

# Caracterização da exposição humana a lodo de esgoto sanitário na cadeia: tratamento, uso agrícola e consumo de hortaliças

*Characterization of human exposure to sewage sludge in the chain: treatment, agricultural use and consumption of vegetables*

Juliana Ferreira de Oliveira<sup>1</sup> , Keila Fuji<sup>1</sup>, Paula Dias Bevilacqua<sup>1\*</sup> 

## RESUMO

Objetivou-se caracterizar a exposição humana à infecção por bactérias e vírus via ingestão, considerando os cenários: tratamento do lodo (cenário 1); uso do lodo como adubo agrícola (cenário 2) e consumo de hortaliças adubadas com lodo (cenário 3). A exposição foi caracterizada pelas concentrações de *Escherichia coli*, vírus entéricos cultiváveis (VEC) e colifagos somáticos (CS) nas amostras: lodo de esgoto em tratamento (LET), água de lavagem das mãos (ALM) no tratamento e no plantio, mistura solo + lodo (MSL) e hortaliças alface e cenoura. No cenário 1, em torno de 50-60 dias, as amostras LET apresentaram umidade < 10% e padrão classe A. Nas amostras LET, concentrações de CS variaram entre  $9,1 \times 10^2$  e  $1,9 \times 10^5$  UFP.g<sup>-1</sup> ST e de VEC entre 2,42 e 7,15 UFP.g<sup>-1</sup> ST. No cenário 2, CS foram detectados em 72% das amostras MSL com concentrações entre 10 e 330 UFP.mL<sup>-1</sup>. Concentrações de *E. coli*  $\leq 10^2$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> foram detectadas nas amostras ALM-tratamento (63,7%). Para vírus, todas as ALM-tratamento foram negativas e 17,4% das ALM-plantio apresentaram VEC entre 3 e 409,2 UFP.mL<sup>-1</sup>. Todas as amostras de alface foram negativas para CS e VEC. Considerando-se as características dos cenários avaliados, trabalhadores do serviço de saneamento, trabalhadores rurais e consumidores de hortaliças estiveram expostos a baixas concentrações de *E. coli* e VEC. CS foram resistentes ao tratamento térmico e ao plantio, o que sugere seu potencial como indicadores de VEC.

**Palavras-chave:** enterovírus; colifagos; reuso; fertilizante.

## ABSTRACT

The aim of this study was to characterize human exposure to microbiological contamination (bacteria and viruses) via ingestion, considering the following scenarios: treatment of sludge (scenario 1); use of sludge as fertilizer (scenario 2) and consumption of vegetables fertilized with sludge (scenario 3). Exposure was characterized by the levels of *Escherichia coli*, cultivable enteric viruses (CEV) and somatic coliphages (SC) in the samples: sewage sludge under treatment (SST); handwashing water (HW) in treatment and planting; mix soil + sludge (MSL) and the vegetables lettuce and carrots. In scenario 1, SST samples presented < 10% humidity and class A pattern around 50-60 days; SC concentrations ranged from  $9,1 \times 10^2$  to  $1,9 \times 10^5$  PFU.g<sup>-1</sup> TS, and CEV ranged from 2,42 to 7,15 PFU.g<sup>-1</sup> TS. In scenario 2, CS were detected in 72% of HW samples, and concentrations ranged from 10 to 330 PFU.mL<sup>-1</sup>. *E. coli* concentrations  $\leq 10^2$  NMP.100 mL<sup>-1</sup> were detected in HW-treatment samples (63,7%). Viruses were not detected in 100% of HW-treatments samples, and 17,4% of HW-plantings had CEV concentrations between 3 and 409,2 PFU.mL<sup>-1</sup>. All the vegetable samples were negative for SC and CEV. Considering the characteristics of the scenarios evaluated, sewage workers, rural workers and consumers of vegetables were exposed to low concentrations of *E. coli* and CEV. Somatic coliphages were resistant to heat treatment and planting, which supports their potential as indicators of CEV.

**Keywords:** enterovirus; coliphages; reuse; fertilizer.

## INTRODUÇÃO

A produção de lodo é inerente aos processos de tratamento de esgoto e tende a aumentar em função do crescimento populacional e das melhorias no setor brasileiro de saneamento, mesmo que estas sejam, ainda, insuficientes. Dados do Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento (SINIS) apontam,

entre 2012 e 2015, discretos aumentos em serviços de esgotamento sanitário, como expansão da rede coletora (12,7%), volume de esgoto coletado (0,72%) e volume de esgoto tratado (6,9%) (BRASIL, 2017). Segundo a Pesquisa Nacional de Saneamento Básico, em 2000, apenas 2,8% dos municípios realizavam tratamento do lodo gerado em biodigestores, 8,3% realizavam apenas desaguamento

<sup>1</sup>Universidade Federal de Viçosa - Viçosa (MG), Brasil.

\*Autora correspondente: paulabevilacqua2@gmail.com

**Conflitos de interesse:** os autores declaram não haver conflito de interesses.

**Financiamento:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

**Recebido:** 05/07/2019 - **Aceito:** 30/12/2019 - **Reg. ABES:** 20190208

do lodo e 1,5% submetia o lodo a outros processos não explicitados (BRASIL, 2000). O lodo de esgoto produzido (tratado ou não) tem sido destinado pelos municípios para incineração (1,6%), terreno baldio (7,9%), rio (13,4%), reaproveitamento (13,9%), aterro sanitário (37,1%) e outros destinos não especificados (26%) (BRASIL, 2008).

Tais dados sugerem alguma iniciativa do setor saneamento para propiciar destino ao lodo, porém muito aquém ainda da possibilidade de aproveitamento desse subproduto, considerando-se, por exemplo, a reciclagem de nutrientes com o uso agrícola do lodo. Essa prática de disposição final implica diferentes benefícios, como aumento do tempo de vida útil dos aterros sanitários, redução dos gastos da agricultura com insumos químicos e orgânicos, bem como reincorporação de carbono orgânico e diversos nutrientes (N, P, K), produzindo efeitos favoráveis sobre as propriedades físicas, químicas e biológicas do solo (GOMES; NASCIMENTO; BIONDI, 2007; CHIBA; MATTIAZZO; OLIVEIRA, 2008).

Por outro lado, o uso agrícola do lodo implica perigos microbiológicos à saúde humana, constituindo importante obstáculo a essa prática. Tratamentos convencionais do esgoto apresentam diferentes eficiências de inativação e remoção, dependendo do micro-organismo, podendo resultar na sua transferência e significativa concentração no lodo produzido (VIAU; PECCIA, 2009; WONG *et al.*, 2010). Conforme estudo realizado por Viau *et al.* (2011), a digestão anaeróbica mesofílica apresentou redução média de  $1,5 \log_{10}$ ,  $1,3 \log_{10}$  e  $1,75 \log_{10}$  das concentrações, respectivamente, de *Escherichia coli*, enterovírus infecciosos e colifagos. A compostagem do lodo digerido proporcionou, em média, redução de  $3,6 \log_{10}$  de bactérias indicadoras e patogênicas e de  $5,5 \log_{10}$  de vírus patogênicos e bacteriófagos. A digestão anaeróbica termofílica apresentou redução média de  $1,6 \log_{10}$  de bactérias indicadoras e de  $2,8 \log_{10}$  de enterovírus.

