



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS - CTC
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

Fernanda Daniela Gonçalves Ferreira

Avaliação da segurança no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais: Contaminação do solo e das plantas.

Florianópolis
2022

Fernanda Daniela Gonçalves Ferreira

Avaliação da segurança no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivo de vegetais: Contaminação do solo e das plantas.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Engenharia Ambiental.
Orientadora: Prof. Maria Elisa Magri, Dra.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra

Ferreira, Fernanda Daniela Gonçalves Avaliação da segurança no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais: Contaminação do solo e das plantas. / Fernanda Daniela Gonçalves Ferreira; orientador, Dra. Maria Elisa Magri, 2022. 121 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Biofertilizante produzido a partir de excretas humanas. 3. Avaliação quantitativa de risco microbiológico. 4. Fitotoxicidade. 5. Contaminação do solo e Internalização de patógenos. I. Magri Maria Elisa. Dra. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Fernanda Daniela Gonçalves Ferreira

Avaliação da segurança no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais: Contaminação do solo e das plantas.

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.(a)

Instituição: UFSC

Prof.(a) Catiane Pelissari, Dr.(a)

Instituição: UNOESC

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental-PPGEA.

Prof.(a) Alexandra Rodrigues Finotti, Dr.(a)

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) Maria Elisa Magri, Dr.(a)

Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus avós, Renato Gonçalves Ferreira e Aparecida Caetano Gonçalves (In memoriam), meus primeiros exemplos de luta e de amor pela Terra.

Com todo carinho, para vocês.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram a vida e aos meus avós que me deram sonhos.

A todos os professores que deixaram sua contribuição de conhecimento em mim, desde a base da educação, com as professoras Josilaine, Eliane, Cleide e Silvia, que me alfabetizaram e me concederam o prazer de aprender a ser também professora. Já postulava Paulo Freire que a educação tem a função de libertar, e que professores possuem fundamental importância com este compromisso, o de ensinar para a liberdade. Liberdade de sonhar e de superar obstáculos e imposições para alcançar feitos grandiosos. Em meu caminho, todo trilhado em escolas públicas, fui presenteada com professores comprometidos com a pedagogia da libertação, da autonomia, da esperança. Professores que verdadeiramente acenderam em mim a vontade de trilhar este caminho. Já na universidade privada, na qual fui bolsista, encontrei professores que me fizeram acreditar que todos os sonhos são passíveis de realização. Dentre eles, Ana, Letycia, Thiago e Rômulo.

Esta etapa também conta com a contribuição de muitos, em especial, minha orientadora, a professora Dra. Maria Elisa Magri, que me concedeu a oportunidade de fazer parte do RReSSa e de aprender tantas coisas. Obrigada pelo voto de confiança em meu trabalho.

À professora Dra. Gislaine Fongaro e ao LVA pelo recebimento e análise de *HAdV-2* nas amostras de planta e solo durante os dois experimentos.

À Cacea pela ajuda e revisão dos cálculos de adubação e irrigação.

À Priscila Carlon, que muito me ensinou sobre microbiologia e que me acolheu tão bem no laboratório durante a pandemia.

Aos meus colegas de laboratório que dividiram comigo muitas horas de conversa, muito trabalho, além de muitas vidrarias para lavar e meios para autoclavar. Lucas, Vitor, Flora, Viviane, Rafael e Amanda, muito obrigada pela ajuda com a montagem dos experimentos, análises, pias quebradas e pelos cafés com bolo na salinha do RReSSa.

Ao Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA), em especial à Aline, por toda atenção disponibilizada, pelo empréstimo da chave e equipamentos para que realização do experimento final fosse possível.

Às gurias do LARA, Ana e Amanda, que me emprestaram por diversas vezes a balança, saindo do 3º andar para abrir e fechar o laboratório para que eu pudesse pesar as amostras.

Ao André, meu grande parceiro de vida e maior incentivador dos meus sonhos. E aos meus poucos e bons, Diego e Mayara por todo apoio e incentivo.

À Isadora, pela ajuda a enxergar sempre o melhor lado de todas as situações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental e à Universidade Federal de Santa Catarina por toda estrutura física, intelectual que amparam esta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos necessários ao desenvolvimento desta pesquisa e pela concessão da bolsa de mestrado que me permitiu dedicação integral à pesquisa.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino. Esses que se encontram um no corpo do outro. Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando. Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago. Pesquiso para constatar, constatando, intervenho, intervindo educo e me educo. Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e comunicar ou anunciar a novidade.”

