UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARIA JULIA DE LIMA BROSSI

Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto

Piracicaba

2008

MARIA JULIA DE LIMA BROSSI

Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente
Orientador: Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior

Piracicaba

2008

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Brossi, Maria Julia de Lima
Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto / Maria Julia de Lima Brossi; orientador Cassio Hamilton Abreu Junior. - - Piracicaba, 2008.
85 p.: fig.

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

1. Espectrometria de massas 2. Florestas 3. Metais pesados do solo 4. Toxicologia ambiental I. Título

CDU 504.5:628.3

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia de um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ERRATA

Folha	Parágrafo	
35	1: substituir por	O experimento foi instalado em dezembro de 2004, em uma área de 3,2 ha, na fazenda Entre Rios, localizada no município de Itatinga (22° 59' de latitude sul e 48° 41' de longitude oeste), SP, pertencente a Suzano Bahia Sul Papel e Celulose S.A. A área experimental (Figura 1) é constituída de um Latossolo Vermelho distrófico e de um Neossolo Quartzarênico. A possibilidade de 2 solos diferentes na área experimental foi levantada na instalação do experimento, motivo pelo qual o experimento foi instalado em dois blocos. Tal fato foi confirmado posteriormente a instalação do experimento, em levantamento pedológico realizado na área.
42	3: acrescentar	As amostragens de solo foram realizadas na camada superficial do solo (0-10 cm) nas datas de 05/06/2006, 01/09/2006, 01/12/2006, 16/03/2007 e 02/10/2007 correspondentes aos 18, 21, 24, 27 e 34 meses após o plantio. Cada amostra de terra foi constituída de seis subamostras coletadas a partir de três pontos pré-estabelecidos em torno de duas árvores escolhidas aleatoriamente na área útil de cada parcela. Os pontos pré-estabelecidos são: 1) a 30 cm do eucalipto, onde não se aplicou adubo mineral nem lodo; 2) na interseção da meia coroa que recebeu adubo mineral com a faixa de aplicação de lodo; e 3) na faixa de aplicação do lodo, objetivando obter uma amostra composta que melhor apresente os efeitos dos tratamentos e a maior homogeneidade possível.
63	3: substituir por	De acordo com os valores obtidos neste teste, pode-se afirmar que o teste com a alga se mostrou eficiente na avaliação da toxicidade do solo. Apesar dos índices de toxicidade terem aumentado de acordo com as doses de lodo, os valores obtidos podem estar relacionado também com a turbidez da amostra, que prejudica o processo de fotossíntese da alga, com a presença de glifosato (e possíveis metabólitos), e também com a presença da sulflaramida, adicionada ao solo para controle de formigas.
70	5: substituir por	De acordo com os valores obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que o teste de com células de *A. cepa* foi eficiente na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade do solo. Apesar das freqüências de aberrações cromossômicas e micronúcleos terem aumentado de acordo com as doses de lodo, os valores obtidos foram baixos e o aumento pode estar relacionado também com a presença de glifosato e sulflaramida, no solo.
74	4: substituir por	Não foi observado contaminação do solo por Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb para nenhuma das doses de lodo aplicada, já que a concentração dos mesmos se encontra abaixo dos limites críticos para metais pesados no solo, estabelecidos pela CETESB (2005). Porém, foi observado aumento nos índices de toxicidade do solo de acordo com as doses de lodo de esgoto o que mostra a importância da realização de pesquisas no aprimoramento do uso agrícola de lodo de esgoto por parte dos órgãos ambientais.
76	1 substituir por	O lodo de esgoto aplicado ao solo na dose de 15,1 t ha^{-1}, que equivale à dose recomendada pela norma P 4.230 da CETESB, com base no critério do nitrogênio, não causa efeito tóxico, genotóxico ou mutagênico no sistema solo-planta, de acordo com os testes com *D. magna*, *P. subcapitata*, *L. sativa* e *A. cepa*.

Por todo amor, companheirismo e carinho

À minha irmã Maria Luiza,

Pelo amor, incentivo, suporte e confiança

Aos meus pais Salma e Ednir

Pelas alegrias, cuidados e amor

Ao meu namorado Thiago

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por fornecer alimento ao meu espírito e me garantir saúde em toda minha empreitada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cassio Hamilton Abreu Junior, pela oportunidade, orientação, ensinamentos e paciência.

A Dr. Regina Monteiro, pela amizade, sinceridade e muita ajuda na elaboração e realização deste projeto.

Aos amigos Lúcia e Carlos por toda a ajuda prestada no experimento e pela atenção e amizade que sempre me prestaram.

Aos amigos do Laboratório de Ecologia e de Nutrição Mineral de Plantas, Tâmara, Laíse, Vivian, Cris, Mário, Luiz, Nuno, Georgia, Maria Alice, Milena ,Gabriela, Lili, Ademir, Leila, Raul, Carol, Marcelo, Vítor, Thiago, Adriana, Juliana e Luiz, pelo convívio e amizade.

Às técnicas Henriqueta Maria Gimenes Fernandes e Rosângela Aparecida De Gaspari, pelo suporte e ajuda prestada no desenvolvimento das análises realizadas, além do convivo e amizade.

Ao Prof. Dr. Enedi Boaretto pela ajuda e colaboração sempre que precisei.

Ao Prof. Dr. Takashi Muraoka, por sempre se mostrar disposto a ajudar e por ter feito parte da minha escolha pela vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. Abílio Lopes de Oliveira Neto, que foi fundamental na escolha do meu estudo (*in memoriam).*

A Suzano (Luiz José Gava e Fernando Silva) por toda ajuda prestada para a realização e desenvolvimento técnico do experimento de campo.

À Biossolo (Fernando Oliveira, Jonas Jacob Chiaradia e Maria Emília Matiazzo), pela ajuda prestada na realização e desenvolvimento do projeto.

Aos meus familiares Júlia, Zezinho, Marly, Octávio, Mozart, Marcelo por todo amor, suporte e dedicação que sempre me prestaram.

A minha amiga Maísa, que mesmo distante é fundamental na minha vida.

Aos amigos Ariane, Gustavo, Carol, João, Paula, Buda, Paulinho e Luiza, pela amizade e por fazerem minha vida mais feliz.

As amigas de Rio Claro Daniela, Cynthia, Jaque, Renata, Thaís, que me ajudaram muito no desenvolvimento do teste com *Allium cepa*, sempre pacientes e prestativas.

Aos funcionários do Cena, Neuda, Soninha, Alzira, Cláudia, Marília, Fernanda e Geraldo, pelo cordial atendimento, sempre que precisei.

Ao Dr. Marcelo (Estatístico), pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao CNPq, FAPESP e FINEP/MCT pelo apoio financeiro.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário ver toda a escada. Apenas dê o primeiro passo**”**

Martin Luther King Jr.

RESUMO

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicologia em um sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

A aplicação do lodo de esgoto em sistemas florestais busca o aprimoramento da produção, favorecendo as características físicas, químicas e biológicas do solo e das plantas. Entretanto, o lodo pode conter patógenos e, elementos orgânicos e inorgânicos tóxicos, e o efeito destes contaminantes no solo e na planta ainda é pouco conhecido. Sendo assim, foi estabelecida a hipótese de que o lodo de esgoto, quando aplicado ao solo, com base na norma P 4.230, da CETESB, não causa efeitos tóxicos ao sistema solo-eucalipto. Com o objetivo de testar a hipótese acima, foi proposta a determinação da concentração dos elementos potencialmente tóxicos, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade do solo tratado com lodo de esgoto e a verificação da correlação entre essas variáveis. O experimento de campo foi instalado em dezembro de 2004, quando mudas de *Eucalyptus grandis* foram plantadas e tratadas com lodo de esgoto, nas doses de 0; 7,7; 15,4 e 23,1 tha^{-1}, base seca, em área comercial de cultivo de eucalipto da companhia Suzano Bahia Sul Papel e Celulose S.A., em Itatinga, SP. Amostras de solo foram coletadas aos 18, 21, 24, 27 e 34 meses após a aplicação do lodo. Foram determinadas as concentrações de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb no solo, extraídos por DTPA, Mehlich-1 e com HNO_3+HCl, e quantificados por ICP-MS. A toxicidade do solo foi avaliada por meio dos testes com *Daphnia magna* (concentração letal-CL_{50}), com *Pseudokcrichirella subcaptata* (inibição de crescimento-CI_{50}), com *Lactuca sativa* (crescimento de raiz) e com *Allium cepa* (índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos). Os resultados mostraram um aumento nos teores de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb no solo de acordo com as doses. Foi observado um aumento da toxicidade para *D.magna*, *P.subcaptata* e genotoxicidade e mutagenicidade para A. cepa de acordo com as doses. O lodo de esgoto aplicado ao solo na dose de 15,1 t ha^{-1}, recomendada pela norma da CETESB, não causa efeito tóxico, genotóxico ou mutagênico no sistema solo-planta, de acordo com os testes realizados. Há correlação entre os testes de toxicidade com *P. subcaptata*, de mutagênicidade com *A. cepa* (micronúcleos), com os teores dos elementos potencialmente tóxicos no solo. O teste com *D. magna* constitui uma importante ferramenta na avaliação toxicológica do lodo aplicado ao solo, apesar de não se correlacionar com os teores de elementos potencialmente tóxicos no solo, indicando que a toxicidade do lodo pode estar relacionada também a outros compostos orgânicos tóxicos e/ou agentes patógenos.O teste de toxicidade com *L.sativa* é inadequado na avaliação toxicológica da aplicação de lodo em relação as doses, por refletir efeitos dos nutrientes e não dos componentes tóxicos do lodo, porém reflete a toxicidade de acordo com o tempo de aplicação do resíduo.

Palavras-chave: - Espectrometria de massas; Florestas; Metais pesados do solo; Toxicologia ambiental

ABSTRACT

BROSSI, M. J. L. **Ecotoxicology of eucalyptus forest system treated with sewage sludge.** 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

The application of sewage sludge in forest systems quests the improvement of the production, favoring the physical, chemistries and biological characteristics of the soil and of the plants. However, the sludge can contain pathogen and, organic and inorganic toxics elements, and the effect of these pollutants in the soil and in the plant is still unknown. It was established the hypothesis that the sewage sludge, when applied to the soil, according to the norm P4.230 of CETESB, doesn't cause toxics effects to the soil-eucalyptus system. To test the hypothesis above, it was established as objective, the determination of the concentration of the potentially toxics elements, the evaluation of the toxicity and genotoxicity of the sewage sludge treated soil, and the verification of the correlation among those variables. The field experiment was conducted in December of 2004, when seedlings of *Eucalyptus grandis* were planted and treated with sewage sludge, in the doses of 0; 7,7; 15,4 and 23,1 tha ^{1}, dry base, in commercial area of eucalyptus cultivation of the Suzano Bahia Sul Papel and Celulose S.A company, in Itatinga, SP. Soil samples were collected to the 18, 21, 24, 27 and 34 months after the application of the sludge. They were established the concentrations of Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in the soil, extracted for DTPA, Mehlich-1 and with concentrated HNO_3+HCl, and quantified by ICP-MS. The toxicity of the soil was evaluated through the tests with *D. magna* (lethal concentration -LC_{50}), with *Pseudokcrichirella subcaptata* (growth inhibition - IC_{50}), with *Lactuca sativa* (root growth) and with *Allium cepa* (mitotic index, cromossomic aberration and micronucleus). The results showed an increase in the concentrations of Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in the soil in agreement with the doses. An increase of the toxicity was observed for *D.magna, P.subcaptata* and an increase of the genotoxicity and mutagenicity for *A. cepa* in agreement with the doses. The applied sewage sludge to the soil in the dose of 15,1t ha^{-1}, recommended by CETESB, doesn't cause toxic, genotoxic or mutagenic effect in the system soil-plant, in agreement with the accomplished tests. There is correlation among the toxicity tests with *P. subcaptata*, of mutagenicity with *A. cepa* (micronucleus) with the concentrations of Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd and Pb in the soil. The test with *D. magna* is an important tool in the toxicological evaluation of the sludge applied to the soil, however it wasn't correlated with the concentration of potentially toxics elements in the soil, indicating that the toxicity of the sludge can also be related to the other toxic organic compound or pathogen agents. The *L.sativa* toxicity test is inadequate in the toxicological evaluation of the sludge application, according to the doses, for reflecting effects of the nutrients and it doesn't reflect the toxic components of the sludge, however it reflects the toxicity in agreement with the time of residue application

Keywords - Mass spectrometry; Forests; Heavy metals of the soil; Environmental Toxicology

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Localização e mapeamento do solo da área experimental na fazenda Entre Rios, município de Itatinga, SP. 36
Figura 2. Médias mensais de temperatura máxima (^{o}C), de temperatura mínima (^{o}C) e valores mensais de precipitação pluviométrica acumulada (mm). 36
Figura 3. Efeitos genotóxicos e mutagênicos em células de Allium cepa. (a) e (b) quebra cromossômica; (c) ponte cromossômica e (d) micronúcleo. 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentração máxima (mg kg^{-1}) de substâncias inorgânicas permitida no lodo de esgoto a ser aplicado de acordo com a resolução CONAMA 375 20
Tabela 2. Concentração máxima de patógenos permitida no lodo de esgoto a ser aplicado na agricultura de acordo com a resolução CONAMA 375.....20
Tabela 3. Características químicas do solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004). 37
Tabela 4. Teores de micronutrientes (método do DTPA) no solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004). 37
Tabela 5. Características físicas do solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004). 38
Tabela 6. Características do lodo de esgoto utilizado no experimento. 39
Tabela 7. Soluções-estoque para manutenção da cultura de *P. subcapitata* 47
Tabela 8. Teores de cobre e de ferro no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto. 54
Tabela 9. Teores de manganês e de zinco no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto. 55
Tabela 10. Teores de chumbo e de níquel no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto 56
Tabela 11. Teores de cádmio e de cromo no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto. 57
Tabela 12. Coeficientes de correlação linear entre os teores de elementos potencialmente tóxicos extraídos por DTPA, Mehlich 1 e ácido concentrado respectivamente. 59
Tabela 13. Valores de CL_{50} (48h) (%), para o teste toxicológico com *D. magna*, do solo, na camada de 0 a 10 cm, de sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.....62
Tabela 14. Valores de CI_{50} (72h)(%), para o teste toxicológico com *P. subcapitata*, do solo, na camada de 0 a 10 cm, de sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.....63

Tabela 15. Crescimento de raiz (cm) no teste toxicológico com *L.sativa*, para o solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.....65
Tabela 16. Comparação das Freqüências de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*, para o solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.....71
Tabela 17. Coeficientes de correlação linear entre os índices de toxicidade, avaliados pelo teste com *D magna* (CL_{50}), *P. subcaptata* (CI_{50}), *L.sativa* (crescimento raiz) e *A. cepa* (índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos), com os teores de elementos, extraídos por DTPA, Mehlich-1 e HNO_3+HCl.....75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 14
2 REVISÃO DA LITERATURA 17
2.1 Uso agronômico do lodo de esgoto 17
2.2 Uso do lodo de esgoto em sistema florestal 21
2.3 Comportamento dos elementos potencialmente tóxicos no solo 24
2.4 Determinação de elementos potencialmente tóxicos 27
2.5 Estudos ecotoxicológicos 28
2.5.1 Ecotoxicidade 28
2.5.2 Genotoxicidade 32
3 MATERIAIS E MÉTODOS 35
3.1 Área de estudo 35
3.1.1Caracterização da área experimental 35
3.1.2 Caracterização do solo 37
3.1.3 Caracterização do lodo de esgoto 38
3.1.4 Aplicação de calcário 40
3.1.5 Aplicação do lodo de esgoto 40
3.1.6 Plantio de mudas 41
3.1.7 Manejo químico do solo 41
3.2 Tratamento e delineamento experimental 42
3.3 Determinação de elementos potencialmente tóxicos no solo 42
3.3.1 Preparo de amostras 42
3.3.2 Métodos de extração 42
3.3.3 Digestão ácida em microondas 43
3.3.4 Extrator DTPA 43
3.3.5 Extrator Mehlich 1 44
3.3.6 Quantificação dos elementos por ICP-MS 44
3.4 Análises toxicológicas no solo 44
3.4.1 Preparo de amostras 44
3.4.2 Testes toxicológicos 45
3.4.3 Manutenção das culturas 45
3.4.3.1 *Daphnia magna* 45
3.4.3.2 *Pseudokirchneriella subcapitata* 46
3.4.4 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna* 47
3.4.5 Teste de toxicidade crônica com *Pseudokirchneriella subcapitata* 48
3.4.6 Testes de crescimento de raiz com sementes de *Lactuca sativa* 48

3.4.7 Teste de genotoxicidade com *Allium cepa* 49
3.5 Análise dos resultados 50
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES 52
4.1 Elementos potencialmente tóxicos no solo.....52
4.2 Teste toxicológico com *D. magna*.....60
4.3 Teste toxicológico com *P. subcaptata* 62
4.4 Teste de crescimento de raiz com *L.sativa* 64
4.5 Teste genotóxico e mutagênico com *A. cepa*.....65
4.5.1 Análise dos efeitos citotóxicos.....66
4.5.2 Análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos 67
4.6 Correlação entre elementos potencialmente tóxicos e índices toxicológicos 72
5 CONCLUSÕES 76
REFERÊNCIAS.....77

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

O crescimento da população e da industrialização no planeta traz como efeito a geração cada vez maior de resíduos. Com o aumento das cidades, também há um aumento da geração de efluentes urbano e industrial. Parte destes resíduos tem destino não conhecido e, na maioria das vezes, são descartados no ambiente sem os cuidados necessários, podendo causar contaminação.

As águas residuárias industriais e domésticas quando lançadas ao rio constituem um significativo agente poluente. Para minimizar os efeitos ambientais negativos do descarte de resíduos urbanos e industriais sem qualquer tratamento, é fundamental realizar o tratamento de esgotos, visando principalmente a redução do seu caráter poluidor. No processo de tratamento de esgoto é originado um material semi-sólido, constituído de matéria orgânica, água e frações minerais, denominado lodo de esgoto.

Entre as alternativas para a destinação final do lodo de esgoto, destacam-se: aterros sanitários, incineração, lagoas de armazenagem, e a reciclagem agrícola. Entre essas, a opção de maior sustentabilidade é o uso agronômico do lodo, situação na qual o resíduo, quando devidamente tratado, pode constituir fonte de matéria orgânica e nutrientes para o agrossistema. O uso de lodo na agricultura tem sido proposto como forma de disposição final deste resíduo, pela reciclagem dos nutrientes nele contidos, ou, então, pelo fato de o lodo se constituir um condicionador de solos, em função de seu conteúdo orgânico. Porém, há questionamentos por parte dos agricultores que utilizam o lodo, e, de órgãos de controle ambiental, em relação aos impactos positivos e negativos do lodo sobre o ambiente, principalmente no que se diz respeito à toxicidade e contaminação do solo e das plantas por elementos potencialmente tóxicos.