Diferentes estudos também apontam a diversidade e as concentrações variadas tanto de organismos indicadores quanto de agentes patogênicos em lodo de esgoto: concentrações de *E. coli* variaram entre  $10^3$  e  $10^7$  NMP ou células.mL<sup>-1</sup> ou g<sup>-1</sup> de lodo (GANTZER *et al.*, 2001; POURCHER *et al.*, 2005; EAMENS; WALDRON; NICHOLLS, 2006; WÉRY *et al.*, 2008; WONG *et al.*, 2010); colifagos somáticos (CS) apresentaram concentrações variando entre  $10^5$  e  $10^8$  UFP.g de sólidos totais (ST) (ASTALS *et al.*, 2012; LEVANTESI *et al.*, 2015); vírus entéricos cultiváveis (VEC) variaram entre “não detectados” e  $1,1 \times 10^4$  UFP.100 mL<sup>-1</sup> e  $7 \times 10^5$  NMP.Kg<sup>-1</sup> em lodos bruto e digerido, respectivamente (SOARES *et al.*, 1994; MONPOEHO *et al.*, 2004; GUZMÁN *et al.*, 2007; SATO *et al.*, 2009; SALVADOR, 2011); o gênero *Enterovirus* apresentou densidades em cópias genômicas (CG) variando entre  $< 50$  CG.g<sup>-1</sup> e  $5,14 \times 10^4$  CG.100 mL<sup>-1</sup> (MONPOEHO *et al.*, 2004; WONG *et al.*, 2010; SIMMONS; XAGORARAKI, 2011; JEBRI *et al.*, 2014). Vírus patogênicos foram detectados nas seguintes concentrações: adenovírus, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), “não detectados” a  $10^9$  CG.g<sup>-1</sup> e, por cultivo celular,  $70$  a  $5,2 \times 10^4$  UFPI<sup>-1</sup> (WILLIAMS JR.; HURST, 1988; SCHLINDWEIN *et al.*, 2010); vírus da Hepatite A,  $10^2$  a  $10^4$  CG.g<sup>-1</sup> (SCHLINDWEIN *et al.*, 2010; PRADO *et al.*, 2013; RHODES *et al.*, 2015); norovírus 1 e 2,  $10^2$  a  $10^7$  CG.g<sup>-1</sup> (WONG *et al.*, 2010; SIMMONS; XAGORARAKI, 2011; PRADO *et al.*, 2013); e rotavírus,  $2,5 \times 10^1$  a  $1,6 \times 10^2$  CG.g<sup>-1</sup> (PRADO *et al.*, 2013). A presença de patógenos no lodo pode expor diferentes grupos populacionais quando da manipulação do lodo durante o tratamento (trabalhadores dos serviços de saneamento) ou práticas agrícolas (trabalhadores rurais) ou do consumo de produtos agrícolas (população em geral).

Para impedir impactos adversos à saúde humana, legislações são elaboradas para regulamentar o processo de uso agrícola do lodo. No Brasil, os procedimentos relativos ao tratamento e ao padrão de qualidade e às orientações para o uso agrícola de lodos de esgoto estão normatizados na Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) n° 375/2006, a qual define duas classes de lodo (A e B). O lodo classe A é caracterizado por: coliformes termotolerantes (CTe)  $< 10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST; ovos viáveis de helmintos  $< 0,25$  ovo.g<sup>-1</sup> de ST; *Salmonella* spp. ausência em 10 g de ST e vírus  $< 0,25$  UFP ou UFF.g<sup>-1</sup> de ST. O lodo classe B é definido por CTe  $< 10^6$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST e ovos viáveis de helmintos  $< 10$  ovos.g<sup>-1</sup> de ST. A aplicação de lodo de esgoto classe B no solo está proibida, a não ser que “sejam propostos novos critérios ou limites baseados em estudos de avaliação de risco e dados epidemiológicos nacionais, que demonstrem a segurança do uso do lodo de esgoto Classe B” (BRASIL, 2006).

Contudo, críticas têm sido feitas a esses padrões e aos procedimentos de tratamento e manejo recomendados, os quais são considerados excessivamente rigorosos e restritivos, dificultando e desestimulando o aproveitamento do lodo de esgoto na agricultura (BASTOS *et al.*, 2009; BASTOS; BEVILACQUA; MARA, 2013). Além disso, a legislação explícita que os critérios definidos para classificar o lodo classe B carecem de fundamentação científica ou empírica que garantam a segurança de seu uso, demandando a realização de pesquisas com tal finalidade.

No Brasil, ainda são escassas as pesquisas realizadas, considerando-se a necessidade de subsidiar a legislação com informações que ajudem a revisar e estabelecer os critérios de qualidade e reavaliar o dimensionamento das restrições de uso do lodo de esgoto. Entre as poucas pesquisas já realizadas, foram contemplados, de forma geral, os seguintes objetivos: verificar a qualidade microbiológica de lodos de esgoto produzidos em estações de tratamento de esgoto (SATO *et al.*, 2009; SALVADOR, 2011); avaliar a eficiência de estratégias de tratamento do lodo (LIMA, 2010; DIAS, 2012); avaliar a contaminação microbiológica e parasitária de hortaliças adubadas com lodo de esgoto classe B e discutir a resolução CONAMA n° 375/2006 sob a perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico (MAGALHÃES, 2012); e padronizar técnicas de biologia molecular para a detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto (SCHLINDWEIN, 2009).

Assim, considerando a necessidade de produção de informações que subsidiem os marcos normativos sobre uso agrícola de lodo de esgoto no país, o presente estudo objetivou: caracterizar a exposição humana à contaminação microbiológica do lodo durante o tratamento por secagem em estufa agrícola (trabalhadores do setor saneamento); o uso agrícola no plantio de hortaliças (trabalhadores rurais); e o consumo de hortaliças adubadas com lodo de esgoto.

## METODOLOGIA

### Procedência e tratamento do lodo

O lodo de esgoto utilizado na pesquisa era proveniente da Unidade Integrada de Tratamento e Utilização de Esgotos da Viçosa (ETE Viçosa), situada no bairro Viçosa, no município de Viçosa, Minas Gerais. A ETE Viçosa era operada pelo Serviço Autônomo de Água e Esgoto (SAAE-Viçosa), em parceria com a Universidade Federal de Viçosa (UFV), tratando o esgoto doméstico proveniente dos domicílios do bairro, que totalizava, aproximadamente, mil habitantes. A estação tratava cerca de 100 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> de esgoto, sendo composta

de um conjunto reator anaeróbio de fluxo ascendente (*upflow anaerobic sludge blanket* — UASB) e biofiltro aerado submerso (inativado), ambos em escala real, pré-fabricados em aço. O reator UASB apresentava as seguintes dimensões: volume de 48 m<sup>3</sup>, altura de 5,70 m e tempo de detenção hidráulica de 7 h. O desaguamento do lodo excedente descartado do reator UASB era realizado em leito de secagem, composto de duas células paralelas (2 m de largura por 4 m de comprimento cada) e estrutura metálica sem cobertura de lona plástica transparente. Durante o experimento, o lodo era descartado no leito de secagem mensalmente e lá permanecia por 14 dias para a redução de volume e da umidade até, aproximadamente, 60%. Quando essa condição era atingida, a camada de lodo era desfeita pela pesquisadora principal, protegida por equipamentos de proteção individual (calça, bota plástica, jaleco, luva, máscara facial filtrante e óculos), e, posteriormente, o lodo era transferido para sacos plásticos e transportado para a etapa de tratamento.

### Cenários de exposição

Foram concebidos três cenários (Quadro 1) de exposição humana considerando as seguintes práticas e populações expostas: tratamento do lodo realizado por trabalhadores do serviço de saneamento (cenário 1); uso do lodo como adubo por trabalhadores rurais (cenário 2) e consumo de hortaliças cultivadas em solo adubado com lodo (cenário 3). Nesses cenários, a exposição humana foi baseada na possibilidade de infecção por bactérias e vírus via ingestão acidental de partículas de lodo, pela população exposta, ao levar as mãos à boca ou consumir hortaliças adubadas com lodo. A caracterização da exposição foi realizada pela determinação dos níveis de contaminação das amostras: lodo de esgoto em tratamento (LET), mistura solo + lodo (MSL), água de lavagem das mãos (ALM) e hortaliças cultivadas. Após serem coletadas, todas as amostras foram acondicionadas sob refrigeração em caixas térmicas e encaminhadas para análise no Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária da UFV (SMVPSP/DVT/UFV).

A seguir são descritos os três cenários de exposição, seus respectivos componentes e os procedimentos analíticos adotados para a caracterização da exposição. Em todos os cenários, durante a execução dos procedimentos, a pesquisadora principal e os colaboradores voluntários da pesquisa utilizaram equipamentos de proteção individual (calça, bota plástica, jaleco, luva, máscara facial filtrante e óculos).

### Cenário 1: tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola

O lodo proveniente do leito de secagem foi tratado em estufa agrícola, localizada na área da Divisão de Água e Esgoto da UFV. A estufa apresentava as seguintes características: 9 m de comprimento por 6 m de largura (54 m<sup>2</sup>); pilares e arcos metálicos; cobertura, partes laterais, posterior e frontal em lona plástica transparente; porta em estrutura metálica e lona plástica (parte frontal); ausência de sistema de ventilação e piso não impermeabilizado em concreto. Cada lodo excedente descartado do reator, desaguado no leito de secagem e tratado em estufa agrícola, correspondeu a um lote (L). O tratamento consistiu na formação de leira com altura máxima de 40 cm de altura, submetida à secagem no interior da estufa, com revolvimento manual do conteúdo uma vez por semana, com auxílio de enxada. Os lotes de lodo tratado, totalizando nove, foram produzidos entre fevereiro e novembro de 2015.

