



Ricardo Cesar et al.

## Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos

Ricardo Cesar<sup>1,3\*</sup>,  
Thiago Alvaro<sup>2</sup>,  
Marianna Silva<sup>3</sup>,  
Juan Colonese<sup>3</sup>,  
Cristiane Moreira<sup>3</sup>,  
Helena Polivanov<sup>2</sup>,  
Sylvia Egler<sup>3</sup>,  
Edison Bidone<sup>1</sup>,  
Zuleica Castilhos<sup>3</sup>

### Resumo:

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo gerado em estações de tratamento de efluentes domésticos e tem sido, comumente, empregado como insumo na agricultura e recuperação de áreas degradadas. Por outro lado, a presença de agentes tóxicos, nesses materiais, incluindo metais pesados, pode causar sérios danos à saúde humana e ambiental. O presente trabalho propõe a avaliação ecotoxicológica de latossolos e chernossolos tratados com LE, utilizando testes agudos com microcrustáceos aquáticos (*Daphnia similis*), testes crônicos com algas clorofíceas (*Pseudokirchneriella subcaptata*) e testes de bioacumulação de metais com oligoquetas (*Eisenia andrei*). Os ensaios agudos com microcrustáceos revelaram que a dose recomendada para emprego na agricultura (6,66% para o latossolo, e 6,58% para o chernossolo) não foi capaz de causar a imobilidade dos organismos. Os bioensaios crônicos com algas demonstraram que, no latossolo, todas as doses testadas (6,66 e 13,32%) foram capazes de inibir, significativamente, a reprodução dos organismos. Em geral, níveis maiores de toxicidade, tanto aguda, quanto crônica, foram observados para o latossolo. Essa constatação sugere que a abundância de argilominerais expansivos no chernossolo, associada à sua elevada fertilidade, parece ser capaz de reduzir a toxicidade e a biodisponibilidade dos contaminantes. O teste de bioacumulação com oligoquetas indicou a acumulação preferencial de metais essenciais e chumbo, bem como possíveis efeitos na reprodução dos organismos. Por fim, espera-se que os resultados possam subsidiar o estabelecimento de doses ideais de LE capazes de refletir as principais classes de solos brasileiros, fornecendo suporte fundamental à tomada de decisão em programas de controle ambiental.

**Palavras-chave:** Latossolo, chernossolo, lodo de esgoto, metais pesados, bioensaios.

### Abstract

Sewage sludge (SL) is a waste produced by Effluents Treatment Stations, and it has been widely used as an input in the agriculture and recuperation of degraded areas. However, the presence of toxic agents, including heavy metals, can cause damages on human health and biota. This investigation proposes the ecotoxicological evaluation of sewage sludge-amended ferralsols and chernossols, using acute bioassays with micro-crustaceous (*Daphnia similis*), chronic bioassays with algae (*Pseudokirchneriella subcaptata*) and bioaccumulation tests of metals with earthworms (*Eisenia andrei*). Acute bioassays revealed that the doses recommended by agricultural application (6.66% and 6.58%, for ferralsol and chernosol, respectively) were not able to provoke the immobility of the crustaceous. Chronic bioassays indicated that all SL applied doses on the ferralsol were able to significantly inhibit the reproduction of algae. Bioaccumulation

1 – Universidade Federal Fluminense, UFF. Instituto de Química, Departamento de Geoquímica Ambiental. Outeiro São João Baptista, s/n. Centro, Niterói - RJ.

2 – Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ. CCMN-Instituto de Geociências. Departamento de Geologia, Setor de Geologia de Engenharia e Ambiental. Av. Athos da Silveira Ramos, 274 – Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ.

3 – Centro de Tecnologia Mineral, CETEM/MCT. Serviço de Desenvolvimento Sustentável, Laboratório de Ecotoxicologia Aplicado à Indústria Mineral-Metalúrgica. Av. Pedro Calmon, 900. Cidade Universitária, Rio de Janeiro – RJ.

\*Autor correspondente: geo\_ricardoce-sar@yahoo.com.br





tests with earthworms revealed preferential accumulations of essential elements and lead, as well as possible effects on the reproduction of the organisms. Finally, it is expected that such results can consolidate the future establishment of ideal SL doses able to reflect the reality of Brazilian pedo-

logical occurrences, in order to support decision-makers in programs on environmental control.

**Key-words:** ferralsol, chernosol, sewage sludge, heavy metals, bioassays.

## 1. Introdução

O lodo de esgoto (LE) é um resíduo gerado em estações de tratamento de efluentes domésticos e sua disposição sustentável tem sido amplamente discutida pela comunidade científica. As alternativas de disposição, via de regra, requerem tecnologias sofisticadas e recursos financeiros: deposição em aterros sanitários, incineração, bota-foras oceânicos, reciclagem agrícola, lagoas de armazenagem e a digestão aeróbica, seguida de disposição em superfície (sobretudo em aterros exclusivos). No Brasil, de acordo com dados de 2001, 50% dos biossólidos são dispostos em aterros sanitários, 15,1 % como insumos na agricultura e 34,9% possuem “disposição indefinida” (Andreolli et al., 2008).

nando concentrações de xenobiontes no ambiente e seus efeitos adversos à saúde dos ecossistemas. Oligoquetas, collembolas, vegetais, microorganismos, peixes, crustáceos aquáticos e algas são largamente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental e na estimativa das frações biodisponíveis de contaminantes em águas, solos e sedimentos (Fjällborg et al., 2006, Crouau et al., 2002, Straalen et al., 2005). No caso dos solos, os oligoquetas (*Eisenia andrei*) têm sido amplamente utilizados como organismos-teste em bioensaios, uma vez que representam um elo importante da cadeia trófica terrestre (servindo de alimento para diversas espécies de animais), ingerem grande quantidade de solo, são abundantes em solos tropicais e temperados e são de fácil cultivo e manutenção em laboratório (Nahmani et al., 2007).