A aplicação do lodo de esgoto em sistemas florestais, como, por exemplo, na cultura de eucalipto, oferece algumas vantagens, tais como: a) teores desejáveis de nitrogênio e fósforo b) redução nos custos de produção florestal, ocasionado pela diminuição significativa do uso de fertilizantes em uma área extensa; c) aumento da produtividade da cultura; d) e, principalmente o fato de que a cultura do eucalipto não está associada à produção de alimentos, diminuindo riscos à saúde pública.

Entretanto, o lodo pode conter patógenos e elementos orgânicos e inorgânicos tóxicos, e o comportamento dos elementos potencialmente tóxicos, notadamente do cádmio e chumbo, no sistema solo-eucalipto tratado com lodo de esgoto ainda é pouco conhecido. Na maioria dos estudos sobre os possíveis efeitos negativos do uso florestal do lodo, têm sido avaliados os teores dos elementos potencialmente tóxicos e são apresentadas discussões sobre os efeitos isolados de cada elemento. Já os estudos toxicológicos expressam efeitos produzidos em função das interações das substâncias contidas nas amostras testadas, sendo, portanto, uma útil ferramenta nesses estudos.

Estudos toxicológicos, utilizando bioensaios, para avaliar a toxicidade do solo ainda são escassos no Brasil. Há carência de pesquisas envolvendo a análise toxicológica do solo após aplicação de lodo de esgoto. Desta forma, o estudo da toxicidade no sistema florestal é de grande interesse na avaliação do efeito da aplicação de lodo de esgoto no solo e permite observar se há relação da toxicologia com o acúmulo de elementos potencialmente tóxicos no solo. Sendo assim, estabeleceu-se a hipótese de que aplicação do lodo de esgoto em plantio de eucalipto, com base na norma P4.230 (CETESB, 1999), não causa toxicidade ao solo.

Com o objetivo de testar a hipótese acima, foi proposta a determinação da concentração dos elementos Cd, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn por ICP-MS, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade do solo tratado com lodo de esgoto, e a verificação da correlação entre essas variáveis.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Uso agronômico do lodo de esgoto

Uma das principais preocupações da sociedade moderna em relação à conservação do ambiente é a qualidade das águas. A etapa inicial do controle da poluição das águas é o tratamento de esgotos, deixando em segundo plano a disposição do resíduo gerado deste processo, denominado de lodo de esgoto (BETTIOL; CAMARGO, 2006). Este resíduo é gerado no tratamento da fase líquida de águas servidas, com a finalidade de torná-las menos poluídas, de modo a permitir seu retorno ao ambiente sem que sejam agentes de poluição. Trata-se de um material semi-sólido e heterogêneo, cuja composição depende do local de origem, da época do ano, do tipo de tratamento empregado para purificar o esgoto e das características das fontes geradoras (ROCHA, 1998). A composição do lodo de esgotos se baseia em quantidades variáveis de água, macro e micronutrientes, matéria orgânica, microorganismos e compostos orgânicos e inorgânicos potencialmente tóxicos à planta, ao animal e ao homem, de acordo com o que for disposto no esgoto doméstico (ABREU JUNIOR et al., 2005).

Entre as opções para destinação final do lodo de esgoto, destacam-se: aterros sanitários, incineração, lagoas de armazenagem, e a reciclagem agrícola Uma opção, quando o resíduo apresentar características adequadas, é a sua aplicação em áreas de produção agrícola. Devido à presença no lodo, de matéria orgânica e macro e micronutrientes que podem exercer um papel fundamental na produção agrícola e na manutenção da fertilidade dos solos, a aplicação deste resíduo em agrossistemas pode favorecer as características físicas, químicas e

biológicas do solo, melhorando as condições de nutrição e desenvolvimento da planta (ABREU JUNIOR et al., 2005).

Para crescer e produzir adequadamente, as plantas necessitam de elementos químicos, considerados essenciais, e de outros que, embora não sejam considerados essenciais, têm efeito positivo sobre o desenvolvimento dos vegetais. Desta forma, o solo de um sistema produtivo racional, deve estar em condições de fornecer os nutrientes das plantas em quantidades adequadas e no momento de suas necessidades.

A maior disponibilidade de nutrientes no solo leva a um melhor desenvolvimento da planta com maior produção de matéria seca conduzindo a maior produtividade. Pela quantidade de nitrogênio e fósforo contidos no lodo de esgoto, é possível admitir que este subproduto, gerado no tratamento de esgoto, possa substituir os fertilizantes minerais como uma fonte de nutrientes para as plantas. Trabalhos evidenciam o aumento na disponibilidade do N do solo pela aplicação de lodo de esgoto (ABREU JUNIOR et al., 2005; ANDRADE; MATIAZZO, 2000), e a expressiva contribuição do lodo em relação ao fósforo disponível (CHIBA, 2005)

A matéria orgânica presente no lodo pode aumentar o conteúdo de húmus, melhorando a capacidade de armazenamento e de infiltração de água no solo, o que gera a resistência dos agregados e redução da erosão (TSUTIYA et al., 2002).

A utilização do lodo de esgoto em agrossistemas apresenta benefícios: a) econômicos - a diferença entre o custo da aplicação no campo e da disposição em aterro proporciona uma economia considerável, que pode ser revertida ainda em melhoria da qualidade do lodo, b) ecológicos - retorno da matéria orgânica ao campo e diminuição do impacto ambiental que o lodo de esgoto pode causar no meio e c) social - possibilidade do aumento da produtividade e diminuição do impacto negativo

desse resíduo sobre o meio, quando disposto de maneira inadequada (ANDRADE, 2004; ABREU JUNIOR et al., 2005).

Mesmo sendo uma alternativa para a disposição de lodo de esgoto, o uso agrícola exige uma regulamentação que fixe condições e restrições para que a aplicação ocorra de forma segura para a população e o ambiente. Para o uso agrícola, devem ser considerados aspectos referentes a qualidade do lodo, principalmente quanto a metais pesados, organismos patogênicos e compostos orgânicos persistentes.

De 1999 até o ano de 2006, o uso de lodo de esgoto como fonte alternativa de nutrientes na agricultura no estado de São Paulo deveria atender à norma P 4.230, da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB, 1999). Nesta norma os principais aspectos relacionados ao ambiente abordado são: declividade da área a ser tratada, distância mínima de nascentes de água e leitos de rio e espécie vegetal de interesse. Quanto ao lodo de esgoto, aspectos relacionados à degradação da fração orgânica do resíduo, taxa de mineralização do nitrogênio, teores de As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mo, Ni, Pb, Se e Zn totais e presença de organismos patogênicos estão presentes nos textos normativos (ANDRADE, 2004).

Atualmente, o uso de lodo de esgoto como fonte alternativa de nutrientes na agricultura no Brasil deve atender à resolução 375 do conselho nacional do meio ambiente. Essa resolução estabelece critérios e procedimentos para o uso agrícola do lodo de esgoto, gerado em estação de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, levando em consideração a proteção do meio ambiente e a saúde da população. Para tanto, estabelece valores máximos da concentração no lodo dos elementos Arsênio, Bário, Cádmio, Chumbo, Cobre, Cromo, Mercúrio,

Cobre, Molibdênio, Níquel, Selênio e Zinco no lodo de esgoto em mg kg^{-1}, base seca (Tabela 1) e também concentração máxima de patógenos (Tabela 2) (CONAMA, 2006).

Tabela 1. Concentração máxima (mg kg^{-1}) de substâncias inorgânicas permitida no lodo de esgoto a ser aplicado de acordo com a resolução CONAMA 375

Substâncias inorgânicas	Concentração (mg kg^{-1}, base seca)
Arsênio	41
Bario	1300
Cádmio	39
Chumbo	300
Cobre	1500
Cromio	1000
Mercúrio	17
Molibdênio	50
Níquel	420
Selênio	100
Zinco	2800

Tabela 2. Concentração máxima de patógenos permitida no lodo de esgoto a ser aplicado na agricultura de acordo com a resolução CONAMA 375

Tipo de lodo de esgoto	Concentração de patógenos
A	Coliformes Termotolerantes $<10^3$ NMP g^{-1}de ST
	Ovos viáveis de helmintos < 0,25 ovo g^{-1} de ST
	Salmonella ausência em 10 g de ST
	Vírus < 0,25 UFP ou UFF g^{-1} de ST
B	Coliformes Termotolerantes $<10^6$ NMP g^{-1} de ST
	Ovos viáveis de helmintos < 10 ovos g^{-1} de ST

ST: Sólidos Totais; NMP: Número Mais Provável; UFF: Unidade Formadora de Foco; UFP: Unidade Formadora de Placa

A simples adoção dos critérios estabelecidos nas legislações não torna segura, por tempo indeterminado, a utilização agrícola do lodo, sendo imprescindível o monitoramento periódico do solo (RANGEL et al., 2004; ABREU JUNIOR et al., 2005).

2.2 Uso do lodo de esgoto em sistema florestal

Sendo as propriedades do lodo semelhantes a de outros produtos orgânicos usados normalmente na agricultura, este pode ser aplicado à maioria das culturas, porém, algumas culturas se adaptam mais que outras, seja por aproveitarem melhor sua composição química, ou por eliminarem riscos associados à reciclagem de resíduos animais, principalmente com relação aos patógenos. Desta forma, de acordo com a resolução 375 do CONAMA (2006), é vetado o uso do lodo, 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. Em função das características agronômicas do sistema solo/planta, as principais culturas selecionadas para uso agrícola foram: milho, café, cana-de-açúcar, citrus e floresta (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

Os plantios florestais são de extrema importância para a sociedade, economia e ambiente, e no contexto brasileiro contribui com cerca de 4% no PIB, um milhão de empregos diretos e indiretos, envolve mais de 600 municípios e tem um forte apelo social como atividade ambientalmente adequada para a conservação dos solos, dos animais e da água (EMBRAPA, 2005). As florestas são fornecedoras de madeira, lenha, carvão e celulose, fato que explica sua importância no contexto econômico e social. Ao começo do ano de 2003, o Brasil possuía 6,4 milhões de hectares de

florestas plantadas, sendo 4,8 milhões de pínus e eucaliptos (PROGRAMA NACIONAL DE FLORESTA, 2004). Segundo o anuário da ABRAF (2007), em 2006 a área total plantada de floresta no Brasil para eucaliptos e pínus atingiu 5,4 milhões de hectares, mostrando um crescimento significativo em relação ao ano de 2003. O plantio de novas áreas plantadas com estas espécies vem sendo realizado mediante pesquisa e desenvolvimento de centros de estudos e refletem a atratividade do plantio das duas espécies.

A sustentabilidade de uma plantação florestal está diretamente relacionada com o balanço nutricional do ecossistema, sendo que a quantidade de nutrientes para o crescimento das árvores que entra na plantação florestal deve ser equivalente à quantidade que sai do devido à colheita florestal, à lixiviação e aos processos erosivos (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

Para aumentar a produtividade das áreas florestais vem ocorrendo o aumento da mecanização e do uso prolongado de fertilizantes minerais, que podem causar impacto negativo no meio em que são aplicados, tais como contaminação da água subterrânea, perda de nutrientes e compactação do solo.

Bettiol e Camargo (2006) destacam que grande parte das áreas destinadas ao plantio florestal é localizada em regiões de solo de baixa fertilidade, que estão em processo de degradação ou já degradados, o que pode ocorrer em função da própria atividade florestal. A grande maioria dos solos usados para fim de florestamento é originado de rochas sedimentares, principalmente os arenitos, com baixa disponibilidade de minerais primários. Os teores de macro e micro nutrientes são considerados baixo ou muito baixos nesses solos, com grandes implicações sobre os potenciais de uso e manejo dos solos podendo resultar em baixa produtividade.

Atentando-se a este fato, pesquisas a respeito dos efeitos positivos da aplicação de lodo de esgoto em ecossistemas florestais estão sendo efetuadas e devem ser incentivadas. Sendo assim, é considerado o uso de resíduos urbanos como uma das formas para suprir, de maneira sistemática, os nutrientes necessários para o desenvolvimento da biomassa arbórea e para melhorar as características do solo em culturas florestais (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

Deve-se salientar que a aplicação de lodo de esgoto pode aumentar a produtividade das florestas (ABREU JUNIOR et al., 2005) e beneficiar os sítios florestais com resultados imediatos que podem ser constatados pelo crescimento das árvores e da vegetação do sub-bosque.

Também deve ser considerado que a aplicação do lodo em áreas florestais pode levar a redução nos custos de produção florestal, ocasionado pela diminuição significativa do uso de fertilizantes em uma extensa área, aumento da produtividade e a vantagem do lodo em relação aos fertilizantes minerais, pelo fato de oferecer de forma contínua a liberação dos nutrientes para o solo e para o sistema radicular das plantas, ao longo de vários anos, sendo seu efeito então, mais duradouro. Em função da alta capacidade de produção de biomassa, sistema radicular profundo e bem distribuído no solo, a eficiência do aproveitamento de nutrientes contidos no lodo pelas culturas florestais é muito elevada, superior à obtida por culturas de ciclo curto. (BETTIOL; CAMARGO, 2006).

2.3 Comportamento dos elementos potencialmente tóxicos no solo

De uma maneira bastante simplificada e evocando sua gênese o solo é definido como o resultado das transformações químicas, físicas e mineralógicas sofridas pelas rochas na superfície da Terra, na interface litosfera, atmosfera, hidrosfera e biosfera. Uma noção importante para a compreensão do solo como ciência: é aquela em que o solo é tratado como um “um corpo vivo”, que se encontra em constante evolução, a qual se verifica naturalmente através do tempo ou influenciada por ações antrópicas, que em geral aceleram um processo evolutivo. Esta noção indica que o solo está sempre em transformação e que para entender seu comportamento, compreender suas propriedades e prever possíveis interações é necessário estudá-lo sob dois aspectos principais: o de sua organização (anatomia) e o de seu funcionamento (fisiologia) (TSUTIYA et al., 2002).

Pesquisas mostraram que o teor de micronutrientes no solo tem aumentado pela aplicação de lodo (DEFELIPO et al., 1991; BERTON et al., 1997). Porém o uso do solo agrícola como alternativa para disposição do lodo de esgoto deve considerar o fato de que o solo compõe um ecossistema capaz de absorver grandes quantidades de poluentes, podendo ocorrer transformações quase sempre irreversíveis e de difícil recuperação. Sendo assim, na aplicação de lodo de esgoto na agricultura é necessário o conhecimento da sua composição, a fim de calcular as quantidades adequadas a serem incorporadas, sem correr o risco de toxicidade às plantas, aos micro e macrorganismos do solo, aos animais e ao homem e de poluir o ambiente (SILVÉRIO, 2004).

Dentre as preocupações advindas da aplicação de lodo no solo, merece destaque a presença de metais pesados.

Aumentos nos teores de Cu em solo, na profundidade de 0-20 cm, foram, verificados no estudo de Ligo et al. (1987). Resultados similares foram obtidos por Simon et al. (1992), Berton et al. (1989) e Pombo et al. (1989). Oliveira (2000) observou aumento nos teores de Cu e Cr em solos tratados com lodo de esgoto, de acordo com as doses aplicadas. Marques et al. (1999), em experimento conduzido em casa de vegetação, utilizando um Latossolo Vermelho-escuro distrófico, adubado com lodo e cultivado com sorgo granífero, verificaram acréscimo dos teores de Zn e Pb no solo, em razão das doses de lodo .

Oliveira e Mattiazzo (2001) e Silva et al. (2001), utilizando doses de lodo, ambos provenientes da ETE de Barueri-SP, na cultura de cana-de-açúcar, verificaram aumentos lineares nos teores de Zn no solo. Pigozzo (2003), aplicando doses de lodo proveniente da Estação de Tratamento de Esgoto da SANEPAR, Município de Maringá-PR, obteve incremento nos teores de Zn e Pb solo. Oliveira et al. (2005) evidenciaram contribuição da adição do lodo nos teores de Zn no solo. Pigozzo et al. (2006), aplicando lodo de esgoto por dois anos consecutivos, em um Latossolo Vermelho distrófico textura média, verificaram que os teores extraíveis de Fe por DTPA aumentaram gradativamente com as doses de lodo.

Bertoncini (1997) em estudo com aplicação de lodo de esgoto verificou o aumento de doses de Cr através de extração com digestão ácida e DTPA, em relação ao solo sem a aplicação do lodo. Em Andrade (1999) e em Andrade e Matiazzo (2000) foi observado efeito significativo do lodo sobre a concentração total de Cr na camada superficial (0-10cm).

Os metais pesados constituem parte integrante do ambiente e da matéria viva, ocorrendo naturalmente em pequenas concentrações, na ordem de mg kg^{-1} e µg kg^{-1}. Entre estes, zinco, ferro, manganês, cobre, cobalto e molibdênio são alguns

que se destacam por serem essenciais aos organismos, ainda que em quantidades mínimas, pois participam de processos fisiológicos; outros elementos-traço, como o mercúrio, chumbo e cádmio, não têm função biológica conhecida e seus efeitos sobre os elementos da biota normalmente são deletérios (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Mesmo os que possuem função biológica, quando em concentrações mais elevadas, podem causar toxicidade aos organismos, por esse fato podem ser chamados de elementos potencialmente tóxicos.

Os metais pesados formam compostos pouco solúveis com alguns ânions presentes no solo. O fator de imobilização desses metais é a formação de complexos polidentados com os componentes húmicos do solo, sendo que a matéria orgânica presente no lodo pode minimizar a toxicidade caudada pelos mesmos (TSUTIYA et al., 2002).

A biodisponibilização e a conseqüente toxicidade de metais pesados são processos de extrema complexidade, sendo função de muitos fatores e propriedades do ambiente em questão (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Os metais pesados podem ficar disponíveis no solo, serem lixiviados, ou absorvidos pelas plantas. A disponibilidade desses metais no solo depende de alguns fatores inerentes ao solo e ao próprio lodo de esgoto, assim como aspectos ligados ao clima, portanto a aplicação do lodo deve ser monitorada, já que permanece indefinida a capacidade dos solos em “reter” esses metais (ANDRADE, 1999).

De maneira geral, a concentração de metais pesados no lodo é maior que no solo, razão pela qual se conclui que seu controle é requisito básico a um sistema de valorização agrícola. As práticas do manejo da aplicação do lodo no solo devem levar em conta as concentrações de metais pesados presentes no resíduo, bem

como os níveis cumulativos máximos permitidos no solo, quantidade de acumulação, as condições do solo regionalmente, condições climáticas e topografia (ANDREOLI et al., 1997; ABREU JUNIOR et al., 2005; CONAMA, 2006).

2.4 Determinação de elementos potencialmente tóxicos

Um dos problemas que podem ser encontrados na determinação da concentração de elementos são as baixas concentrações destes em comparação com os limites de detecção dos instrumentos analíticos geralmente utilizados.