No cenário 1, a população exposta (trabalhadores do serviço de saneamento responsáveis pelo revolvimento das leiras e coleta de amostras de lodo) foi representada pela pesquisadora principal. A exposição foi caracterizada pela coleta semanal de amostras de LET na estufa e amostras de ALM (ALM-tratamento). Amostras de LET foram coletadas após revolvimento da leira com uma pá de jardinagem, por amostragem simples de diferentes locais e profundidades, totalizando em torno de 2.000 g/amostra. As amostras foram submetidas ao procedimento de quebra dos torrões usando soquete de madeira, homogeneizadas e colocadas em saco plástico estéril (700 g). Amostras de ALM-tratamento foram obtidas após cada evento de exposição (revolvimento das leiras e coleta das LET), vertendo-se 250 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS) refrigerada sobre as mãos, protegidas por luvas de látex, e friccionando-se uma contra a outra, enquanto o volume do lavado era coletado em um conjunto estéril composto de funil inserido em frasco reagente (Schott®).

Os parâmetros *E. coli*, CS e VEC foram pesquisados em ambas as amostras e umidade e pH foram determinados apenas nas amostras de LET.

### Cenário 2: uso agrícola de lodo de esgoto

Lodo de esgoto tratado por secagem em estufa agrícola foi utilizado como adubo no cultivo de alface (*Lactuca sativa*) e cenoura (*Daucus carota* subsp. *sativus*). No delineamento do cenário, optou-se por caracterizá-lo de forma

**Quadro 1** – Componentes dos cenários de exposição e elementos utilizados para a caracterização da exposição a *Escherichia coli* e vírus entéricos.

Cenários	Fonte da exposição	Forma de exposição	População exposta	Caracterização da exposição	
				Amostras coletadas	Parâmetros pesquisados
1	Lodo de esgoto durante tratamento	Ingestão acidental de partículas de lodo ao levar as mãos à boca	Trabalhadores do serviço de saneamento	LET ALM-tratamento	LET: <i>Escherichia coli</i> , CS, VEC, U e pH ALM-tratamento: <i>E. coli</i> , CS e VEC
2	Lodo de esgoto utilizado como adubo no plantio de hortaliças	Ingestão acidental de partículas de lodo ao levar as mãos à boca	Trabalhadores rurais	MSL ALM-plantio	MSL: CS e VEC ALM-plantio: CS, VEC e <i>E. coli</i>
3	Hortaliças adubadas com lodo de esgoto	Consumo de hortaliças adubadas com lodo	População consumidora de hortaliças cruas (alface e cenoura)	Hortaliças	CS e VEC

LET: lodo de esgoto em tratamento; ALM: água de lavagem das mãos; MSL: mistura solo + lodo; CS: colifagos somáticos; VEC: vírus entéricos cultiváveis; U: umidade.  
Fonte: elaborado pelos autores (2019).

mais desfavorável, ou seja, potencializando a exposição. Assim, as hortaliças utilizadas foram selecionadas com base nos seguintes critérios:

- hortaliças comuns na dieta da população brasileira;
- hortaliças consumidas cruas;
- crescimento da alface rente e da cenoura dentro do solo, favorecendo a contaminação;
- tempos de cultivo relativamente rápidos (30 – 90 dias);
- procedimentos de plantio e colheita realizados manualmente pelo trabalhador rural.

Também de forma a potencializar a exposição aos vírus, foram inoculadas suspensões de vírus de referência nos lotes de lodo utilizados como adubo.

No plantio das hortaliças, realizado na mesma estufa agrícola utilizada para tratamento do lodo, foram empregados, como adubo, lotes de lodo caracterizados como classe A (L3, L4, L5 e L6) ou classe B (L6 e L7), dependendo da fase de tratamento na estufa agrícola e da obtenção dos lotes de lodo para plantio. Para cada lote foi realizado o plantio de dois canteiros de alface e dois canteiros de cenoura, e para cada cultura, em um dos canteiros, foi adicionado lodo de esgoto previamente contaminado com volume de suspensões de vírus que resultasse em concentrações finais de  $10^3$ – $10^4$  UFP.mL<sup>-1</sup> de poliovírus 1 Sabin e de CS Phi X174. As suspensões de vírus foram mantidas sob refrigeração, em banho de gelo em caixa térmica, até o momento de contaminação de cada lote de lodo. Foram produzidos 24 canteiros, sendo 12 de alface (seis contaminados artificialmente) e 12 de cenoura (seis contaminados artificialmente).

Previamente à montagem dos canteiros, realizada conforme Magalhães (2012), as quantidades necessárias de lodo de esgoto e de solo foram pesadas e mantidas separadas em sacos plásticos até o momento de mistura. O solo utilizado nos plantios foi obtido na área do entorno da estufa. As mudas de alface e sementes de cenoura foram adquiridas no comércio local. Cada canteiro possuía três fileiras e, ao longo de cada fileira, foram plantadas quatro mudas de alface ou colocadas as sementes de cenoura. A irrigação dos canteiros era diária, no início da manhã ou fim da tarde, com água tratada proveniente da estação de tratamento de água da UFV, que é monitorada e apresenta ausência de *E. coli*.

No cenário 2, a população exposta de trabalhadores rurais foi representada por dois servidores do SMVPSP/DVT/UFV, colaboradores voluntários da pesquisa (Trabalhador 1 e Trabalhador 2), que realizaram os seguintes procedimentos relacionados à exposição: aplicação prévia do lodo (tratado ou contaminado) ao solo, montagem do canteiro e plantio das hortaliças. Os servidores utilizaram um par de luvas de látex por evento de exposição, de forma que, entre um evento e o seguinte, as mãos de cada um, individualmente, foram lavadas com 120 mL PBS para coleta de amostras de ALM (ALM-plantio), conforme descrito no cenário 1.

Nesse cenário, a exposição também foi caracterizada com base na coleta de amostras da MSL de cada canteiro, no momento da colheita das hortaliças, que ocorreu 52 dias após o plantio. As amostras de aproximadamente 700 g foram obtidas após revolvimento do canteiro, acondicionadas em saco plástico estéril e mantidas sob refrigeração em caixas térmicas.

Os parâmetros CS e VEC foram pesquisados em ambas as amostras (MSL e ALM-plantio). Já o parâmetro *E. coli* foi pesquisado somente nas amostras ALM-plantio.

### Cenário 3: consumo de hortaliças cultivadas em solo adubado com lodo

A exposição ao consumidor foi caracterizada com base na verificação da contaminação por CS e VEC nas hortaliças após o período de 52 dias do cultivo.

#### Determinação de parâmetros físicos e químicos

Os teores de umidade foram determinados conforme Andreoli (1999). A determinação dos teores de ST foi realizada conforme o método 2.540G (APHA; AWWA; WEF, 1998). O pH foi aferido segundo o método 9.045D (USEPA, 2004).

#### Detecção e quantificação de *Escherichia coli*

A identificação e a quantificação de *E. coli* foram realizadas pelo método cromogênico-fluorogênico, utilizando cartela Quanti-Tray® 2000 (IDEXX®) e meio de cultura Colilert®. As concentrações de *E. coli* nas amostras de 100 mL de ALM-tratamento foram expressas em NMP.100 mL<sup>-1</sup> da amostra. Já para as amostras diluídas ( $10^{-1}$ – $10^{-7}$ ) de LET (20 g), a concentração de *E. coli* foi expressa em NMP.g<sup>-1</sup> de ST e calculada pela Equação 1:

$$\text{NMP.g}^{-1} \text{ de ST} = \frac{(\text{NMP tabelado}) \times (\text{fator de diluição}) \times 100}{(\% \text{ sólidos totais})} \quad (1)$$

Em que:

NMP = número mais provável;

ST = sólidos totais.