Paulo Freire in *Pedagogia da autonomia*.

RESUMO

O aproveitamento de resíduos de sistemas de saneamento, em particular das excretas humanas, tem como premissa a preservação dos recursos hídricos e a manutenção da fertilidade dos solos agricultáveis. Entretanto, devido a carga patogênica presente nas fezes humanas, o uso deste recurso pode oferecer riscos de contaminação aos agricultores e consumidores, tornando seu uso limitado. Neste sentido, este trabalho teve por objetivo avaliar o comportamento de microrganismos presentes em fezes humanas co-compostadas em cultivos de alface e o risco microbiológico na fertilização manejo e consumo destas hortaliças. O estudo analisou o comportamento dos micro-organismos: *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Adenovírus humano tipo 2 (HAdV-2)* no solo e na parte interna do tecido vegetal, durante o período vegetativo da planta e após colheita. Os resultados do cultivo em vasos indicaram que quanto maior a concentração de *E. coli* no biofertilizante, mais rápido é o seu decaimento no solo. A estimativa de inativação (T90) foi de 13,74, 11 e 08,63 dias para fezes contaminadas em concentrações de 6,58, 7,31 e 8,01 Log₁₀.UFC.g⁻¹, respectivamente. A bactéria *E. coli* foi encontrada nas folhas em concentrações maiores que nas raízes para as duas concentrações mais altas durante as 3 primeiras semanas do experimento. O *HAdV-2*, foi encontrado nas raízes em concentração constante (2-3 Log₁₀.UFP.g⁻¹) durante as 5 semanas do cultivo mesmo em concentrações menores em relação à *E. coli* (5 Log₁₀.UFP.g⁻¹). O resultado do plantio em lisímetros indicou que o decaimento de *E. coli* e *Salmonella* no solo sofrem influência quanto à presença de raízes no sistema, apresentando decaimento mais rápido em sistemas com plantas, com k (dia⁻¹) de -0,0244 para *E. coli* e -0,0331 para *Salmonella* para sistema sem a presença de raízes e k de -0,0728 para *E. coli* e -0,07651 para *Salmonella* no sistema com raízes. O T90 foi de 16,46 dias para a *Salmonella* para o sistema com plantas e 38,39 dias para o sistema sem plantas. Para *E. coli*, este valor foi de 13,24 dias e 40,85 dias, respectivamente. Os riscos anuais de infecção envolvidos na fertilização variaram entre 23,22% e 53,31% para *E. coli* e de 44 a 57 % para *Salmonella*. Para o *HAdV-2*, a probabilidade de infecção anual no cenário de fertilização foi de 100%. Para os cenários de manejo do sistema solo-planta o risco anual para *E. coli* variou entre 0,00000000009% e 0,00000005%. O risco para *Salmonella* variou de 0,0000027 a 0,00000013%. Para o *HAdV-2* o risco observado foi mais alto e variou entre 3,19% e 94,83%. Para o cenário de ingestão das hortaliças, o risco anual para *E. coli* foi estimado entre 0,000000006% e 0%. O risco anual para *Salmonella* foi de 0,000000010% e para *HAdV-2* de 0,0077% para todas as contaminações testadas. As fezes co-compostadas apresentaram fitotoxicidade moderada para as sementes de alface na concentração de 10% com IG de 66,3% e alta fitotoxicidade para as concentrações de 25% com IG de 10% e 50% com IG de 0%.

Palavras-chave: Biofertilizantes. Excretas humanas. Contaminação das plantas. Internalização de patógenos. Avaliação quantitativa de risco microbiológico. Fitotoxicidade.