De fato, a reciclagem agrícola do LE tem se tornado uma alternativa interessante de disposição final, sobretudo do ponto de vista econômico. Seu uso, na agricultura e na recuperação de áreas degradadas, é, comumente, justificado por seus teores elevados de matéria orgânica e de nutrientes, capazes de incrementar os níveis de fertilidade, porosidade, permeabilidade e agregabilidade dos solos (Surthar & Singh, 2008). Entretanto, a presença de metais pesados, de contaminantes orgânicos e de patógenos constitui a principal restrição ao emprego do LE nessas atividades (Obbard, 2001; Bright & Healey, 2003; Cai et al., 2007). Além do risco de contaminação do lençol freático, a incorporação de elementos tóxicos pela biota edáfica e plantas, associada à presença de microorganismos patogênicos, pode causar sérios prejuízos à saúde dos ecossistemas terrestres. Além disso, processos erosivos e de lixiviação podem mobilizar os agentes tóxicos para drenagens vizinhas, comprometendo à saúde da biota aquática.

No que diz respeito ao ecossistema aquático, microcrustáceos aquáticos (gênero *Daphnia*) e algas clorofíceas são comumente empregados na avaliação da qualidade de águas fluviais e de sedimentos de fundo. Alguns autores têm, também, proposto a utilização desses organismos na avaliação do potencial tóxico de solos em cenários de risco, onde contaminantes possam ser mobilizados em direção a sistemas aquáticos vizinhos (Maxam et al., 2000, Fjällborg et al., 2005). As razões que justificam o emprego desses organismos em bioensaios são o simples cultivo em laboratório, curto ciclo de vida e sua abundância em sistemas fluviais. Além disso, esses organismos se reproduzem por partenogênese, possibilitando a obtenção de populações mais homogêneas (Maxam et al., 2000) a serem utilizadas em bioensaios.

Testes ecotoxicológicos são amplamente utilizados para avaliação da qualidade dos recursos naturais, relacio-

O presente trabalho trata da avaliação ecotoxicológica de latossolos e de chernossolos tratados com diferentes doses de LE, utilizando testes ecotoxicológicos com oligoquetas, microcrustáceos e algas de água doce.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1 Amostras

A amostra de LE utilizada nesse trabalho foi coletada na Estação de Tratamento de Efluentes da Ilha do Governador (município do Rio de Janeiro, RJ). De forma a estudar a interação desse material com solos de características distintas, foram amostrados latossolos e chernossolos. Os latossolos possuem ampla distribuição geográfica no Brasil, sendo largamente utilizados na agricultura do país. Os chernossolos,

menos abundantes, apresentam elevada fertilidade natural, sendo muito importante para a agricultura, sobretudo na região sul do país.

As amostras de latossolo e de chernossolo (horizonte B) foram coletadas, respectivamente, nos municípios de Duque de Caxias (RJ. 22° 41' 34.2"S, 43° 17' 14.5"W) e do Rio de Janeiro (RJ. 22° 51' 22.5"S, 43° 30' 0.7"W). As amostras



foram coletadas com auxílio de trado e acondicionadas em sacos plásticos. Em laboratório, foram secas à temperatura ambiente e peneiradas a 10 malhas (1,7 mm), de forma a se removerem raízes, detritos e outras partículas maiores.

A caracterização física, química e mineralógica dessas mesmas amostras de solo foi descrita por Alamino et al. (2007) e Cesar et al. (2008). De acordo com os referidos autores, o latossolo apresenta-se com uma textura argilo-

sa, valores ácidos de pH (4,8 unidades), baixos níveis de fertilidade, altos teores de ferro total e fração argila predominantemente composta por caulinita, gibbsita e goethita. O chernossolo, mais alcalino que o latossolo (pH = 6,2 unidades), possui textura argilosa, baixa permeabilidade, elevados teores de nutrientes e fração argila majoritariamente composta de vermiculita, caulinita, interestificado illita-smectita e illita.

## 2.2 Determinação de metais pesados em solos e oligoquetas

O método adotado para a determinação de Hg total foi baseado na pirólise da amostra, sendo a determinação analítica efetuada por absorção atômica (LUMEX RA 915+). A quantificação dos teores totais dos demais elementos (Cu, Zn, Pb, Hg, Ni e Cr) foi realizada a partir de 1 grama de amostra (PS), solubilizada com 40 mL de uma solução composta de ácido fluorídrico (HF), ácido clorídrico (HCl) e ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) (2:1:1), em béquer de platina. A solução obtida foi, então, aquecida até secar em chapa a 120 °C, sendo retomada com ácido nítrico 5% (HNO<sub>3</sub>) para medição na Absorção Atômica (Varian, modelo Spectra 55b). Antes de serem submetidos a esses procedimentos, os oligoquetas foram previamente congelados e liofilizados. Dessa forma, os resultados foram emitidos em peso seco.

A contaminação dos solos acrescidos de LE foi avaliada

por comparação com os valores estipulados pela CETESB (2005) e pelo CONAMA (2009) relativos à qualidade dos solos (Tabela 1). É importante ressaltar que os valores orientadores do CONAMA (2009) correspondem aos mesmos valores das concentrações de prevenção e de intervenção descritas em CETESB (2005), cabendo a cada Estado da Federação estipular seus próprios valores de referência com base nos seus respectivos *backgrounds* pedogeométricos. Neste sentido, a CETESB (2005) já possui um *background* estabelecido para o Estado de São Paulo, o qual foi empregado, nesse trabalho, como valor de referência.