#### Vírus, células e produção de inóculos

Como controle positivo para VEC foi utilizado poliovírus 1 Sabin e, para sua multiplicação, células derivadas de rhabdomyosarcoma humano (células RD) com passagens entre 171 e 185, cultivadas em meio mínimo essencial e de Leibovitz (L-15), na proporção 1:1, com soro fetal bovino a 15%, sendo realizados subcultivos de 1:3 a cada 72 horas. Suspensões de poliovírus 1 Sabin foram produzidas com a inoculação de 500 µL de suspensão viral em cultura de 24h de células RD com 90 a 100% de confluência.

Como controle positivo para CS, foi usada a cepa Phi X174 (ATCC#13706-B1) e sua respectiva bactéria hospedeira, *E. coli* CN13 (ATCC#15597-B1). As suspensões do colifago Phi X174 foram produzidas com a inoculação desse vírus em cultura da bactéria hospedeira na fase *log* de crescimento, na proporção 1:2. Essa mistura era incubada em estufa a 37°C por 4 horas para multiplicação do vírus. Após os períodos de incubação para cada vírus, as suspensões eram centrifugadas a 8.000 rpm por 10 minutos a 4°C e, em seguida, filtradas em membrana de ésteres de celulose (nitrato e acetato) de porosidade 0,22 µm (USEPA, 2001).

Uma alíquota de cada suspensão era retirada para quantificação de vírus, obtendo-se inóculos de poliovírus 1 Sabin (concentração:  $10^5$ – $10^8$  UFP.mL<sup>-1</sup>) e de colifago Phi X174 (concentração:  $10^6$ – $10^{10}$  UFP.mL<sup>-1</sup>); as suspensões dos inóculos eram armazenadas, respectivamente, a -80°C e 4°C.

#### Eluição, concentração e quantificação de vírus

Para a detecção de VEC e CS, foram processadas as seguintes quantidades das amostras:

- LET e MSL — quantidade equivalente a 12 g de ST da amostra;
- ALM-tratamento — 100 mL;
- LET-plantio — 100 mL da diluição 1:100;

- alface — plantas de tamanho pequeno foram utilizadas em sua totalidade (máximo 20 g) e plantas de tamanho maior derivaram duas amostras de 10 g cada, constituídas de folhas externas e internas.

A pesquisa de vírus foi realizada em duplicata para as amostras MSL, por constituírem matriz muito complexa.

Para a eluição e concentração de VEC e CS das amostras LET, ALM-tratamento, ALM-plantio, MSL e de alface foi empregada a técnica descrita em EPA/600/R-07/118 (USEPA, 2007). Para amostras de alface, a eluição de vírus foi realizada em sacos plásticos estéreis, contendo 50 mL de extrato de carne 1% pH 9 com glicina (50 mM) e  $MgCl_2$  (50 mM), e foi efetuada homogeneização manual por 15 minutos. Ao término do procedimento, retirava-se uma alíquota de cada amostra para a realização do teste de esterilidade e a todas as amostras adicionavam-se 500  $\mu$ L de gentamicina (10 mg.mL<sup>-1</sup>) antes do armazenamento à temperatura de -80°C.

A quantificação de CS foi realizada pelo ensaio de plaqueamento em ágar duplo (USEPA, 2001) e o resultado expresso em UFP.mL<sup>-1</sup>. A carga de VEC foi quantificada pelo método da diluição limitante (50% tissue culture infectious dose — TCID<sub>50</sub>), usando células RD/passagens 171–185 com concentração de 1–2 × 10<sup>5</sup> células.mL<sup>-1</sup>, e calculada pelo método Spearman-Kärber (HIERHOLZER; KILLINGTON, 1996). A carga de vírus expressa em TCID<sub>50</sub> foi transformada em UFP com a multiplicação pelo fator de conversão 0,69 (DAELEMANS *et al.*, 2011). Para amostras líquidas de ALM-tratamento, ALM-plantio e alface, o resultado foi mantido em UFP.mL<sup>-1</sup> e, para LET e MSL, concentração viral foi calculada pela Equação 2 e expressa em UFP.g<sup>-1</sup> de ST:

$$UFP.g^{-1} \text{ de ST} = \frac{(UFP.mL^{-1}) \times (\text{volume recuperado da amostra}) \times 100}{(\% \text{ sólidos totais})} \quad (2)$$

Em que:

UFP = unidade formadora de placa;

ST = sólidos totais.

### Controle de qualidade na recuperação e quantificação de vírus

O método utilizado para eluição e concentração de vírus das diferentes amostras oriundas dos experimentos foi avaliado quanto à eficiência. Para tanto, constituíram-se amostras controle positivo (ACP), com a inoculação de concentrações conhecidas (10<sup>3</sup> UFP.mL<sup>-1</sup>) de poliovírus 1 e colifago Phi X174 em quantidade equivalente a 12 g de ST amostras de lodo (ACP-lodo) e em 20 g de amostras da MSL (ACP-MSL) previamente descontaminada por calor úmido a 121°C por 30 minutos. Posteriormente, realizavam-se eluição e concentração de vírus.

ACP de alface (ACP-alface) foram preparadas com folhas obtidas no comércio local, imersas por 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio (200 ppm), enxaguadas em água destilada autoclavada e secas com papel toalha estéril. Posteriormente, realizou-se o procedimento de contaminação, conforme BUTOT *et al.* (2007), no qual foram utilizadas amostras de 10 g de alface inoculadas com concentrações de 10<sup>7</sup>–10<sup>8</sup> UFP.mL<sup>-1</sup> de poliovírus 1 e colifago Phi X174. O percentual de recuperação de cada vírus foi determinado pela razão entre a concentração de vírus na amostra processada e a concentração inoculada na amostra. Os percentuais foram determinados em 16 ensaios para as ACP-lodo, dois ensaios para ACP-MSL e três ensaios (com amostras em triplicata) para ACP-alface.

Amostras controle negativo de lodo (ACN-lodo), MSL (ACN-MSL) e alface (ACN-alface) foram constituídas com o objetivo de avaliar a ocorrência

de resultados falso-positivos decorrentes da toxicidade das amostras para as células RD nos ensaios de quantificação de VEC por TCID<sub>50</sub> e para as bacterianas hospedeiras com a quantificação de colifagos nos ensaios de plaqueamento em ágar duplo. As ACN foram preparadas conforme as ACP, sendo isentas da inoculação de vírus de referência.

## RESULTADOS

### Cenário 1: tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa agrícola

A maioria dos lotes de lodo (6) apresentou teores de umidade inicial entre 6 e 80% e final entre 2 e 4%. Os valores médios do pH variaram de 5,3 (L3) a 6,4 (L9), indicando tendência a leve acidificação. Quanto à qualidade bacteriológica, exceto em L1, que apresentou problemas nas diluições, L3, L4 e L6 foram transportados para estufa já com qualidade bacteriológica equivalente ao lodo classe B (< 1 × 10<sup>6</sup> NMP *E. coli*.g<sup>-1</sup> de ST), enquanto L5, L7 e L8 levaram até 20 dias para alcançar essa qualidade. O tempo de tratamento necessário para que os lotes passassem do tipo classe B para classe A (< 1 × 10<sup>3</sup> NMP *E. coli*.g<sup>-1</sup> de ST) foi, no mínimo, 28 dias (L4), no máximo, 88 dias (L5) e, em média, 50–60 dias. Para L9, as densidades de *E. coli* ainda eram superiores a 10<sup>6</sup> NMP.g<sup>-1</sup> de ST no encerramento do monitoramento (25 dias) (Tabela 1).