ABSTRACT

The use of waste from sanitation systems, particularly human excreta, is premised on preserving water resources and supporting soil fertility. However, because of the pathogenic load present in human excreta, this resource can offer contamination risks to farmers and consumers, limiting its use. In this sense, this work aimed to evaluate the microbiological behavior of co-composted feces in lettuce crops, the risk of fertilization, planting, management, and consumption of lettuce, and the phytotoxicity of bio-fertilizer for lettuce seeds. The study set out to analyze the behavior of the microorganisms: *Escherichia coli*, *Salmonella*, and human Adenovirus (HAdV) in the soil and the internal part of the plant tissue during the vegetative period and after harvest. The results of the pot culture showed that the higher the inoculated concentration, the faster the decay in the soil. With decay coefficient k of -0.07279, -0.09092, and -0.115 for inocula with 6.58, 7.31 and 8.01 $\text{Log}_{10}.\text{CFU}.\text{g}^{-1}$, respectively. The estimated inactivation (T_{90}) was 13.74, 11, and 08.63 days for 6.58, 7.31, and 8.01 $\text{Log}_{10}.\text{CFU}.\text{g}^{-1}$, respectively. *E. coli* was found on leaves at higher concentrations than in the roots for the two highest concentrations during the first three weeks of the experiment. *HAdV-2* was found in the roots at a constant concentration (2-3logs) during five weeks of cultivation, even at lower concentrations (5 $\text{Log}_{10}.\text{UFP}.\text{g}^{-1}$). Results from lysimeter planting showed that roots influence the decay of *E. coli* and *Salmonella* in soil, showing k -0.0244 for *E. coli* and k -0.0331 for *Salmonella* in a system without roots. In the soil-plant system, *E. coli* showed k -0.0728 and -0.07651 for *Salmonella*. The T_{90} was 16.46 days for *Salmonella* for the system with plants and 38.39 days without plants. For *E. coli*, this value was 13.24 days and 40.85 days, respectively. The annual risks involved in fertilization ranged from 23.22% to 53.31% for *E. coli*, and 44 to 57 % for *Salmonella*. The annual probability of *HAdV-2* infection in the fertilization scenario was 100%. For the soil-plant system management scenarios, the yearly risk for *E. coli* ranged from 0.000000000009% to 0.00000005%, and for the *Salmonella* 0,0000027 to 0,00000013%. For *HAdV-2*, this value is higher and ranges from 3.19% to 94.83%. In the vegetable ingestion scenario, *E. coli* annual risk was estimated between 0.00000000006% and 0%, 0,000000010% for *Salmonella*, and 0.0077% for *HAdV-2*. Co-composted feces showed moderate phytotoxicity to lettuce seeds at the 10% concentration with GI of 66.3% and high phytotoxicity for the concentrations of 25% with GI of 10% and 50% with GI of 0%.

Keywords: Biofertilizers. Human excreta. Contamination of plants. Internalization of pathogens. Quantitative microbiological risk assessment. Phytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fluxo de nutrientes do sistema de saneamento ecológico aplicado na pesquisa.	20
Figura 2: Banheiros secos separadores em áreas rurais	22
Figura 3: Banheiros secos separadores em áreas urbanas	22
Figura 4: Estrutura exemplificada de um banheiro seco separador.....	23
Figura 5: Figura esquemática das etapas da Avaliação quantitativa de risco microbiológico QMRA.....	36
Figura 6: Fluxograma de distribuição de atividade no tempo aplicado à pesquisa....	44
Figura 7: Banheiro seco sem segregação de urina, Hotel SESC, Cacupé, Florianópolis-SC.	45
Figura 8: a) Leira de compostagem de resíduos orgânicos e fezes humanas. b) Bombonas de armazenamento de fezes para co-compostagem com resíduos orgânicos, Hotel SESC – Cacupé, Florianópolis.	46
Figura 9: Casa de vegetação do Departamento de Imunologia e Parasitologia – MIP	51
Figura 10: Layout ensaio de definição da relação entre o processo de internalização e concentração.	52
Figura 11: Local de instalação dos lisímetros.	54
Figura 12: Esquema de drenagem lisímetros.	55
Figura 13: Esquema de irrigação lisímetros	56
Figura 14: Vista superior lisímetros CETRE	57
Figura 15: Layout experimental e amostral do 2º experimento	58
Figura 16: Índice de germinação fezes co-compostadas.	66
Figura 17: Média de temperatura na casa de vegetação do MIP durante o primeiro cultivo.	68
Figura 18: Média dos valores de pH para o solo dos vasos do cultivo na casa de vegetação do MIP	69
Figura 19: Gráfico tipo blox pot com os valores mínimos e máximo das médias (barras) e desvio padrão (caixas) do pH no solo das concentrações C1, C2 e C3.	70
Figura 20: Média dos valores de umidade do solo nos vasos do cultivo na casa de vegetação do MIP	71

