	55	8,1x10 ¹				
9	54	1,0x10 ⁵	63	1,1x10 ¹	62	1,0x10 ²	70	1,0x10 ³	60	2,6x10 ³	63	5,1x10 ¹	64	2,5x10 ²				
10	61	2,1x10 ⁴	70	1,1x10 ¹	79	2,2x10 ²	77	1,2x10 ¹	68	2,6x10 ³	71	1,9x10 ¹	70	9,6x10 ²				
11			79	1,1x10 ¹	85	2,7x10 ¹	84	1,1x10 ¹	74	2,0x10 ³	77	1,8x10 ¹	76	1,3x10 ²				
12			84	1,1x10 ¹	90	2,8x10 ¹	91	1,1x10 ¹	81	1,0x10 ³	86	2,2x10 ¹	83	1,76 x10 ²				
13			91	1,1x10 ¹			99	1,4x10 ¹	88	6,1x10 ²	99	1,0x10 ¹						
14			108	1,0x10 ¹			105	1,0x10 ¹	95	6,1x10 ²	105	2,4x10 ¹						
15			114	1,3x10 ¹			113	6,8x10 ¹	103	4,3x10 ¹	112	1,7x10 ¹						
16			119	1,0x10 ¹			119	1,1x10 ¹	109	2,6x10 ¹								
17							133	N.D	118	1,3x10 ¹								
18									131	1,03								

ANEXO 7

Anexo 7 – Níveis de colifagos somáticos (CS) das amostras de lodo de esgoto dos lotes L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostras	Lote 1		Lote 2		Lote 3		Lote 4		Lote 5		Lote 6		Lote 7		Lote 8		Lote 9	
	T (dias)	CS (UFP/g ST)#	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)	T (dias)	CS (UFP/g ST)
0	0	5,6x10 ⁴	0	ND	0	2,1x10 ³	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND	0	ND
1	7	1,7x10 ³	7	ND	7	6,7x10 ³	7	ND	6	ND	7	ND	6	ND	7	1,9x10 ⁵	6	ND
2	11	3,7x10 ³	14	ND	14	ND	16	ND	11	ND	14	ND	14	ND	15	3,2x10 ⁴	19	ND
3	18	9,1x10 ²	21	ND	21	ND	21	ND	19	ND	21	ND	20	ND	21	2,2x10 ⁴	25	1,0x10 ⁵
4	25	1,8x10 ³	28	ND	28	ND	28		25	ND	28	ND	27	ND	30	ND		
5	32	ND*	35	ND	35	ND	45	ND	32	ND	36	ND	34	ND	43	5,0x10 ⁴		
6	39	ND	42	ND	42	ND	51	ND	39	ND	42	ND	41	1,5x10 ⁵	49	1,1x10 ⁵		
7	47	ND	49	ND	50	ND	56	ND	46	ND	49	ND	49	2,2x10 ⁴	56	ND		
8	56	ND	56	ND	55	ND	64	ND	54	ND	56	ND	55	9,3x10 ³				
9	54	ND	63	ND	62	ND	70	ND	60	ND	63	1,1x10 ⁴	64	ND				
10	61	ND	70	ND	79	ND	77	ND	68	ND	71	ND	70	8,0x10 ³				
11			79	ND	85	ND	84	ND	74	ND	77	ND	76	ND				
12			84	ND	90	ND	91	ND	81	ND	86	ND	83	ND				
13			91	ND			99	ND	88	ND	99	ND						
14			108	ND			105	ND	95	ND	105	ND						
15			114	ND			113	ND	103	ND	112	ND						
16			119	ND			119	ND	109	ND								
17							133	ND	118	ND								
18									131	ND								

Unidade Formadora de Placa/g de sólido total; *Não detectado.

ANEXO 8

Anexo 8 – Resultados das análises de indicadores bacterianos, vírus totais cultiváveis e colifagos somáticos das amostras de água de lavagem das mãos coletadas após manejo das leiras de lotes de lodo de esgoto L1 a L9 durante secagem em estufa de secagem segundo tempo de tratamento, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa-MG.