VEC foram detectados em três (2,5%) das 119 amostras analisadas, nos L6 (duas amostras) e L7 (uma amostra), somente após passagem em monocamada de células RD. As cargas virais obtidas na titulação foram: 2,42 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (L6), 7,15 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (L6) e 3,25 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (L7) (Tabela 1). CS foram detectados em amostras de LET dos lotes L1, L3, L6, L7, L8 e L9, totalizando 18 (15,1%) amostras. Em L1, L3 e L9, as amostras positivas foram identificadas até o 26º dia de tratamento, com concentrações de CS: variando de 5,6 × 10<sup>4</sup> a 9,1 × 10<sup>2</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST, em amostras com umidade de 83,1 a 22,6% (L1); variando de 2,1 a 6,7 × 10<sup>3</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST, em amostras com umidade de 80 a 71,1% (L3); e igual a 1 × 10<sup>5</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST, em amostra com 16,3% de umidade (L9). L6 apresentou uma única amostra positiva (63º dia de tratamento) com concentração de colifago igual a 1,1 × 10<sup>4</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST, em amostra com 4,7% de umidade. Em L7, amostras com umidade inferior a 10% apresentaram concentrações de colifagos entre 1,5 × 10<sup>5</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST (41º dia de tratamento) e 8 × 10<sup>3</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST (70º dia de tratamento). Em L8, do 7º ao 49º dia, a concentração de colifagos variou de 1,9 × 10<sup>5</sup> a 2,2 × 10<sup>4</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST e a umidade reduziu de 13,8 para 2,7% (Tabela 1). O percentual médio de recuperação de poliovírus 1 Sabin nas amostras ACP-lodo (16) foi 22,1% (7,2 a 53,4%) e, para colifago Phi X174, 29,7% (8,4 a 55,6%). As amostras ACN-lodo (16) não apresentaram efeitos citotóxicos para células RD ou para as bactérias hospedeiras.

Quanto às amostras de ALM-tratamento, 63,6% (21) e 33,3% (11) apresentaram concentrações de *E. coli* compreendidas, respectivamente, nos intervalos ≤ 10<sup>2</sup> NMP.100 mL<sup>-1</sup> e entre 10<sup>2</sup>–10<sup>4</sup> NMP.100mL<sup>-1</sup>. Apenas uma amostra apresentou resultado superior (2,4 × 10<sup>5</sup> NMP.100 mL<sup>-1</sup>). A detecção de VEC e CS foi negativa em todas as 33 amostras.

### Cenário 2: uso agrícola de lodo de esgoto

Durante a etapa de plantio das hortaliças, obtiveram-se 48 amostras ALM-plantio. Em 68,8% delas foram determinadas concentrações de *E. coli* ≤ 10<sup>2</sup> NMP.mL<sup>-1</sup> e, em 31,3%, concentrações entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>4</sup> NMP.mL<sup>-1</sup>. Na pesquisa de vírus, testaram-se 46 amostras, todas negativas para a presença de CS. Vírus entéricos foram

**Tabela 1** - Resultados das análises das amostras de lodo de esgoto em tratamento em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa, Minas Gerais.

Lote	Tempo de tratamento total (dias)	Umidade (% inicial - final)	Parâmetros												
			<i>Escherichia coli</i>						Virus						
			>10 <sup>6</sup> NMP.g <sup>-1</sup> de ST		10 <sup>3</sup> < <i>E. coli</i> < 10 <sup>6</sup> NMP.g <sup>-1</sup> de ST (Classe B)		< 10 <sup>3</sup> NMP.g <sup>-1</sup> de ST (Classe A)		Colifagos somáticos (CS)			Virus entéricos cultiváveis			
			Amostras (%)	Dias de tratamento (total)	Amostras (%)	Dias de tratamento (total)	Amostras (%)	Dias de tratamento (total)	Amostras (n)	Amostras positivas (%)	Concentração (UFP.g <sup>-1</sup> de ST) <sup>a</sup>	Dias de tratamento (total)	Amostras positivas (%)	Dias de tratamento (total)	
1	62	83,1-31	- <sup>c</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	- <sup>b</sup>	11	5 (45,5)	5,6 × 10 <sup>4</sup> -9 × 10 <sup>2</sup>	0-25 <sup>o</sup> (26)	ND	-
2	120	49,5-4	1 (6%)	0-6 <sup>o</sup> (7)	7 <sup>o</sup> -62 <sup>o</sup> (56)	8 (47)	63 <sup>o</sup> -119 <sup>o</sup> (57)	8 (47)	8 (47)	17	ND	-	-	ND	-
3	91	79,8-7,7	ND	ND	0-54 <sup>o</sup> (55)	7 (58,3)	55 <sup>o</sup> -90 <sup>o</sup> (36)	5 (41,7)	5 (41,7)	13	2 (15,4)	6,7 × 10 <sup>4</sup> -2,1 × 10 <sup>3</sup>	0-7 <sup>o</sup> (8)	ND	-
4	120	68,2-1,8	ND	ND	0-27 <sup>o</sup> (28)	4 (25)	28 <sup>o</sup> -119 <sup>o</sup> (92)	12 (75)	12 (75)	18	ND	-	-	ND	-
5	132	63,6-2,4	2 (11)	0-10 <sup>o</sup> (11)	11 <sup>o</sup> -87 <sup>o</sup> (77)	10 (55,6)	88 <sup>o</sup> -131 <sup>o</sup> (44)	6 (33,3)	6 (33,3)	19	ND	-	-	ND	-
6	113	65,4-2,2	ND	ND	0-55 <sup>o</sup> (56)	7 (46,7)	56 <sup>o</sup> -112 <sup>o</sup> (57)	8 (53,3)	8 (53,3)	16	1 (6,3)	1,1 × 10 <sup>4</sup>	63 <sup>o</sup> (1)	2 (12,5) <sup>c</sup>	63 <sup>o</sup> -71 <sup>o</sup> (9)
7	84	76,4-2,7	3 (25)	0-19 <sup>o</sup> (20)	20 <sup>o</sup> -48 <sup>o</sup> (29)	4 (33,3)	49 <sup>o</sup> -83 <sup>o</sup> (35)	5 (41,7)	5 (41,7)	13	4 (30,8)	1,5 × 10 <sup>5</sup> -8 × 10 <sup>1</sup>	41 <sup>o</sup> -70 <sup>o</sup> (30)	1 (7,7) <sup>c</sup>	41 <sup>o</sup> (1)
8	57	27,1-2,2	1 (12,5)	0-6 <sup>o</sup> (7)	7 <sup>o</sup> -48 <sup>o</sup> (42)	5 (62,5)	49 <sup>o</sup> -56 <sup>o</sup> (8)	2 (25)	2 (25)	8	5 (62,5)	1,9 × 10 <sup>6</sup> -2,2 × 10 <sup>4</sup>	7 <sup>o</sup> -49 <sup>o</sup> (43)	ND	-
9 <sup>f</sup>	26	61,4-6,2	3 (100)	0-25 (26)	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	- <sup>d</sup>	4	1 (25)	1 × 10 <sup>5</sup>	25 <sup>o</sup> (1)	ND	-

SL: sólidos totais; ND: não detectado; <sup>a</sup>variação da concentração de colifagos somáticos nas amostras positivas; <sup>b</sup>lote apresentou problemas na realização das diluições para *E. coli*; após inoculação de 100 µL da amostra concentrada em cultura de células derivadas de rabiomiosarcoma humano por 72 horas, duas amostras positivas do lote 6 e uma amostra positiva do lote 7 apresentaram, respectivamente, as cargas virais: 2,42 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (63<sup>o</sup> dia), 7,15 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (71<sup>o</sup> dia) e 3,35 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (41<sup>o</sup>); <sup>c</sup>no encerramento do experimento, o lote não havia alcançado qualidade bacteriológica classe A ou B, conforme Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº 375/2006. Fonte: elaborado pelos autores (2019).

detectados em 17,4% das amostras (75% pertencentes ao Trabalhador 1), com cargas virais variando entre 3 e 409,2 UFP.mL<sup>-1</sup>, sendo todas as amostras oriundas de canteiros adubados com lodo tratado inoculado com poliovírus 1 Sabin.

Obtiveram-se amostras MSL de 16 canteiros (oito de alface e oito de cenoura), adubados com lotes L3-A, L4-A, L5-A e L6-B, totalizando 32. Por dificuldades no monitoramento, não foram obtidas amostras de canteiros adubados com os lotes L6-A e L7-B. Não foi possível detectar resultados positivos para VEC em qualquer das 32 amostras. Quanto à detecção de CS, 72% das amostras MSL foram positivas, com concentrações variando entre 10 e 330 UFP.mL<sup>-1</sup>. Os percentuais de amostras positivas e as cargas virais foram semelhantes para as amostras MSL provenientes de canteiros adubados com lodo tratado (34,4% — 10 a 330 UFP.mL<sup>-1</sup>) e artificialmente contaminados (37,5% — 10 a 140 UFP.mL<sup>-1</sup>).