Bettiol e Camargo (2006) relatam que em um estudo com a aplicação de lodo na agricultura, elevadas quantidades contendo metais pesados, foram aplicadas ao solo, e a concentração dos mesmos na planta, se apresentou abaixo do nível de detecção. Isso pode significar que esses elementos não foram absorvidos pela planta, ou então que as concentrações dos elementos não foram medidas pelo método utilizado na análise .

Em estudo com eucalipto desenvolvido por Molina (2004), 55 meses após a aplicação de 10, 20 e 40 t ha^{-1} de lodo (base seca), as concentrações de Cd e Cr nas folhas estiveram abaixo do limite de detecção pela técnica de espectrofotometria de absorção atômica (EAA) indicando que a concentração de Cd foi inferior a 0,06 g kg^{-1} e que a de Cr foi inferior a 0,5 g kg^{-1}. Nas amostras de terra, os teores de Cd e Cr totais e disponíveis (Mehlich 3) também foram inferiores ao limite de detecção do EAA, ou seja, inferiores a 0,6 mg kg^{-1} de Cd e a 0,5 mg kg^{-1} de Cr.

Contudo, a não detecção dos elementos químicos por EAA não significa que os mesmos não estejam presentes no solo ou na planta. Desta forma, há a necessidade de se utilizar técnicas analíticas de maior sensibilidade. Dentre os

instrumentos para análise de elementos ao nível de traço e ultratraço em amostras diversas destacam-se: o espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GF-EAA), o espectrômetro de emissão óptica com fonte de plasma (ICP-OES) e o espectrômetro de massa com fonte de plasma (ICP-MS). Devido às altas temperaturas do plasma e, principalmente, à capacidade de determinação multielementar, os métodos com fonte de plasma apresentam vantagens se comparados ao EAA. No caso dos métodos analíticos com ICPs os limites de detecção e faixas analíticas alcançados pelo ICP-MS são muito melhores dos que os do ICP-OES (YAMANAKA, 2001).

2.5 Estudos ecotoxicológicos

2.5.1 Ecotoxicidade

O termo ecotoxicologia foi definido por Ramade (1977) como a ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou produzidos pelo homem, seus mecanismos de ação e efeitos sobre os seres vivos da biosfera. Sendo assim essa ciência permite avaliar os danos ocorridos em diversos ecossistemas após contaminação, e também pode fazer previsão de impactos futuros.

O uso de testes ecotoxicológicos integra os conceitos da ecologia, no que diz respeito à diversidade e representatividade dos organismos e seu caráter ecológico nos ecossistemas, e da toxicologia em relação aos diversos efeitos de poluentes sobre comunidades biológicas (PLAA, 1982). A ecotoxicidade de uma determinada substância ou ambiente contaminado pode ser o resultado da ação da interação e

magnitude de vários agentes presentes num determinado ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

A determinação da toxicidade em amostras de solo tratadas com lodo de esgoto pode ser uma importante ferramenta na de avaliação de risco da contaminação do solo pelo uso de resíduos na agricultura.

Vale ressaltar que o resultado de um teste de toxicidade expressa um efeito produzido em função das interações das substâncias nas amostras e que, portanto, a avaliação da toxicidade pode ser complementada com resultados físico-químicos, mas nem sempre seus valores estão correlacionados (BERTOLETTI, 1990).

Os efeitos adversos dos poluentes sobre os organismos vivos podem ser quantificados por uma variedade de critérios, como: número de organismos mortos ou vivos, taxa de reprodução, comprimento e massa corpórea, número de anomalias ou incidência de tumores, alterações fisiológicas e mesmo a densidade e diversidade de espécies numa determinada comunidade biológica, dentre outros. É possível avaliar a toxicidade de um composto químico puro ou uma mistura complexa, como também de efluentes líquidos e amostras ambientais. Cabe destacar que a amostra testada deve representar o ambiente em estudo. Em todos os ensaios ecotoxicológicos são utilizados frascos controle, nos quais se avalia a viabilidade do lote de organismos expostos. Após o período de teste é avaliado o efeito da amostra sobre variáveis biológicas como, mortalidade, crescimento, reprodução, comportamento dos organismos, dentre outros (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Com o intuito de se compreender o efeito de substâncias tóxicas são realizados, primeiramente, os testes de toxicidade aguda e, em seqüência, os testes de toxicidade crônica que fornecem informações adicionais sobre concentrações não detectadas nos testes agudos.

O ensaio de toxicidade aguda avalia efeitos severos e rápidos, sofridos pelos organismos expostos ao agente químico, em curto período de tempo. Devido à facilidade de execução, curta duração e baixo custo, os ensaios de toxicidade aguda foram os primeiros a serem desenvolvidos e, portanto, constituem a base de dados ecotoxicológicos (BIRGE et al.,1986). O teste de toxicidade aguda permite o conhecimento de informações a respeito da letalidade relativa de um material, sendo esboçado a fim de determinar a concentração suficiente para dizimar 50% dos organismos-teste. Essa concentração é calculada a partir da exposição de organismos-teste a uma série de concentrações de uma solução, durante uma curta fase da vida e as respostas dos organismos são examinadas (JARDIM, 2004).

O teste de toxicidade crônica submete todos os organismos, exceto o controle, aos agentes tóxicos durante um período relevante do seu ciclo de vida e avalia os efeitos subletais sobre a reprodução, crescimento, comportamento, fisiologia e efeitos bioquímicos (ADAMS, 1995). Mesmo sendo mais complexos, os dados produzidos nos testes de toxicidade crônica são úteis na predição de efeitos que não são detectados em testes agudos (JARDIM, 2004). Reduções na sobrevivência, crescimento e sucesso reprodutivo do organismo teste têm grande significado, já que podem indicar redução da diversidade ecológica (BUIKEMA et al., 1991).

Diversos fatores podem afetar os resultados dos testes de toxicidade e podem estar relacionados com o procedimento experimental, com o organismo teste utilizado ou com fatores ambientais externos. Sendo assim, é aconselhável a utilização de procedimentos de ensaios padronizados para minimizar a variabilidade dos resultados e melhorar a precisão e reprodutibilidade dos testes (COONEY, 1995). Atualmente, vários ensaios de toxicidade já estão bem

estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normatização. Entre os testes de toxicidade padronizados, estão incluídos os bioensaios com os organismos*: Daphnia. magna, Pseudokirchneriella subcapitata*, e *Lactuca sativa.*

Bioensaio com *Daphnia magna* (DUTKA, 1997): dentro do grupo de cladóceros, a espécie do gênero *Daphnia* é as mais utilizadas como organismos testes de referência em bioensaios. Especificamente o teste de toxicidade com *D. magna* permite determinar a letalidade potencial de substancias químicas puras, efluentes domésticos e industriais, lixiviados, água superficial ou subterrânea, sedimento, solo, entre outros. O bioensaio consiste na exposição de indivíduos jovens (neonatos de até 24 horas de vida) de *Daphnia magna* a várias concentrações da amostra, por um período de 48 horas, nas condições prescritas na norma utilizada. Tal procedimento permite determinar a concentração que leva a morte de 50% dos organismos em 48 horas [Concentração letal: CL_{50} (48h)].

Bioensaio com *Pseudokirchneriella subcapitata* (BLAISE et al., 2000): *Pseudokirchneriella subcapitata*, anteriormente chamada de *Selesnatrum capricornutum*, é uma alga verde unicelular e com um volume aproximado entre 40 a 60 mm^3. O bioensaio que utiliza esta alga estima o potencial fitotóxico crônico das amostras testadas. Quando as células são expostas a amostras que contêm contaminantes tóxicos, sua reprodução é afetada, alterando a taxa de crescimento das algas O efeito de inibição causado pelo agente tóxico, em 72 horas de exposição, é determinado comparando o crescimento das células obtidos nas diferentes diluições da amostra com o crescimento observado no controle. Através deste teste é possível o cálculo da concentração da amostra que inibe o crescimento de 50% das células em 72 horas de exposição [Concentração de inibição: CI_{50}(72h)].

Bioensaio com *Lactuca sativa* (DUTKA, 1997): O bioensaio de germinação e crescimento de raízes com sementes de alface é um teste de toxicidade aguda (72 horas). Neste teste podem ser avaliados os efeitos fitotóxicos, de compostos puros ou amostras ambientais, no processo de germinação das sementes e do desenvolvimento das plantas durante os primeiros dias de crescimento. Este teste avalia a porcentagem de germinação das sementes e o aumento do crescimento da raiz (tamanho da radícula). Nos primeiros dias de desenvolvimento da planta, ocorrem numerosos processos fisiológicos nos quais a presença de substâncias tóxicas pode interferir, alterando a sobrevivência e desenvolvimento normal da planta, por ser uma etapa de grande sensibilidade a fatores externos adversos.

2.5.2 Genotoxicidade

A genética toxicológica surgiu da preocupação com a vulnerabilidade do material genético às agressões impostas pela contaminação ambiental (RABELLO - GAY et al., 1991). Tal ciência tem como objetivo identificar mecanismos de ação de agentes químicos presentes no ambiente, aos quais diversos organismos vivos, inclusive o homem, estão expostos, além de estimar os possíveis danos às células pela detecção dos efeitos genotóxicos e/ou mutagênicos (LEME, 2007).

Ao longo da vida, a molécula de DNA pode sofrer alterações denominadas mutações, que podem ser induzidas por erros durante a sua duplicação e/ou durante o ciclo de divisão celular (RIBEIRO; MARQUES, 2003). Porém essas alterações no DNA não se restringem apenas às causas mencionadas acima, mas também podem ocorrer por intervenção do homem no ambiente, sendo induzidas pela ação de diversos xenobiontes (LEME, 2007).

Agentes capazes de interagir com a molécula de DNA podem ser mutagênicos ou genotóxicos, que interagem com o material genético, ou com outros componentes celulares (LEME, 2007).

O termo genotoxicidade é relacionado com a formação de aductos que distorcem o DNA e bloqueiam a replicação, através de lesões na fita de DNA, da síntese de DNA não programada e da trocas entre cromátides-irmãs. Já a mutagenicidade é relacionada com a indução de mutação no nível gênico ou cromossômico. Os efeitos genotóxicos podem ser transitórios, ou seja, pode haver o reparo do DNA, mas os efeitos mutagênicos são persistentes, alterando irreversivelmente o conteúdo ou a estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD et al., 2002).

Uma grande variedade de organismos-teste é utilizada na avaliação genotóxica e cerca de 200 testes de curta duração vêm sendo desenvolvidos para avaliar agentes potencialmente causadores de danos genéticos (VANZELLA, 2006).

Entre os bioensaios genotóxicos realizados, aqueles que utilizam organismos eucarióticos são capazes de detectar uma grande amplitude de danos, incluindo desde mutações gênicas até danos cromossômicos (HOUK 1992). Dentre os testes realizados em eucariotos, destacam-se a análise da freqüência de DNA, as trocas entre cromátides-irmãs, a quantificação de aductos de DNA, o ensaio do cometa, o teste de aberrações cromossômicas e o teste de micronúcleo (LEME, 2007)

Segundo Rank et al. (2002), o teste de aberrações cromossômicas é uma das mais antigas e utilizadas ferramentas na avaliação de efeitos genotóxicos, podendo fornecer informações em relação ao modo de ação dos químicos testados. O teste de micronúcleo é considerado um teste simples e efetivo na avaliação de efeitos mutagênicos induzidos (LEME, 2007).

Os testes de aberrações cromossômicas e de micronúcleos têm uma grande aceitação na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade induzidas por químicos ambientais, e podem ser aplicados em uma ampla variedade de organismos-teste, desde mamíferos até vegetais superiores.

Os vegetais superiores apresentam características que os tornam excelentes modelos genéticos na avaliação genotóxica de poluentes ambientais. Tal fato se deve à sensibilidade de detecção de mutágenos em diferentes ambientes, e também pela possibilidade de avaliação de diversos *endpoints*[1] genéticos que abrangem desde as mutações pontuais até as aberrações cromossômicas em células de diferentes órgãos, como folhas, polens e endospermas (GRANT, 1994).

Entre os vegetais superiores utilizados como organismos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando devido a sua eficiência na detecção de danos genéticos a partir da avaliação de aberrações cromossômicas e micronúcleos induzidos por poluentes ambientais (FISKESJÖ, 1985; RAN; NIELSEN, 1994; SMAKA-KINCL et al., 1996; MATSUMOTO et al., 2006; FATIMA; AHMAD, 2006; MIGID et al., 2007), bem como por sustâncias químicas puras (FISKESJÖ, 1982, 1985, 1988; RANK et al., 1993; RANK; NIELSEN, 1997; ATEEQ et al., 2002; TÜRKOGLU, 2007). Além da sensibilidade, a espécie de *A. cepa* tem sido indicada por vantagens como baixo custo, fácil manuseio e por apresentar cromossomos grandes e em número reduzido (2n=16), sendo ideal nos estudos de avaliação de danos cromossômicos e/ou de distúrbios do ciclo de divisão celular (FISKESJÖ, 1985, MATSUMOTO et al., 2006; FERNANDES et al., 2007).

---

[1] *Endpoint* é um termo que se refere as diferentes variáveis que podem ser medidas para avaliar o efeito tóxico, por exemplo, mortalidade, crescimento, aberrações, etc.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

3.1.1Caracterização da área experimental

O experimento foi instalado em dezembro de 2004, em uma área de 3,2 ha, na fazenda Entre Rios, localizada no município de Itatinga (22° 59' de latitude sul e 48° 41' de longitude oeste), SP, pertencente a Suzano Bahia Sul Papel e Celulose S.A. A área experimental (Figura 1) é constituída de um Latossolo Vermelho distrófico e de um Neossolo Quartzarênico, motivo pelo qual o experimento foi instalado em dois blocos.

A Figura 2 apresenta as variações de temperatura e de precipitações pluviométricas no período de realização das coletas, de junho de 2006 a outubro de 2007.

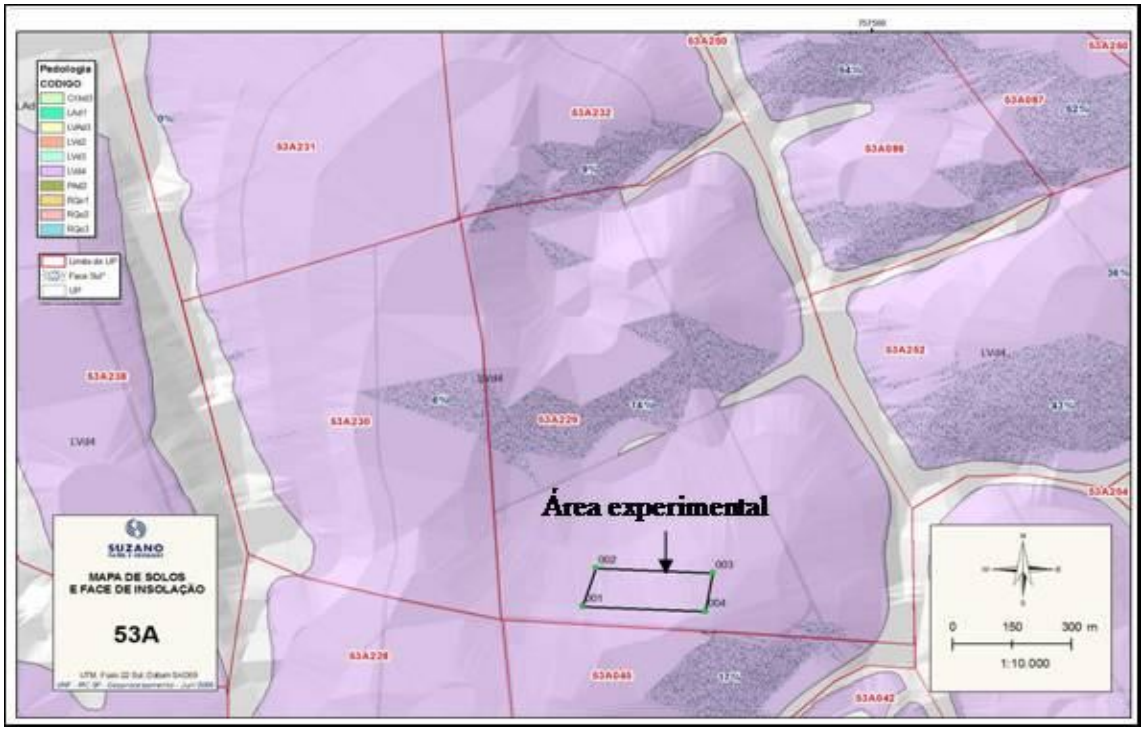

Figura 1. Localização e mapeamento do solo da área experimental na fazenda Entre Rios, município de Itatinga, SP.

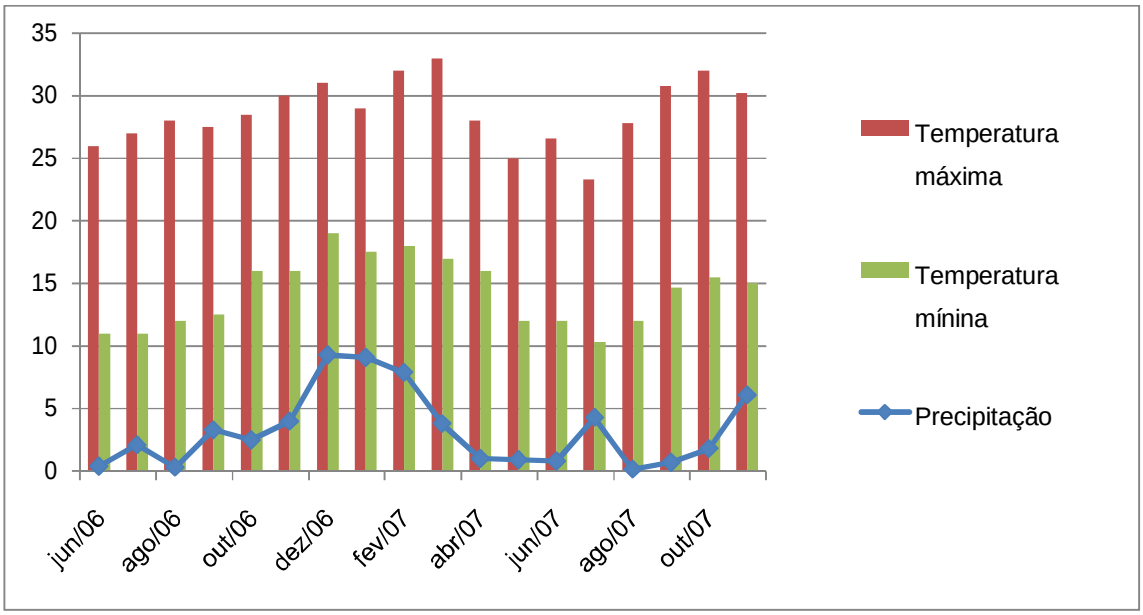

Figura 2. Médias mensais de temperatura máxima (°C), de temperatura mínima (°C) e valores mensais de precipitação pluviométrica acumulada (mm).