As concentrações de metais no LE foram comparadas àquelas propostas pelo CONAMA (2006), que estabelece os teores orientadores de elementos metálicos no LE para fins agrícolas (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores orientadores de metais pesados para qualidade de solos (CETESB 2005, CONAMA 2009) e para o uso de lodo de esgoto na agricultura (CONAMA, 2006).

| Elementos | Valores propostos pela CETESB (2005) e CONAMA (2009) para qualidade de solos |                   |                              | Valores recomendados pelo CONAMA para uso agrícola de lodo de esgoto (mg/kg) |
|-----------|--|-------------------|------------------------------|--|
|           | Referência (mg/kg)   | Prevenção (mg/kg) | Intervenção agrícola (mg/kg) |  |
| Cu        | 35   | 60                | 200                          | 1500   |
| Ni        | 13   | 30                | 70                           | 420  |
| Cr        | 40   | 75                | 150                          | 1000   |
| Pb        | 17   | 72                | 180                          | 300  |
| Zn        | 60   | 300               | 450                          | 2800   |
| Hg        | 0,05   | 0,5               | 12                           | 17   |
| Cd        | 0.5  | 1.3               | 3                            | 39   |

## 2.3 Teste de toxicidade aguda com microcrustáceos aquáticos (*Daphnia similis*)

O bioensaio agudo com microcrustáceos da espécie *Daphnia similis* foi baseado na exposição de fêmeas de seis a 24 horas de idade a lixiviados (elutriados) de misturas de diferentes proporções solo:LE, por um período de 48 horas

(ABNT NBR 12713/2004). As referidas proporções foram definidas com bases em trabalhos prévios (Cesar et al., 2008, Cesar et al., 2010) executados com essas amostras de solo e de LE. Sendo assim, foram estudadas as doses ideais para o



uso agrícola do LE (6,66% para o latossolo, e 6,58% para o Chernossolo), com bases nas recomendações de Tsutiya (2000 *apud* Cesar et al., 2008). As demais doses (quatro) seguiram uma progressão aritmética dos valores iniciais (latossolo: 13,32; 19,98; 26,64; 33,3% - Chernossolo: 13,16; 19,74; 26,32; 32,90%), visando à simulação de cenários de acumulação ou aplicações sucessivas de LE sobre os solos.

O procedimento adotado, para a preparação dos elutriados, está fundamentado nas recomendações de Baun et al. (2002), que propõem a agitação orbital (200 rpm) de uma mistura composta de solo-teste:água (1:8) durante um período de 24 horas. Após essa etapa, a mistura é centri-

fugada, sendo o sobrenadante filtrado e, posteriormente, congelado para a avaliação ecotoxicológica. Os elutriados foram preparados com o emprego do meio de cultivo *D. similis*, meio M. S., conforme ABNT NBR 12713/2004. O emprego de elutriados, na avaliação ecotoxicológica de solos tratados com LE, é amplamente conhecido na literatura científica, sendo que os resultados gerados consistem em bons parâmetros para futuras comparações (Maxam et al., 2000; Fjällborg et al., 2005; Carbonell et al., 2009). A estimativa da concentração de LE capaz de provocar a imobilidade de 50% dos organismos testados (CE50) foi realizada com o auxílio do software *Trimmed Spearman Karbed*.

#### 2.4 Teste de toxicidade crônica com algas clorofíceas (*Pseudokirchneriella subcapitata*)

O bioensaio crônico com *Pseudokirchneriella subcapitata* foi baseado na avaliação do crescimento da população de algas expostas a elutriados de diferentes proporções solo:LE. Os testes foram realizados sob temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , iluminação contínua de 3500 lux ( $\pm 10\%$ ) e velocidade de agitação orbital de 100 a 175 rpm. As doses de LE empregadas, nos ensaios, foram estabelecidas com base nos testes agudos com *D. similis* e, portanto, foram testadas somente as doses que não causaram imobilidade

nos microcrustáceos. Os elutriados foram preparados com o meio de cultura utilizado no cultivo das algas, meio L. C. Oligo (ABNT NBR 12648/2005).

Após 96 horas de exposição, procedeu-se à contagem celular, de modo a se verificarem possíveis anomalias no crescimento da população de algas. As biomassas iniciais foram subtraídas daquelas obtidas após 96 horas. O resultado foi expresso em porcentagem de inibição de crescimento (ABNT NBR 12648/2005).

#### 2.5 Teste de bioacumulação de metais com oligoquetas edáficos (*Eisenia andrei*)

Esse experimento foi realizado de acordo com as recomendações da ASTM (2004). O ensaio é composto de duas etapas: bioacumulação e depuração, ambas com duração de 28 dias. O teste foi realizado com 3600 g de solo-teste e 90 organismos adultos de peso semelhante (para garantir populações mais homogêneas) por réplica (3) (total de 270 indivíduos). A umidade das amostras foi ajustada de acordo com a capacidade de campo. Os recipientes-testes foram vedados com um plástico fino, contendo pequenos orifícios, de modo a impedir a fuga dos animais. Durante a etapa de bioacumulação, 10 organismos foram retirados de cada réplica, em dias previamente definidos (**4º, 7º, 14º, 21º, 28º dias**), e enviados para a determinação de metais pesados (vide item 2.3.1). Os fatores de bioconcentração (FBC), um *Proxy* da biodisponibilidade e da cinética do processo, foram calculados através da razão entre o teor do contaminante no organismo e a concentração no solo.

Após a etapa de bioacumulação, os organismos restantes foram transferidos para um solo artificial não

contaminado, onde permaneceram por 28 dias (fase de depuração). A composição do solo artificial seguiu as recomendações de Garcia (2004): 70% de areia de sílica, 20% de caulim e 10% de casca de coco. Novamente, 10 organismos foram retirados de cada réplica, em dias previamente estabelecidos (**7º, 14º, 21º, 28º dias**), e enviados para a quantificação dos teores de metais pesados, de forma a mensurar o potencial de eliminação desses elementos pelos organismos.