Figura 21: Gráfico tipo blox-plot com valores mínimos e máximos das médias (barras) e desvios padrões (caixas) da umidade no solo das concentrações C1, C2 e C3.	71
Figura 22: Gráfico tipo Blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) para a contaminação de <i>E. coli</i> no solo das concentrações C1, C2 e C3, respectivamente.	72
Figura 23: Retas de decaimento da bactéria <i>E. coli</i> no solo e equação da reta para cada concentração.	74
Figura 24: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas de concentração de <i>E. coli</i> internalizadas nas raízes das alfaces.	76
Figura 25: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) da internalização de <i>E. coli</i> na folha de alface.	78
Figura 26: Internalização <i>HAdV-2</i> nas raízes das alfaces durante o ciclo de cultivo com erro padrão.	81
Figura 27: Radiação solar e umidade relativa do ar durante o plantio.	83
Figura 28: Dados de precipitação combinados com as lâminas de irrigação e a temperatura média do 2º cultivo.	84
Figura 29: Variação dos dados de pH ao longo do ciclo de cultivo nos lisímetros.	85
Figura 30: Gráfico tipo blox-plot com a distribuição dos dados de desvio padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) dos valores de pH para os lisímetros 1, 2 e 3, controle 1 e controle 2, respectivamente.	85
Figura 31: Gráfico tipo blox-plot da série de dados de umidade do solo com desvio padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) dos lisímetros 1, 2 e 3 e controles 1 e 2., respectivamente.	86
Figura 32: Variação dos dados de umidade ao longo do ciclo de cultivo nos lisímetros	87
Figura 33: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas das médias de contaminação do solo por <i>Salmonella</i> nos lisímetros 1,2 e 3 e controle sem planta.	88
Figura 34: Retas de regressão e equações de decaimento da <i>Salmonella</i> no solo dos lisímetros em triplicata e do controle 1	89
Figura 35: Gráfico do tipo Blox-plot com os erros padrões (caixas) e mínimas e máximas (barras) da distribuição dos dados de contaminação do solo por <i>E. coli</i> dos lisímetros 1, 2 e 3 e controles 1 e 2, respectivamente.	91

Figura 36: Retas de decaimento e equações da reta dos lisímetros de fezes compostadas em triplicatas e controle 1 e 2.92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Processos de tratamento da Urina	24
Quadro 2: Principais micro-organismos excretados nas fezes	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Nutrientes na urina em diferentes países.	24
Tabela 2: Teores nutricionais, pH e interpretação dos teores de fósforo conforme Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina 2016.	56
Tabela 3: Média de sementes germinadas e do tamanho das raízes com desvio padrão, GRS (%), CRR (%) e IG (%).	65
Tabela 4: Coeficiente de decaimento, T90, intervalo de confiança 95% para T90 e tempo de decaimento de 4 unidades logarítmicas para as três concentrações de <i>E. coli</i>	73
Tabela 5: Coeficientes de determinação (r^2), coeficientes de decaimento (k), T90, Tempo para decaimento de 4 logs, e valores de p para a bactéria <i>Salmonella</i>	88
Tabela 6: Valores de R^2 , k, p, T90 e tempo de inativação para 4 Log_{10} para a bactéria <i>E. coli</i>	91
Tabela 7: Doses ingeridas por exposição única e anual e risco por única exposição e anual para os cenários de fertilização, plantio e manejo e consumo das hortaliças fertilizadas com fezes co-compostadas.	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	Nitrato de Prata
Ca	Cálcio
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FAO	Organização para a Alimentação e Agricultura
HAdV -2	Adenovírus Humano, tipo 2
K	Potássio
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LIMA	Laboratório Integrado de Meio Ambiente
LVA	Laboratório de Virologia Aplicada
Mg	Magnésio
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MIP	Departamento de microbiologia, imunologia e parasitologia
MS2	Bacteriófago RNA F- específico MS2
MSA	Modified Scholten's Ágar
MSB	Modified Scholten's Broth
N	Nitrogênio
P	Fósforo
P ₂ O ₅	Pentóxido de Fósforo
pH	Potencial Hidrogeniônico
PVC	Policloreto de vinila
RPM	Rotações por minuto
RReSSa	Laboratório de Recuperação de Recursos de Sistemas de Saneamento
SLABA	Slanetz Bartley
TYGA	Tryptone Yeast Extract Glucose Ágar
TYGB	Tryptone Yeast Extract Glucose Broth
UFC.g ⁻¹	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFP.g ⁻¹	Unidade Formadora de Placa por grama
WHO	Organização Mundial de Saúde
XLD	Xilose Lisina Desoxicolato