3.1.2 Caracterização do solo

Em outubro de 2004, foi realizada a amostragem de solo, em pré-plantio, obtendo-se três amostras compostas a partir de 10 subamostras, nas camadas de 0 - 20 e 20 - 40 cm de profundidade. As amostras foram secas ao ar, passadas em peneiras com abertura de malha de 2 mm e analisadas quimicamente, em relação ao pH em $CaCl_2$ 0,01 mol L^{-1}, fósforo disponível (resina), cálcio, magnésio, potássio trocáveis, acidez total (H+Al), matéria orgânica e micronutrientes (DTPA) de acordo com metodologia descrita em Raij et al. (2001) (Tabelas 3 e 4). A análise granulométrica foi feita pelo método da pipeta (Day, 1965) (Tabela 5).

Tabela 3. Características químicas do solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004).

Prof.	pH	MO[1]	N	S-SO_4	P	K	Ca	Mg	H+Al[2]	SB[3]	CTC[4]	V[5]
cm	$CaCl_2$	g dm^{-3}	mg kg^{-1}		mg dm^{-3}	----------mol_c dm^{-3} ----------						%
0-20	3,6	20,2	430	1,2	6,5	0,25	1,25	1,00	40,0	2,5	42,5	5,7
20-40	3,8	15,5	340	1,0	5,5	0,20	1,00	1,00	30,2	2,2	32,4	6,7

[1]MO – Matéria orgânica; [2] H+Al – Acidez; [3] SB – Soma de bases; [4] CTC – Capacidade de troca de cátions; [5]V – Saturação por base

Tabela 4. Teores de micronutrientes (método do DTPA) no solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004).

Prof.	B	Cu	Fe	Mn	Zn
cm	----------mg dm^{-3} ----------				
0-20	0,40	0,4	91	1,3	4,0
040	0,26	0,4	53	0,7	3,5

Tabela 5. Características físicas do solo da área experimental antes da instalação do experimento (amostra coletada em outubro de 2004).

Prof.	Areia MG[1]	Areia Grossa	Areia Média	Areia Fina	Areia MF[2]	Areia Total	Silte	Argila Total	Argila Água	Floculação	Classe Textural
cm						%					
0-20	0	6	36	36	6	84	4	12	2	83	Arenosa
20-40	0	8	40	30	6	84	4	12	2	83	Arenosa

[1] MG- Muito Grossa; [2] MF- Muito Fina

3.1.3 Caracterização do lodo de esgoto

O lodo de esgoto foi fornecido pela Opersan Serviços Ambientais S.C. Ltda, empresa que gerencia o lodo produzido na Estação de Tratamento de Esgotos de Jundiaí, SP, da Companhia Saneamento de Jundiaí (CSJ). O lodo foi gerado em sistema de lagoas aeradas de mistura completa, seguida de lagoas de decantação, sendo o desaguamento feito com floculação à base de polímero catiônico, seguido de centrifugação e secagem em pátio (revestido), com revolvimento mecânico.

Para análise química, uma amostra do lodo de esgoto que foi empregado no experimento foi seca ao ar, moída e passada em peneira com abertura de malha de 2 mm, conforme descrito em Raij et al. (2001). As concentrações dos elementos foram determinadas por ICP-AES. O nitrogênio total e o nitrogênio amoniacal foram determinados pelo método Kjeldahl. A umidade e os sólidos voláteis foram determinados pela perda de massa, a 60°C e a 500°C, respectivamente. O carbono orgânico foi determinado por titulometria, após digestão com dicromato, e o fluoreto, após fusão com soda, foi determinação com eletrodo de íon seletivo (Tabela 6).

Tabela 6. Características do lodo de esgoto utilizado no experimento.

Característica	valor
pH (em água)	6,2[(1)]
Umidade (%) (mm^{-1})	79
Sólidos voláteis (%)(mm^{-1})	65
Carbono orgânico (g kg^{-1})	340
Nitrogênio total (g kg^{-1})	33
N amoniacal (g kg^{-1})	3,6
N nitrato-nitrito (g kg^{-1})	0,018
Fósforo (g kg^{-1})	8,1
Potássio (g kg^{-1})	1
Cálcio (g kg^{-1})	8,1
Enxofre (g kg^{-1})	16,4
Magnésio (g kg^{-1})	1,6
Boro (mg kg^{-1})	7,6
Cobre (mg kg^{-1})	881
Ferro (mg kg^{-1})	16062
Manganês (mg kg^{-1})	483
Molibdênio (mg kg^{-1})	ND[(2)]
Zinco (mg kg^{-1})	989
Sódio (mg kg^{-1})	997
Alumínio (mg kg^{-1})	15888
Arsênio (mg kg^{-1})	ND
Cádmio (mg kg^{-1})	11
Chumbo (mg kg^{-1})	85
Cromo total (mg kg^{-1})	111
Mercúrio (mg kg^{-1})	ND
Níquel (mg kg^{-1})	26
Selênio (mg kg^{-1})	ND
Fluoreto (mg kg^{-1})	288
Vanádio (mg kg^{-1})	13
Bário (mg kg^{-1})	273
Prata (mg kg^{-1})	ND
Cobalto (mg kg^{-1})	50
Antimônio (mg kg^{-1})	ND

[(1)] Todos os valores de concentração são apresentados com base na matéria seca.
[(2)] ND - Não detectado, concentrações menores do que 0,1 mg kg^{-1}.

De acordo com os valores obtidos na caracterização do lodo de esgoto utilizado, esse lodo está apto a ser usado na agricultura de acordo com a concentração de elementos inorgânicos limitados pela norma P.4230 (CETESB, 1999) e pela resolução 375, do CONAMA, que estabelecem a concentração máxima permitida no lodo de esgoto ou produto derivado (mg kg^{-1}, base seca).

3.1.4 Aplicação de calcário

O estaqueamento da área experimental foi realizado nos dias 13 e 14 de dezembro de 2004. O calcário dolomítico foi aplicado a lanço, em 15/12/2004 em área total, na dose de 1,8 t ha^{-1}. A dose de calcário foi estabelecida em função de se obter uma porcentagem de saturação por bases de 45%, na camada de 0-20 cm de profundidade.

3.1.5 Aplicação do lodo de esgoto

De 16 a 20 de dezembro de 2004, o lodo de esgoto foi distribuído superficialmente no solo, em faixa de aproximadamente 30 cm na linha de plantio, com auxilio de uma adubadeira. A quantidade de lodo de esgoto aplicada foi baseada no critério do nitrogênio, de acordo com a norma P. 4.230 da CETESB (1999) e seguiu os seguintes passos: (1) conforme recomendação técnica da Suzano para a área experimental, a dose recomendada de N foi de 142 kg ha $^{-1}$, valor este considerado como sendo 100 % do recomendado de N; (2) o lodo de esgoto continha 33 g kg ^{1} de N, ou seja, cada tonelada de lodo continha 33 kg de N; (3) considerando que o fator de mineralização do lodo, para cálculo do N disponível, era de 0,28, então havia 9,24 kg de N disponível por tonelada do resíduo; e, então,

(4) taxa de aplicação (t ha ^{1}) = [N recomendado (kg ha^{-1}) / N disponível (kg t $^{-1}$)] = (142/9,24) = 15,4 t ha^{-1}. Portanto, 15,4 t ha^{-1} de lodo de esgoto seco foi definida como sendo a dose de 100%, 23,1 t ha^{-1}, a dose de 150%, e 7,7 t ha^{-1}, a dose de 50%.

3.1.6 Plantio de mudas

O sulcamento e a aplicação de KCl (54% K_2O) e de herbicida (glifosato) foram realizados do dia 21 a 22 de dezembro de 2004, com auxílio de um sulcador e aplicador de produtos químicos. O plantio das mudas de *Eucalyptus grandis* foi realizado em 23 de dezembro de 2004, a 50 cm da faixa de aplicação do lodo. O plantio foi realizado sob condições de cultivo mínimo, conforme recomendado pela Suzano para produção comercial de eucalipto.

3.1.7 Manejo químico do solo

O manejo químico do solo da área experimental foi baseado em recomendações técnicas da Suzano, para área de plantação comercial de eucalipto, em função das características físicas e químicas do solo e da produção esperada de madeira.

O potássio, sendo um nutriente escasso no lodo de esgoto, cerca de 1 g kg $^{-1}$ foi fornecido ao eucalipto, em todas as parcelas, aplicando-se 188 kg ha $^{-1}$ de K_2O, na forma de KCl, equivalente a 100% do recomendado, parcelado em 4 vezes. A aplicação do KCl foi realizada com auxilio do sulcador-aplicador, distribuindo o fertilizante em linha, a 0,5 m das mudas em pré-plantio e na segunda aplicação. Na

adubação de pré-plantio, foram aplicados 29 g de KCl a cada 2 m linear. A terceira e quarta aplicação de KCl foram realizadas manualmente na linha de plantio.

Os tratos culturais como, capina manual e química e controle de formiga também foram conduzidos de acordo com os procedimentos convencionais da Suzano Bahia Sul Papel e Celulose S.A., para a produção comercial de eucalipto.

3.2 Tratamento e delineamento experimental

Os tratamentos foram constituídos por quatro doses de lodo de esgoto (0, 50, 100 e 150% do recomendado, em função do critério do nitrogênio de acordo com a norma P 4.230 da CETESB). Os tratamentos foram aplicados em um delineamento em blocos ao acaso, com duas repetições. Cada parcela contém 42 plantas, incluindo bordadura simples, sendo o espaçamento de 3 x 2 m entre as plantas.

3.3 Determinação de elementos potencialmente tóxicos no solo

3.3.1 Preparo de amostras

As amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em peneira de 0,5 mm de malha.

3.3.2 Métodos de extração

Foram determinados, nas amostras de solo, os teores de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb, extraídos com solução de DTPA, a pH 7,3 (RAIJ et al., 2001),

extraídos com solução Mehlich 1 (BATAGLIA et al., 1989) e também solubilizados por meio da digestão ácida com HNO_3 e HCl, em forno microondas (método 3051A, manual SW-846, da USEPA, 1994) e, posteriormente, quantificados através da leitura em ICP-MS.

3.3.3 Digestão ácida em microondas

Foi realizada extração dos elementos por digestão ácida em microondas (ETHOS touch control – Advanced Microwave Labstation – Sorisole – BG - Italy), com sistema de regulação de temperatura e pressão. Foram utilizados 0,5 g de amostra de solo, 7 mL de ácido nítrico concentrado e 3 mL de ácido clorídrico concentrado em tubos reacionais de 100 mL com três réplicas por amostra (Method 3051) (USEPA, 1994). O volume final do digerido foi completado para 50 mL com água Milli-Q em tubo Falcon, e diluído na relação 1:5, com água Milli-Q, para a determinação dos elementos desejados por ICP-MS.

3.3.4 Extrator DTPA

Foram utilizados 10 g de amostra de solo em 20 mL de solução com três réplicas por amostra (RAIJ et al., 2001). O extrato obtido foi filtrado e diluído na relação 1:5 com solução de HNO_3 (1%) + HCl (0,5%), para a determinação dos elementos desejados por ICP-MS.

3.3.5 Extrator Mehlich 1

Foram utilizados 5 g de amostra de solo em 50 mL de solução Mehlich 1 (H_2SO_4 0,0125 mol L^{-1} + HCl 0,05 mol L^{-1}), com três réplicas por amostra (BATAGLIA et al., 1989). O extrato obtido foi filtrado e diluído na relação 1:5 com solução de HNO_3 (1%) + HCl (0,5%), para a determinação dos elementos desejados por ICP-MS.

3.3.6 Quantificação dos elementos por ICP-MS

Os extratos obtidos foram submetidos a analise química por ICP-MS, para determinação dos teores de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb, conforme metodologia para ICP-MS que foi adaptada, a partir do método 6020A (manual SW-846) (USEPA, 1994), no Laboratório de Análise e Referência em Amostras Ambientais e Fertilizantes (LARAFERT, CENA/USP), do Laboratório de Nutrição Mineral de Plantas, CENA/USP

3.4 Análises toxicológicas no solo

3.4.1 Preparo de amostras

As amostras de solo foram secas ao ar, destorroadas e peneiradas em peneira de 2 mm de malha, e conservadas em sacos plásticos até a realização dos testes de toxicidade.

3.4.2 Testes toxicológicos

Os testes toxicológicos foram realizados no laboratório de Ecologia Aplicada (CENA/USP). Nos testes de toxicidade, foram realizados o preparo e a manutenção dos organismos testes. A cada três meses foram realizados testes de sensibilidade a fim de avaliar as condições fisiológicas dos organismos utilizados. O teste de sensibilidade emprega substância tóxica de referência e detecta mudanças na sensibilidade do organismo (SANTOS et al., 2008).

Para a realização dos bioensaios, 250 g de amostra foram pesados em um béquer de 2 L e adicionado 1 litro de água destilada, na proporção terra: água de 1:4 (m/v). Após agitação inicial (1 hora em agitador magnético) e sedimentação por 24 horas, foi retirado o líquido sobrenadante, denominado de elutriato. Para a exposição dos organismos testes, o elutriato foi considerado solução 100%, e foi diluído com água destilada ou meio de cultivo (de acordo com o bioensaio a ser realizado). Foram realizados testes de toxicidade aguda para *Daphnia magna*, teste de toxicidade crônica com *Pseudokirchneriella subcapitata*, teste de germinação e crescimento de raízes com alface (*Lactuca sativa*) e teste de genotoxicidade para cebola (*Allium Cepa*).

3.4.3 Manutenção das culturas

3.4.3.1 *Daphnia magna*

As culturas de *D. magna* foram mantidas segundo as normas da OECD (1998) e ABNT (2005). As culturas foram iniciadas em julho de 2004, no Laboratório

de Ecologia Aplicada do CENA/USP. Os organismos foram cultivados em béquer de 2 L de capacidade, com 20 matrizes, em meio de cultura apresentando dureza total de 250 ± 25 mg L^{-1} de $CaCO_3$ e pH entre 7 e 8, após aeração de 48 h.

O meio de cultivo da cultura estoque foi trocado três vezes por semana. A alimentação e retirada dos filhotes também foi realizada três vezes por semana. A alimentação foi realizada com suspensão de alga *P. subcapitata*, com densidade de 105 indivíduos mL^{-1} e uma solução de fermento biológico (5g L^{-1}) e ração para trutas (5g L^{-1}), dissolvidos em água destilada e aerados por 7 dias. Após a aeração, o sobrenadante foi filtrado, em camada de gazes de algodão, para ser utilizado como alimento para Daphnia.

3.4.3.2 *Pseudokirchneriella subcapitata*

As culturas de *P. subcapitata* foram mantidas no Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP, seguindo as recomendações de Blaise et al (2000). As culturas foram iniciadas a partir de inóculo cedidos pelo Laboratório de Ecotoxicologia do Saint Lawrence Center, Montréal, Canadá, provenientes de Culturas Americanas (ATCC No. 22662). Na preparação desse meio de cultivo foram utilizados macro e micronutrientes, na forma de cinco soluções- estoque (Tabela 7), essenciais ao crescimento e desenvolvimento desta micro-alga. O meio de cultivo foi preparado com 1 mL de cada solução estoque para 1 L de água destilada, o pH foi aferido para 7,00 ± 0,01, e esta solução foi autoclavada por 30 min a 121ºC. A cultura foi mantida no meio de cultivo em temperatura ambiente, sob iluminação contínua de 4.000 ± 10% lux, e agitadas manualmente três vezes ao dia. Semanalmente foram formadas novas culturas de alga, transferindo de 1 a 2 mL da

cultura para um novo meio de cultivo, de maneira a assegurar o suprimento das células.

Tabela 7. Soluções-estoque para manutenção da cultura de *P. subcapitata*

Solução estoque *	Compostos	Quantidade em 500 mL
Micro nutrientes 1	$MgCl_2.6H_2O$	6,08 g
	$CaCl_2.2H_2O$	2,20 g
	H_3BO_3	92,8 mg
	$MnCl_2.4H_2O$	208,0 mg
	$ZnCl_2$	1,64 mg
	$FeCl_3.6H_2O$	79,9 mg
	$CoCl_2.6H_2O$	0,714 mg
	$Na_2MoO_4.2H_2O$	3,63 mg
	$CuCl_2.2H_2O$	0,006 mg
	$Na_2EDTA.2H_2O$	150,0 mg
Macro nutriente 2	$NaNO_3$	12,75 g
Macro nutriente 3	$MgSO_4.7H_2O$	7,35 g
Macro nutriente 4	K_2HPO_4	0,522 g
Macro nutriente 5	$NaHCO_3$	7,50 g

*Blaise et al (2000)

3.4.4 Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Para a determinação de toxicidade aguda com *D. magna* foi utilizado protocolo estabelecido por Dutka (1997). Cinco neonatos, com até 24 h de idade, foram separados e colocados em frascos de poliestireno contendo 28 mL das respectivas diluições do elutriato de solo e expostos durante um período de 48 h. As diluições do elutriato, com o meio de cultivo da *D. magna* foram de: 100%, 95%,

90%, 85%, 80%, 75%. No controle foi utilizado meio de cultivo para *D. magna*. O efeito medido ao final do período de exposição foi a mortalidade dos organismos, em relação ao controle [CL_{50}(48h)].

3.4.5 Teste de toxicidade crônica com *Pseudokirchneriella subcapitata*

O protocolo usado para cultivo, manutenção e realização dos testes de *P. subcapitata* foram baseados na metodologia de Blaise et al. (2000). A validade dos testes para este ensaio de toxicidade foi condicionada as seguintes premissas: o coeficiente de variação de cinco amostras controle, com tempo de exposição igual a 72 horas, não pode exceder a 40%; e a densidade celular nos frascos de controle deve aumentar por um fator de no mínimo 16.

Para os testes do elutriato , populações de *P. subcapitata* foram expostas às amostras diluídas com o meio de cultivo da alga nas concentrações de 100, 75, 50, 25, 12,5 e 6,25%. Estes frascos permaneceram vedados com filme plástico transparente e incubados sob luz contínua, por 72 h, sendo realizada agitação manual dos frascos, três vezes ao dia. Após este período, foi avaliada a toxicidade realizando-se a contagem das células com auxílio de microscópio óptico, em câmara de Neubauer.

3.4.6 Testes de crescimento de raiz com sementes de *Lactuca sativa*

Para avaliar o crescimento de raízes de alface (*Lactuca sativa*) foi utilizado protocolo estabelecido por Dutka (1997). Sementes de alface foram expostas a 2 mL do elutriato de solo, em placas de Petri (9 cm de diâmetro) contendo um disco de

papel de filtro, para suporte das sementes. Cada placa recebeu 20 sementes, uniformemente distribuídas, e mantida a 25ºC por 72 h, em ausência de luz. O efeito medido ao final do período de exposição foi o comprimento das raízes, medidos em papel milimetrado, em relação ao controle (água destilada).

