

# Avaliação da sobrevivência de indicadores bacterianos e vírus durante higienização de lodo de esgoto por secagem térmica em estufa agrícola

*Survival evaluation of bacterial indicators and viruses during thermal drying of sewage sludge in a greenhouse*

Juliana Ferreira de Oliveira<sup>1</sup> , Raquel Ribeiro Ferreira Ker<sup>1</sup> ,  
Geovane Amaro Teixeira<sup>1</sup> , Rafael Kospchitz Xavier Bastos<sup>1</sup> , Paula Dias Bevilacqua<sup>1\*</sup> 

## RESUMO

O presente trabalho objetivou avaliar o processo de secagem térmica de lodos de esgoto em estufa agrícola com vistas à inativação bacteriana e de vírus, além do comportamento de colifagos somáticos como indicadores desses organismos. Cada volume de lodo de esgoto excedente descartado de reator *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) foi desaguado em leito de secagem por 14 dias e direcionado para secagem em estufa agrícola correspondendo a um lote (L) de lodo. Entre fevereiro e novembro de 2015, foram tratados 9 lotes (L1 a L9) por, em média, 13 semanas. O pH se manteve estável na maioria deles (entre 5,0-6,0). Após, aproximadamente, 60 dias de tratamento, todos os lotes apresentavam umidade abaixo de 10%, exceto L3 e L4 (10-25%). O tempo necessário para atingir 90% de sólidos totais (ST) variou entre 40-50 (L1 e L7), 60 (L5 e L6) e 85-100 (L2, L3 e L4) dias. Os lotes levaram, em média, 50-60 dias para alcançarem níveis de *E. coli* iguais ou menores a  $1 \times 10^3$  número mais provável (NMP)/g de ST. A detecção de colifagos somáticos foi baixa e eventual. O ensaio de inoculação mostrou decaimento rápido de vírus (Poliovírus 1 Sabin), mas colifago somático Phi X174 mostrou-se mais persistente nas três temperaturas avaliadas (estufa agrícola, controladas em laboratório – 30 e 60°C). O tratamento térmico de lodo de esgoto em estufa agrícola se apresentou como simples e eficiente na obtenção de produto granulado, seco e com níveis de redução da contaminação bacteriana atendendo ao parâmetro estabelecido como seguro para uso agrícola conforme a legislação brasileira.

**Palavras-chave:** biossólido; coliformes; Poliovírus 1 Sabin; colifago somático PHI X174.

## ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the thermic drying of sewage sludge in agricultural greenhouse, in order to inactivate bacterial and virus, and to evaluate the behavior of somatic coliphages as indicator of these organisms. Each volume of excess sewage sludge discarded from UASB reactor, drained in a drying bed for 14 days and directed to thermic drying treatment in greenhouse corresponded to a batch (B) of sludge. Between February and November 2015, nine batches (L1 to L9) were treated for an average of 13 weeks. Most batches kept the pH between 5.0-6.0. After about 60 days of treatment, all batches showed humidity below 10%, except B3 and B4 (10-25%). The time required to reach 90% of total solids ranged between 40-50 (B1 to B7), 60 (B5, B6) and 85-100 (B2, B3 and B4) days. On average, levels of *E. coli* reduced to  $<1 \times 10^3$  NMP/g TS after 50-60 days of treatment. The detection of somatic coliphages was low and eventual. Tests of inoculation showed rapid decay of virus (Sabin 1 strain poliovirus), but somatic coliphage Phi X174 was more persistent in the three temperatures evaluated (greenhouse, laboratory controlled 30 and 60°C). The thermic drying treatment of sewage sludge in agricultural greenhouse was presented as simple and efficient in obtaining granulated and dried product, and in reducing bacterial contamination levels given the parameter set as safe for agricultural use under the Brazilian law.

**Keywords:** biossolid; coliforms; Sabin 1 strain poliovirus; somatic coliphage PHI X174.

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

\*Autor correspondente: paula@ufv.br

Recebido: 01/08/2016 - Aceito: 21/07/2017 - Reg. ABES: 167356

## INTRODUÇÃO

No Brasil, o manejo e tratamento do lodo de esgoto será, inevitavelmente, alvo de preocupação, em virtude de estratégias estabelecidas pelo governo no setor de saneamento que abrangem a expansão da rede coletora e a implantação de estações de tratamento de águas residuárias, com conseqüente crescimento da produção de lodo de esgoto. Por causa da sua constituição de nutrientes e matéria orgânica, esse resíduo apresenta potencial para uso agrícola, tratando-se de prática de disposição final benéfica por promover o condicionamento do solo, aumentar o tempo de vida útil dos aterros sanitários e reduzir gastos da agricultura com insumos.

No entanto, durante o tratamento do esgoto, a totalidade dos organismos patogênicos não é inativada ou removida, resultando na transferência e concentração destes para o lodo produzido, o qual acaba apresentando densidades consideráveis, que podem oferecer risco à saúde de trabalhadores do serviço de saneamento e, como resultado do reúso agrícola, a trabalhadores rurais e a consumidores de alimentos.

Para impedir impactos adversos à saúde humana, legislações são elaboradas para regulamentar o processo de uso agrícola do lodo. No país, os procedimentos a respeito do tratamento, do padrão de qualidade e das orientações de uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto são normatizados pela Resolução CONAMA nº 375/2006, a qual define duas “classes” de lodo (A e B) (BRASIL, 2006). O classe A é caracterizado por: coliformes termotolerantes (CTe)  $<10^3$  número mais provável (NMP).g<sup>-1</sup> de sólidos totais (ST); ovos viáveis de helmintos  $<0,25$  ovo.g<sup>-1</sup> de ST; *Salmonella* spp. com ausência em 10 g de ST e vírus  $<0,25$  unidade formadora de placa (UFP) ou unidade formadora de foco (UFF).g<sup>-1</sup> de ST; e o 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). Ou seja, 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 país, ainda são escassas as pesquisas realizadas considerando 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. De modo geral, essas pesquisas realizadas contemplaram: verificar a qualidade microbológica de lodos de esgoto produzidos em Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) (SATO et al., 2009; SALVADOR, 2011); avaliar a eficiência de estratégias de tratamento do lodo (ANDREOLI et al., 2000; COMPARINI & ALÉM SOBRINHO, 2002; LIMA, 2010; DIAS, 2012); avaliar a contaminação microbológica e parasitária de hortaliças

adubadas com lodo de esgoto classe B; e discutir a Resolução CONAMA nº 375/2006 sob a perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico (MAGALHÃES, 2012) e padronização de técnicas de biologia molecular para detecção de vírus entéricos em amostras de lodo de esgoto (SCHLINDWEIN, 2009).

Considerando a necessidade de fortalecimento técnico-científico e de caracterização do contexto brasileiro para prover informações que subsidiem a adequação da legislação, as pesquisas devem ser orientadas a priorizar, inicialmente, os seguintes objetos de investigação: determinar a qualidade microbológica e parasitária dos diferentes tipos de lodo de esgoto; verificar as eficiências de remoção e inativação de agentes patogênicos e indicadores (tradicionais e candidatos) pelos processos de tratamento recomendados na resolução; e padronizar e avaliar métodos analíticos de processamento de amostra de lodo de esgoto e de detecção e enumeração de diferentes organismos quanto ao grau de exequibilidade, à confiabilidade dos resultados e aos custos para realização de monitoramento rotineiro da qualidade do lodo pelas instituições de saneamento.

Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar o potencial de higienização da secagem térmica em estufa agrícola quanto aos níveis de contaminação bacteriana e virológica de amostras de lodo de esgoto doméstico, considerando colifagos somáticos como possíveis indicadores da presença de vírus entéricos.

## METODOLOGIA

### Procedência do lodo de esgoto e remoção de umidade

O lodo de esgoto utilizado na pesquisa era proveniente da Unidade Integrada de Tratamento e Utilização de Esgotos da Viçeira (ETE Viçeira), situada no bairro Viçeira, do município de Viçosa, Minas Gerais, Brasil. A ETE Viçeira é 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 totaliza aproximadamente 1.000 habitantes. A estação trata cerca de 100 m<sup>3</sup>.d<sup>-1</sup> de esgoto e é composta de um conjunto reator *upflow anaerobic sludge blanket* (UASB) e biofiltro aerado submerso (inativado), ambos em escala real, pré-fabricados em aço. O reator UASB apresenta as seguintes dimensões: volume=48 m<sup>3</sup>; altura=5,70 m; e tempo de detecção hidráulica (TDH)=7 h. Para o desaguamento do lodo excedente descartado do reator UASB, a estação possui um leito de secagem, que é constituído por duas células em paralelo, com 2,0 m de largura e 4,0 m de comprimento cada (8,0 m<sup>2</sup>), e estrutura metálica sem cobertura de lona plástica transparente.

O lodo de esgoto excedente do reator UASB foi descartado com frequência mensal e direcionado para uma das células do leito de secagem,

sem cobertura plástica, onde permanecia por 14 dias para redução de volume e formação de uma camada de lodo seco com cerca de 60% de umidade. Quando essa condição era atingida, a camada de lodo era desfeita com o auxílio de ferramentas, o lodo, transferido para sacos plásticos e transportado para a etapa de tratamento.

## Higienização de lodo de esgoto por secagem térmica em estufa agrícola

A secagem do lodo de esgoto foi realizada em estufa agrícola instalada no entorno do Laboratório de Controle da Qualidade da Água da Divisão de Água e Esgoto (LCQA/DAG) da UFV. A estufa agrícola utilizada para secagem térmica do lodo possuía 9,0 m de comprimento por 6,0 m de largura (54,0 m<sup>2</sup>); ausência de sistema de ventilação; piso não impermeabilizado em concreto; pilares e arcos metálicos; cobertura e partes laterais, posterior e frontal eram fixas à estrutura metálica e em lona plástica transparente. A parte frontal da estufa apresentava porta em estrutura metálica e lona plástica.

Para a amostragem da temperatura do ar no interior da estufa, foi instalado dispositivo *datalogger*, entretanto, devido a problemas na memória do equipamento, não foi possível utilizar os dados. Assim, a temperatura média do ar no interior da estufa foi estimada com base na temperatura média do ar externo à estufa referente ao período de tratamento de cada lote, obtida a partir dos dados horários aferidos por estação meteorológica convencional e disponíveis no Banco de Dados Meteorológico para Ensino e Pesquisa, do Instituto Nacional de Meteorologia, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BDMEP/INMET/MAPA). Assim, a temperatura média do ar resultante da análise do banco de dados foi utilizada em modelo de regressão (Equação 1), para estimar a temperatura média (°C) do ar no interior da estufa, conforme propostos por Dias (2012) em experimento prévio de secagem de lodo em estufa agrícola.

$$T_{\text{média na estufa}} = 0,858 (T_{\text{média do ar}}) + 11,931 \quad (1)$$

Lote (L) de lodo de esgoto correspondeu a cada lodo excedente descartado do reator aproximadamente a cada 30 dias, desaguado no leito de secagem e tratado em estufa agrícola. Para cada lote de lodo de esgoto, foi formada uma leira com altura máxima de 40 cm, a qual foi submetida à secagem no interior da estufa com revolvimento manual do conteúdo uma vez por semana. Após o revolvimento dela, realizava-se a amostragem do lodo, coletando-se amostras simples de diferentes locais e profundidades, totalizando em torno de 2.000 g. Essa amostra era submetida ao procedimento de quebra dos torrões, homogeneizada, colocada em saco plástico (700 g), acondicionada sob refrigeração e encaminhada para análise no Setor de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Pública do Departamento de Veterinária da UFV (SMVPSP/DVT/UFV). As amostras coletadas foram analisadas quanto ao pH, à umidade, ST, coliformes totais (CT), *Escherichia coli* (EC), vírus entéricos cultiváveis e colifagos somáticos até que a leira de lodo atingisse umidade menor que 10%.

Conforme o Quadro 1, nove lotes de lodo de esgoto (L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7, L8 e L9) foram higienizados entre fevereiro de 2015 e novembro de 2015 (10 meses); eles permaneceram na estufa por, no mínimo, oito semanas (L1 e L8), chegando até 19 semanas (L4), com uma média de 13 semanas. Considerando as datas de início e fim do tratamento e as estações climáticas do ano, L2, L3 e L4 foram tratados no outono e no inverno, enquanto os demais lotes (L1, L5, L6, L7, L8 e L9) foram submetidos à secagem em períodos que, na maior parte, abrangeram as estações quentes do ano, primavera e verão. De modo geral, as temperaturas médias do ar dentro da estufa nos períodos de tratamento de cada lote não foram discrepantes, pois variaram de 28,8 a 33,5°C (Quadro 1). Os lotes 2, 3 e 4 foram tratados em temperatura média próxima de 30°C, e os demais lotes (L1, L5, L6, L7, L8 e L9) foram submetidos à secagem em temperaturas médias pouco superiores a 30°C.

**Quadro 1** - Tempo de tratamento e temperaturas do ar externas e internas à estufa agrícola segundo o lote de lodo de esgoto tratado por secagem térmica em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).

	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	L8	L9
Tempo de tratamento (dias)									
Início do tratamento	19/02	16/03	13/04	18/05	02/07	03/08	25/08	28/09	22/10
Fim do tratamento	27/04	13/07	13/07	28/09	10/11	23/11	23/11	23/11	16/11
Tempo (dias) de tratamento do lodo no interior da estufa	61	119	90	133	131	112	90	56	25
Temperatura (°C)									
Temperatura média do ar fora da estufa*	22,9	20,5	19,7	20,0	21,9	23,0	23,9	24,9	25,1
Temperatura média estimada do ar no interior da estufa**	31,6	29,5	28,8	29,1	30,7	31,7	32,4	33,3	33,5

\*Dados obtidos no INMET (2016).

\*\*Temperaturas médias estimadas com a Equação 1.

## Ensaio de contaminação artificial com vírus de referência de lotes de lodo de esgoto

Para verificar a relação entre o decaimento de colifagos somáticos e vírus entéricos em lodo de esgoto e a resistência desses vírus ao tratamento térmico, foram realizados experimento de contaminação artificial de lodo com colifago somático Phi X174 (ATCC®13706-B1™) e cepa vacinal de Poliovírus tipo 1 (Poliovírus 1 Sabin) e avaliação do decaimento sob efeito da temperatura variável dentro da estufa agrícola e as temperaturas controladas 30 e 60°C — a temperatura 30°C foi considerada controle. O ensaio foi realizado em outubro de 2015.