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	18
2.1	OBJETIVO GERAL	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1	SANEAMENTO FOCADO EM RECURSOS.....	19
3.2	CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS EXCRETAS HUMANAS..	21
3.3	BANHEIROS SECOS COM SEPARAÇÃO DE URINA	22
3.3.1	Tratamento da Urina.....	23
3.3.2	Tratamento das fezes.....	25
3.4	POTENCIAL AGRONÔMICO DAS EXCRETAS HUMANAS.....	28
3.5	USO DE BIOFERTILIZANTES NA AGRICULTURA	29
3.6	RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE BIOFERTILIZANTES PRODUZIDOS A PARTIR DE EXCRETAS HUMANAS.....	30
3.6.1	Percolação dos micro-organismos patogênicos	31
3.6.2	Internalização dos patógenos no tecido vegetal	31
3.6.3	Fitotoxicidade das fezes co-compostadas.....	33
3.7	REGULAMENTAÇÃO DO USO DE EXCRETAS HUMANAS NA AGRICULTURA	33
3.8	AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (AQRM) .	35
3.8.1	Identificação do Perigo.....	36
3.8.2	Avaliação da exposição.....	39
3.8.3	Análise da Dose-Resposta.....	40
3.8.4	Caracterização do risco:.....	41

4	MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1	COLETA E TRATAMENTO DAS FEZES CO-COMPOSTADAS COM RESÍDUOS ORGÂNICOS	44
4.2	CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOFERTILIZANTE	46
4.3	ENSAIO DE FITOTOXICIDADE DAS FEZES CO-COMPOSTADAS	47
4.4	CÁLCULO DA DEMANDA DE BIOFERTILIZANTE	48
4.4.1	Adubação dos vasos para o primeiro experimento.....	48
4.4.2	Fertilização dos lisímetros para o segundo experimento	48
4.5	INOCULAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS NOS BIOFERTILIZANTES...	49
4.5.1	Preparação da solução inóculo	49
4.5.2	Incorporação das soluções de inóculo nos biofertilizantes.....	50
4.6	PLANTIO EXPERIMENTAL 1: RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE E A CONTAMINAÇÃO NO SOLO E PLANTAS.....	50
4.6.1	Localização e Design experimental	51
4.6.2	Solo	52
4.6.3	Inoculação das fezes co-compostadas para obtenção de diferentes concentrações de contaminação.	53
4.7	EXPERIMENTO 2 – CONTAMINAÇÃO DO SOLO E INTERNALIZAÇÃO DE PATÓGENOS NO PLANTIO DE ALFACE COM FEZES CO-COMPOSTADAS	53
4.7.1	Localização	53
4.7.2	Clima.....	54
4.7.3	Lisímetros	54
4.7.4	Solo	56
4.7.5	Esquema Experimental e amostral	57
4.8	ANÁLISE DE LIXIVIAÇÃO E PERCOLAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	58
4.8.1	Percolação e persistência de micro-organismos patogênicos.....	58
4.8.2	Lixiviação dos micro-organismos patogênicos.....	59

4.9	ANÁLISE DE INTERNALIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NOS TECIDOS VEGETAIS	59
4.9.1	Tratamento da amostra vegetal e análise de internalização nas raízes e folhas	59
4.10	TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS NOS CULTIVOS EXPERIMENTAIS.	60
4.11	ANÁLISE QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO APLICADO (QMRA) 61	
4.11.1	Identificação do perigo	61
4.11.2	Avaliação da exposição.....	63
5	resultados e discussão	65
5.1	TESTE DE FITOTOXICIDADE DAS FEZES CO-COMPOSTADAS	65
5.2	EXPERIMENTO DE CULTIVO EM VASOS- CASA DE VEGETAÇÃO MIP 67	
5.2.1	Contaminação microbiológica das fezes co-compostadas, solo e mudas de alface antes do plantio	67
5.1.2	Temperatura da estufa, pH e umidade do solo durante o plantio	68
5.1.3	Decaimento da bactéria <i>E. coli</i> no solo	72
5.1.4	Internalização da <i>E. coli</i> nas raízes da alface.....	75
5.1.5	Internalização da bactéria <i>E. coli</i> nas folhas de alface.....	76
5.1.6	Internalização do vírus <i>HAdV-2</i> nas folhas e raízes	80
5.3	EXPERIMENTO DE CULTIVO EM LISÍMETROS CETRE	82
5.3.1	Contaminação microbiológica das fezes co-compostadas, solo e mudas de alface antes do plantio	82
5.3.2	Condições climatológicas do plantio	82
5.3.3	Umidade e pH do solo.....	84
5.3.4	Decaimento bactéria <i>Salmonella</i> no solo	87
5.3.5	Decaimento bactéria <i>E. coli</i> no solo.....	90
5.3.6	Presença de <i>E. coli</i> e <i>Salmonella</i> no lixiviado	93