3.4.7 Teste de genotoxicidade com *Allium cepa*

Os ensaios de genotoxicidade foram realizados com sementes de cebola (*Allium cepa)*. A variedade da semente utilizada foi Baia Periforme (Topseed). A avaliação das aberrações cromossômicas e de micronúcleos em células meristemáticas de radículas de *Allium cepa* foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações.

As sementes de cebola foram germinadas em placas de Petri forradas com papel filtro (duas réplicas por amostra). Quando atingiram cerca de 2 cm de comprimento, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy 3:1 (3 partes de etanol para 1 parte de ácido acético), por 6 a 18 horas em temperatura ambiente. Após nova troca do mesmo fixador, as raízes foram armazenadas, em geladeira, até a sua utilização para confecção das lâminas.

Para a confecção de lâminas as raízes fixadas foram lavadas em água destilada e, posteriormente, hidrolisadas em solução ácida (HCl 1 mol L^{-1} a 60°C). As raízes foram transferidas para coloração em reativo de Schiff, por aproximadamente 2 horas. Posteriormente as raízes foram lavadas em água destilada até a total retirada do corante. Para o preparo das lâminas, os meristemas foram suavemente esmagados em uma gota de carmim acético (20 g L^{-1}) e recobertos com lamínulas. Para a confecção de lâminas permanentes, as mesmas

foram submersas em nitrogênio líquido, para a retirada da lamínula e, posteriormente montadas com resina sintética.

Para a avaliação das aberrações cromossômicas, foram considerados fragmentos, perdas, pontes, atrasos, aderências cromossômicas, entre outras aberrações presentes nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). No entanto, para a avaliação das aberrações cromossômicas como uma única variável de avaliação, todas as diferentes aberrações foram reunidas em um só grupo. A análise de micronúcleos foi considerada como outra variável de avaliação, não sendo agrupada junto com as aberrações cromossômicas. O índice mitótico, relacionado com o número de células em divisão, constituiu um terceiro parâmetro de avaliação.

A avaliação desses três parâmetros ocorreu na contagem de 5000 células por amostra, sendo 1000 células contadas por lâmina para um total de 5 lâminas por amostra.

3.5 Análise dos resultados

Na avaliação de elementos potencialmente tóxicos no solo, foram obtidos os teores dos elementos Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb em mg kg^{-1}.

Para os testes toxicológicos com *D.magna*, o efeito medido foi a mortalidade, sendo estimado a CL_{50} (48 h), pelo método Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1978).

Para os testes toxicológicos com *P. subcapitata,* o efeito medido foi a inibição do crescimento, sendo estimado a CI_{50} (72 h) pelo método Trimmed Spearman-Karber (HAMILTON et al., 1978).

Para o teste de crescimento de raiz com *L. sativa* foi medido o comprimento das raízes germinadas.

Para o teste de genotoxicidade com *Allium cepa*s foram contabilizadas a freqüência de índice mitótico, a freqüência de aberrações cromossômicas e a freqüência de micronúcleos das células analisadas.

Para a análise estatística dos resultados obtidos, foram realizadas análises de variância, testes de médias, e regressão simples com o auxílio do programa SAS (1989).

Para verificar a relação entre os teores dos elementos potencialmente tóxicos e os índices de toxicidade, procedeu-se a análise de correlação (Pearson r)

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Elementos potencialmente tóxicos no solo

Com relação aos micronutrientes analisados (Cu, Fe, Mn, Zn e Ni), verificou-se um aumento linear dos teores em função das doses de lodo de esgoto. Constatou-se que os teores extraídos com DTPA, Mehlich-1 e HNO_3+HCl, no solo tratado com 0 e 23,1 t ha 1, variaram, em mg kg^{-1}, de 0,48 a 2,44; de 0,38 a 1,65; e de 0,92 a 7,50, respectivamente, para o cobre (Tabela 8); de 35,6 a 76,8; de 44,7 a 90,0; e de 3861 a 8918, respectivamente, para o ferro (Tabela 8); de 0,70 a 3,86; de 2,84 a 4,71; e de 21,1 a 53,3, respectivamente, para o manganês (Tabela 9); de 0,57 a 6,88; de 1,31 a 3,22; e de 2,48 a 20,96, respectivamente, para o zinco (Tabela 9); de 0,043 a 0,204; de 0,03 a 0,25; e de 1,31 a 1,9, respectivamente, para o níquel (Tabela 10) Houve interação significativa entre as doses de lodo de esgoto e as épocas de amostragem para os teores de Cu, Fe, Mn, Zn e Ni extraídos com HNO_3+HCl. Foram observados maiores teores desses elementos, extraídos com HNO_3+ HCl ,na coletada realizada aos 24 meses (dezembro de 2006), o que pode ter sido ocasionado pelo aumento da serrapilheira, que ao se decompor pode contribuir no aumento de nutrientes na camada superficial do solo.

Aumentos nos teores de Cu em solo, na profundidade de 0-20 cm, foram, verificados no estudo de Ligo et al. (1987). Resultados similares foram obtidos por Simon et al. (1992), Berton et al. (1989) e Pombo et al. (1989). Oliveira (2000) observou aumento nos teores de Cu em solos tratados com lodo de esgoto.

Marques et al. (1999), Oliveira e Mattiazzo (2001), Silva et al. (2001), Pigozzo (2003) e Oliveira et al. (2005), utilizando lodo de esgoto, verificaram acréscimo dos teores de Zn no solo, em razão das doses.

Pigozzo et al. (2006), aplicando lodo de esgoto por dois anos consecutivos, verificaram que os teores extraíveis de Fe por DTPA aumentaram gradativamente com as doses de lodo.

Com relação aos elementos tóxicos (Pb, Cd e Cr), verificou-se um aumento linear, eventualmente quadrático, dos teores em relação as doses de lodo de esgoto, para todos os métodos de extração e digestão utilizados. Houve interação significativa entre as doses de lodo de esgoto e as épocas de amostragem, para Cd, através de digestão ácida (HNO_3+HCl). Para os metais tóxicos, constatou-se que os teores extraídos com DTPA, Mehlich-1 e HNO_3+HCl, no solo tratado com 0 e 23,1 t ha ^{1}, variaram, em mg kg^{-1}, de 0,59 a 1,33; de 0,72 a 1,16; e de 4,15 a 6,35, respectivamente, para o chumbo (Tabela 10); de 0,015 a 0,026; de 0,09 a 0,14; e de 9,9 a 12,68, respectivamente, para o cromo (Tabela 11); e em µg kg^{-1}de 1,38 a 88,22; de 1,90 a 93,15; e de 4,82 a 152,67, respectivamente, para o de cádmio (Tabela 11);

Bertoncini (1997) em estudo com aplicação de lodo de esgoto verificou o aumento de doses de Cr através de extração com digestão ácida e DTPA, em relação ao solo sem a aplicação do lodo. Em Andrade (1999) e Andrade e Matiazzo (2000) foi observado efeito significativo do lodo aplicado no solo, sobre a concentração total de Cr na camada superficial (0-10cm).

Marques et al. (1999) e Pigozzo (2003), em um experimento com aplicação de lodo de esgoto, verificaram acréscimo dos teores de Pb no solo, em razão das doses de lodo

Tabela 8. Teores de cobre e de ferro no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Extrator	Doses lodo de esgoto (t ha^{-1})					Termo de regressão	
		0	7,7	15,4	23,1	Média	Linear	Quadrático
		----------Cobre (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,37	0,59	0,97	1,73	**0,92b**	-	-
21		0,28	0,71	1,45	1,88	**1,08b**	-	-
24		0,53	0,86	2,62	2,97	**1,75a**	-	-
27		0,56	1,22	1,99	3,10	**1,72 a**	-	-
34		0,66	0,90	1,41	2,51	**1,37ab**	-	-
Média		**0,48**	**0,86**	**1,69**	**2,44**		0,98**	ns
	Mehlich 1							
18		0,41	0,51	0,79	1,26	**0,74 b**	-	-
21		0,17	0,51	0,87	1,39	**0,73 b**	-	-
24		0,34	0,93	0,96	1,83	**1,01ab**	-	-
27		0,58	0,75	1,49	1,95	**1,19 a**	-	-
34		0,41	0,91	1,32	1,85	**1,21 a**	-	-
Média		**0,38**	**0,72**	**1,09**	**1,65**		0,98**	ns
	HNO_3+HCl							
18		1,44 a	2,06 a	3,18 bc	3,75 b		0,98**	ns
21		0,92 a	2,01 a	4,82 ab	6,47 a		0,98**	ns
24		2,67 a	2,59 a	6,33 a	7,43 a		0,87**	ns
27		0,96 a	3,47 a	5,66 a	7,50 a		0,99**	ns
34		1,27 a	1,67 a	2,43 c	5,95 a		0,80**	0,98*
		----------Ferro (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		35,6 b	45,6 b	53,1 b	75,0a		0,94**	0,98*
21		42,0 b	62,7 a	62,8 a	76,8a		0,89**	ns
24		49,5 a	49,3 b	68,0 a	71,4a		0,85**	ns
27		40,4 b	47,7 b	48,6 bc	63,4b		0,88**	ns
34		38,9 b	42,0 b	43,9 c	53,7c		0,87**	ns
	Mehlich 1							
18		44,7	51,0	57,5	68,9	**55,5**	-	-
21		46,0	65,5	80,9	88,4	**70,2**	-	-
24		48,5	59,2	80,9	88,8	**69,3**	-	-
27		52,5	64,4	79,1	90,0	**71,5**	-	-
34		53,5	60,1	65,0	80,5	**64,8**	-	-
Média		**49,0**	**60,0**	**72,7**	**83,3**		0,99**	ns
	HNO_3+HCl							
18		3861 b	4494 c	5127 c	5577 c		0,99**	ns
21		7022 a	7169 b	7373 b	7860 b		0,92**	ns
24		7263 a	7440ab	8109 a	8798 a		0,95**	ns
27		7295 a	7398ab	8261 a	8918 a		0,93**	ns
34		7649 a	7942 a	7887ab	8032 b		ns	ns

Letras diferentes nas colunas, para cada método de extração, mostram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), de acordo com o teste de Tukey; *$p<0,05$;** $p< 0,01$.

Tabela 9. Teores de manganês e de zinco no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Extrator	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})					Termo de regressão	
		0	7,7	15,4	23,1	Média	Linear	Quadrático
		----------Manganês (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,70b	2,06a	2,28c	2,43c		0,78*	0,98**
21		1,49a	2,04a	2,79b	2,86b		0,92**	0,97*
24		1,48a	1,63b	3,31a	3,86a		0,91**	0,92*
27		0,90b	1,09c	1,09d	1,44d		0,87**	ns
34		1,05b	1,93ab	2,13c	3,02b		0,95**	ns
Média								
	Mehlich 1							
18		2,76	3,86	4,30	4,78	**3,92b**	-	-
21		2,97	4,35	5,00	5,14	**4,37a**	-	-
24		3,21	3,93	4,22	4,43	**3,95b**	-	-
27		2,52	3,42	4,51	5,11	**3,89b**	-	-
34		2,71	3,48	3,67	4,07	**3,48c**	-	-
Média		**2,84**	**3,81**	**4,34**	**4,71**		0,95*	0,99*
	HNO_3+HCl							
18		21,1c	23,8d	29,6d	34,8d		0,85**	ns
21		36,8ab	42,6ab	43,3bc	46,4b		0,91**	0,99**
24		34,2b	43,9a	46,7ab	50,1ab		0,84**	0,98**
27		38,6a	39,2bc	48,8a	53,3a		0,74**	ns
34		35,1ab	38,4c	39,3c	40,1c		0,95**	ns
Média								
		----------Zinco (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,57a	1,44c	1,33b	2,57b		0,97**	ns
21		1,09a	2,06ab	3,44a	6,88a		0,90**	ns
24		1,50a	2,04ab	2,99a	6,58a		0,91**	0,98*
27		1,11a	3,48a	3,61a	3,95b		0,92**	ns
34		1,14a	2,33ab	3,86a	4,19b		0,88**	ns
Média								
	Mehlich 1							
18		0,79	1,23	2,22	3,28	**1,88b**	-	-
21		1,05	1,78	2,30	3,95	**2,27ab**	-	-
24		1,44	2,19	2,61	3,85	**2,52a**	-	-
27		1,00	1,57	1,98	2,43	**1,75b**	-	-
34		1,38	1,85	2,19	2,58	**1,99ab**	-	-
Média		**1,31**	**1,72**	**2,16**	**3,22**		0,99**	ns
	HNO_3+HCl							
18		2,48c	3,91b	4,21c	9,89b		0,79**	0,93*
21		7,87b	13,15a	14,60b	18,07a		0,95**	ns
24		10,92ab	12,43a	14,55b	20,96a		0,89**	0,99*
27		7,85b	13,52a	15,17b	18,07a		0,94**	ns
34		11,81a	14,31a	19,80a	19,19a		0,85**	ns

Letras diferentes nas colunas, para cada método de extração, mostram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), de acordo com o teste de Tukey; *$p<0,05$;** $p< 0,01$.

Tabela 10. Teores de chumbo e de níquel no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Extrator	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})					Termo de regressão	
		0	7,7	15,4	23,1	Média	Linear	Quadrático
		----------Chumbo (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,69a	0,81ab	1,07ab	1,28a		0,98**	ns
21		0,90a	1,03a	1,09ab	1,34a		0,94**	ns
24		0,70a	0,87a	0,86b	1,33a		0,80**	ns
27		0,76a	0,80ab	0,84b	1,24a		0,74**	ns
34		0,59a	0,54b	1,23a	1,28a		0,80**	ns
	Mehlich 1							
18		0,56	0,60	0,64	0,66	**0,61b**	-	-
21		0,71	1,00	1,36	1,36	**1,12a**	-	-
24		0,71	0,84	1,06	1,39	**1,00a**	-	-
27		0,78	0,94	0,95	1,32	**1,00a**	-	-
34		0,82	0,95	1,00	1,08	**0,96a**	-	-
Média		**0,72**	**0,87**	**1,00**	**1,16**		0,99**	ns
	HNO_3+HCl							
18		2,352	3,025	3,046	4,017	**3,11b**	-	-
21		4,436	5,206	5,535	6,363	**5,38a**	-	-
24		5,047	5,842	6,644	7,894	**6,36a**	-	-
27		4,296	5,959	5,859	7,013	**5,78a**	-	-
34		4,646	5,004	5,362	6,480	**5,37a**	-	-
Média		**4,15**	**5,01**	**5,29**	**6,35**		0,96*	ns
		----------Níquel (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,03	0,05	0,06	0,08	**0,06c**	-	-
21		0,04	0,15	0,19	0,23	**0,16a**	-	-
24		0,09	0,09	0,21	0,22	**0,15a**	-	-
27		0,03	0,12	0,13	0,21	**0,12b**	-	-
34		0,04	0,08	0,12	0,27	**0,13b**	-	-
Média		**0,04**	**0,10**	**0,14**	**0,20**		0,99*	ns
	Mehlich 1							
18		0,04a	0,07a	0,09bc	0,10d		0,95**	ns
21		0,03a	0,08a	0,11bc	0,25a		0,89**	0,96**
24		0,03a	0,04b	0,09c	0,18b		0,90**	0,99**
27		0,05a	0,09a	0,14a	0,15c		0,91**	0,97*
34		0,03a	0,05b	0,12b	0,12d		0,88**	ns
	HNO_3+HCl							
18		0,69c	0,74d	0,89d	0,96d		0,96**	ns
21		1,32a	1,55ab	1,77a	1,88a		0,97**	ns
24		1,30a	1,69a	1,56b	1,91a		0,74**	ns
27		1,12b	1,47b	1,52b	1,75a		0,93**	ns
34		0,96b	1,09c	1,21c	1,27c		0,98**	ns

Letras diferentes nas colunas, para cada método de extração, mostram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), de acordo com o teste de Tukey; *$p<0,05$;** $p< 0,01$.

Tabela 11. Teores de cádmio e de cromo no solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Extrator	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})					Termo de regressão	
		0	7,7	15,4	23,1	Média	Linear	Quadrático
		----------Cádmio (µg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		1,38a	2,85b	4,29c	19,43b		0,75*	ns
21		3,24a	15,95ab	25,92cb	75,25a		0,85**	0,98**
24		19,54a	34,78a	59,48a	88,22a		0,86**	ns
27		3,88a	34,25a	61,78a	78,16a		0,98**	ns
34		18,75a	38,44a	50,48ab	58,89a		0,99**	ns
	Mehlich 1							
18		1,90a	3,59a	6,04c	24,19c		ns	ns
21		3,62a	13,14a	25,17bc	71,25ab		0,85**	ns
24		11,55a	17,03a	86,50a	93,15a		0,86**	ns
27		3,80a	28,35a	45,30b	59,53b		0,99**	ns
34		11,49a	29,97a	40,48b	54,40b		0,99**	ns
	HNO_3+HCl							
18		4,82a	8,55b	16,10c	31,79 c		0,91*	ns
21		14,71a	40,71ab	129,23a	145,9ab		0,93**	ns
24		33,71a	67,96b	160,93a	152,67a		0,85**	0,89*
27		21,25a	70,54b	126,47a	139,8ab		0,95**	ns
34		42,73a	63,43b	84,79b	112,35b		0,99**	ns
		----------Cromo (mg kg^{-1})----------						
	DTPA							
18		0,019	0,021	0,023	0,028	**0,023a**	-	-
21		0,014	0,025	0,026	0,028	**0,023a**	-	-
24		0,017	0,022	0,022	0,025	**0,021a**	-	-
27		0,011	0,014	0,016	0,026	**0,017b**	-	-
34		0,013	0,016	0,017	0,021	**0,017b**	-	-
Média		**0,015**	**0,019**	**0,021**	**0,026**		0,96**	ns
	Mehlich 1							
18		0,09	0,10	0,12	0,12	**0,10ab**	-	-
21		0,08	0,09	0,12	0,16	**0,13a**	-	-
24		0,10	0,12	0,13	0,16	**0,12ab**	-	-
27		0,08	0,09	0,10	0,13	**0,10bc**	-	-
34		0,08	0,09	0,09	0,11	**0,09c**	-	-
Média		**0,09**	**0,09**	**0,11**	**0,14**		0,96**	ns
	HNO_3+HCl							
18		5,58	7,35	7,79	8,03	**7,2d**	-	-
21		10,17	11,52	11,56	12,14	**11,4c**	-	-
24		11,93	13,06	14,75	15,50	**13,8a**	-	-
27		10,74	11,40	14,44	14,66	**12,8ab**	-	-
34		11,10	12,38	12,79	13,05	**12,3bc**	-	-
Média		**9,90**	**11,14**	**12,27**	**12,68**		0,96*	ns

Letras diferentes nas colunas, para cada método de extração, mostram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), de acordo com o teste de Tukey; *$p<0,05$;** $p< 0,01$.