No experimento, foram utilizadas amostras de quatro lotes de lodo de esgoto que estavam em tratamento na estufa com as respectivas umidades: L5 (U=3,72%), L6 (U=9,65%), L7 (U=15,77%) e L8 (U=3,50%). Para cada um desses lotes, três amostras de cinco litros foram retiradas, acondicionadas em potes plásticos e submetidas à descontaminação por calor úmido a 121°C por 30 minutos. Posteriormente, à temperatura ambiente, sob homogeneização, essas amostras foram contaminadas com volumes de suspensões dos vírus que resultassem na concentração final entre  $10^5$ – $10^7$  *tissue culture infective dose* (TCID)<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup> para Poliovírus 1 Sabin e  $10^5$ – $10^7$  UFP.mL<sup>-1</sup> para colifago somático Phi X174. Seis amostras adicionais foram coletadas do L8, sendo que três permaneceram naturalmente contaminadas funcionando como controle positivo (testemunha) e três foram descontaminadas (calor úmido a 121°C por 30 minutos) e não inoculadas, conformando o controle negativo.

Após o preparo das amostras, estas foram colocadas no interior da estufa agrícola e de duas estufas do tipo *biochemical oxygen demand* (BOD) em laboratório, cujas temperaturas foram ajustadas para 30 e 60°C. Em cada contexto de temperatura, foi monitorada uma amostra artificialmente contaminada de cada lote, uma controle positivo e uma controle negativo. O decaimento da carga (quantidade) de vírus nas amostras de lodo de esgoto foi monitorado por 21 dias, com amostragem a cada 3–4 dias.

## Análises laboratoriais

Os teores de umidade foram determinados conforme Andreoli (1999). A determinação dos teores de ST foi realizada conforme método 2.540G (APHA; AWWA; WPCF, 1998). O pH foi aferido segundo método 9.045D (USEPA, 2004). A pesquisa de CT e *E. coli* foi realizada pelo método cromogênico-fluorogênico, usando cartelas Quanty-Tray® 2000 e meio de cultura Colillert® (ENVIRONMENT AGENCY, 2003). Para recuperação de vírus entéricos e colifagos somáticos das amostras de lodo, foi utilizada técnica descrita em EPA/600/R-07/118 (USEPA, 2007). A quantificação de colifagos somáticos foi realizada pelo ensaio de plaqueamento em ágar duplo (USEPA, 2001) e o resultado, expresso em UFP.g<sup>-1</sup>.ST<sup>-1</sup>. A carga de vírus entéricos foi obtida pelo Método da Diluição Limitante (que informa os resultados em TCID<sub>50</sub>), usando células RD (rabdomiossarcoma embrionário humano – células utilizadas para isolamento

de vírus entéricos), com passagens 171 a 185 ( $1-2 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>) e foi calculado pelo método de Spearman-Kärber (HIERHOLZER & KILLINGTON, 1996). A carga de vírus (expressa em TCID<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>) foi transformada em UFP através da multiplicação pelo fator de 0,69 e expressa por UFP.g<sup>-1</sup> de ST. O controle negativo consistiu em amostra de lodo de esgoto autoclavada a 121°C/30 minutos, já o controle de recuperação era preparado da mesma forma que o negativo e adicionava-se suspensão de Poliovírus 1 Sabin equivalente a 400–900 UFP.mL<sup>-1</sup>.

## Coeficiente de decaimento bacteriano e análise dos dados

O decaimento dos indicadores bacterianos durante o tratamento foi determinado por meio do cálculo do coeficiente de decaimento ( $Kb_T$ ) para temperatura de operação (T) (°C) a partir da geração de modelos de regressão linear (X;Y=0;0) das populações remanescentes de cada lote de lodo analisado, conforme Dias (2012). A partir dos coeficientes para as temperaturas de operação de cada lote, foram calculados os coeficientes de decaimento para a temperatura de 20°C ( $Kb_{20}$ ) (d<sup>-1</sup>), utilizando a Equação 2, em que se utilizou coeficiente de temperatura ( $\theta$ ) adimensional para o decaimento de bactérias em corpos d'água igual a 1,07, devido à ausência de um coeficiente específico para lodos de esgoto (VON SPERLING, 2005).

$$Kb_T = Kb_{20} \cdot \theta^{(T-20)} \quad (2)$$

Os resultados de todos os parâmetros analisados foram registrados conforme o lote de lodo em análise. Para os dados de pH, foram construídos diagramas *boxplot*. Análise de regressão linear foi realizada para umidade e população dos indicadores bacterianos segundo o tempo (dias) de secagem do lodo na estufa. O decaimento dos vírus no ensaio de inoculação foi analisado em gráficos de dispersão entre as densidades detectadas e o tempo de monitoramento.

## RESULTADOS

Na Figura 1, pode-se observar que a maioria dos lotes foi transferida para estufa agrícola com teor de umidade em torno de 60–80% (exceto L8). Houve gradativa perda de umidade do lodo ao longo do tratamento, com coeficientes de determinação ( $R^2$ ) que variaram de 0,823 (L2) a 0,976 (L3). Após cerca de 60 dias de secagem na estufa, todos os lotes já apresentavam teor de umidade abaixo dos 10%, exceto L3 e L4, que apresentavam entre 10–25%. Logo, ao fim do tratamento, a maioria dos lotes apresentou teor de umidade entre 2–4%.

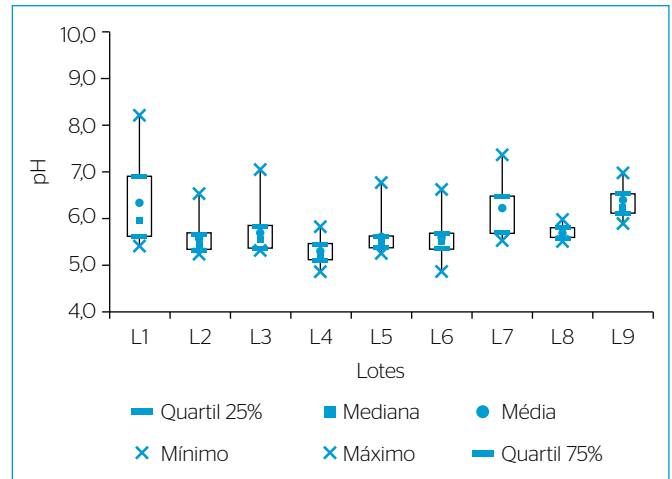
Paralela à redução de umidade, ocorreu redução do volume da leira e da concentração de sólidos. Em todos os lotes, os teores de ST permaneceram em progressiva elevação conforme aumentava o tempo de secagem, até atingirem valores próximos de 90%, alcançados entre

40–50 dias nos lotes 1 e 7, entre 55–65 dias nos lotes 5 e 6 e entre 85–100 dias nos lotes 2, 3 e 4.