Amostra	Coliformes totais (NMP/mL)	<i>E.coli</i> (NMP/mL)	Vírus entéricos totais cultiváveis TCID ₅₀ [#] /mL	Colifagos somáticos (UFP ^{\$} /100mL)
1	1,7 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
2	2,4 x 10 ⁵	1,0 x 10 ²	ND	ND
3	1,6 x 10 ⁴	6,1 x 10 ³	ND	ND
4	3,1 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
5	2,4 x 10 ⁵	2,3 x 10 ³	ND	ND
6	4,5 x 10 ³	2,0 x 10 ²	ND	ND
7	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
8	1,3 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
9	1,6 x 10 ⁴	7,1 x 10 ²	ND	ND
10	2,9 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
11	4,6 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
12	2,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
13	4,2 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
14	2,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
15	1,6 x 10 ³	2,0 x 10 ²	ND	ND
16	1,6 x 10 ⁴	6,2 x 10 ²	ND	ND
17	3,0 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
18	1,4 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
19	4,6 x 10 ⁴	1,5 x 10 ³	ND	ND
20	1,0 x 10 ²	4,0 x 10 ²	ND	ND
21	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
22	1,0 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
23	2,5 x 10 ⁴	3,8x 10 ³	ND	ND
24	3,9 x 10 ³	1,0x 10 ²	ND	ND
25	1,1 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
26	3,6 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
27	3,1 x 10 ²	1,0 x 10 ²	ND	ND
28	2,5 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
29	2,0 x 10 ³	1,0 x 10 ²	ND	ND
30	2,4 x 10 ⁵	1,3 x 10 ³	ND	ND
31	2,4 x 10 ⁵	2,4 x 10 ⁵	ND	ND
32	1,1 x 10 ⁴	1,4 x 10 ³	ND	ND
33	1,6 x 10 ⁴	1,0 x 10 ²	ND	ND

* Número mais provável; # Tissue Cell Infectious Dose (Método da Diluição Limitante); \$ Unidade Formadora de Placa.

ANEXO 9

Anexo 9 - Níveis de coliformes totais e *E. coli* das amostras de água de lavagem (dilução 1:100) das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros nos eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote de lodo de esgoto utilizado na produção do canteiro	Trabalhador 1							
	Alface				Cenoura			
	Coliformes totais (NMP/mL)		<i>E. coli</i> (NMP/mL)		Coliformes totais (NMP/mL)		<i>E. coli</i> (NMP/mL)	
	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado
Lote 3 (Classe A)	3,4 x10 ⁴	4,9 x10 ⁴	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²	2,0 x10 ²	1,0 x10 ²	4,1 x10 ²	1,0 x10 ²
Lote 4 (Classe A)	9,3 x10 ³	2,0 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²	4,1 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ⁴
Lote 5 (classe A)	8,2 x10 ⁴	1,0 x10 ²	4,1 x10 ²	1,0 x10 ²	1,4 x10 ³	8,6 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²
Lote 6 (Classe B)	2,4 x10 ⁵	2,4 x10 ⁵	7,0 x10 ²	2,9 x10 ³	5,1x10 ³	5,2 x10 ⁴	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²
Lote 6 (Classe A)	2,4 x10 ⁵	2,6 x10 ⁴	4,1 x10 ²	1,0 x10 ²	3,0 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²	1,0 x10 ²
Lote 7 (Classe B)	1,2 x10 ⁴	6,7 x10 ⁴	7,1 x10 ³	2,4 x10 ³	4,7 x10 ³	1,0 x10 ²	1,0 x10 ⁴	1,0 x10 ²

Lote de lodo de esgoto utilizado na produção do canteiro	Trabalhador 2							
	Alface				Cenoura			
	Coliformes totais (NMP/mL)		<i>E. coli</i> (NMP/mL)*		Coliformes totais (NMP/mL)*		<i>E. coli</i> (NMP/mL)	
	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado	Lodo Tratado	Lodo Inoculado
Lote 3 (Classe A)	1,7x10 ²	1,4x10 ⁴	1,0x10 ²	4,1x10 ²	1,0x10 ²	2,6x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²
Lote 4 (Classe A)	1,0x10 ²	9,9x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,4x10 ³	6,8x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²
Lote 5 (classe A)	2,0x10 ²	4,9x10 ⁴	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,1x10 ⁴	2,4x10 ⁵	1,0x10 ²	2,0x10 ³
Lote 6 (Classe B)	9,8x10 ⁴	1,6x10 ³	2,9x10 ³	1,0x10 ²	8,2x10 ⁴	3,0x10 ⁴	4,3x10 ³	4,1x10 ²
Lote 6 (Classe A)	2,0x10 ²	1,0 x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²	1,2x10 ⁴	2,7x10 ³	1,0x10 ²	1,0x10 ²
Lote 7 (Classe B)	7,4x10 ³	6,3x10 ²	2,0x10 ²	1,0x10 ²	1,2x10 ⁴	2,0x10 ²	1,0x10 ²	1,0x10 ²