Devido à indisponibilidade de amostra, esse ensaio foi somente realizado com o latossolo. A dose de LE empregada no experimento (8,14%) está baseada nos ensaios de ecotoxicidade aguda com *E. andrei* realizados por Cesar et al. (2010); esses autores determinaram uma CL50 (concentração capaz de provocar a mortalidade de 50% dos animais expostos) de 14,37% (intervalo de 95% de confiança: 13,04 a 16,06%), para essas mesmas amostras de LE e de latossolo, e sugeriram a ausência de efeitos letais significativos para o tratamento de 8,14%.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Determinação de metais pesados nos solos

A determinação de metais nos solos tratados com LE revelou que os teores de Cu, Zn, Pb e Hg apresentaram não-conformidades em relação aos valores orientadores

propostos pela CETESB (2005) e pelo CONAMA (2009) (Tabela 2). As amostras de solo não tratadas com LE apresentaram, com exceção do Hg no latossolo, concentrações



de metais abaixo dos limites de referência propostos pela CETESB. Para todas as doses estudadas – i.e., misturas solo:LE - as concentrações de metais ficaram acima dos valores de referência (CETESB, 2005), para, pelo menos, um dos elementos considerados, sugerindo teores acima do *background* pedogeoquímico determinado para o Estado de São Paulo (CETESB, 2005). As duas maiores doses empregadas mostraram valores de Hg, Zn e Cu acima dos limites de prevenção, para a ocorrência potencial de efeitos adversos à saúde da biota terrestre (CETESB, 2005; CO-

NAMA, 2009).

Os teores de metais na amostra de LE mostraram-se coerentes com as concentrações estipuladas pelo CONAMA (2006) (Tabela 1 e 2), único documento legal brasileiro que trata do uso do LE como insumo na agricultura. Por outro lado, é importante destacar que esses valores não foram estabelecidos com base em testes ecotoxicológicos, tornando extremamente importante a execução de estudos relacionados.

| Doses de lodo de esgoto (%) | Concentrações de metais pesados (mg/kg) |      |       |        |         |        |
|-----------------------------|---|------|-------|--------|---------|--------|
|                             | Cu                                      | Ni   | Cr    | Pb     | Zn      | Hg     |
| 0                           | 6,80                                    | 2,90 | 7,20  | 13,00  | 48,60   | 0,097* |
| 6,66                        | 19,67                                   | 4,25 | 9,39  | 20,66* | 93,05*  | 0,21*  |
| 8,14***                     | 22,53                                   | 4,55 | 9,88  | 22,36* | 102,93* | 0,24*  |
| 13,32                       | 32,53*                                  | 5,60 | 11,58 | 28,32* | 137,50* | 0,32*  |
| 19,98                       | 45,40*                                  | 6,96 | 13,77 | 35,98* | 181,95* | 0,44*  |
| 26,64                       | 58,27*                                  | 8,31 | 15,96 | 43,64* | 226,40* | 0,55** |
| 33,3                        | 71,14**                                 | 9,66 | 18,16 | 51,30* | 270,84* | 0,66** |
| 100 (LE <i>in natura</i> )  | 200,00                                  | 23,2 | 40,1  | 128,00 | 716,00  | 1,80   |

Notas: \* – acima do limite de referência; \*\* – acima do limite de prevenção; \*\*\* – dose empregada somente para realização do teste de bioacumulação de metais com oligoquetas.

Tabela 2 – Determinação dos teores totais de metais pesados em latossolos, acrescidos de distintas doses de lodo de esgoto, em amostra de lodo de esgoto (100%) *in natura*

| Doses de lodo de esgoto (%) | Concentrações de metais pesados (mg/kg) |      |       |        |         |        |
|-----------------------------|---|------|-------|--------|---------|--------|
|                             | Cu                                      | Ni   | Cr    | Pb     | Zn      | Hg     |
| 0                           | 15,8                                    | 1,6  | 3,1   | 5,2    | 40,00   | 0,032  |
| 6,58                        | 27,92                                   | 3,02 | 5,53  | 13,28  | 84,48*  | 0,15*  |
| 13,16                       | 40,04*                                  | 4,44 | 7,97  | 21,36* | 128,96* | 0,26*  |
| 19,74                       | 52,16*                                  | 5,86 | 10,40 | 29,44* | 173,44* | 0,38*  |
| 26,32                       | 64,28**                                 | 7,29 | 12,84 | 37,52* | 217,92* | 0,50** |
| 32,9                        | 76,40**                                 | 8,71 | 15,27 | 45,60* | 262,40* | 0,61** |

Notas: \* – acima do limite de referência; \*\* – acima do limite de prevenção

Tabela 3 – Concentrações totais de metais pesados em chernossolos acrescidos de lodo de diferentes doses de lodo de esgoto

### 3.2 Teste de toxicidade aguda com microcrustáceos aquáticos

Os resultados referentes aos bioensaios com *D. similis* revelaram que a dose de LE recomendada para uso em áreas degradadas (6,66 e 6,58%, para o latossolo e chernossolo, respectivamente) não causou imobilidade aos organismos testados, em ambas as classes de solo (Tabela 4). Por outro lado, em cenários de acumulações ou aplicações sucessivas de LE no solo, níveis significativos de toxicidade (imobilidade) foram detectados para doses iguais ou maiores que 19,98%. O elutriado da amostra de LE *in natura* provocou a imobilidade de 100% dos organismos. Testes estatísticos de regressão linear indicaram a existência de relações positivas de dependência entre o número de microcrustáceos imóveis e aumento da dose de LE (latossolo:  $p = 0,007$ ; chernossolo:  $p = 0,03$ ), i.e., incremento das concentrações de agentes tóxicos no solo (incluindo metais). Esses resul-

tados sugerem que os metais podem sofrer lixiviação e/ou serem capturados por partículas erodidas, sendo carregados para sistemas aquáticos co-localizados e comprometendo a saúde da fauna aquática.