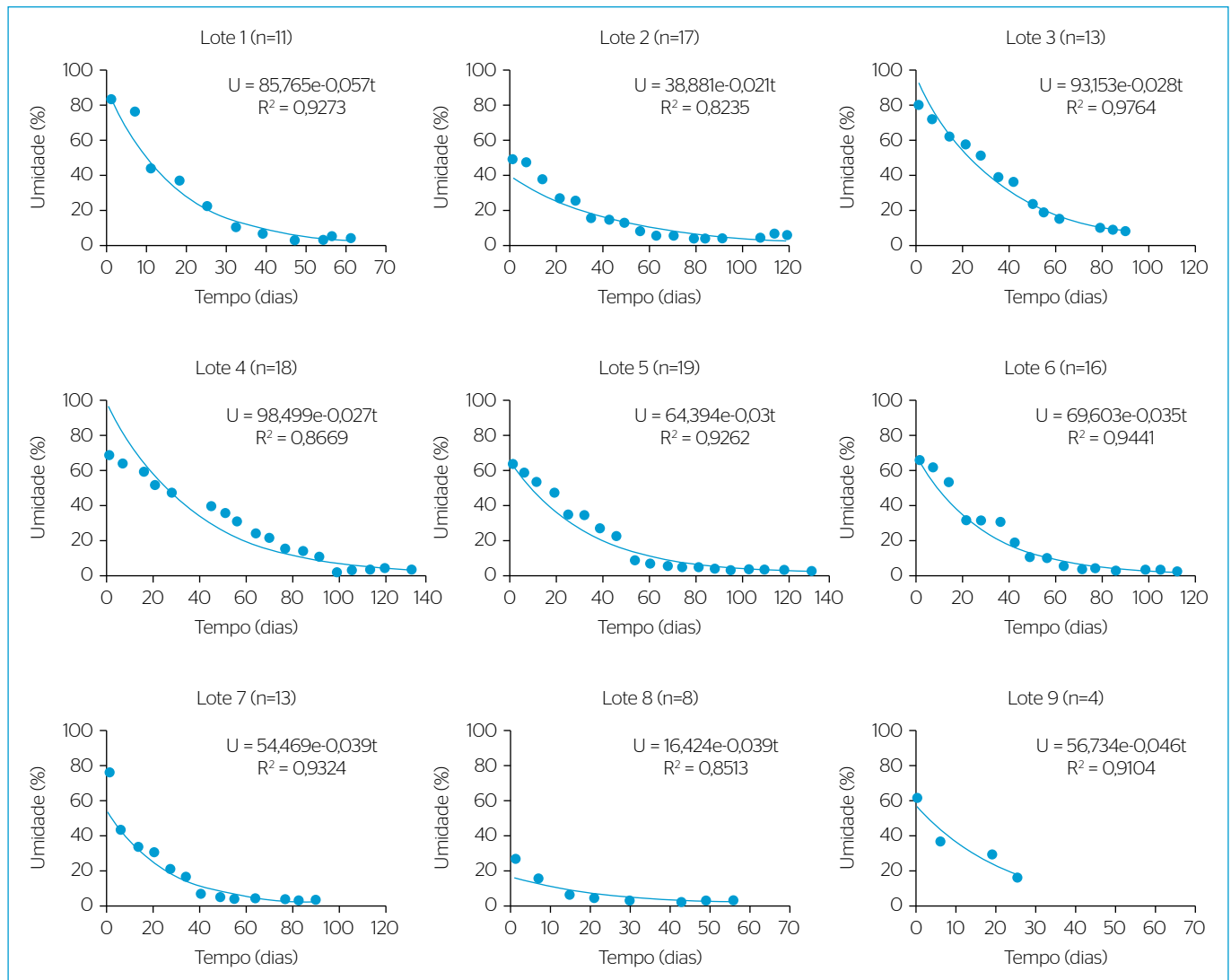
Quanto aos valores do pH, L1 e L7 foram os que apresentaram maiores variações (5,0–7,5). Os demais lotes tiveram menores variações, estabilizando-se entre 5,0–6,0 (Figura 2).

Sobre a qualidade bacteriológica do lodo durante a higienização em estufa de secagem, altas concentrações de CT ( $10^6$  e  $10^8$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST) e de *E. coli* ( $10^5$  e  $10^7$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST) foram verificadas em todos os lotes, exceto em L1 e L2, que apresentaram problemas nas diluições. De acordo com a Figura 3, os lotes 3, 4 e 6 foram transportados para estufa apresentando níveis bacterianos compatíveis com lodo classe B ( $<1 \times 10^6$  NMP *E. coli*.g<sup>-1</sup> de ST), enquanto L5, L7 e L8 levaram até 20 dias para alcançar essa qualidade.

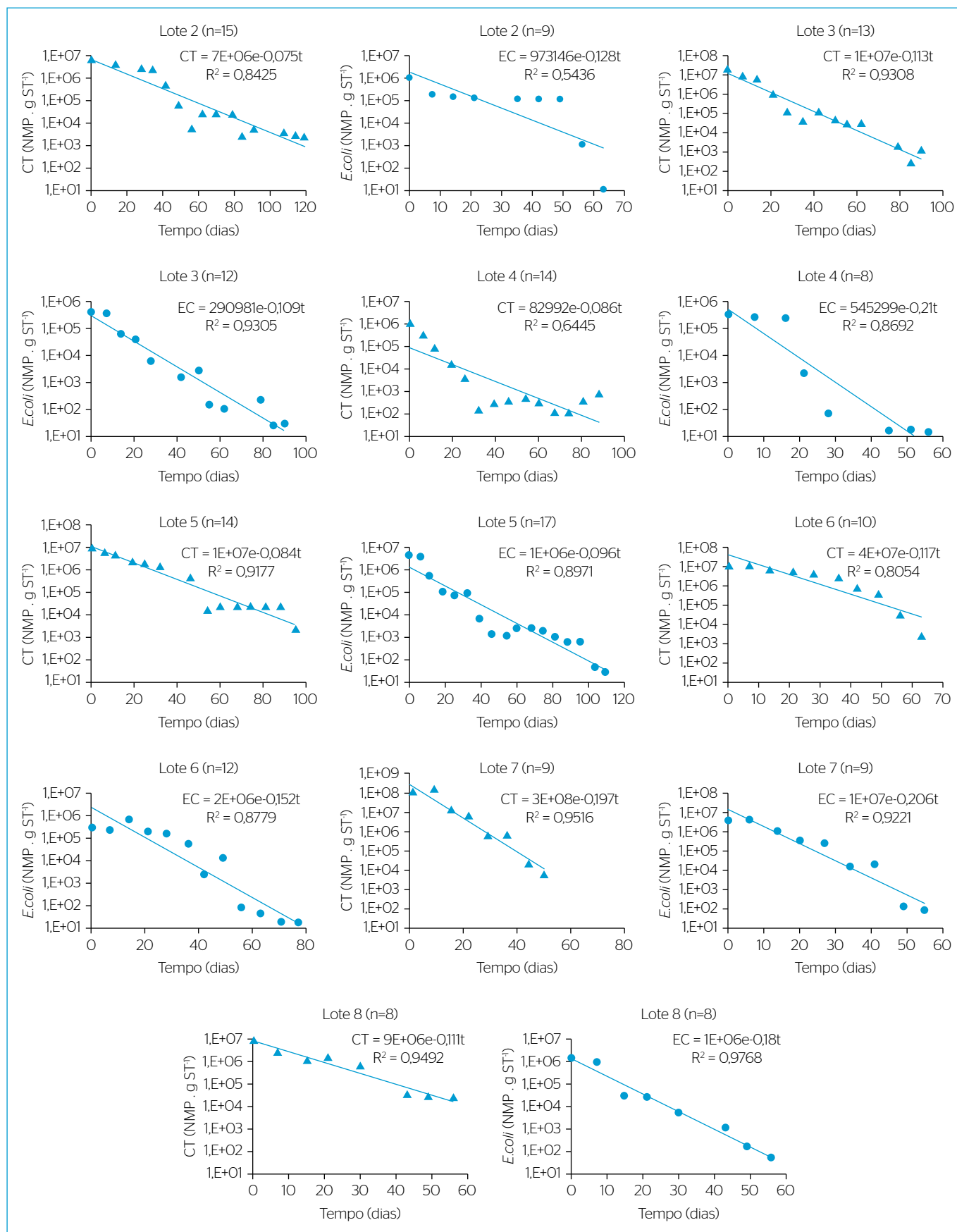
O tempo de tratamento necessário para que os lotes passassem do tipo classe B para classe A ( $<1 \times 10^3$  NMP *E. coli*.g<sup>-1</sup> de ST) foi, no



**Figura 2** - Distribuição dos valores de pH para os lotes de lodo de esgoto tratados por secagem térmica em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).