5.3.7	Internalização de <i>Salmonella</i> nas raízes e folhas de alface	94
5.3.8	Internalização <i>E. coli</i> nas raízes e folhas de alface	95
5.3.9	Contaminação do solo e Internalização do Adeno vírus humano tipo 2 (<i>HAdV-2</i>) nas raízes e folhas de alface.	96
5.4	AVALIAÇÃO DE RISCO MICROBIOLÓGICO (AQRM).....	97
6	RESUMO DOS RESULTADOS	101
7	CONCLUSÃO.....	103
8	RECOMENDAÇÕES FINAIS	104
9	REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

O aumento populacional, aliado ao uso insustentável dos recursos naturais geram impactos negativos sobre todos os sistemas terrestres. O planeta Terra possui cerca de 7,7 bilhões de pessoas e irá ultrapassar os 9,5 bilhões até 2050 (WORLDMETERS, 2020). Tal desenvolvimento inerente às atividades humanas, em conjunto com o aumento populacional aumenta a pressão sobre os recursos naturais, limitando o acesso a princípios fundamentais, como segurança alimentar e sanitária, sobretudo aos mais pobres.

Estima-se que cerca de 820 milhões de pessoas sofrem com a fome. Dentre estas, 113 milhões sofrem com insegurança alimentar severa, onde a falta de acesso a alimentos adequados coloca em perigo a vida ou a subsistência do indivíduo. A demanda por alimentos também tende a aumentar na mesma proporção, com estimativas de aumento de até 60% até 2050 (FAO, 2019). Ademais, cerca de 2 bilhões de pessoas vivem sob estresse hídrico, em situações em que a demanda por água excede a oferta de água renovável disponível. Dentre estas, 1 bilhão não têm acesso a abastecimento de água. Concomitante com a limitação de oferta, a demanda de consumo aumentou em 1% desde 1980 e deverá continuar aumentando em taxa similar até 2050, o que pode representar um aumento em torno de 20 a 30% considerando o consumo e as projeções de crescimento populacional (UNESCO, UN WATER, 2020).

Apesar dos problemas como a escassez hídrica e alimentar, a atual forma de gerenciamento dos sistemas sanitários em todo o mundo não tem foco no reaproveitamento da água utilizada e dos nutrientes gerados. Em sistemas convencionais, as excretas são consideradas um material repulsivo que deve ser imediatamente afastado do local de geração (SCHONNING; STEMSTROM, 2004). Paradoxalmente, este material rico em nutrientes é afastado com quantidades consideráveis de água potável e transportadas por grandes distâncias até o tratamento e finalmente, a destinação final da fase líquida em corpos hídricos e da fase sólida em aterros sanitários, em casos de tratamento centralizado (LANGERGRABER; MUELLEGGER, 2005).

Embora a universalização do saneamento seja uma área com crescente esforço e investimentos de entidades governamentais e da sociedade civil, ainda há muito a ser feito de modo a alcançar a sustentabilidade econômica e ambiental de tais sistemas. Conforme estimativas da Organização Mundial de Saúde, as excretas de cerca de 4,5 bilhões de pessoas, aproximadamente 60% da população mundial, são lançadas em corpos hídricos sem tratamento (WHO, UNICEF, 2019). Desta forma, além do aspecto quantitativo, o aspecto qualitativo da

água também se torna um problema, uma vez que está intimamente relacionado com a disseminação de diversas doenças entéricas.