Níveis maiores de toxicidade foram observados para as amostras de latossolo ( $CE_{50} = 26,21\%$ ; intervalo de 95% de confiança = 18,50 a 37,14%), com relação ao chernossolo ( $CE_{50} = 31,11\%$ ; intervalo de 95% de confiança = 25,59 a 37,83%) (Tabela 4). Cesar et al. (2010), ao avaliar a ecotoxicidade aguda dessas amostras utilizando oligoquetas, observaram comportamento semelhante, sugerindo que as propriedades dos solos estudados desempenharam papel importante nos mecanismos de biodisponibilidade. Nesse contexto, é importante ressaltar que os chernossolos correspondem a materiais que sofreram processos intempéricos

menos intensos e, dessa forma, contam com valor de pH na faixa de neutralidade, além da presença abundante de argilominerais expansivos e de nutrientes. A abundância dos referidos minerais de argila parece diminuir a mobilidade e a biodisponibilidade de contaminantes para a solução do solo (fração geoquímica solúvel), reduzindo os níveis de ecotoxicidade. Matske et al. (2008), ao estudar a fitotoxi-

cidade de solos tratados com distintos minerais de argila, também verificaram a redução da toxicidade associada à presença de argilas do tipo 2:1. No caso do Chernossolo, ainda é importante destacar que altas concentrações de nutrientes representam maior disponibilidade de alimento e, dessa forma, os animais tendem a estar mais saudáveis e a suportar maiores teores de agentes tóxicos no ambiente.

| LATOSSOLO          |                |                     | CHERNOSSOLO        |                |                     |
|--------------------|----------------|---------------------|--------------------|----------------|---------------------|
| Lodo de esgoto (%) | Fêmeas imóveis | % de fêmeas imóveis | Lodo de esgoto (%) | Fêmeas imóveis | % de fêmeas imóveis |
| 0,0                | 0              | 0                   | 0,0                | 0              | 0                   |
| 6,66               | 0              | 0                   | 6,58               | 0              | 0                   |
| 13,32              | 0              | 0                   | 13,16              | 0              | 0                   |
| 19,98              | 8              | 40                  | 19,74              | 0              | 0                   |
| 26,64              | 10             | 50                  | 26,32              | 7              | 35                  |
| 33,33              | 12             | 60                  | 32,90              | 11             | 55                  |

Tabela 4 – Grau de imobilidade de fêmeas de *Daphnia similis* expostas a elutriados de latossolos e chernossolos tratados com diferentes doses de lodo de esgoto

### 3.3 Teste de toxicidade crônica com algas clorofíceas

Os bioensaios crônicos com *P. subcaptata* revelaram, a exemplo dos testes com os crustáceos, níveis maiores de ecotoxicidade para o latossolo, em comparação ao Chernossolo (Tabela 5). Novamente, a presença de argilominerais expansivos, associada aos elevados níveis de fertilidade, parece ter desempenhado papel crucial na redução da ecotoxicidade, possibilitando níveis maiores de reprodução celular nos elutriados de Chernossolo.

Todas as doses testadas com o latossolo (6,66 e 13,12%) indicaram a ocorrência de efeitos adversos às algas, com inibição significativa da reprodução em relação ao controle (> 20%), sugerindo elevados níveis de ecotoxicidade crônica associada às doses estudadas (Tabela 5).

Para o elutriado da amostra de LE *in natura*, o número de células, ao final do ensaio, foi menor do que o inóculo inicial (inibição negativa), indicando altos níveis de toxicidade. No Chernossolo, somente a maior dose testada (19,74%) foi capaz de inibir, significativamente, a reprodução dos organismos (> 20%) (Tabela 5), indicando a ocorrência de efeitos adversos em cenários de acumulações e aplicações sucessivas de LE no solo. Ainda, é importante destacar que as algas clorofíceas representam um nível trófico inferior (produtores) aos microcrustáceos (consumidores primários) e, dessa forma, danos à saúde desses organismos podem comprometer, seriamente, a cadeia trófica do ecossistema aquático em que vivem.

| LATOSSOLO          |                            | CHERNOSSOLO        |                            |
|--------------------|----------------------------|--------------------|----------------------------|
| Lodo de esgoto (%) | Inibição da reprodução (%) | Lodo de esgoto (%) | Inibição da reprodução (%) |
| 0,0                | 0                          | 0,0                | 0                          |
| 6,66               | 54,92                      | 6,58               | 16,54                      |
| 13,32              | 57,30                      | 13,16              | 19,48                      |
| -                  | -                          | 19,74              | 60,13                      |

Tabela 5 – Inibição da reprodução celular em indivíduos de *Pseudokirchneriella subcaptata* expostos a elutriados de latossolos e chernossolo tratados com lodo de esgoto.

### 3.4 Teste de bioacumulação de metais com oligoquetas

Os resultados do teste de bioacumulação com *E. andrei* revelaram, ao término da etapa de bioacumulação, uma mortalidade de 20% dos organismos. É importante ressaltar que a dose de LE aplicada não foi capaz de provocar mortalidade significativa sob uma exposição aguda (Cesar

et al., 2010), porém causou efeitos letais significativos sob exposição crônica. Outra constatação que confirma a mais elevada toxicidade crônica é a ausência de casulos ao final da etapa de bioacumulação, sugerindo que os agentes tóxicos presentes no LE foram capazes de provocar efeitos

adversos à reprodução dos oligoquetas. De fato, Spurgeon et al. (1994 apud Luz et al., 2004) sugerem que a produção de casulos pelos oligoquetas é fortemente sensível à presença de metais tóxicos no solo, o que justificaria a diminuição da abundância ou até mesmo a ausência desses organismos em solos contaminados por elementos metálicos.