Com os resultados obtidos nas determinações dos elementos citados, foi possível observar que os teores extraídos com digestão ácida com HNO_3+HCl foram maiores que aqueles extraídos com DTPA e Melich 1. Esses resultados, de acordo com Abreu et al (2007), são esperados, já que a digestão ácida (HNO_3+HCl), digere praticamente todos os constituintes do solo que contém metais pesados, até mesmo os mais fortemente adsorvidos, exceto a fração silicatada. O DTPA e o Mehlich extraem geralmente as frações teoricamente consideradas como disponível às plantas. No presente trabalho os teores obtidos com DTPA e Mehlich 1para Cd, Cu, Ni, Pb, Zn foram semelhantes. Por outro lado os teores de Cr, Fe e Mn foram superiores quando extraídos com Mehlich 1 provavelmente pelo fato.deste último utilizar uma solução ácida, e poder extrair os metais mais fortemente.

Resultados semelhantes foram obtidos por Rangel (2003), onde os teores extraíveis de Mn pelo Mehlich-1 foram maiores em relação ao DTPA. Abreu et al. (1996) observaram uma menor extração de Mn pelo DTPA em relação aos extratores ácidos, em solo com pH próximo a 5,5. Segundo os autores, o pH do extrato obtido pelo DTPA (pH 7,3) é maior do que o obtido nas amostras, causando a precipitação do Mn. Segundo Borkert (1991), as soluções ácidas extraem mais Mn do que as alcalinas, as contendo sais ou as preparadas com o uso de complexos orgânicos.

Pela análise de correlação entre os teores de cada elemento obtidos através dos diferentes tipos de extração (Tabela 12) foi possível observar uma alta correlação entre os métodos DTPA e Mehlich 1 para todos os elementos.

Os teores obtidos com DTPA apresentaram correlação com os teores obtidos com extração com HNO_3+HCl para os elementos Cu, Zn, Cd, Ni e Pb; porém não apresentou correlação com os elementos Fe, Mn e Cr.

Os teores obtidos com Mehlich 1 apresentaram correlação com a digestão com HNO_3+HCl, exceto para o Cr.

Portanto, pelas análises de correlação discutidas acima e considerando que houve incremento nos teores de todos os elementos, em função das doses de lodo, avaliados por todos os métodos de extração, pode se inferir os incrementos nos teores de Cr, Fe e Mn pelo lodo, foi devido a adição de formas de baixa solubilidade/disponibilidade destes elementos, notadamente do Cr. Segundo Soon e Abboud (1993) o Cr é pouco móvel e inerte no solo em comparação aos outros metais .

Os resultados obtidos demonstram que a capacidade de extração dos métodos empregados variou de acordo com o elemento e em alguns casos de acordo com a dose de lodo de esgoto aplicada, o que mostra a necessidade de se considerar esses fatores na escolha de um determinado extrator para monitorar solos tratados com lodo de esgoto.

Tabela 12. Coeficientes de correlação linear entre os teores de elementos potencialmente tóxicos extraídos por DTPA, Mehlich 1 e ácido concentrado respectivamente.

Elementos	Comparação entre os métodos de extração		
	HNO_3+HCl X DTPA	HNO_3+HCl X Mehlich-1	DTAP X Mehlich-1
Cu	**0,95*** **	**0,84*** **	**0,91*** **
Fe	0,29	**0,63** **	**0,77*** **
Mn	0,36	**0,56** **	**0,61** **
Zn	**0,83*** **	**0,65** **	**0,85*** **
Cd	**0,92*** **	**0,92*** **	**0,94*** **
Cr	0,06	0,37	**0,80*** **
Ni	**0,74*** **	**0,60** **	**0,76*** **
Pb	**0,45* **	**0,86*** **	**0,57** **

*p<0,05 ;** p< 0,01;*** p<0,001

De acordo com Silva et al. (2006), o acúmulo de metais pesados em solo, em função de aplicações de lodo de esgoto, é um dos aspectos que mais causa preocupação com relação à segurança ambiental necessária para a viabilização do uso desse resíduo na agricultura. Entretanto, ao se comparar os teores obtidos de Cd, Pb, Cu, Cr, Ni, Zn no solo, extraídos com HNO_3+HCL com os limites críticos estabelecidos pela CETESB (2005) em mg kg^{-1}: Cd = 3; Pb =180; Cu = 200; Cr = 150, Ni = 70 e Zn = 450, verificou-se que os teores destes elementos estiveram dentro dos valores permissíveis para solos agrícolas, mesmo para o tratamento com 23,1t ha^{-1}.

De acordo com McBRIDE (1994), quando os metais pesados se encontram em baixas concentrações, há tendência de que eles permaneçam retidos no solo pelo processo de adsorção. Silva et al. (2001) verificaram que, embora o lodo provoque aumento nos teores de metais pesados no solo, esses perduram por apenas um ano e em níveis aquém dos valores considerados nocivos ao ambiente. Sob condições naturais, a presença desses metais pesados no solo não tem causado danos às plantas e animais, fato que pode estar associado à formação de complexos estáveis com ácidos húmicos ou a formação de óxidos e hidróxidos, causando redução na sua disponibilidade (MIYAZAWA, et al., 1999).

4.2 Teste de toxicidade com *D. magna*

Os Valores de CL_{50} (48h) (%), para o teste toxicológico com *D. magna,* do solo tratado com lodo de esgoto tratado com 0 e 23,1 t ha^{-1}, variaram, em %, de 94 a 78,respectivamente (Tabela 13). Houve efeito significativo da interação entre doses de lodo e épocas para os valores de $CL_{50.}$ Em relação as doses de lodo, os valores

de CL_{50} se ajustaram melhor ao modelo quadrático de regressão, com ponto mínimo, exceto aos 34 meses após aplicação de lodo, em que houve um ajuste ao modelo linear decrescente. Portanto, o teste de *D.magna*, evidenciou que houve aumento na toxicidade no solo em função das doses de lodo dos 18 aos 34 meses após aplicação do resíduo. Destaca-se, porém, que a toxicidade para *D.magna* foi baixa, com índice de toxicidade máxima de 78%.

Baixa toxicidade para *D. magna* também foi encontrada no trabalho de Fernandez et al (2005) que realizou testes com amostras de solo de uma área industrial. Em Maxam et al (2000), amostras de solo contaminado com diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas foram analisadas pelo bioensaio com *D. magna* e também obtiveram baixos valores de potencial ecotoxicológico.

No entanto, em um ensaio utilizando *D. magna* para testar a toxicidade de lixiviados de lodo de esgoto, foi observada alta toxicidade, com valores de CL_{50} (48h) =15% (FJALLBORG et al., 2005). Fjllborg and Gustfsson (2006) também relataram efeitos tóxicos para *D. magna* observando valores de CL_{50} (48h) = 16%, testando amostras de lodo de esgoto, verificando haver correlação entre a toxicidade para *D.magna* e a concentração de metais pesados em algumas amostras, principalmente em relação ao cobre.

Testes toxicológicos realizados para efluentes de um laboratório de química da UFSCAR mostraram alta toxicidade para Daphnia, obtendo valores de CL_{50} (48h) de até 2% (GEORGETTI, 2008).

De acordo com os valores obtidos, pode-se afirmar que não houve substâncias presentes nas amostras de solo tratadas com lodo capazes de causar alta toxicidade para *D. magna.*

Tabela 13. Valores de CL_{50} (48h) (%), para o teste toxicológico com *D. magna*, do solo, na camada de 0 a 10 cm, de sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})				Termo de regressão	
	0	7,7	15,4	23,1	Linear	Quadrático
	----------%----------					
18	91c	88bc	81d	81d	0,89**	0,93**
21	89d	78d	79e	79e	0,52**	0,89**
24	91c	87c	83c	83c	0,88**	0,99**
27	92b	89b	89b	89b	0,52**	0,89**
34	94a	97a	94a	92a	0,99**	ns

Letras diferentes nas colunas mostram diferenças significativas entre si (p<0,05), de acordo com o teste de Tukey *p<0,05 ;** p< 0,01

4.3 Teste toxicológico com *P. subcaptata*

Os valores de CI_{50} (72h) (%), para o teste toxicológico com *P.subcapata,* do solo tratado com lodo de esgoto tratado com 0 e 23,1 t ha^{-1}, variaram, em %, de 98 a 30, respectivamente (Tabela 14). Houve efeito significativo da interação entre doses de lodo e épocas para os valores de $CI_{50.}$ Em relação as doses de lodo, os valores de CI_{50} se ajustaram melhor ao modelo quadrático de regressão, com ponto mínimo, exceto aos 34 meses após aplicação de lodo, em que houve um ajuste ao modelo linear decrescente. Portanto, o teste de toxicidade com *P. subcaptata*, evidenciou que houve aumento na toxicidade no solo em função das doses de lodo dos 18 aos 34 meses após aplicação do resíduo.

Foi observado que, em relação ao índice de toxicidade para as amostras de solo analisadas, a alga foi mais sensível que a Daphnia. Resultados semelhantes foram observados por Fernandez et al. (2005) utilizando os mesmos testes

toxicológicos, em amostras de solos de área industrial, e em Blaise e Férard (2005) avaliando a toxicidade de resíduo sólido municipal.

A alga *P.subcaptata* tem sido utilizada para testes de avaliação de toxicidade e detecção de fontes de poluentes por serem produtores primários e se encontrarem na base da cadeia alimentar. Aspectos relativos a sua sensibilidade a tóxicos podem fornecer informações de substancias fitotóxicas em amostras ambientais.

De acordo com os valores obtidos neste teste, pode-se afirmar que o teste com a alga se mostrou eficiente na avaliação da toxicidade do solo tratado com lodo de esgoto e havia substancias presentes no solo capaz de causar toxicidade para *P. subcaptata*.

Tabela 14. Valores de CI_{50} (72h)(%), para o teste toxicológico com *P. subcapitata*, do solo, na camada de 0 a 10 cm, de sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})				Termo de regressão	
	0	7,7	15,4	23,1	Linear	Quadrático
	P.subcaptata CI_{50}(48h) %					
18	98a	70a	61a	63a	0,74**	0,99**
21	71b	43d	30d	30e	0,83**	0,99**
24	60d	48c	38c	36c	0,93**	0,99**
27	97a	48c	40c	34d	0,78**	0,97**
34	63c	62b	47b	44b	0,87**	ns

Letras diferentes nas colunas mostram diferenças significativas entre si (p<0,05), de acordo com o teste de Tukey.; *p<0,05 ** p< 0,01

4.4 Teste de crescimento de raiz com *L.sativa*

Não houve efeito significativo da interação entre doses de lodo e épocas para os valores de crescimento de raiz no teste toxicológico com *L.sativa*.

O teste toxicológico demonstrou um aumento linear do crescimento das raízes em função das doses de lodo de esgoto (Tabela 15), e os valores variaram de 1,54 cm, na amostra de solo sem aplicação lodo, até 2,06 cm, na amostra com 23,1 t ha^{-1} de lodo, indicando que o aumento das doses de lodo provavelmente contribuiu para o crescimento da planta. Todavia, verificou-se também que o crescimento das raízes foi menor aos 18 meses após a aplicação de lodo, medindo 1,33 cm, do que aos 27, 34 meses, medindo 1,98 e 2,00 cm, respectivamente. Este resultado permite dizer que houve restrição no crescimento da raiz aos 18 meses do que quando comparado ao crescimento obtido 34 meses após a aplicação do lodo.

As médias dos crescimentos de raízes para todas as amostras testadas ficaram compreendidas na faixa de 1,5cm-2,8cm, que segundo Fjllborg e Dave (2004), é considerado um comprimento de raiz adequado para as primeiras 72 horas de crescimento da alface.

Banks et al. (2006) também observaram um aumento do crescimento de raízes de alface para testes realizados com amostras de solo tratadas com lodo de esgoto.

Todavia no trabalho realizado por Valerio et al. (2007), o sistema-teste com *L.sativa* mostrou ser sensível a amostras de solo afetadas por minas de pirita, demonstrando que substâncias tóxicas presentes nas amostras de solo tiveram efeito tóxico para a alface, prejudicando seu crescimento. Esse fato pode ter ocorrido pelo fato de que a alface é uma planta que acumula relativamente grande

quantidade de metais pesados, tais como Cu, Zn a Pb (HUE et al., 1988; BOON; SOLTANPOUR, 1992), elementos que estavam presentes nas amostras de solo do trabalho citado, porém em teores muito superiores aos do presente trabalho.

Em Correa et al. (2005), foi observado efeito toxicológico do cádmio (400 mg kg^{-1} de solo) nas taxas de germinação de alface. A produção da biomassa diminuiu em função do amento dos teores de cádmio. Porém a concentração tóxica de cádmio observada por Correa et al. (2005) foi bem maior do que concentração observada no presente estudo até para o tratamento com 23,1t ha^{-1}, cujo teor de cádmio foi de0,153 mg kg^{-1}.

Tabela 15. Crescimento de raiz (cm) no teste toxicológico com *L.sativa*, para o solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Doses de lodo de esgoto (t ha^{-1})						Termo de regressão	
	C	0	7,7	15,4	23,1	Média	Linear	Quadrático
				Alface				
18	1,32	1,34	1,38	1,41	1,92	**1,33c**		
21	1,63	1,76	2,12	2,21	2,31	**1,79b**		
24	1,69	1,82	1,96	2,11	2,17	**1,90ab**		
27	1,55	1,69	1,83	1,91	1,99	**1,98a**		
34	1,24	1,62	1,91	2,01	2,10	**2,00a**		
Média	**1,54**	**1,72**	**1,82**	**1,87**	**2,06**		0,87*	ns

Letras diferentes nas colunas mostram diferenças significativas entre si (p<0,05), de acordo com o teste de Tukey;*p<0,05 ;** p< 0,01

4.5 Teste genotóxico e mutagênico com *A. cepa*

Os resultados obtidos no sistema-teste com *Allium cepa* foram divididos em efeitos citotóxicos, avaliados pela freqüência de índice mitótico, efeitos genotóxicos, avaliados pela freqüência de aberrações cromossômica e efeitos mutagênicos, avaliados pela freqüência de micronúcleos (Tabela 16).

4.5.1 Análise dos efeitos citotóxicos

Os efeitos citotóxicos, avaliados pela freqüência de índice mitótico, mostraram que houve diferença significativa das amostras de solo tratadas com lodo 23,1 t ha^{-1} de lodo em relação ao controle de laboratório (água destilada) e a amostra de solo sem tratamento de lodo (Tabela 16).

A inibição de atividades mitóticas é freqüentemente usada para rastrear substâncias citotóxicas (LINNAINMAA et al., 1978). Um decréscimo maior de 22% em relação ao controle causa efeito subletal nos organismos testados (ANTONSIE-WIEZ, 1990), enquanto um decréscimo maior de 50% (valor limite citotóxico), usualmente causa efeito letal (PANDA e SAHU, 1985; SHARMA,1983).

Na coleta realizada aos 18 meses após a aplicação, não foram observadas diferenças significativas na freqüência do índice mitótico, quando comparadas as amostras tratadas com lodo com aquelas sem tratamento de lodo e o controle, indicando que o lodo não causou efeito citotóxico para *Allium cepa* (Tabela 16).

Na coleta realizada aos 21 meses após aplicação de lodo no solo, foi observado um aumento significativo na freqüência do índice mitótico quando comparadas a amostra tratada com 23,1 t ha^{-1}de lodo com todas as outras e com o controle. O aumento do índice mitótico pode ter sido causado pelo efeito da matéria orgânica e nutrientes que o lodo viabilizou a amostra, aumentando assim o crescimento da planta exposta. Como o crescimento da planta se dá por divisões celulares, isso pode explicar o aumento do nível mitótico. Essa explicação também pode definir o aumento da freqüência do nível mitótico das amostras tratadas com lodo, e também, daquelas sem tratamento de lodo em relação ao controle negativo

de laboratório nas coletas realizadas aos 24, 27 e 34 meses após a aplicação do lodo.

Os resultados obtidos na avaliação da freqüência de índice mitótico, de células de *Allium cepa,* mostraram que as doses de lodo de esgoto, não causaram toxicidade e, ainda promoveram um crescimento na quantidade de mitose. Esse efeito demonstrou que este teste não foi efetivo para avaliar a toxicidade do solo em função das doses de lodo de esgoto, e que o solo tratado não continha concentração suficiente de substâncias que pudessem causar efeito tóxico na divisão celular da planta. Todavia, assim como no teste com *L.sativa*, este teste evidenciou que quanto maior o tempo após a aplicação do lodo, maior o crescimento da divisão celular na planta, ou seja, havia algum composto ou substância que não beneficiava o teste aos 18 meses, em relação aos benefícios notados aos 34 meses após a aplicação.

4.5.2 Análise dos efeitos genotóxicos e mutagênicos

Foram observadas irregularidades cromossômicas e celulares a partir do sistema teste com *Allium cepa.* As alterações cromossômicas foram divididas em duas categorias: as alterações genotóxicas e as alterações mutagênicas (Tabela 16).

Foi possível notar que o controle negativo apresentou freqüência do índice de aberrações cromossômicas genotóxicas baixa (0,3%). Já a amostra de solo sem tratamento de lodo, da coleta realizada aos 18 meses após o início do experimento, apresentou uma freqüência mais alta (0,72%), sendo considerada estatisticamente diferente do controle negativo, indicando um potencial genotóxico da amostra de solo pelo sistema-teste *Allium cepa.* Nesta mesma coleta, aos 18 meses, a

freqüência de aberrações cromossômicas na amostra tratada com maior dose de lodo, se mostrou estatisticamente diferente do controle negativo e da amostra de solo sem tratamento, indicando um potencial mutagênico com o aumento da dose do lodo, no sistema-teste *Allium cepa*. Resultado semelhante ocorreu na amostra tratada com maior dose de lodo nas coletas realizadas aos 21, 27 e 34 meses após a aplicação do lodo. Na coleta realizada aos 24 meses após o tratamento com lodo, nenhuma amostra tratada apresentou diferença significativa em relação à amostra sem tratamento com lodo, porém, as freqüências das aberrações cromossômicas, das amostras tratadas com 15,4 e 23,1 tha^{-1} de lodo foram estatisticamente maiores que a freqüência observada no controle negativo.

De acordo com Natarajan (2002) as aberrações cromossômicas podem ser causadas por agentes de ações genotóxicas, aos quais muitos organismos, incluindo o homem, podem estar expostos. Sendo assim, a avaliação das aberrações cromossômicas como *endpoint* de agentes químicos têm sido usadas como uma ferramenta no monitoramento ambiental.