*Número mais provável

ANEXO 10

Anexo 10 – Resultados de vírus entéricos totais cultiváveis das amostras de água de lavagem das mãos dos Trabalhadores 1 e 2 após a produção de canteiros nos eventos de plantio de alface e de cenoura, agosto e setembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote	TRABALHADOR 1				TRABALHADOR 2			
	Lodo Tratado		Lodo Inoculado		Lodo tratado		Lodo Inoculado	
	Alface	Cenoura	Alface	Cenoura	Alface	Cenoura	Alface	Cenoura
L3 classe A	Negativa*	Negativa	Positiva com título ^{\$}	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título
L4 classe A	Negativa	Negativa	Positiva com título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título	Negativa	Positiva sem título
L5 classe A	Não tem	Positiva sem título [#]	Positiva sem título	Positiva sem título	Negativa	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva com título
L6 classe B	Negativa	Positiva sem título	Positiva com título	Positiva com título	Negativa	Negativa	Positiva sem título	Positiva sem título
L6 classe A	Negativa	Positiva sem título	Positiva com título	Positiva sem título	Negativa	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva com título
L7 classe B	Não tem	Positiva sem título	Positiva com título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título	Positiva sem título

*Amostra negativa: no teste TCID₅₀, réplicas das formas não-diluída e diluições da amostra não apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD; # Amostra positiva sem título: no teste TCID₅₀, somente réplicas da forma não-diluída da amostra apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD; \$ Amostra positiva com título: no teste TCID₅₀, réplicas das diluições ≥ 1 da amostra apresentaram efeito citopático na monocamada de células RD.

ANEXO 11

Anexo 11 – Resultados de colifagos somáticos das amostras de solo + bio sólido após período de 52 dias de cultivo da cultura de alface, setembro de 2015, Viçosa-MG.

Lote	Lodo Tratado				Lodo Inoculado			
	Amostra de alface (UFP/mL)		Amostra de cenoura (UFP/mL)		Amostra de alface (UFP/mL)		Amostra de cenoura (UFP/mL)	
	1	2	1	2	1	2	1	2
L3 classe A	20	70	10	50	N.D	10	10	80
L4 classe A	N.D	N.D	20	40	20	N.D	20	6
L5 classe A	N.D	N.D	160	70	80	N.D	30	100
L6 classe B	N.D	330	50	20	10	N.D	140	10

ANEXO 12

Anexo 12 – Resultados dos títulos e percentual de recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 de amostras de alface inoculadas e submetidas ao Protocolo 1 para recuperação de vírus de amostras de alface.

Repetição	Amostra inoculada	Protocolo 1 - Eluente com extrato de carne 1% + concentração por floculação orgânica					
		Poliovírus			Colifago somático Phi X174		
		Título amostra (TCID ₅₀ /mL)	Log ₁₀	Recuperação (%)	Título amostra (UFP/mL) [#]	Log ₁₀	Recuperação (%)
R1	1	3,33 x10 ⁵	5,52	0,93	5,73 x10 ⁶	6,76	4,62
	2	7,90 x10 ⁵	5,90	2,21	3,87 x10 ⁶	6,59	3,12
	3	1,41 x10 ⁶	6,15	3,94	3,62 x10 ⁵	5,56	0,29
R2	1	1,41 x10 ⁷	7,15	39,39	5,89 x10 ⁶	6,77	4,75
	2	4,45 x10 ⁶	6,65	12,43	6,83 x10 ⁶	6,83	5,51
	3	1,87 x10 ⁷	7,27	52,23	4,19 x10 ⁶	6,62	3,38
R3	1	2,50 x10 ⁶	6,40	6,98	4,99 x10 ⁶	6,70	4,02
	2	1,87 x10 ⁷	7,27	52,23	4,67 x10 ⁶	6,67	3,77
	3	7,90 x10 ⁶	6,90	22,07	8,61 x10 ⁶	6,94	6,94

* Tissue cell infectious dose; # Unidade Formadora de Placa.

ANEXO 13

Anexo 13 – Resultados dos títulos e percentual de recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 de amostras de alface inoculadas e submetidas ao Protocolo 2 para recuperação de vírus de amostras de alface.