**Figura 1** - Comportamento do teor de umidade (%) em lotes de lodo de esgoto (L1 a L9) em função do tempo (dias) de tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).



**Figura 3 -** Decaimento da concentração de coliformes totais e *E. coli* nos lotes de lodo de esgoto (L2 a L8) durante o tempo de secagem na estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).

mínimo, 28 dias (L4), no máximo, 88 dias (L5) e, em média, 50–60 dias. L3, L5, L6 e L8 tiveram redução de 2-3  $\log_{10}$  para *E. coli* em 40–60 dias. Para L9, as densidades de *E. coli* ainda eram superiores a  $10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST no encerramento do monitoramento.

De modo geral, observou-se, entre os lotes, mesma tendência de variação dos coeficientes  $Kb_T$  e  $Kb_{20}$  e valores não discrepantes. Os coeficientes de decaimento de *E. coli* à temperatura de operação ( $Kb_T$ ) variaram de 0,113 d<sup>-1</sup> (L3) a 0,197 d<sup>-1</sup> (L4) e, quando estimados para temperatura de 20°C ( $Kb_{20}$ ), apresentaram valores menores que 0,100.d<sup>-1</sup> (0,062 a 0,075), exceto o coeficiente para L4 (0,106).

Com relação ao monitoramento de vírus nas amostras de lodo de esgoto durante o tratamento térmico na estufa, 32 amostras controle (16 positivas e 16 negativas) foram analisadas, de modo que os percentuais de recuperação variaram de 7,2 a 53,4% para Poliovírus 1 Sabin e de 8,4 a 55,6% para colifago Phi X174. Todas as amostras controle negativo não apresentaram efeitos citotóxicos.

Contudo, nas amostras de lodo coletadas ao longo do tratamento, as detecções de colifagos somáticos e vírus entéricos foram baixas e eventuais, não permitindo inferir sobre níveis de contaminação e grau de decaimento. Inicialmente, para vírus entéricos, todas as amostras (n=119) foram negativas, todavia, esse resultado foi confirmado através de inoculação de 100  $\mu$ L de cada volume de amostra processada em monocamada de células RD (25cm<sup>2</sup>), que foram monitoradas por 72 horas. Observou-se monocamada íntegra (sem presença de efeito citopático) para todas as amostras, exceto para três, que apresentaram, em 24 horas, 90–100% de destruição do tapete celular. Essas amostras apresentaram, no sobrenadante da inoculação, as seguintes cargas virais em TCID<sub>50</sub>.mL<sup>-1</sup>: 1,77x10<sup>3</sup> (L6), 7,49x10<sup>3</sup> (L6) e 2,37x10<sup>3</sup> (L7).

Os lotes L1, L3, L6, L7, L8 e L9 apresentaram amostras positivas para colifagos somáticos, totalizando 18 (15,1%) amostras das 119 analisadas. Na Tabela 1, apresenta-se a variação das cargas de vírus e da umidade nas amostras positivas conforme o lote de lodo:

**Tabela 1** - Amostras positivas para colifagos somáticos segundo o lote de lodo e a umidade durante tratamento por secagem em estufa agrícola, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).

Lote de lodo de esgoto (amostras analisadas)	Número de amostras positivas (%)	Colifagos somáticos (UFP.g <sup>-1</sup> de ST)*	Umidade (%)
L1 (11)	5 (45,5)	5,6x10 <sup>4</sup> –9,1x10 <sup>2</sup>	83,15–22,64
L3 (13)	2 (15,4)	2,1–6,7x10 <sup>3</sup>	79,84–71,11
L6 (16)	1 (6,3)	1,1x10 <sup>4</sup>	4,69
L7 (13)	4 (30,8)	1,5x10 <sup>5</sup> –8,0x10 <sup>3</sup>	7,33–2,90
L8 (8)	5 (62,5)	1,9x10 <sup>5</sup> –2,2x10 <sup>4</sup>	13,8–2,66
L9 (4)	1(25,0)	1,0x10 <sup>5</sup>	16,24
Total	18/119 (15,0)	-	-

\*Unidade formadora de placa/grama de sólidos total.

- em L1, as cinco amostras positivas se referem às quatro primeiras semanas do tratamento, quando colifagos somáticos foram detectados em concentrações que variaram de 5,6x10<sup>4</sup> para 9,1x10<sup>2</sup> a UFP.g<sup>-1</sup> de ST em amostras com umidade de 83,15 a 22,64%;
- em L7, as amostras já possuíam umidade inferior a 10% e apresentaram concentração de colifagos entre 1,53x10<sup>5</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST (41º dia de tratamento) e 8,0x10<sup>3</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST (70º dia de tratamento);
- em L8, do 7º ao 49º dia, a densidade de colifagos variou de 1,9x10<sup>5</sup> a 2,2x10<sup>4</sup> UFP.g<sup>-1</sup> de ST e a umidade caiu de 13,8 para 2,66%.

A Figura 4 mostra perfil de decaimento semelhante de Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174 a 30°C e à temperatura da estufa agrícola no ensaio de inoculação dos vírus em lodo. Poliovírus 1 Sabin foi detectado por até sete dias a 30°C (L5, L6, L7 e L8) e na estufa agrícola (L5, L7 e L8); além disso, foi suscetível à temperatura de 60°C, quando foi recuperado em menor número de lotes de lodo, somente em L4 (quatro dias pós-inoculação) e L8 (sete dias pós-inoculação). Quanto ao colifago somático Phi X174, este se apresentou mais resistente ao ser detectado por até nove dias tanto nas temperaturas controladas, 30°C (L5 e L7) e 60°C (L5 e L8), quanto nas variáveis da estufa (L5 e L6).