O balanço de massa de metais nos tecidos dos oligoquetas revelou que, a exceção do Hg, os organismos foram capazes de depurar (excretar) mais de 90% da quantidade de metais estocada durante a etapa de bioacumulação

(Tabela 6). Essa observação sugere que, caso deixasse de ser exposto, o organismo desses animais seria capaz de se recuperar. A quantificação do teor de metais nos tecidos dos oligoquetas apresentou acumulações preferenciais (Tabela 6): Zn (90,4 – 115 mg/kg) > Pb (14,9 – 28,5 mg/kg) > Cu (18,1 – 21,8 mg/kg) > Cr (3,4 - 5,6 mg/kg) > Ni (1,9 - 3,7 mg/kg) > Hg (0,068 - 0,095 mg/kg). Essa seqüência pode estar relacionada ao papel desempenhado pelos metais no metabolismo desses animais (elementos essenciais e não-essenciais), bem como a questões de seletividade alimentar.

Tabela 6 – Teores totais de metais pesados em tecidos de oligoquetas expostas a latossolo tratado com 8,14% de lodo de esgoto: 28 dias de exposição em solo-teste (fase de bioacumulação) e solo artificial (fase de depuração/excreção).

| Dias de exposição | Cu (mg/kg) |      | Zn (mg/kg) |      | Pb (mg/kg) |      | Cr (mg/kg) |      | Hg (mg/kg) |      | Ni (mg/kg) |      |
|-------------------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
|                   | OL         | FBC  | OL         | FBC  | OL         | FBC  | OL         | FBC  | OL         | FBC  | OL         | FBC  |
| 0.                | 12         | -    | 77,7       | -    | 2,6        | -    | 0,99       | -    | 0,025      | -    | 1,5        | -    |
| 4. <sup>b</sup>   | 18,1       | 0,80 | 90,4       | 0,88 | 14,9       | 0,67 | 3,4        | 0,34 | 0,068      | 0,28 | 1,9        | 0,42 |
| 7. <sup>b</sup>   | 17         | 0,75 | 110        | 1,07 | 13,2       | 0,59 | 2,2        | 0,22 | 0,076      | 0,32 | 1,5        | 0,33 |
| 14. <sup>b</sup>  | 19,9       | 0,88 | 101        | 0,98 | 13,4       | 0,60 | 2,9        | 0,29 | 0,077      | 0,32 | 2,2        | 0,48 |
| 21. <sup>b</sup>  | 20,4       | 0,91 | 114        | 1,11 | 24,8       | 1,11 | 3,1        | 0,31 | 0,087      | 0,36 | 3,4        | 0,75 |
| 28. <sup>b</sup>  | 21,8       | 0,98 | 115        | 1,12 | 28,5       | 1,28 | 5,6        | 0,57 | 0,095      | 0,40 | 3,7        | 0,81 |
| 7. <sup>d</sup>   | 15,8       | -    | 85,2       | -    | 25,9       | -    | 3,4        | -    | 0,074      | -    | 2,9        | -    |
| 14. <sup>d</sup>  | 15,3       | -    | 81,6       | -    | 14,8       | -    | 1,1        | -    | 0,063      | -    | 1,9        | -    |
| 21. <sup>d</sup>  | 13,9       | -    | 74,6       | -    | 10,5       | -    | 2,4        | -    | 0,065      | -    | 2          | -    |
| 28. <sup>d</sup>  | 12         | -    | 72,9       | -    | 2,6        | -    | 0,83       | -    | 0,058      | -    | 1,6        | -    |

Notas: <sup>b</sup> – Etapa de bioacumulação; <sup>d</sup> – etapa de depuração; OL = tecido de oligoquetas; FBC = fator de bioconcentração.

### 3.5 Mercúrio

A quantificação da concentração de Hg nos oligoquetas revelou teores extremamente baixos em comparação aos demais metais, bem como FBCs abaixo de uma unidade, indicando que os organismos somente absorveram Hg, mas não bioacumularam (Liu et al. 2005) (Tabela 6). Entretanto é importante ressaltar que Hg não desempenha qualquer função biológica no metabolismo dos oligoquetas e que, de forma geral, a maioria dos FBCs para Hg total em oligoquetas é usualmente menor do que uma unidade, sendo poucos os casos, na literatura, que reportam valores maiores (Burton et al., 2006). Por outro lado, é importante destacar que o mercúrio é um elemento altamente tóxico e mesmo a incorporação biológica de baixas concentrações pode causar sérios danos ao ecossistema. Ainda, a quantificação dos teores de Hg em oligoquetas mostrou que a acumulação e a depuração de Hg ocorreram mais efetivamente durante os primeiros dias em solo-teste e solo artificial, respectivamente, e que os animais não foram capazes de excretar totalmente o estoque de Hg incorporado na etapa

de bioacumulação (total bioacumulado > total excretado) (Tabela 6).

A constatação de um balanço de massa positivo de Hg nos oligoquetas denota a existência de mecanismos de fixação interna do metal. Neste sentido, Veiga e Hinton (2001) sugerem a existência de mecanismos de metilação interna de Hg no trato intestinal desses organismos, através da ação de bactérias redutoras de sulfato. Cesar et al. (2008b) ainda encontraram FBCs de metilmercúrio (MeHg) maiores do que 20 unidades em testes de toxicidade aguda com *E. andrei*, enquanto aos FBCs de Hg total permaneceram abaixo de uma unidade. Burton et al. (2006) sugerem que cerca de 0,5 a 1,5% do Hg total em solos corresponde a metilmercúrio e que, dessa forma, o potencial de transposição da substância para os oligoquetas é, em geral, baixo. Sendo assim, é provável que esse balanço de massa positivo para Hg esteja associado à metilação de formas inorgânicas do metal no intestino desses animais, porém essa hipótese deve ser ainda mais bem estudada.