O percentual médio de recuperação de colifago PhiX174 nas amostras ACP-MSL (2) foi de 11,3%, e as amostras ACN-MSL (2) não apresentaram efeitos citotóxicos para as bactérias hospedeiras. Para poliovírus 1 Sabin, as amostras ACP-MSL e ACN-MSL foram citotóxicas para as células RD, não permitindo o cálculo do percentual de recuperação.

### Cenário 3: consumo de hortaliças cultivadas em solo adubado com lodo

No cultivo das hortaliças, só se obteve êxito na produção de alface, tendo sido colhidas 76 (53,1%) amostras oriundas de canteiros com lodo tratado e 67 (46,9%) de canteiros com lodo contaminado artificialmente. Todas as amostras foram negativas para pesquisa de CS e VEC. O percentual médio de recuperação de poliovírus 1 Sabin nas amostras ACP-alface (9) foi de 21,4% (0,9 a 52,2%) e, para colifago Phi X174, de 4% (0,3 a 7%). As amostras ACN-alface (9) não apresentaram efeitos citotóxicos para células RD ou para as bactérias hospedeiras.

## DISCUSSÃO

Em geral, como foram recuperadas baixas concentrações de vírus, os cenários estudados estiveram associados à baixa exposição a VEC. Além disso, a exposição reduz gradativamente entre os cenários, ou seja, trabalhadores de saneamento estiveram mais expostos que trabalhadores rurais e estes mais expostos que consumidores de hortaliças. O percentual de amostras LET positivas para VEC (2,5%) foi inferior aos encontrados em estudos realizados em grandes centros urbanos (60–80%) que também utilizaram técnicas de quantificação baseadas em cultivo celular. Por outro lado, as baixas concentrações identificadas foram semelhantes, sendo inferiores a 20 UFP.g<sup>-1</sup> de ST (SATO *et al.*, 2009; LIMA, 2010; SALVADOR, 2011). O pequeno número de amostras positivas e as baixas quantificações de VEC em lodo têm sido relacionados à variação da ocorrência de vírus na população humana produtora do esgoto sanitário, às diferentes eficiências de tratamento e, também, ao uso de somente uma linhagem celular para a pesquisa de vírus nas amostras — tendo em vista que as linhagens celulares apresentam variados níveis de suscetibilidade aos diferentes tipos de vírus (SHE *et al.*, 2006; PRIM *et al.*, 2013).

Soma-se a essas considerações o fato de que os resultados de quantificação de VEC foram obtidos após passagem em cultivo celular. Esse procedimento foi adotado porque os ensaios de titulação das amostras originais foram todos negativos. Assim, para se confirmar a ausência de VEC, as amostras foram inoculadas em cultivo celular e, posteriormente, tituladas. Com esse procedimento, as concentrações identificadas podem não refletir a amostra original, já que na passagem celular há aumento da concentração viral, superestimando, assim, os

resultados de quantificação. Por outro lado, em não se fazendo esse procedimento, os resultados seriam falso-negativos.

De forma semelhante, os resultados do monitoramento do parâmetro bacteriológico (*E. coli*) em amostras de LET significaram baixa exposição, dado que a maioria dos lotes de lodo ou já foi transferido para a estufa com valores correspondentes à classe B (< 10<sup>6</sup> NMP.g<sup>-1</sup> de ST) ou passou à classe A em, no máximo, 88 dias (média 50 a 60 dias). Esses resultados demonstram a adequação da higienização do lodo por meio da secagem em estufa agrícola como estratégia de redução adicional de patógenos, conforme exigência da Resolução CONAMA n° 375/2006 (BRASIL, 2006).

Ainda, os resultados referentes às amostras de ALM-tratamento (cenário 1), cuja maioria (97%) apresentou concentração de *E. coli* menor que < 10<sup>4</sup> NMP.100 mL<sup>-1</sup> e cuja totalidade não teve vírus entéricos detectados, reforçam a consideração de que a exposição para trabalhadores de saneamento durante o tratamento do lodo em estufa agrícola é baixa. Destaca-se, ainda, que o manejo das leiras (revolvimento e coleta de amostras) foi realizado com o uso de ferramentas (enxada e pás), o que pode ter funcionado como barreira, reduzindo a contaminação das mãos. Entretanto, esses resultados não permitem avaliar a exposição ao lodo em diferentes tempos de tratamento, já que as amostras de ALM-tratamento foram coletadas após o revolvimento de todas as leiras, com diferentes dias de tratamento. Adicionalmente, à medida que o lodo perde umidade e se torna mais seco, a exposição por inalação aumenta em relevância pela maior formação de aerossóis. Estudo realizado por Silva e Achon (2018) identificou que trabalhadores de ETE que manejavam lodo estavam expostos a diferentes riscos, até mesmo biológicos, mesmo em unidade com elevado nível de automação. Os autores também apontam a ausência, no Brasil, de legislação específica, no âmbito da saúde e segurança ocupacional, que regule as atividades de operação de ETE. E, por extensão, ressaltamos essa condição para unidades de gerenciamento de lodo.

O número de amostras positivas (15,1%) e as concentrações (entre 10<sup>2</sup> e 10<sup>5</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST) de CS identificadas foram semelhantes às relatadas em outros estudos (MANDILARA *et al.*, 2006; WONG *et al.*, 2010). A detecção de CS em amostras com menos de 10% de umidade e após 60 dias de tratamento (L6 e L7) demonstrou a resistência de CS naturais, conforme já demonstrado por Levantesi *et al.* (2015), Pascual-Benito *et al.* (2015) e Martín-Díaz *et al.* (2016).

Os resultados acima reforçam o potencial de CS como indicadores de VEC em lodo de esgoto. Ambos já compartilham importantes aspectos que sustentam essa relação, como: presença na microbiota de animais de sangue quente e estrutura, morfologia e tamanho semelhantes (GRABOW, 2001); ocorrem simultaneamente em lodo de esgoto (SIDHU; TOZE, 2009); e apresentam multiplicação limitada ou inexistente no ambiente (PASCUAL-BENITO *et al.*, 2015; JOFRE *et al.*, 2016). Estudos recentes que avaliaram a persistência de CS em amostras de lodo de esgoto em processos de higienização sugerem que vírus entéricos podem estar ausentes ou em concentrações muito baixas, sendo essas inferiores aos limites de detecção das técnicas, quando a concentração de CS é menor que 10<sup>4</sup> UFP/g ST (LEVANTESI *et al.*, 2015; PASCUAL-BENITO *et al.*, 2015; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2016).

No cenário de uso agrícola de lodo, a detecção de VEC e CS foi errática e em certa medida contraditória, já que amostras de ALM-plantio, coletadas após a produção dos canteiros (inoculado e não inoculado com poliovírus 1 e colifago Phi X174), foram positivas para VEC e negativas para CS. Em que pese essa ressalva, a detecção de VEC apenas em amostras de ALM-plantio obtidas da manipulação de canteiros adubados com lodo tratado inoculado com poliovírus 1 sugere a necessidade de elevada carga viral presente na MSL para a contaminação das

mãos de trabalhadores durante o plantio. Ressalta-se que os canteiros inoculados com poliovírus 1 ( $10^3$ – $10^4$  UFP.mL<sup>-1</sup>) representaram cenários muito mais desfavoráveis, já que amostras de lodo tratado apresentaram concentrações de VEC variando de 2.42 UFP.g<sup>-1</sup> de ST a 7.15 UFP.g<sup>-1</sup> de ST. Além disso, o fato de a aplicação do lodo ao solo e a produção dos canteiros de cenoura e alface terem sido realizadas manualmente aumenta mais ainda a condição desfavorável desse cenário. Dito de outra forma, os resultados indicam que a aplicação manual de lodo de esgoto classe A não implicaria exposição importante ao trabalhador. Os resultados ainda sugerem que a determinação da Resolução nº 375/2006 (Artigo 18º) de um intervalo de seis meses entre a aplicação de lodo classe B e a colheita manual seria muito exigente. Por outro lado, o uso de equipamentos de proteção individual, em qualquer situação, deve ser incentivado, na medida em que funciona como barreira adicional à exposição microbiológica.

A não correspondência entre a detecção de VEC e CS não permitiu avaliar o comportamento dos colifagos como indicadores de vírus entéricos na MSL. Apesar de autores assinalarem o potencial uso de CS como indicadores de vírus entéricos (CAMPOS *et al.*, 2013), o comportamento e decaimento de colifagos no solo ainda são incertos.