## DISCUSSÃO

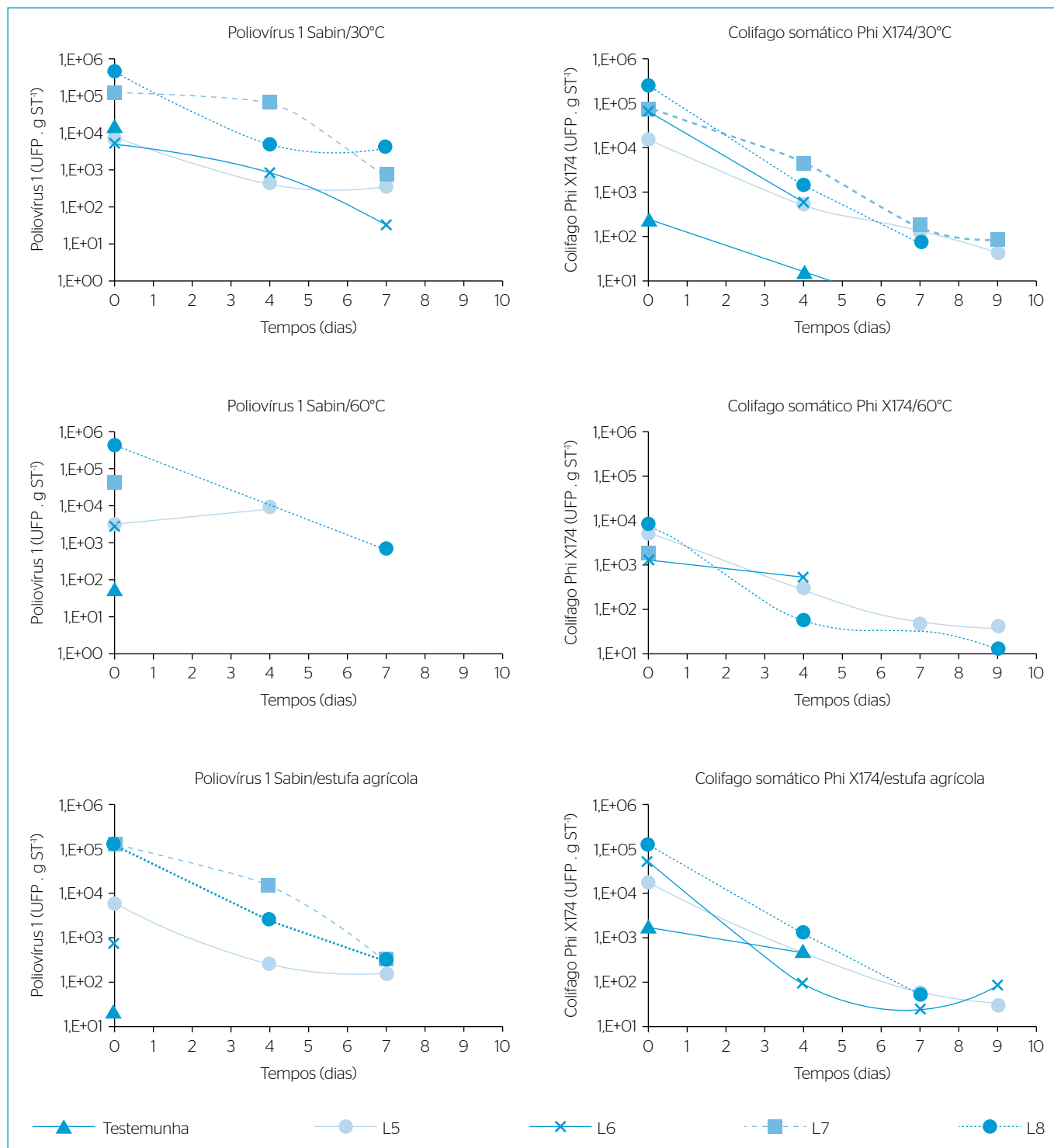
A estratégia de tratamento adotada no estudo por meio da manufatura de lodo previamente desaguado em estufa agrícola, disposto diretamente no solo na forma de leira, revolido manualmente a cada sete dias, proporcionou a obtenção de um produto granulado, extremamente seco e de volume reduzido, corroborando o que foi reportado em estudos no Brasil (COMPARINI & ALÉM SOBRINHO, 2002; LIMA, 2010; DIAS, 2012) e em diferentes países (BUX *et al.*, 2002; SALIHOGLU; PINARLI; SALIHOGLU, 2007; SHANAHAN *et al.*, 2010; MATHIOUDAKIS *et al.*, 2009), em que a exposição à radiação solar incidente sobre o filme plástico da estufa eleva a temperatura interna e proporciona a perda progressiva da umidade, na mesma medida em que concentra os sólidos presentes e reduz o volume da leira de lodo.

As temperaturas médias estimadas (28,8–33,5°C) para o interior da estufa no período de secagem de cada lote foram semelhantes às reportadas (25,3–30,2°C) em outros estudos conduzidos no país (COMPARINI & ALÉM SOBRINHO, 2002; LIMA, 2010; DIAS, 2012). As pesquisas destacam que a variação da temperatura diária dentro da estufa apresenta um padrão diário de variação com temperatura mínima de 10–20°C no período da noite e início da manhã, chegando a atingir máximas entre o meio-dia e início da tarde em torno de 50–60°C, seguida de declínio no fim da tarde e início da noite (LIMA, 2010; DIAS, 2012).

Na secagem do lodo de esgoto em estufa agrícola, o tempo de tratamento necessário para alcançar teor de umidade de 10% foi em torno de 60 dias. Também em Viçosa (MG), Dias (2012) constatou que, em

45 dias de tratamento, a umidade foi reduzida para 20% em todos os sete lotes de lodo tratados. Assim, depreende-se que, nessa cidade, 50 dias de secagem em estufa parecem ser suficientes para reduzir teores de umidade iniciais de 60–80% para 20% de lodos de esgoto. Já Comparini e Além Sobrinho (2002), em Franca (SP), reportaram

média de 70 dias de tratamento para se alcançarem teores de umidade menores que 10%, o que também foi constatado por Lima (2010) em experimentos sucedidos em Vila Velha (ES). O expressivo declínio da umidade até teor de 20%, com subsequente tendência à estabilidade, também foi reportado por Comparini e Além Sobrinho (2002).



**Figura 4** - Decaimento de Poliovirus 1 Sabin e colifago somático Phi X174 em amostras de lodo de esgoto submetidas à variação de temperatura da estufa agrícola e às temperaturas controladas 30 e 60°C, fevereiro a novembro de 2015, Viçosa (MG).



Esse comportamento é comum ao lodo de esgoto durante processos de tratamento térmico, quando significativa redução da umidade ocorre em função da remoção das águas intersticial e de superfície constituintes da massa de lodo (BENNAMOUN, 2012).

No Brasil, de forma geral, os estudos realizaram de forma semelhante a secagem de lodo de esgoto em estufa agrícola com a formação de leiras de 10 a 40 cm altura, revolvidas de 1 a 3 vezes por semana. Já em outros países, as estufas agrícolas utilizadas nos estudos são equipadas com diferentes sistemas automatizados de ventilação e de revolvimento do lodo, permitindo adoção de diversos protocolos de tratamento, os quais acabam por determinar tempos variados de obtenção de um produto seco (BUX *et al.*, 2002; SALIHOGLU; PINARLI; SALIHOGLU, 2007; SHANAHAN *et al.*, 2010; MATHIOUDAKIS *et al.*, 2009).