### 3.6 Zinco e cobre

A determinação dos teores de Zn revelou valores bastante elevados em comparação aos demais metais,

bem como FBCs acima de uma unidade, indicando que os animais absorveram e bioacumularam o metal (Liu et



al., 2005) (Tabela 6). No caso de Cu, as concentrações nos tecidos dos oligoquetas também foram altas, mas os FBCs permaneceram abaixo de uma unidade (Tabela 6). A transposição e a depuração de ambos os metais parecem ocorrer mais efetivamente durante os primeiros dias em solo-teste e solo artificial, respectivamente. Os resultados ainda sugerem que os oligoquetas foram capazes de depurar o estoque de Zn e Cu incorporado durante a etapa de bioacumulação, indicando que o organismo desses animais poderia se recuperar, caso fossem afastados da exposição.

A elevada biodisponibilidade de Zn e Cu pode estar

associada ao papel importante que esses elementos desempenham no metabolismo dos oligoquetas. Alguns autores sugerem que, em ambientes contaminados, os oligoquetas seriam capazes de estocar altas quantidades de Zn e Cu, para futuras demandas fisiológicas, e que esse processo seria fortemente mediado via ação de metalotioneínas (Hopkin, 1989, *apud* Lukkari, et al. 2005, Kagi & Kojima, 1987, *apud* Suthar & Singh, 2008). Conforme Lukkari et al. (2005), Zn participa no desenvolvimento, crescimento e regeneração dos tecidos dos oligoquetas, enquanto Cu possui papel vital no transporte de substâncias entre as células e os tecidos.

### 3.7 Chumbo, Cromo e Níquel

A determinação do teor de Pb nos tecidos dos oligoquetas demonstrou a existência de concentrações elevadas em relação aos demais metais não-essenciais, com FBCs maiores do que uma unidade durante os últimos dias da etapa de bioacumulação (Tabela 6). Embora o Pb não desempenhe qualquer função biológica para os oligoquetas, outros autores também reportam a capacidade desses animais de acumular altas quantidades de Pb (Suthar & Singh, 2008; Carbonell et al., 2009; Nahmani et al., 2009). Dessa forma, devido à sua elevada toxicidade e alta biodisponibilidade (FBCs > 1), é possível que o Pb tenha desempenhado papel

de destaque na ecotoxicidade de metais em comparação aos demais elementos metálicos presentes no LE.

A quantificação das concentrações de Cr e Ni revela FBCs abaixo de uma unidade, indicando que os animais somente absorveram os contaminantes, mas não bioacumularam (Tabela 6). A constatação de transposição de Cr para os organismos merece maior atenção, devido à elevada toxicidade de sua forma hexavalente, carcinogênica para humanos e amplamente conhecida por provocar sérios efeitos adversos a plantas e microorganismos (Katz & Salem, 1993).

## 4. Conclusões

A determinação do teor de metais pesados nos solos tratados com LE revelou teores acima da referência e de prevenção ambiental para Hg, Zn, Cu e Pb. Os bioensaios com organismos aquáticos apresentaram uma relação positiva e significativa entre o incremento de dose (i.e., da concentração de agentes tóxicos, incluindo metais) e efeitos adversos sobre organismos. Entre os testes ecotoxicológicos, o bioensaio crônico com algas parece ser o mais sensível à presença de agentes tóxicos contidos no LE, indicando, no caso do latossolo, inibição significativa da reprodução, mesmo para a dose ideal para a agricultura (6,66%). Os testes agudos com microcrustáceos indicaram toxicidade em misturas solo-LE acima de 13%.

O teste de bioacumulação com oligoquetas demonstrou acumulações preferenciais de metais, possivelmente associadas a frações geoquímicas potencialmente biodisponíveis e ao papel desempenhado por cada metal no metabolismo e fisiologia dos oligoquetas. Entre os metais estudados, o Zn e o Pb apresentaram os maiores FBCs, indicando teores altamente biodisponíveis no solo. No caso de Pb, esses resultados merecem maior atenção, devido à elevada toxicidade associada a esse metal. O Hg foi o único metal que apresentou balanço de massa positivo em tecidos de oligoquetas, sugerindo a existência de processos de fixação interna e possível metilação no trato intestinal dos animais.

## 5. Agradecimentos

Os autores agradecem à equipe da Coordenação de Análises Mineraias, ao Laboratório de Especificação de Mercúrio Ambiental (LEMA) e ao Laboratório de Ecotoxicologia (LECOMIN) do CETEM/MCT, por disponibilizarem a

infra-estrutura laboratorial. A concessão de bolsas do CNPq para Ricardo Cesar (Doutorado), Thiago Alvaro (IC), Juan Colonese (IC) e Marianna Silva (IC) foi também de fundamental importância à execução desse trabalho.