A análise das freqüências totais de aberrações realizadas neste estudo, mostrou diferenças significativas das freqüências das amostras em relação ao controle negativo e, em algumas coletas, também mostrou uma diferença das amostras tratadas com maior dose de lodo, em relação as amostra sem tratamento de lodo. Porém, os valores observados nas freqüências de aberrações, nas amostras deste estudo, podem ser considerados baixos. Estudos realizados por Caritá, (2007) com o mesmo sistema-teste (*Allium cepa*), com amostras brutas de lodo de esgoto de diferentes estações de tratamento de esgoto, inclusive da estação de tratamento de Jundiaí, mostram valores de freqüências de aberrações de até 2,63%. Em Migdi (2007), amostras de efluentes industriais sem tratamento e diluída

a 60%, mostraram valores de freqüência de aberrações cromossômicas de 9,4%, enquanto o valor máximo encontrado neste estudo foi de 0,98%.

Deve ser levado em consideração o fato de que a freqüência total de aberrações cromossômicas pode indicar a genotoxicidade dos compostos presentes nas amostras testadas e não os mecanismos de ação destes sob o material genético da célula. Uma análise diferenciando cada tipo de alteração cromossômica encontrada pode informar sobre os efeitos dos compostos sobre a ação no DNA.

Tipos de aberrações, como C-metáfase, perdas e atrasos cromossômicos, podem ser derivados de problemas nos microtúbulos (estrutura do fuso mitótico), que são responsáveis pela segregação correta dos cromossomos para as células filhas (FERNANDES, 2005). Porém este tipo de aberração foi pouco encontrado no presente estudo, indicando que substancias presentes no solo tratado com lodo não interferiram no fuso mitótico diretamente. No estudo realizado por Caritá (2007), com amostras de lodo de esgoto, também se observou este mesmo resultado em relação as freqüências das aberrações citadas acima. Outro dado que também pode confirmar, que as amostras testadas neste estudo não possuem substancias que interferem nos microtúbulos, é que também foram observadas baixas freqüências de células poliplóides, e de células binucleadas. Nas análises realizadas neste estudo, a alteração observada em maior freqüência foi a ponte cromossômica, presente na anáfase, e na telófase (Figura 3).

As pontes anafásicas, podem ser formadas como conseqüência da aderência cromossômica. O trabalho realizado por Caritá (2007) também demonstrou alta freqüência de pontes cromossômicas na anáfase, em amostras de lodo de esgoto no sistema *Allium cepa*.

Pela análise dos dados obtidos, foi possível observar que o controle negativo apresentou freqüência de 0% de micronúcleos. A amostra de solo sem tratamento de lodo apresentou valores baixos de freqüência de micronúcleos, variando de 0% até 0,04%, não diferindo do controle negativo.

As amostras tratadas com maior dose de lodo de esgoto apresentaram freqüências de micronúcleos estatisticamente diferentes do controles negativos e da amostra sem tratamento de lodo, indicando um potencial mutagênico das amostras em relação ao sistema-teste *Allium cepa*, que pode ter sido provocada por alguma substancia presente no lodo de esgoto aplicado no solo.

Mesmo assim, os valores das freqüências de micronúcleos nas amostras do presente estudo podem ser considerados baixos. Estudos realizados por Caritá (2007) mostrou valores de freqüências de micronúcleos de até 1,31%. Em Migdi (2007), foi observado valores de freqüência de micronúcleos de até 5,2%, enquanto o valor máximo encontrado neste estudo foi de 0,16%,

No presente trabalho, os micronúcleos observados podem ter sido conseqüência de fragmentos cromossômicos decorrentes de pontes cromossômicas, já que foi encontrada uma maior freqüência dessa aberração. Para ser capaz de induzir a formação de um micronúcleo a substancia deve ser clastogênica ou aneugênica. Segundo Matsumoto et al. (2006) a ação clastogênica leva a formação de micronúcleos através de quebras cromossômicas durante a divisão celular. Já a ação aneugênica leva a formação de micronúcleos pela inativação do fuso mitótico, ocorrendo a perda de cromossomos inteiros.

De acordo com os valores obtidos no presente estudo, pode-se afirmar que o teste de com células de *Allium cepa* se mostrou eficiente na avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade do solo tratado com lodo de esgoto e que havia

substâncias presentes no solo capaz de causar efeito genotóxico e mutagênico para *A. cepa.*

Tabela 16. Comparação das Freqüências de índice mitótico (IM), aberrações cromossômicas (AC) e micronúcleos (MN) em células meristemáticas de *A. cepa*, para o solo, na camada de 0 a 10 cm, em sistema florestal de eucalipto tratado com lodo de esgoto.

Tempo após aplicação do lodo (mês)	Amostras tha^{-1} lodo	Índice Mitotico	Aberrações Cromossômicas %	Micronúcleo
18	Controle Negativo	20,16^{a}	0,3^{b}	0^{b}
	0	22,62^{a}	0,72^{a}	0^{b}
	0 7,7	21,4^{a}	0,8^{a}	0,02^{ab}
	15,4	20,9^{a}	0,82^{a}	0^{b}
	23,1	22,24^{a}	0,88^{a}	**0,06^{a}**
21	Controle Negativo	20,16^{b}	0,3^{c}	0^{c}
	0	24,7^{b}	0,44^{bc}	0,04^{bc}
	0 7,7	25,96^{b}	0,66^{bc}	0,1^{c}
	15,4	24,9^{b}	0,7^{ab}	0,06^{ab}
	23,1	**33,2^{a}**	**0,96^{a}**	**0,08^{a}**
24	Controle Negativo	20,16^{c}	0,3^{d}	0^{b}
	0	35,06^{bc}	0,4^{cd}	0^{b}
	0 7,7	42,84^{a}	0,68^{ac}	0,06^{ab}
	15,4	40,96^{a}	0,72^{b}	**0,16^{a}**
	23,1	31,26^{bc}	0,98^{a}	**0,1^{a}**
27	Controle Negativo	20,16^{c}	0,3^{c}	0^{c}
	0	35,14^{b}	0,52^{bc}	0^{c}
	0 7,7	40,22^{a}	0,6^{b}	0,1^{b}
	15,4	33,36^{b}	**0,88^{a}**	0,1^{b}
	23,1	29,5^{bc}	**0,84^{a}**	**0,16^{a}**
34	Controle Negativo	20,16^{d}	0,3^{cd}	0^{c}
	0	36,64^{bc}	0,26^{d}	0,02^{bc}
	0 7,7	45,36^{a}	0,52^{bc}	0^{c}
	15,4	35,6^{c}	**0,56^{b}**	0,06^{b}
	23,1	42,7^{ab}	**0,94^{a}**	**0,1^{c}**

Letras diferentes nas colunas, para cada coleta, mostram diferenças significativas entre si ($p<0,05$), de acordo com o teste de Tukey.

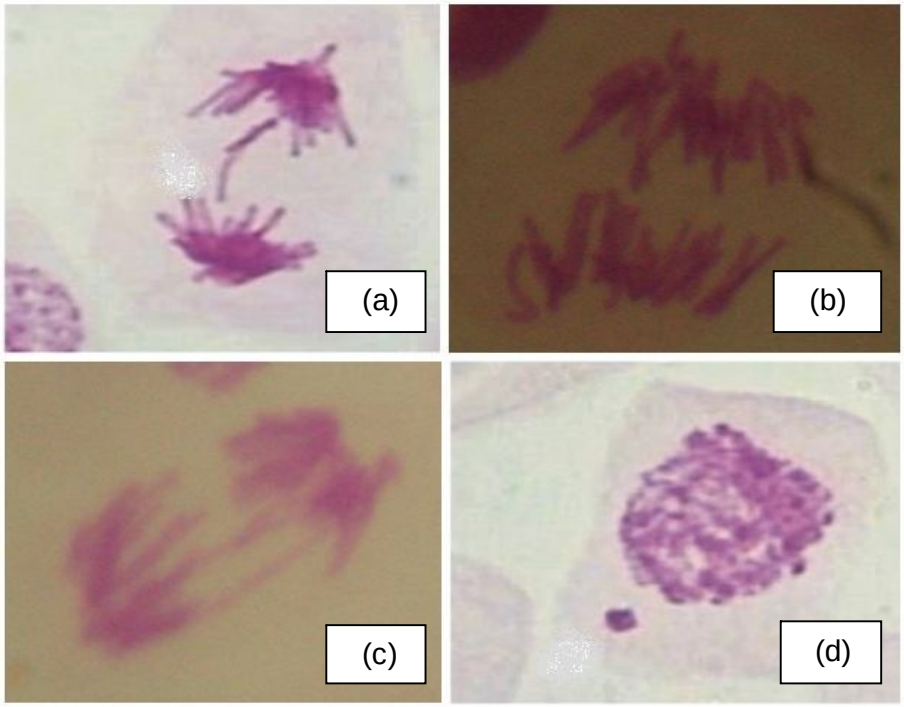

Figura 3. Efeitos genotóxicos e mutagênicos em células de Allium cepa. (a) e (b) quebra cromossômica; (c) ponte cromossômica e (d) micronúcleo.

4.6 Correlação entre elementos potencialmente tóxicos e índices toxicológicos

Os resultados obtidos para os coeficientes de correlação linear permitiram verificar que houve correlação entre os índices de toxicidade e os teores de elementos potencialmente tóxicos (Tabela 17).

Os índices para *D. magna* mostraram correlação com os teores de metais para os elementos Fe, Mn, Zn, Cr, Ni e Pb. Pode-se afirmar que os teores de elementos potencialmente tóxicos no solo, não foram suficientes para causar toxicidade para a *D. magna.*

Em um ensaio utilizando *D. magna* para testar a toxicidade de lixiviados de lodo de esgoto, foi possível observar uma correlação entre a toxicidade e a concentração de Zn e Cu nas amostras.

Em Maxam et al (2000), amostras de solo contaminado com diferentes substâncias orgânicas e inorgânicas foram analisadas pelo bioensaio com *D. magna* e não foi verificado correlação entre os índices de toxicidade e os teores de metais pesados observados.

O teste de toxidade com a alga *P. subcaptata* mostrou alta correlação com os teores de todos os elementos potencialmente tóxicos (Tabela 17). Pode-se afirmar que os teores de metais observados nas amostras de solo contribuíram para causar toxicidade para a alga *P.subcaptata.*

Em Koukala et al. (2003) a concentração de Cd e Zn foi responsável pelo aumento da toxicidade para da *P. subcaptata* .

O teste de toxidade com *L.sativa* mostrou que houve um aumento do crescimento da raiz de acordo com o aumento dos elementos potencialmente tóxicos, demonstrando que os teores desses elementos não foram tóxicos para a planta utilizada no teste, porém houve efeito tóxico em relação ao tempo de aplicação do lodo.

O teste de citoxicidade para *Allium cepa* (indice mitótico) mostrou que houve um aumento do crescimento do índice mitótico, de acordo com o aumento dos elementos potencialmente tóxicos, demonstrando que os teores desses elementos não foram tóxicos para a divisão celular da planta utilizada no teste.

O teste de genotoxidade com *Allium cepa* (aberrações cromossômicas) mostrou correlação com os teores de todos os elementos potencialmente tóxicos, porém nem com todas as extrações (Tabela 17). Em Migdi (2007), amostras de efluentes industriais sem tratamento e diluída a 60%, mostraram correlação entre os metais pesados com as aberrações cromossômicas observadas. No presente

estudo, pode-se afirmar que os teores de metais observados nas amostras de solo contribuíram para causar genotoxicidade nas células de *Allium cepa.*

O teste de mutagenicidade com *Allium cepa* (micronúcleos) mostrou correlação com os teores de todos os elementos potencialmente tóxicos. Porém para o elemento Cr, não foi observado correlação quando o mesmo foi extraído por DTPA e Mehlich -1, provavelmente por estar fortemente adsorvido no solo. Metais pesados são citados como causa de distúrbios nas funções do fuso, e aparição de micronúcleos, particularmente o cobre, cromo e chumbo (VILLALOBAS-PIETRINI et al., 1993; DOVGALIUK et al., 2001).

De acordo com os valores obtidos, pode-se afirmar que os teores de metais observados nas amostras de solo contribuíram para indução de micronúcleos por meio de distúrbio no fuso ou por quebras cromossômicas, causando mutagênicidade nas células de *Allium cepa.*

Não foi observado contaminação do solo por Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb para nenhuma das doses de lodo aplicada, já que a concentração dos mesmos se encontra abaixo dos limites críticos para metais pesados no solo, estabelecidos pela CETESB (2005). Porém no solo com aplicação da dose de 23,1 t ha^{-1}, foi observado potencial tóxico, genotóxico e mutagênico de acordo com o teste da *P.subcaptata* e da *Allium cepa* respectivamente, o que sugere a realização de pesquisas no aprimoramento do uso agrícola de lodo de esgoto por parte dos órgãos ambientais.

Tabela 17. Coeficientes de correlação linear entre os índices de toxicidade, avaliados pelo teste com *D magna* (CL_{50}), *P. subcaptata* (CI_{50}), *L.sativa* (crescimento raiz) e *A. cepa* (índice mitótico, aberrações cromossômicas e micronúcleos), com os teores de elementos, extraídos por DTPA, Mehlich-1 e HNO_3+HCl

Elemento	Extração	Testes de toxicidade					
		D. magna	*P. subcaptata*	*L.sativa*	*A. cepa* (IM)	*A.cepa* (AC)	*A. cepa* (MN)
Cu	DTPA	-0,26	**-0,70*** **	**0,62** **	0,35	**0,69*** **	**0,83*** **
	Mehlich 1	-0,15	**-0,63** **	**0,58** **	0,35	**0,71*** **	**0,75*** **
	HNO_3+HCl	-0,42	**-0,77*** **	**0,63** **	0,25	**0,76*** **	**0,77*** **
Fe	DTPA	**-0,78*** **	**-0,67** **	**0,69*** **	-0,09	**0,68*** **	**0,54* **
	Mehlich 1	-0,44	**-0,84*** **	**0,78*** **	0,29	**0,70*** **	**0,80*** **
	HNO_3+HCl	0,13	**-0,66** **	**0,76*** **	**0,74*** **	-0,01	**0,58** **
Mn	DTPA	**-0,56* **	**-0,59** **	**0,60** **	0,03	**0,57** **	**0,46* **
	Mehlich 1	**-0,72*** **	**-0,79*** **	**0,61** **	-0,12	**0,78*** **	**0,61** **
	HNO_3+HCl	-0,23	**-0,77*** **	**0,83*** **	**0,54* **	0,31	**0,71*** **
Zn	DTPA	-0,35	**-0,76*** **	**0,76*** **	0,31	**0,63** **	**0,67** **
	Mehlich 1	**-0,55* **	**-0,70*** **	**0,71*** **	0,14	**0,70*** **	**0,55** **
	HNO_3+HCl	-0,04	**-0,80*** **	**0,86*** **	**0,61** **	0,26	**0,74*** **
Cd	DTPA	-0,12	**-0,76*** **	**0,73*** **	**0,56* **	**0,53* **	**0,76*** **
	Mehlich 1	-0,25	**-0,71*** **	**0,71*** **	**0,47* **	**0,57* **	**0,74*** **
	HNO_3+HCl	-0,27	**-0,84*** **	**0,79*** **	**0,50* **	**0,51* **	**0,76*** **
Cr	DTPA	**-0,80*** **	**-0,55* **	**0,45* **	-0,34	**0,73*** **	0,39
	Mehlich 1	**-0,66** **	**-0,62** **	**0,54* **	-0,03	**0,78*** **	0,43
	HNO_3+HCl	0,04	**-0,72*** **	**0,76*** **	**0,74*** **	0,13	**0,66** **
Ni	DTPA	-0,41	**-0,84*** **	**0,82*** **	0,34	**0,60** **	**0,83*** **
	Mehlich 1	**-0,50* **	**-0,68*** **	**0,62** **	0,04	**0,77*** **	**0,62** **
	HNO_3	-0,44	**-0,80*** **	**0,85*** **	0,38	0,33	**0,62** **
Pb	DTPA	**-0,57** **	**-0,57** **	**0,56** **	-0,20	**0,71*** **	**0,64** **
	Mehlich 1	-0,31	**-0,81*** **	**0,84*** **	0,37	0,41	**0,65** **
	HNO_3+HCl	-0,14	**-0,80*** **	**0,84*** **	**0,65** **	0,30	**0,76*** **

*p<0,05 ,**; p< 0,01***; p<0,001

5 CONCLUSÕES

De acordo com os testes toxicológicos conclui-se:

O lodo de esgoto aplicado ao solo na dose de 15,1 t ha^{-1}, que equivale à dose recomendada pela norma P4.230 da CETESB, com base no critério do nitrogênio, não causa efeito tóxico, genotóxico ou mutagênico no sistema solo-planta, de acordo com os testes com *D.magna*, *P.subcaptata*, *L.sativa* e *Allium cepa*. Porém o lodo aplicado na dose de 23,1 t ha^{-1}, 50% a mais do que a dose recomendada, causa efeito tóxico, genotóxico e mutagênico, para os mesmos organismos, no sistema solo-planta.

De acordo com os teores dos elementos potencialmente tóxicos conclui-se:

A aplicação de lodo de esgoto aumentou os teores de Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Cd e Pb no solo em função das doses.

Há correlação entre os testes de toxicidade com *P. subcaptata,* de mutagênicidade com *A. cepa* (micronúcleos) com os teores do elementos potencialmente tóxicos no solo, constituindo-se, portanto, nos melhores indicadores no estudo toxicológico para sistemas de solo tratados com lodo de esgoto.

O teste com *D. magna* constituiu uma importante ferramenta na avaliação toxicológica do lodo aplicado ao solo. A toxicidade aumentou em função das doses, porém ela não se correlaciona com os teores de elementos potencialmente tóxicos no solo. Isto indica que a toxicidade do lodo pode estar relacionada também a outros compostos orgânicos tóxicos e/ou agentes patógenos.

O teste de toxicidade com *L.sativa* é inadequado na avaliação toxicológica da aplicação de lodo no solo em relação as doses, por refletir efeitos dos nutrientes e não dos componentes tóxicos do lodo, porém reflete a toxicidade de acordo com o tempo de aplicação do resíduo.

REFERÊNCIAS

ASSOCIAÇÃO DE PRODUTORES DE FLORESTAS PLANTADAS. **Anuário estatísco da ABRAF ano base 2006.** Brasília, 2007.

ABREU, C.A.; LOPES, A.S.; SANTOS, G. Micronutrientes. In: NOVAIS, R.F.; ALVAREZ V., V.H.; BARROS, N.F.; FONTES, R.L.F.; CANTARUTTI, R.B.; NEVES, J.C.L. (Ed.). **Fertilidade do solo**. Viçosa: SBCSolo, 2007. p. 645-736.

ABREU, C.A.; BETON, R.S.; ANDRANDE, J.C. Comparison of methods to evaluate heavy metals in organic wastes. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 27, n.5/8, p. 1125-1153, mar./apr. 1996.