A secagem do lodo em estufa com revolvimento manual mostrou ser processo eficiente na higienização do lodo considerando indicadores bacterianos. Observou-se redução nas contagens de *E. coli*, no início do tratamento, que correspondiam ao padrão de qualidade classe B ( $<10^6$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST) para classe A ( $<10^3$  NMP.g<sup>-1</sup> de ST) em 50–60 dias para a maioria dos lotes. Em Viçosa (MG), Dias (2012) reportou que lodo classe A foi obtido para 4 lotes em 45 dias e para outros 3, o tempo foi igual ou superior a 75 dias. Em Franca (SP), Comparini e Além Sobrinho (2002) alcançaram concentração de *E. coli* correspondente ao padrão classe A, em período superior a 60 dias (70–98 dias). Em Vitória (ES), Lima (2010) conseguiu obter lodo classe A em 28 dias quando tratou lodo digerido, adensado e desaguado; na segunda etapa, no tratamento de lodo apenas adensado e desaguado, tempos superiores foram necessários, chegando a 56 dias.

Os resultados negativos para a presença de enterovírus foram diferentes de outros estudos que os identificaram em amostras de lodo oriundas de digestão anaeróbia (GUZMÁN *et al.*, 2007; WONG; ONAN; XAGORARAKI, 2010; VIAU & PECCIA, 2009). Essa ausência, ou ocorrência em níveis não detectáveis, de vírus nas amostras de lodo pode estar associada ao fato de as densidades de vírus em amostras de lodo serem influenciadas pela variação da ocorrência de vírus na população humana, pelas diferentes eficiências de tratamento ou ainda ser atribuída à quantidade da amostra analisada e aos métodos analíticos empregados (ROMDHAMA *et al.*, 2009); além disso, as técnicas usadas, principalmente quando são baseadas em cultivo celular, podem ter as contagens afetadas pela toxicidade das amostras e pela sensibilidade das linhagens celulares aos diversos tipos de vírus (WONG; ONAN; XAGORARAKI, 2010; PRIM *et al.*, 2013).

Até o momento, no Brasil, além da presente pesquisa, somente Lima (2010), em Vila Velha (ES), teve como objetivo pesquisar diferentes tipos de vírus (enterovírus, rotavírus, vírus da hepatite A e adenovírus) em amostras de lodo (n=30) higienizado em estufa agrícola, das quais 11 (36,7%) foram negativas, 19 foram positivas para adenovírus com cargas virais variando de  $<0,3$  a  $2,8$  UFP.g<sup>-1</sup> de ST, duas foram

positivas para vírus da hepatite A por meio de polymerase chain reaction (PCR) e o teste de infectividade com cultura de células HEp-2 foi sugestivo para adenovírus em 12 (40%) amostras. No Estado de São Paulo, Salvador (2011) avaliou amostras de lodo de 6 ETEs, por meio de plaqueamento em cultura de células RD, e verificou 29 (83%) das 35 amostras positivas para vírus totais cultiváveis com cargas virais de até  $12,5$  UFP.g<sup>-1</sup> de ST. Ainda em São Paulo, Sato *et al.* (2009) tiveram 28 (77,8%) amostras positivas de 36 analisadas por plaqueamento em cultura de RD, com concentração média de  $2,23$  UFP.g<sup>-1</sup> de ST.

Durante o tratamento, colifagos somáticos foram detectados em amostras de lodo com elevada (superior a 70%) e reduzida ( $<5\%$ ) umidade, de forma pontual em poucos lotes e em densidades semelhantes às relatadas em amostras de lodo de esgoto digerido anaeróbio (MANDILARA *et al.*, 2006; PEPPER *et al.*, 2010; WONG; ONAN; XAGORARAKI, 2010). Se a concentração da população viral que ocorre naturalmente em amostras de lodo oscila em função de diversos fatores, a execução de experimentos de contaminação artificial com “vírus modelos”, paralela à pesquisa de campo, como foi realizado no presente estudo, torna-se útil na avaliação do comportamento desses organismos sob diferentes contextos de tratamento. Nesse sentido, o ensaio de contaminação de amostras de lodo com Poliovírus 1 e colifago somático Phi X174, submetidas a diferentes temperaturas, confirmou a maior resistência de colifagos somáticos em relação a enterovírus em tratamento térmico com temperatura limite de 60°C; logo, dando suporte à sobrevivência de colifagos somáticos em amostras de lodo durante o tratamento em estufa agrícola, onde a temperatura média foi em torno de 30°C — entretanto, as temperaturas máximas podem chegar a 50–60°C nas horas mais quentes do dia.

Os resultados encontrados apontaram para a resistência de colifagos somáticos de ocorrência natural, os quais têm sido amplamente sugeridos como candidatos a serem indicadores da presença de vírus durante tratamento de lodo. Na literatura, colifagos somáticos são apontados como o grupo de bacteriófagos mais resistente, principalmente em processos de tratamento térmico (MOCÉ-LLIVINA *et al.*, 2003; MANDILARA *et al.*, 2006; GUZMÁN *et al.*, 2007; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2016). Tal fato tem sido associado à capacidade de adsorção dos vírus aos sólidos (LASOBRAS *et al.*, 1999), que pode favorecer uma distribuição irregular dos vírus e dificultar a detecção, conforme Pourcher *et al.* (2007), que relataram problemas de irregularidade na detecção de amostras positivas no experimento em que o lodo era mais seco e havia a presença de torrões. Estudos recentes, que avaliaram a relação entre as densidades de vírus entéricos e colifagos somáticos em amostras de lodo de esgoto em processos de higienização do lodo, sugerem que vírus entéricos infecciosos podem estar ausentes ou em concentrações muito baixas, sendo inferiores aos limites de detecção das técnicas, quando a concentração de colifagos somáticos é menor que  $10^4$  UFP.g<sup>-1</sup> de ST (ASTALS *et al.*, 2012; LEVANTESI *et al.*, 2015; MARTÍN-DÍAZ *et al.*, 2016).

## CONCLUSÕES

A higienização do lodo de esgoto por secagem térmica em estufa agrícola se apresentou como técnica de manejo simples e eficiente, que proporciona a obtenção, em tempo aceitável, de produto granulado, seco e com níveis de contaminação bacteriana estabelecidos

como seguros pela legislação brasileira para uso agrícola. Lacunas sobre a eficiência do tratamento quanto à redução da contaminação por vírus entéricos ainda persistem, entretanto, os resultados obtidos apontam para a persistência de colifagos somáticos durante o tratamento térmico.