## 6. Referências

- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)- NBR 12713. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Crustácea, Cladocera). Rio de Janeiro: ABNT 2004.
- ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas)- NBR 13373. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae) Rio de Janeiro: ABNT 2005.
- ALAMINO, R.C.J., POLIVANOV, H., CAMPOS, T.M.P.C., SILVA, V.H.G., SANTOS, L.V., MENDES, J.C. 2007. Biodisponibilidade de cádmio em latossolo acrescido de lodo de esgoto. Anuário do Instituto de Geociências, **30**(2): 45-54.
- ANDREOLI, C.V., GARBOSSA, L.H.P., LUPATINI, G., PEGORINI, E.S. Wastewater sludge management: a Brazilian approach. In: global atlas of excreta, wastewater sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource, p. 131-146, 2008.
- ASTM (American Society for Testing and Materials). (2004). Standard Guide for Conducting Laboratory Soil Toxicity or Bioaccumulation Tests with the Lumbricid Earthworm *Eisenia fetida* and the enchytraeid potworm *Enchytraeus albidus*. ASTM 1676-04
- BAUN, A., JUSTESEN, K.B., NYHOLM, N. 2002. Algal tests with soil suspensions and elutriates: a comparative evaluation for PAH-contaminated soils. Chemosphere, **46**(2): 251-258.
- BRIGHT, D.A. & HEALEY, N. 2003. Contaminant risks from biosolids land application: contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. Environmental Pollution, **126**: 39-49.
- BURTON, D.T., TURLEY, S.D., FISHER, D.J.U., GREEN, D.J. & SHEDD, T.R. 2006. Bioaccumulation of total mercury and monomethylmercury in the earthworm *Eisenia fetida*. Journal of Water, Air and Soil Pollution, **170**: 37-54.
- CAI, Q., MO, C., WU, Q., ZENG, Q., KATSOYAIANNIS, A. 2007. Occurrence of organic contaminants in sewage sludges from eleven wastewater treatment plants, China. Chemosphere, **68**: 1751-1762.
- CARBONELL, G., GÓMEZ, J.P.N., BABÍN, M.M., FERNÁNDEZ, C.; ALONSO, E., TARAZONA, J.V. 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: ecotoxicological effects on representative soil organisms. Ecotoxicology and Environmental Safety, **72**: 1309-1319.
- CESAR, R.G., EGLER, S.G., ALAMINO, R.C.J., POLIVANOV, H., SILVA, R.C., CASTILHOS, Z.C., ARAUJO, P. 2008. Avaliação do potencial tóxico de latossolos e chernossolos acrescidos de lodo de esgoto utilizando bioensaios com oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. Anuário do Instituto de Geociências-UFRJ, **31**(2): 53-60.
- CESAR, R.G., SILVA, M.B., COLONESE, J.P., EGLER, S.G., BIDONE, E.D., CASTILHOS, Z.C., POLIVANOV, H. 2010a. Acute ecotoxicity and mercury bioavailability in sewage sludge amended-soils using bioassays with earthworms. In: 3<sup>rd</sup> International Eco-Health Conference, London (England), CD-Room.
- CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). 2005. Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo. Disponível em: <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela\\_valores\\_2005.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/relatorios/tabela_valores_2005.pdf)>. Acessado em 03 mar 2011.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 2006. Resolução nº 375 de 29 de agosto de 2006. 6p.
- CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente). 2009. Resolução nº 420 de 28 de dezembro de 2009. 12p.
- CROUAU, Y., GISCLARD, C., PEROTTI, P. 2002. The use of *Folsomia candida* (Collembola, Isomidae) in bioassays of waste. Applied Soil Ecology, **19**: 65-79.
- FJÄLLBORG, B., AHLBERG, G., NILSSON, E., DAVE, G. 2005. Identification of metal toxicity in sewage sludge leachate. Environment International, **31**: 25-31.
- FJÄLLBORG, B., LI, B., NILSSON, E., DAVE, G. 2006. Toxicity identification evaluation of five metals performed with two organisms (*Daphnia magna* and *Lactuca sativa*). Archives of Environmental Contamination and Toxicology, **50**: 196-204.
- KATZ, S.A. & SALEM, H. 1993. The toxicology of chromium with respect to its chemical speciation: a review. Journal of Applied Toxicology, **13**: 217-224
- LIU, X., CHENGXIAO, H., ZHANG, S. 2005. Effects on earthworm activity on fertility and heavy metals bioavailability in sewage sludge. Environment International, **31**: 874-879.
- LUKKARI, T., ASTSINKI, M., VÄISÄNEN, A., HAIMI, J. 2005. Toxicity of copper and zinc Assessed with three different earthworms tests. Applied Soil Ecology, **30**: 133-146.
- MAXAM, G., RILA, J., DOTT, W., EISENTRAEGER, A. 2000. Use of bioassays for assessment of water-extractable ecotoxic potential of soils. Ecotoxicology and Environmental Safety, **45**: 240-246.
- MATZKE, M., STOLTE, S., ARNING, J., UEBERS, U., FILSER, J. 2008. Imidazolium based ionic liquids in soils: effects of the side chain length on wheat (*Triticum aestivum*) and cress (*Lepidium sativum*) as affected by different clays and organic matter. Green Chemistry, **10**: 584-591.
- NAHMANI, J., HODSON, M.E., BLACK, S. 2007. A review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. Environmental Pollution, **145**: 402-424.
- NAHMANI, J., HODSON, M.E., DEVIN, S., VIJVER, M.G. 2009. Uptake kinetics of metals by the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated soils. Environmental Pollution, **157**: 2622-2628.
- OBBARD, J.P. 2001. Ecotoxicological assessment of heavy metals in sewage sludge-amended soils. Applied Geochemistry, **15**: 1405-1411.
- STRAALEN N.M., DONKER M.H., VIJVER M.G., GESTEL C.A.M. 2005. Bioavailability of contaminants estimated from uptake rates into soil invertebrates. Environmental Pollution, **136**: 409-417.
- SUTHAR S. & SINGH S. 2008. Bioconcentrations of metals (Fe, Cu, Zn, Pb) in earthworms (*Eisenia fetida*), inoculated in Municipal sewage sludge: do earthworms pose a possible risk of terrestrial food chain contamination? Ecotoxicology and Environmental Safety, **24**(1): 25-32.
- VEIGA, M.M. & HINTON, J.J. 2001. Methylation of mercury-organic compounds by earthworms. In: International Conference on Mercury as a Global Pollutant, 6, Minamata, Japan, Book of Abstracts, 117p..