Repetição	Amostra inoculada	Protocolo 2 - Eluente com extrato de carne 3% + concentração por floculação orgânica					
		Poliovírus			Colifago somático Phi X174		
		Título amostra (TCID ₅₀ /mL) [*]	Log ₁₀	Recuperação (%)	Título amostra (UFP/mL) [#]	Log ₁₀	Recuperação (%)
R1	1	1,41 x10 ⁶	6,15	3,94	3,14 x10 ⁶	6,50	2,53
	2	5,93 x10 ⁶	6,77	16,56	4,65 x10 ⁶	6,67	3,75
	3	1,87 x10 ⁶	6,27	5,22	3,80 x10 ⁶	6,58	3,06
R2	1	1,41 x10 ⁷	7,15	39,39	4,01 x10 ⁶	6,60	3,23
	2	7,90 x10 ⁶	6,90	22,07	4,94 x10 ⁵	5,69	0,40
	3	1,41 x10 ⁷	7,15	39,39	1,79 x10 ⁶	6,25	1,44
R3	1	5,93 x10 ⁶	6,77	16,56	2,37 x10 ⁶	6,37	1,91
	2	7,90 x10 ⁶	6,90	22,07	3,19 x10 ⁶	6,50	2,57
	3	2,50 x10 ⁶	6,40	6,98	9,52 x10 ⁵	5,98	0,77

* Tissue cell infectious dose; # Unidade Formadora de Placa.

ANEXO 14

Anexo 14 – Resultados dos títulos e percentual de recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 de amostras de alface inoculadas e submetidas ao Protocolo 3 para recuperação de vírus de amostras de alface.

Protocolo 3 - Eluente com extrato de carne 1% + concentração por filtração à vácuo							
Repetição	Amostra inoculada	Poliovírus			Colifago somático Phi X174		
		Título amostra (TCID ₅₀ /mL)*	Log ₁₀	Recuperação (%)	Título amostra (UFP/mL)#	Log ₁₀	Recuperação (%)
R1	1	1,87 x10 ⁵	5,27	0,52	3,96 x10 ⁵	5,60	0,32
	2	1,41 x10 ⁴	4,15	0,04	1,26 x10 ⁵	5,10	0,10
	3	5,93 x10 ⁴	4,77	0,17	4,20 x10 ⁵	5,62	0,34
R2	1	4,45 x10 ⁵	5,65	1,24	8,40 x10 ⁴	4,92	0,07
	2	1,41 x10 ⁵	5,15	0,39	8,25 x10 ⁴	4,92	0,07
	3	1,87 x10 ⁵	5,27	0,52	1,27 x10 ⁵	5,10	0,10
R3	1	1,41 x10 ⁵	5,15	0,39	9,30 x10 ⁵	5,97	0,75
	2	5,93 x10 ⁴	4,77	0,17	1,80 x10 ⁵	5,26	0,15
	3	7,90 x10 ⁴	4,90	0,22	2,92 x10 ⁵	5,47	0,24

* Tissue cell infectious dose; # Unidade Formadora de Placa.

ANEXO 15

Anexo 15 – Resultados dos títulos e percentual de recuperação de Poliovírus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 de amostras de alface inoculadas e submetidas ao Protocolo 4 para recuperação de vírus.

Protocolo 4 - Eluente com extrato de carne 3% + concentração por filtração à vácuo							
Repetição	Amostra inoculada	Poliovírus			Colifago somático Phi X174		
		Título amostra (TCID ₅₀ /mL)*	Log ₁₀	Recuperação (%)	Título amostra (UFP/mL)#	Log ₁₀	Recuperação (%)
R1	1	2,50 x10 ⁴	4,40	0,07	1,19 x10 ⁵	5,08	0,10
	2	3,33 x10 ⁴	4,52	0,09	1,57 x10 ⁵	5,20	0,13
	3	2,50 x10 ⁴	4,40	0,07	2,17 x10 ⁵	5,34	0,18
R2	1	1,87 x10 ⁵	5,27	0,52	2,32 x10 ⁵	5,37	0,19
	2	7,90 x10 ⁴	4,90	0,22	1,35 x10 ⁵	5,13	0,11
	3	2,50 x10 ⁵	5,40	0,70	8,10 x10 ⁵	5,91	0,65
R3	1	1,05 x10 ⁶	6,02	2,93	N.D	N.D	N.D
	2	1,41 x10 ⁶	6,15	3,94	1,97 x10 ⁶	6,29	1,59
	3	4,45 x10 ⁵	5,65	1,24	7,84 x10 ⁵	5,89	0,63

* Tissue cell infectious dose; # Unidade Formadora de Placa.