Em geral, verificou-se grande variação de resultados positivos e de concentrações de VEC e CS nas matrizes pesquisadas. No lodo, durante a higienização, além dos aspectos já mencionados, a dificuldade de detecção também pode estar relacionada à tendência à agregação dos vírus a partículas sólidas. Estas se tornam, durante a secagem do lodo, mais volumosas, enrijecidas e secas, podendo proteger vírus em seu interior e favorecendo a distribuição irregular deles, o que dificulta a detecção. Pourcher *et al.* (2007) também relataram problemas de irregularidade na detecção de amostras positivas na área do experimento em que o lodo era mais seco e havia a presença de torrões. Em solo adubado ou não com lodo, a sobrevivência de vírus é influenciada por vários parâmetros, entre eles a adsorção às partículas do solo, a temperatura e a umidade (POURCHER *et al.*, 2007; SCHWARZ *et al.*, 2014). Ressalta-se que os percentuais de recuperação das técnicas encontrados no estudo indicam a sua capacidade como ferramentas de pesquisa de vírus e colifagos.

Com relação à exposição ao consumidor (cenário 3), após 52 dias de cultivo das hortaliças (alface), não foi detectado vírus entérico nas amostras, seja naquelas cultivadas em contato com solo adubado com lodo de esgoto classe A ou B, seja nos canteiros inoculados com vírus ( $10^3$  a  $10^4$  UFP.g<sup>-1</sup> de ST). Os resultados mostram o quanto é restritiva a recomendação da Resolução nº 375/2006

(Artigo 12º), que determina o período mínimo de 48 meses da última aplicação do lodo de esgoto ou produto derivado no solo para o cultivo de olerícolas, tubérculos, raízes e demais culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo (BRASIL, 2006). Outros estudos indicam que a sobrevivência de micro-organismos patogênicos no solo adubado com lodo varia de dias até seis meses ou mais (POURCHER *et al.*, 2007; CAMPOS *et al.*, 2013; SCHWARZ *et al.*, 2014).

## CONCLUSÕES

Os cenários de exposição avaliados sugerem que as restrições impostas pela legislação brasileira para o uso agrícola de lodo de esgoto, considerando os parâmetros vírus entéricos e *E. coli*, são muito rigorosas, principalmente em se tratando do lodo classe A. Por outro lado, apesar de os trabalhadores de saneamento estarem expostos a baixos níveis de contaminação bacteriana e virológica, deve-se garantir condições de trabalho adequadas — no caso específico, o uso de equipamentos de proteção individual.

CS foram mais resistentes que *E. coli* e VEC durante secagem do lodo de esgoto em estufa agrícola e no plantio de hortaliças. A proporcionalidade dos níveis de concentração entre CF, VEC e *E. coli* permanece indefinida, no entanto reitera-se como favorável a possibilidade da utilização de CS como indicadores em processos de higienização térmica de lodo de esgoto.

Diferentes métodos de recuperação de vírus (passagem em células, titulação, reação em cadeia da polimerase — PCR) são utilizados, sozinhos ou combinados, nos estudos que se debruçam sobre esse campo, o que torna imprecisa e frágil a comparação entre os resultados das pesquisas. Assim, há a necessidade de padronização das técnicas de detecção de vírus em matrizes ambientais, por exemplo, se por biologia molecular ou cultivo celular. No caso de cultivo, são aspectos importantes a escolha de linhagens de células (já que elas apresentam variados níveis de suscetibilidade aos diferentes tipos de vírus) e a garantia de descontaminação adequada das amostras, principalmente em se tratando de lodo de esgoto.

## CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Oliveira, J. F.: Conceituação, Curadoria de Dados, Investigação, Escrita — Primeira Redação, Escrita — Revisão e Edição. Fuji, K.: Conceituação, Investigação, Escrita — Primeira Redação. Bevilacqua, P. D.: Conceituação, Obtenção de Financiamento, Supervisão, Validação, Escrita — Primeira Redação, Escrita — Revisão e Edição.

## REFERÊNCIAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER ENVIRONMENTAL FEDERATION (WEF). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington, D.C.: APHA, AWWA, WEF, 1998. 1496 p.

ANDREOLI, C.V. *Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura*. Curitiba: Companhia de Saneamento do Paraná (Sanepar), 1999. 98 p.

ASTALS, S.; VENEGAS, C.; PECES, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; MATA-ALVAREZ, J. Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, v. 46, n. 19, p. 6218-6227, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.035>

BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; DIAS, G.M.F.; BARONY, F.J.A. Análise crítica da legislação brasileira para uso agrícola de lodos de esgotos na perspectiva da avaliação quantitativa de risco microbiológico. *Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales*, v. 2, n. 1, p. 143-159, 2009. <https://doi.org/10.22201/iingen.0718378xe.2009.2.1.13111>

BASTOS, R.K.X.; BEVILACQUA, P.D.; MARA, D.D. Análise crítico-comparativa das normas brasileira, estadunidense e britânica de qualidade microbiológica de biossólidos para uso agrícola. *Revista DAE*, v. 191, p. 10-20, 2013. <https://doi.org/10.4322/dae.2014.098>



- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente (Conama). Resolução nº 375/2006. *Diário Oficial da União*, Brasília, 30 ago. 2006.
- BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental (SNSA). *Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: Diagnóstico Anual dos Serviços de Água e Esgotos*. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2017. Disponível em: <http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos>. Acesso em: 21 fev. 2019.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico*. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. 397 p.
- BRASIL. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). *Pesquisa Nacional de Saneamento Básico*. Rio de Janeiro: IBGE, 2008. 219 p.
- CAMPOS, C.; BELTRÁN, M.; DUARTE, M.; MEDINA, L.; LUCENA, F.; JOFRE, J. Abatement of helminth eggs and bacterial and viral indicators in soil after land application of treated sludges. *Journal of Water Resource and Protection*, v. 5, n. 12, p. 1155-1164, 2013. <https://doi.org/10.4236/jwarp.2013.512122>
- CHIBA, M.K.; MATTIAZZO, M.E.; OLIVEIRA, F.C. Cultivo de cana-de-açúcar em argissolo tratado com lodo de esgoto. II- Fertilidade do solo e nutrição da planta. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 32, n. 2, p. 653-662, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-06832008000200020>
- DAELEMANS, D.; PAUWELS, R.; CLERCQ, E.D.; PANNECOUQUE, C. A time-of drug addition approach to target identification of antiviral compounds. *Nature Protocols*, v. 6, n. 6, p. 925-933, 2011. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.330>
- DIAS, E.H.O. *Tratamento de lodo de esgoto por secagem em estufa: higienização e produção de biossólidos para uso agrícola*. 160f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- EAMENS, G.J.; WALDRON, A.M.; NICHOLLS, P.J. Survival of pathogenic and indicator bacteria in biosolids applied to agricultural land. *Australian Journal of Soil Research*, v. 44, n. 7, p. 647-659, 2006. <https://doi.org/10.1071/SR06015>
- GANTZER, C.; GASPARD, P.; GALVEZ, L.; HUYARD, A.; DUMOUTHIER, N.; SCHWARTZBROD, J. Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge. *Water Research*, v. 35, n. 16, p. 3763-3770, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00105-1](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00105-1)
- GOMES, S.B.V.; NASCIMENTO, C.W.A.; BIONDI, C.M. Produtividade e composição mineral de plantas de milho em solo adubado com lodo de esgoto. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v. 11, n. 5, p. 459-465, 2007. <https://doi.org/10.1590/S1415-43662007000500002>
- GRABOW, W. Bacteriophages: update on application as models for viruses in water. *Water South African*, v. 27, n. 2, p. 251-268, 2001. <https://doi.org/10.4314/wsav27i2.4999>
- GUZMÁN, C.; JOFRE, J.; MONTEMAYOR, M.; LUCENA, F. Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolid. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, n. 6, p. 2420-2429, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>
- HIERHOLZER, J.C.; KILLINGTON, R.A. Virus isolation and quantitation. In: MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. (org.). *Virology Methods Manual*. Reino Unido: Academic Press, 1996. p. 25-45.
- JEBRI, S.A.; HMAIEDA, F.; LUCENA, F.; SAAVEDRA, M.E.; YAHYA, M.; HAMD, M. A comparison of two extraction methods for the detection of Enteroviruses in raw sludge. *Journal of Virological Methods*, v. 200, p. 1-5, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.01.018>
- JOFRE, J.; LUCENA, F.; BLANCH, A.R.; MUNIESA, M. Coliphages as model organisms in the characterization and management of water resources. *Water*, v. 8, n. 5, p. 199, 2016. <https://doi.org/10.3390/w8050199>
- LEVANTESI, C.; BEIMFOHR, C.; BLANCH, A.R.; CARDUCCI, A.; GIANICO, A.; LUCENA, F.; TOMEI, M.C.; MININNI, G. Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 10, p. 7237-7247, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3572-6>
- LIMA, M.R.P. *Uso de estufa agrícola para secagem e higienização de lodo de esgoto*. 284f. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.
- MAGALHÃES, T.B. *Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da Resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico*. 180f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2012.
- MANDILARA, G.D.; SMETI, E.M.; MAVRIDOU, A.T.; LAMBIRI, M.P.; VATOPOULOS, A.C.; RIGAS, F.P. Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters*, v. 263, n. 1, p. 119-126, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00414.x>
- MARTÍN-DÍAZ, J.; CASAS-MANGAS, R.; GARCÍA-ALJARO, C.; BLANCH, A.R.; LUCENA, F. Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Science e Technology*, v. 73, n. 9, p. 2182-2188, 2016. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.066>
- MONPOEHO, S.; MAUL, A.; BONNIN, C.; PATRIA, L.; RANARIJAONA, S.; BILLAUDEL, S.; FERRÉ, V. Clearance of Human-Pathogenic Viruses from Sludge: Study of Four Stabilization Processes by Real-Time Reverse Transcription-PCR and Cell Culture. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 9, p. 5434-5440, 2004. <https://doi.org/10.1128/aem.70.9.5434-5440.2004>
- PASCUAL-BENITO, M.; GARCÍA-ALJARO, C.; CASANOVAS-MASSANA, S.; BLANCH, A.R.; LUCENA, F. Effect of hygienization treatment on the recovery and/or regrowth of microbial indicators in sewage sludge. *Journal of Applied Microbiology*, v. 118, n. 2, p. 412-418, 2015. <https://doi.org/10.1111/jam.12708>
- POURCHER, A.M.; FRANÇOISE, P.B.; VIRGINIE, F.; AGNIESZKA, G.; VASILICA, S.; GÉRARD, M. Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, v. 35, n. 3, p. 473-479, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.10.005>
- POURCHER, A.M.; MORAND, P.; PICARD-BONNAUD, F.; BILLAUDEL, S.; MONPOEHO, S.; FEDERIGHI, M.; FERRÉ, V.; MOGUEDET, G. Decrease of enteric micro-organisms from rural sewage sludge during their composting in straw mixture. *Journal of Applied Microbiology*, v. 99, n. 3, p. 528-539, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02642.x>
- PRADO, T.; GUILAYN, W.C.P.B.; GASPARD, A.M.; MIAGOSTOVICH, M.P. The efficiency of concentration methods used to detect enteric viruses in anaerobically digested sludge. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 108, n. 1, p. 77-83, 2013. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100013>
- PRIM, N.; RODRÍGUEZ, G.; MARGALL, N.; DEL CUERPO, M.; TRALLERO, G.; RABELLA, N. Combining cell lines to optimize isolation of human enterovirus from clinical specimens: report of 25 years of experience. *Journal of Medical Virology*, v. 85, n. 1, p. 116-120, 2013. <https://doi.org/10.1002/jmv.23426>

- RHODES, E.R.; BOCZEK, L.A.; WARE, M.W.; MCKAY, M.; HOELLE, J.M.; SCHOEN, M.; VILLEGAS, D.N. Determining pathogen and indicator levels in class B municipal organic residuals used for land application. *Journal Environmental Quality*, v. 44, n. 1, p. 265-274, 2015. <https://doi.org/10.2134/jeq2014.04.0142>
- SALVADOR, R.M. *Deteção e quantificação de Enterovírus em lodo de esgoto proveniente de estações de tratamento de esgoto com potencial uso na agricultura do estado de São Paulo*. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2011.
- SATO, M.I.Z.; HACHICH, E.M.; RAZZONOLI, M.T.P.; NARDOCCI, A.C. Avaliação quantitativa de risco microbiológico como instrumento de tomada de decisão na área de saneamento. *Microbiologia in Foco*, n. 9, p. 39-45, 2009.
- SCHLINDWEIN, A.D. *Pesquisa de vírus entéricos humanos em amostras de lodo da Estação de Tratamento de Esgoto (Sistema Insular) de Florianópolis, SC: padronização e avaliação de técnicas moleculares e de cultura celular na detecção e viabilidade viral*. 145f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
- SCHLINDWEIN, A.D.; RIGOTTO, C.; SIMÕES, C.M.O.; BARARDI, C.R.M. Detection of enteric viruses in sewage sludge and treated wastewater effluent. *Water Science e Technology*, v. 61, n. 2, p. 537-544, 2010. <https://doi.org/10.2166/wst.2010.845>
- SCHWARZ, K.R.; SIDHU, J.P.S.; PRITCHARD, D.L.; LI, Y.; TOZE, S. Decay of enteric microorganisms in biosolids amended soil under wheat (*Triticum aestivum*) Cultivation. *Water Research*, v. 59, p. 185-197, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.03.037>
- SHE, R.C.; CRIST, G.; BILLETDEAUX, E.; LANGER, J.; PETTI, C.A. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: a national perspective. *Journal of Clinical Virology*, v. 37, n. 3, p. 151-155, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.06.009>
- SIDHU, J.P.S.; TOZE, S.G. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environment International*, v. 35, n. 1, p. 187-201, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.07.006>
- SILVA, A.R.; ACHON, C.L. Identificação dos riscos ocupacionais no manejo do lodo de ETE. In: CONGRESSO SUL-AMERICANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS E SUSTENTABILIDADE, 1., 2018. *Anais [..]*. Gramado: Ibeas, 2018. p. 1-6.
- SIMMONS, F.J.; XAGORARAKI, I. Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities. *Water Research*, v. 45, n. 12, p. 3590-3598, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.001>
- SOARES, A.C.; STRAUB, T.M.; PEPPER, I.L.; GERBA, C.P. Effect of anaerobic digestion on the occurrence of enteroviruses and Giardia cysts in sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 29, n. 9, p. 1887-1897, 1994. <https://doi.org/10.1080/10934529409376155>
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Method 1602 - Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in water by Single Agar Layer (SAL) procedure*. EPA 821-R-01-029. Washington, DC.: USEPA, 2001. 38 p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Preliminary Comparative Study of Methods to Extract Virus from Raw and Processed Sewage Sludge*. Washington, DC.: USEPA, 2007. 30 p.
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). *Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods*. 3ª ed. Washington, DC.: USEPA, 2004. 910 p.
- VIAU, E.; BIBBY, K.; PAEZ-RUBIO, T.; PECCIA, J. Toward a consensus view on the infectious risks associated with land application of sewage sludge. *Environmental Science & Technology*, v. 45, n. 13, p. 5459-5469, 2011. <https://doi.org/10.1021/es200566f>
- VIAU, E.; PECCIA, J. Survey of wastewater indicators and human pathogen genomes in biosolids produced by class A and class B stabilization treatments. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 75, n. 1, p. 164-174, 2009. <https://doi.org/10.1128/aem.01331-08>
- WÉRY, N.; LHOUTELLIER, C.; DUCRAY, F.; DELGENÈS, J.P.; GODON, J.J. Behaviour of pathogenic and indicator bacteria during urban wastewater treatment and sludge composting, as revealed by quantitative PCR. *Water Research*, v. 42, n. 1-2, p. 53-62, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.048>
- WILLIAMS JR., F.P.; HURST, C.J. Detection of environmental viruses in sludge: enhancement of enterovirus plaque assay titers with 5-iodo-2'-deoxyuridine and comparison to adenovirus and coliphage titers. *Water Research*, v. 22, n. 7, p. 847-851, 1988. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(88\)90022-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(88)90022-X)
- WONG, K.; ONAN, B.M.; XAGORARAKI, I. Quantification of enteric viruses, pathogen indicators, and Salmonella bacteria in class B anaerobically digested biosolids by culture and molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 76, n. 19, p. 6441-6448, 2010. <https://doi.org/10.1128/AEM.02685-09>