## REFERÊNCIAS

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA); AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION (AWWA); WATER POLLUTION CONTROL FEDERATION (WPCF). (1998) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21. ed. Washington, D.C.: APHA. 1496 p.
- ANDREOLI, C.V. (1999) *Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura*. Curitiba: Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR). 98 p.
- ANDREOLI, C.V.; FERREIRA, A.C.; TELES, C.R.; CHERUBINI, C.; BERNET, P.M.; FAVARIN, F.; CASTRO, L.R. (2000) Avaliação da eficiência do uso de estufa plástica, revolvimento de lodo e injeção de calor na secagem e desinfecção de lodo anaeróbico em leito de secagem. *In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL*, 9, 2000, Porto Seguro. *Anais...* Porto Seguro: ABES. p. 1-10.
- ASTALS, S.; VENEGAS, C.; PECES, M.; JOFRE, J.; LUCENA, F.; MATA-ALVAREZ, J. (2012) Balancing hygienization and anaerobic digestion of raw sewage sludge. *Water Research*, v. 46, p. 6218-6227. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.07.035>
- BENAMOUN, L. (2012) Solar drying of wastewater sludge: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 16, p. 1061-1073. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2011.10.005>
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. (2006) Resolução CONAMA nº 375. *Diário Oficial da União*.
- BUX, M.; BAUMANN, R.; QUADT, S.; PINNEKAMP, J.; MÜHLBAUER, W. (2002) Volume reduction and biological stabilization of sludge in small sewage plants by solar drying. *Drying Technology*, v. 20, p. 829-837. <https://doi.org/10.1081/DRT-120003765>
- COMPARINI, J.B.; ALÉM SOBRINHO, P. (2002) Decaimento de patógenos em biossólidos submetidos à secagem em estufa agrícola. *In: CONGRESSO INTERAMERICANO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL*, 28, 2002, Cancun. *Anais...* Cancun: AIDIS. p. 1-8.
- DIAS, E.H.O. (2012) *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.
- ENVIRONMENT AGENCY. (2003) *The Microbiology of Sewage Sludge (2003) - Part 3 - Methods for the isolation and enumeration of Escherichia coli, including verocytotoxigenic Escherichia coli*. UK: Environment Agency. 44 p.
- GUZMÁN, C.; JOFRE, J.; MONTEMAYOR, M.; LUCENA, F. (2007) Occurrence and levels of indicators and selected pathogens in different sludges and biosolid. *Journal of Applied Microbiology*, v. 103, p. 2420-2429. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03487.x>
- HIERHOLZER, J.C.; KILLINGTON, R.A. (1996) Virus isolation and quantitation. *In: MAHY, B.W.J.; KANGRO, H.O. (Orgs.). Virology Methods Manual*. Reino Unido: Academic Press. p. 25-45.
- INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA (INMET). *Banco de Dados Meteorológico para Ensino e Pesquisa*. Disponível em: <[www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep](http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=bdmep/bdmep)>. Acesso em: 14 jun. 2016.
- LASOBRAS, J.; DELLUNDE, J.; JOFRE, J.; LUCENA, F. (1999) Occurrence and levels of phages proposed as surrogate indicators of enteric viruses in different types of sludges. *Journal of Applied Microbiology*, v. 86, p. 723-729. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1999.00722.x>
- LEVANTESI, C.; BEIMFOHR, C.; BLANCH, A.R.; CARDUCCI, A.; GIANICO, A.; LUCENA, F.; TOMEI, M.C.; MININNI, G. (2015) Hygienization performances of innovative sludge treatment solutions to assure safe land spreading. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 10, p. 7237-7247. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3572-6>
- LIMA, M.R.P. (2010) *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. (2012) *Uso agrícola de biossólidos: análise crítica da Resolução CONAMA 375/2006 na perspectiva da metodologia de avaliação de risco microbiológico*. 2012. 180f. Dissertação (Mestrado em Saneamento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- MANDILARA, G.D.; SMETI, E.M.; MAVRIDOU, A.T.; LAMBIRI, M.P.; VATOPOULOS, A.C.; RIGAS, F.P. (2006) Correlation between bacterial indicators and bacteriophages in sewage and sludge. *FEMS Microbiology Letters*, v. 263, p. 119-126. <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. (2016) Somatic coliphages as surrogates for enteroviruses in sludge hygienization treatments. *Water Science & Technology*, v. 73, n. 9, p. 2182-2188. <https://doi.org/10.2166/wst.2016.066>

- MATHIOUDAKIS, V.L.; KAPAGIANNIDIS, A.G.; ATHANASOULIA, E.; DIAMANTIS, V.I.; MELIDIS, P.; AIVASIDIS, A. (2009) Extended Dewatering of Sewage Sludge in Solar Drying Plants. *Desalination*, v. 248, p. 733-739. <https://doi.org/10.1016/j.desal.2009.01.011>
- MOCÉ-LLIVINA, L.; MUNIESA, M.; PIMENTA-VALE, H.; LUCENA, F.; JOFRE, J. (2003) Survival of bacterial Indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, n. 3, p. 1452-1456. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.3.1452-1456.2003>
- PEPPER, I.L.; BROOKS, J.P.; SINCLAIR, R.G.; GURIAN, P.L.; GERBA, C.P. (2010) Pathogens and Indicators in United States Class B Biosolids: National and Historic Distributions. *Journal of Environmental Quality*, v. 39, p. 2185-2190.
- POURCHER, A.N.; FRANÇOISE, P.B.; FERRÉ, V.; AGNIESZKA, G.; STAN, V.; GÉRARD, M. (2007) Survival of faecal indicators and enteroviruses in soil after land-spreading of municipal sewage sludge. *Applied Soil Ecology*, v. 35, p. 473-479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.10.005>
- PRIM, N.; RODRÍGUEZ, G.; MARGALL, N.; DEL CUERPO, M.; TRALLERO, G.; RABELLA, N. (2013) Combining Cell Lines to Optimize Isolation of Human Enterovirus From Clinical Specimens: Report of 25 Years of Experience. *Journal of Medical Virology*, v. 85, p. 116-120. <https://doi.org/10.1002/jmv.23426>
- ROMDHANA, M.H.; LECOMTE, D.; LADEVIE, B.; SABLAYROLLES, C. (2009) Monitoring of pathogenic microorganisms contamination during heat drying process of sewage sludge. *Process Safety and Environmental Protection*, v. 87, p. 377-386. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2009.08.003>
- SALIHOGU, N.K.; PINARLI, V.; SALIHOGU, G. (2007) Solar drying in sludge management in Turkey. *Renewable Energy*, v. 32, p. 1661-1675. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2006.08.001>
- SALVADOR, R.M. (2011) *Detecção e quantificação de Enterovírus em lodo de esgoto proveniente de estações de tratamento de esgoto com potencial uso na agricultura do estado de São Paulo*. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo.
- SATO, M.I.Z.; HACHICH, E.M.; RAZZONOLI, M.T.P.; NARDOCCI, A.C.; LAURETTO, M.S.; MEHNERT, D.U. (2009) *Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico como Instrumento de Tomada de Decisão na Área de Saneamento*. Documento Básico da Rede Prosab Microbiologia para o Saneamento Ambiental. São Paulo: Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. 46 p.
- SCHLINDWEIN, A.D. (2009) *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.
- SHANAHAN, E.F.; ROIKO, A.; TINDALE, N.W.; THOMAS, M.P.; WALPOLE, R.; KURTBÖKE, D.I. (2010) Evaluation of pathogen removal in a solar sludge drying facility using microbial indicators. *Environmental Research and Public Health*, v. 7, p. 565-582. <https://dx.doi.org/10.3390%2Fijerph7020565>
- UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). (2001) *Method 1602 - Male-specific (F+) and Somatic Coliphage in water by Single Agar Layer (SAL) procedure*. EPA 821-R-01-029. Washington, D.C.: USEPA. 38 p.
- \_\_\_\_\_. (2004) *Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods*. 3. ed. Washington, D.C.: USEPA. 910 p.
- \_\_\_\_\_. (2007) *Preliminary comparative study of methods to extract virus from raw and processed sewage sludge*. Washington, D.C.: USEPA. 30 p.
- VIAU, E.; PECCIA, J. (2009) 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01331-08>
- VON SPERLING, M. (2005) *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3. ed. Belo Horizonte: Editora UFMG. 452 p.
- WONG, K.; ONAN, B.M.; XAGORARAKI, I. (2010) 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.02685-09>