ABREU JUNIOR, C.H.; BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T.; KIEHL, J.C. Uso agrícola de resíduos orgânicos: propriedades químicas do solo e produção vegetal. **Tópicos em Ciência do Solo**, Viçosa, v. 4., p. 391-470, 2005.

ADAMS, W.J. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON, G.A.J. (Org.). **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis, 1995. p. 25-34.

ANDRADE, C.A. **Fração orgânica de biossólidos e efeito no estoque de carbono e qualidade da matéria orgânica de um Latossolo cultivado com eucalipto.** 2004. 121 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

ANDRADE, C. A.; MATIAZZO, M.E. Nitratos e metais pesados nos solos e nas árvores após aplicação de biossolido (lodo de esgoto) em plantações florestais de *Eucalyptus grandis.*v.58, p.59-72, 2000.

ANDRADE, C.A. **Nitratos e metais pesados no solo e em plantas de *Eucalyptus grandis* após a aplicação de biossólido da ETE de Barueri. 1999**. 65 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

ANDREOLI, C.V.; ILHENFELD, R.G.K.; PEGORINI, E.S. Fatores limitantes, In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; ILHENFELD, R.G.K. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura**. Rio de Janeiro: Sanepar; Prosap; Finep, 1997. 97 p.

ANTONSIE-WIEZ, D.,. Analysis of the cell cycle in the root meristem of Allium cepa under the influence of Leda krin. **Folia Histochem. Cytobiol**. v.26, p.79–96, 1990.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp. (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT, 2005.

ATEEQ, B.; ABUL FARAH, M.; ALI, M.N.; AHAMAD, W. Induction of micronuclei and erythrocyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and butachlor. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 518, p. 135-144, 2002.

BANKS, M.K.; SCHWAB, A.P.; COFIELD, N.; ALLEMAN, J.E.; SWITZENBAUM, M.; SHALABI, J.; WILLIAMS, P. Biosolids-amended soils: Part I. Effects of biosolids application on soil quality and ecotoxicity. **Water Environment Research**, Alexandria, v. 78, p. 2217-2230, 2006.

BATAGLIA, O.C.; RAIJ, B. van. Eficiência de extratores de micronutrientes na análise do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 13, p. 205-212, 1989.

BERTOLETTI, E. Toxicidade e concentração de agentes tóxicos em efluentes industriais. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, p. 271-277, 1990.

BERTONCINI, E.I. **Mobilidade de metais pesados em solos tratados com lodo de esgoto,** Piracicaba, 1997. 102 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1997.

BERTON, R.S.; CAMARGO, O.A.; VALADARES, J.M.A.S. Absorção de nutrientes pelo milho em resposta à adição de lodo de esgoto a cinco solos paulistas. **Revista Brasileira de Ciência de Solo,** Campinas, v. 13, n. 2, p. 187-192, maio/ago. 1989.

BERTON, R.S.; PRATI, P.F.; FRANKENBERGER JUNIOR, W.T. Phosphorus availability ins soils amended with organic materials, estimated by three chemical methods and two enzymes activities. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 21, p. 617-624,1997.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. **Lodo de esgoto: Impactos ambientais na agricultura**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006, v.1, 347 p.

BIRGE, W.G.; BLACK, J.A.; WESTERMAN, A.G. Short-term fish and amphibian tests for determining the effects of toxicants stress on early life stages and estimating chronic values for singles compounds and complex effluents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 49, p. 807-821, 1986.

BLAISE, C.; FÉRARD, E.J-F. **Small scale freshwater toxicity investigations**. Netherlands: Springer., 2005 . v.2, 375p.

BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Journal of Environmental Toxicology**, New York, v. 15, p. 352-359, 2000. Special Issue: Watertox Bioassays.

BOON, D.Y.; SOLTANPOUR, P.N. Lead, cadmium, and zinc contamination of aspen garden soils and vegetation. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 3, p. 250-253, 1992.

BORKERT, C. M. Manganês. In: FERREIRA, M. E.; CRUZ, M. C. P. (Ed.) **Micronutrientes na agricultura**. Piracicaba: Potafos/CNPQ, 1991. p. 173-190.

BUIKEMA, A.L.J.; NIEDERLEHNER, B.R.; CAIRNS, J.J. Biological monitoring. **Water Research**, New York, v. 16, p. 1585-1601, 1991.

CARITÁ. R. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de lodos provenientes de estações de tratamento de esgoto de grandes centros urbanos do estado de São Paulo, pela metodologia de aberrações cromossômicas em Allium cepa.** 2007. Monografia – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2007.

CHIBA, M.K. **Uso do lodo de esgotona cana-de-açúcar como fonte de nitrogênio e fósforo: parâmetros de fertilidade de solo, nutrição de plantas e rendimentos da cultura.** 2005. 165 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA E SANEAMENTO AMBIENTAL. **Aplicação de biossólido de sistemas de tratamento biológico em áreas agrícolas**: critérios para projeto e operação. São Paulo, 1999. 35 p. (Manual Técnico, Norma P.4230).

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Decisão de diretoria Nº195-2005-E, de 23 de novembro de 2005.** Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf>. Acesso em: 5 março 2007.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados**: critérios para projeto e operação; manual técnico, resolução 375. Brasília: CONAMA, 2006. 31 p.

COONEY, J.D. Freshwater testes. In: RAND, G.M. (Ed). **Fundamentals of aquatic toxicology**. 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 1995. 1125 p.

CORREA A.X.R.; RORIGA L.R.;. VERDINELLI. M.A; COTELLEB S.; FERARDB J.F.; RADETSKIA C.M. Cadmium phytotoxicity: Quantitative sensitivity relationships between classical endpoints and antioxidative enzyme biomarkers. **Science of the Total Environment** v. 357 p.120-127, 2006.

DAY, P.R. Particle fractionation and particle-size analysis. In: BLACK, C.A. (Ed.). **Methods of soil analysis**: Part 1. Madison: ASA, 1965. p. 545-567.

DEARFIELD, K.L.; CIMINO, M.C.; MCCARROLL, N.E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L.R. Genotoxicity risk assessment a proposed classification strategy. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 521, p. 121-135, 2002.

DEFELIPO, B.V.; NOGUEIRA, A.V.; LOURES, E.G.; ALVARES, Z.V.H. Eficiência agronômica do lodo de esgoto proveniente de uma siderúrgica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 15, p. 389-393, 1991.

DOVGALIUK, A.L., KALINIIAK, T.B., BLIUM, L.A.B., Assessment of phyto- and cytotoxic effects of heavy metals and aluminum compounds using onion apical meristem. **Tsitol. Genet**. v.35,p. 3–9, 2001.

DUTKA, B.J. **Methods for microbiological and toxicological analysis of waters, wastewaters and sediments**. Ottawa: National Water Research Institute, Environmental Canada, 1997.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Cultivo do eucaliptio: Importância ocioeconômica e ambiental**. Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2005. (Sistemas de Produção, 5). Disponível em: http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Eucalipto/CultivodoEucalipto. Acesso em: 19 mar. 2006.

FATIMA, R.A.; AHMAD, M. Genotoxicity of industrial wastewaters obtained from two different pollution sources in northern India: A comparison of three bioassays. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 609, p. 81-91, 2006.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos efeitos tóxicos, mutagênicos e genotóxicos do herbicida trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como sistemas-testes**. 2005. 212 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2005.

FERNANDES, T.C.C.; MAZZEO, D.E.C.; MARIN-MORALES, M.A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidizated cells of Allium cepa exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam, v. 88, n.3, p. 252-259, 2007.

FERNANDEZ, M.D.; CAGIGAL, E.; VEGA, M.M.; URZELAI, A.; BABIN, M.; PROA, J.; TARAZONA, J.V. Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment Laboratory for Ecotoxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 62, p. 174-184, 2005.

FJLLBORG B, AHLBERG G, NILSSON E, DAVE G. Identification of toxicity in sewage sludge leachate. **Environ Int** v. 31 p. 25–31, 2005

FJLLBORG, B., DAVE, G. Toxicity of Sb and Cu in sewage sludge to terrestrial plants (lettuce, oat, radish), and of sludge elutriate to aquatic organisms (Daphnia and Lemna). **Water Air Soil Pollution** v. 155 p.3–20, 2004

FJLLBORG B.; GUSTAFSSON N. Short-Term Bioassay Responses to Sludge Products and Leachate. **Environ. Contam. Toxicol** v.51 p. 367-376,2006.

FISKESJÖ, G.; LASSEN, C. Benzo[a]pireno and nitrosoguanidine in the Allium test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 97, p. 188-190, 1982.

FISKESJÖ, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, Lund, v. 102, p. 99-112, 1985.

GEORGETTI, M.S.; SALVADOR, N.N.B.; ROCHA, O. Avaliação química e ecotoxicológica de efluentes de laboratório químico. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ECOTOXICOLOGIA, 10., 2008, Bento Gonçalves. **Livro de resumos...** Bento Gonçalves: Sociedade Brasileira de Limnologia, 2008. p. 210.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in Allium. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 99, p. 273-291, 1982.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 310, p. 175-185, 1994.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays, **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 11, p. 714-719, 1977; Correction, v. 12, p.417, 1978.

HOUK, V.S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents – a review. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 277, p. 91-138, 1992.

HUE, N.V.; SILVA, J.A.; ARIFIN, R. Sewage Sludge-soil interactions by plants measured by plant and soil chemical composition. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 17, p. 384-390, 1988.

JARDIM, G.M. **Estudos ecotoxicológicos da água e do sedimento do rio Corumbataí, SP**. 2004. 126 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

KOUKAL B.; GUEGUEN C.; PARDOS M.; DOMINIK J. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* **Chemosphere** v.53 p. 953–961, 2003

LEME, D.M. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de águas e sedimentos do rio Guaecá, São Sebastião – SP, após impacto de vazamento de oleoduto da região**. 2007. 156 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro, 2007.

LIGO, M. A. M.; TEDESCO, M. J.; SIMON, Z; GIANELLO, C. **Efeito do lodo ativado no sistema solo-planta-água-1**o cultivo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 21., 1987, Campinas. Resumos... Campinas: SBCS, 1987. p. 112-113.

LINNAINMAA, K., MERETOJA, T., SORSA, M., VAINTO, H., Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide. **Mutat. Res**. v.8, p.277–286, 1978.

MARQUES, M.O.; MELO, W.J.; BELLINGIERI, P.A.; OLIVEIRA, F.C.; PERECIN, D. Metais pesados em solo acrescido de lodo de esgoto e em plantas de sorgo granífero. **Científica,** São Paulo, v. 27, n. 1/2, p. 13-29, 1999.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTII, M.I.A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 29, p. 148-158, 2006.

MAXAM, G.; RILA, J.P.; DOTT, W.; EISENTRAEGER, A. Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 45, p. 240-246, 2000.

McBRIDE, M.B. **Environmental chemistry of soils.** New York: Oxford University, 1994. 406p.

MIGID, A.H.M.; AZAB, Y.A.; IBRAHIM, W.M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 66, p. 57-64, 2007.

MIYAZAWA, M.; GIMENEZ, S.M.N.; FERNANDES, F.; OLIVEIRA, E.L.; SILVA, S.M.C.P. Efeito do lodo de esgoto nos teores de metais pesados no solo e na planta. In: ANDREOLI, C.V.; LARA, A.I.; FERNANDES, F. **Reciclagem de biossólidos: transformando problemas em soluções**. Curitiba: Sanepar/Finep, 1999. p. 204-225.

MOLINA, M.V. **Nitrogênio e metais pesados em latossolo e eucalipto cinqüenta e cinco meses após a aplicação de biossólido**. 2004. 66 f. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 504, p. 3-16, 2002.

OLIVEIRA, F.C. **Disposição de lodo de esgoto e composto de lixo urbano num latossolo vermelho amarelo cultivado com cana de açúcar**. 2000. 247 f. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2000.

OLIVEIRA, F.C.; MATIAZZO, M.E. Metais pesados em latossolo tratado com lodo de esgoto e em plantas de cana-de-açúcar. **Scientia Agrícola**, Piracicaba, v. 58, n. 3, p. 581-593, jul./sept. 2001.

OLIVEIRA, K.W.; MELO, W.J.; PEREIRA, G.T.; MELO, V.P.; MELO, G.P. Heavy metals in oxisols amended with biosolids and cropped with maize in a long-term experiment. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v, 62, n. 4, p. 381-388, jul./aug. 2005.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test Guidelines**: Test 202 - Daphnia sp. Acute immobilization test and reproductive test. Paris: OECD, 1998.

PANDA, B.B., SAHU, U.K., Induction of abnormal spindle function and cytokinesis inhibition in mitotic cells of Allium cepa by the organophosphorus insecticide fensulfothion. **Cytobios** v.42, p.147–155, 1985.

PIGOZZO, A.T.J. **Disposição de lodo de esgoto: acúmulo de metais pesados no solo e em plantas de milho (*Zea mays* L.).** 2003. 200 f. Tese (Doutorado Energia na Agricultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2003.

PIGOZZO, A.T.J.; LENZI, E.; LUCAS JÚNIOR, J. de; SCAPIM, C.A.; COSTA, A.C.S.. Transition metal rates in latosol twice treated with sewage sludge. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, p. 515-526, 2006.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 60, p. 1010-1016, 1982.

POMBO, L. C. A.; TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C. **Descarte de lodo de curtume em solo podzólico vermelho-amarelo.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 23., 1989, Porto Alegre. Resumos. . . Porto Alegre: SBCS, 1989. p. 309.

PROGRAMA NACIONAL DE FLORESTAS. **Política nacional de florestas**. Disponível em: www.mma.gov.br/port/sbf/pnf/politica.html. Acesso em: 27 maio 2004.

RABELO-GAY, M.N.; RODRIGUEZ, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. Testes com organismos superiores. In: RABELLO-GAY, M.N.; RODRIGUES, M.A.R.; MONTELEONE-NETO, R. **Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação**. Ribeirão Preto: SBG, 1991. p. 59-75.

RAIJ, B. van; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agronômico, 2001. 285 p.

RAMADE, F. **Ecotoxicologie**. Paris: Ed. Masson, 1977. 201 p.

RANGEL, O.J.P.**Disponibilidade de Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em latossolo cultivado com milho após aplicação de de lodo de esgoto:**. 2003. 88 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

RANGEL, O.J.P.; SILVA, C.A.; BETTIOL, W.; GUILHERME, L.R.G.; DYNIA, J.F. Acúmulo de Cu, Mn, Ni, Pb e Zn em Latossolo Vermelho adubado com fontes de lodo de esgoto e cultivado com milho. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 1, p. 15-23, 2004.

RANK, J.; JENSEN, A.-G.; SKOV, B.; PEDERSEN, L.H.; JENSEN, K. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 300, p. 29-36, 1993.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Evaluation of the Allium anaphase-telophase test in relation to genotoxicity screening of industrial wastewater. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 312, p. 17-24, 1994.

RANK, J.; NIELSEN, M.H. Allium cepa anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 390, p. 121-127, 1997.

RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in Allium cepa root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v. 136, p. 13-18, 2002.

RIBEIRO, L.R.; MARQUES, E.K. A impotância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. (Org.). **Mutagênese ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003. p. 21-27.

ROCHA, M.T. **Utilização de lodo de esgoto na agricultura: um estudo de caso para as bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivarí e Jundiaí**. 1998. 140 f. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

SANTOS, M.A.P.F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R.T.R. Sensitivity of Four Test Organisms (*Chironomus xanthus, Daphnia magna, Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, n. 3, p. 229-236, 2007.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT User's guide**. Version 6. 4. ed. Cary, NC: SAS Institute Inc., 1989. v. 1/2, 1686 p.

SHARMA, C.B.S.R.,. Plant meristems as monitors of genetic toxicity of environmental chemicals. **Curr. Sci**. v.52, p.1000–1002, 1983.

SILVA, C.A.; RANGEL, O.J.P.; BETTIOL, W.; MANZATTO, C.V.; BOEIRA, R.C.; DYNIA, F. Dinâmica de metais pesados em latossolo adubado com lodo de esgoto e em plantas de milho. In: BETTIOL, W.; CAMARGO, O.A. (Eds.) **Lodo de esgoto: impactos ambientais na agricultura.** Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 2006. p. 45-77.

SILVA, F.C.; BOARETTO, A.E.; BERTON, R.S.; ZOTELLI, H.B.; PEXE, C.A.; BERNARDES, E. M. Efeito do lodo de esgoto na fertilidade de um Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 5, p. 831-840, maio 2001.

SILVERIO, L. Uso agrícola do lodo de esgoto, da matéria orgânica do lixo urbano e de resíduos industriais. **O Agrônomico**, Campinas, v. 56, n. 1, p. 5-8, 2004. Disponível em: www.iac.sp.gov.br/oagronomico. Acesso em: 26 mar. 2006

SIMON, Z.; TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C. **Long term land application of activated sludge from petrochemical wastewater treatment plant**. Water Science and Technology, Oxford, v. 24, n. 11, p. 19-31, 1991.

SMAKA-KINCL, V.; STEGNAR, P.; LOVKA, M.; TOMAN, M.J. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 368, p. 171-179, 1996.

SOON, Y.K.; ABBOUD, S. Cadmium, chromium, lead, and nickel. In: CARTER, M.R. (Ed.). **Soil sampling and methods of analysis**. Boca Raton: Lewis Publisher, 1993. cap. 13, p. 101-109.

TSUTIYA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A.; HESPANHOL, I.; CARVALHO, P.C.T.; MELFI, A.J.; MELO, W.J.; MARQUES, M.O. **Biossólidos na agricultura**. 2. ed. São Paulo: ABES, 2002. 468 p.

TÜRKOGLU, S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 626, p. 4-14, 2007.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA/SW-846**: Test methods for evaluating solid waste. Washington: National Technical Information Service, 1994. Disponível em: http://www.epa.gov/sw-846/sw846.htm. Acesso em: 25 set. 2007.

VALERIO, M.E.; GARCIA, J.F.; PEINADO, F.M. Determination of phytotoxicity of soluble elements in soils, based on a bioassay with lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Science of the Total Envirnment**, Amsterdam, v. 378, n. 1-2, p. 63-66, 2007.

VANZELLA, T.P**. Efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel do óleo diesel em uma espécie de peixe neotropical**. 2006. 90 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2006.

VILLALOBAS-PIETRINI, R., FLORES-MARQUEZ, A.R., GOMEZ-ARROYO, S.,. Cytogenetic evaluation of the effects of Chromium and Detergents in Vicia faba. **Cytologia** v.58, p.41–45,1993.

YAMANAKA, K.; FRYER, F. **Measurement of macro and trace elements in plant digests using the 7500c ICP-MS system**. Foster City: Agilent Technologies, 2001. 5 p. (Application Report 5998-4450EN). Disponível em: www.agilent.com/chem. Acesso em: 19 nov. 2001.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. v. 1, 464 p.