Doenças entéricas são transmitidas via fecal-oral e estão intimamente ligadas com a ausência de saneamento básico. A disseminação dessas doenças é um problema antigo que tem acompanhado a sociedade até os dias atuais, sendo uma das maiores causas de morbidade e mortalidade por todo o mundo. Tais doenças podem ser transmitidas pela água ou alimentos contaminados e são causados por micro-organismos como vírus, bactérias, protozoários e helmintos presentes no trato gastrointestinal humano, e ainda por toxinas produzidas por alguns destes (WHO, 2015; PRADO, MIAGOSTOVICH, 2014).

Estimativas apontam que houve aproximadamente 600 milhões de casos de doenças entéricas transmissíveis causadas por 31 tipos de patógenos em 2010, dos quais 550 milhões são doenças diarreicas, responsáveis por 230.000 mortes. Os patógenos causadores das doenças entéricas com maior mortalidade foram: *Escherichia coli* EPEC (37.000 mortes), *E. coli* ETEC (26.000), norovírus (35.000) e *Salmonella entérica* não-tifoide (59.000) (WHO, 2015). O documento também verifica que áreas mais pobres sofrem mais com a mortalidade, mostrando que das 59.000 mortes por *S. entérica* não-tifoide, 32.000 foram em duas sub-regiões da África.

Sistemas de saneamento sustentáveis podem desempenhar papel vital para a solução destes problemas, atuando no controle da poluição de corpos hídricos, promovendo a saúde e o aumento na produção de alimentos através da reciclagem de nutrientes que estão presentes em grande quantidade no esgoto e que seriam descartados. Diante deste cenário, o saneamento ecológico (EcoSan) é uma alternativa que visa a sustentabilidade no setor através do reaproveitamento de subprodutos desses sistemas. Efluentes tratados, bem como o lodo fecal e urina são vistos sob a ótica de reaproveitamento dos nutrientes para a fertilização de solos agricultáveis e áreas de conservação (ESREY et al., 2001). Deste modo, a implantação deste novo paradigma sanitário se faz profundamente necessário, principalmente em países em desenvolvimento, que podem se beneficiar com a economia de água potável, a recuperação de nutrientes para a fertilização de lavouras, além da redução de doenças de veiculação hídrica (ESREY et al., 2001).

Embora as vantagens do EcoSan sejam inúmeras, é necessário atentar-se para a potencial presença de micro-organismos patogênicos em subprodutos de sistemas de saneamento. Neste sentido, é necessário garantir que os biofertilizantes produzidos através de excretas sejam seguros para o cultivo agrícola, tanto no manuseio do produtor rural como no consumo final. Portanto, torna-se imprescindível estudar o comportamento destes fertilizantes no solo e nas

plantas, para que se tenha uma visão adequada sobre sua eficiência e os riscos que podem oferecer para a saúde humana em sua manipulação, bem como na ingestão de alimentos cultivados à base desse tipo de fertilizante.

Com base nos argumentos apresentados, este estudo teve como premissa a investigação da segurança do uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais, investigando os riscos associados a contaminação do solo e internalização de patógenos nos alimentos cultivados com o uso desse biofertilizante.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a potencial contaminação microbiológica na utilização de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas em cultivos de vegetais consumidos crus.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a fitotoxicidade das fezes co-compostadas em sementes de alface;
- Analisar a internalização dos modelos patogênicos: *Escherichia coli*, *Salmonella* e *Adenovírus humano tipo 2 (HAdV-2)* em alface biofertilizado com fezes co-compostadas;
- Analisar a contaminação e persistência dos modelos patogênicos no solo e lixiviado;
- Avaliar quantitativamente o risco microbiológico da produção e consumo de alface biofertilizado com fezes co-compostadas.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 SANEAMENTO FOCADO EM RECURSOS

Assim como os demais animais, o *Homo sapiens* tem a necessidade fisiológica de eliminar os resíduos produzidos em seu corpo através da urina e das fezes. Durante a evolução de nossa espécie, por muito tempo depositamos nossos excrementos no solo, devolvendo os nutrientes contidos nas excretas para o crescimento das plantas, fechando o ciclo. Tal prática já foi comum em regiões dos Estados Unidos e Europa e até o começo do século XXI podia ser encontrada em algumas culturas, como o Vietnã, onde a população camponesa fertilizava os campos de arroz com o uso das excretas (ESREY, 1998).

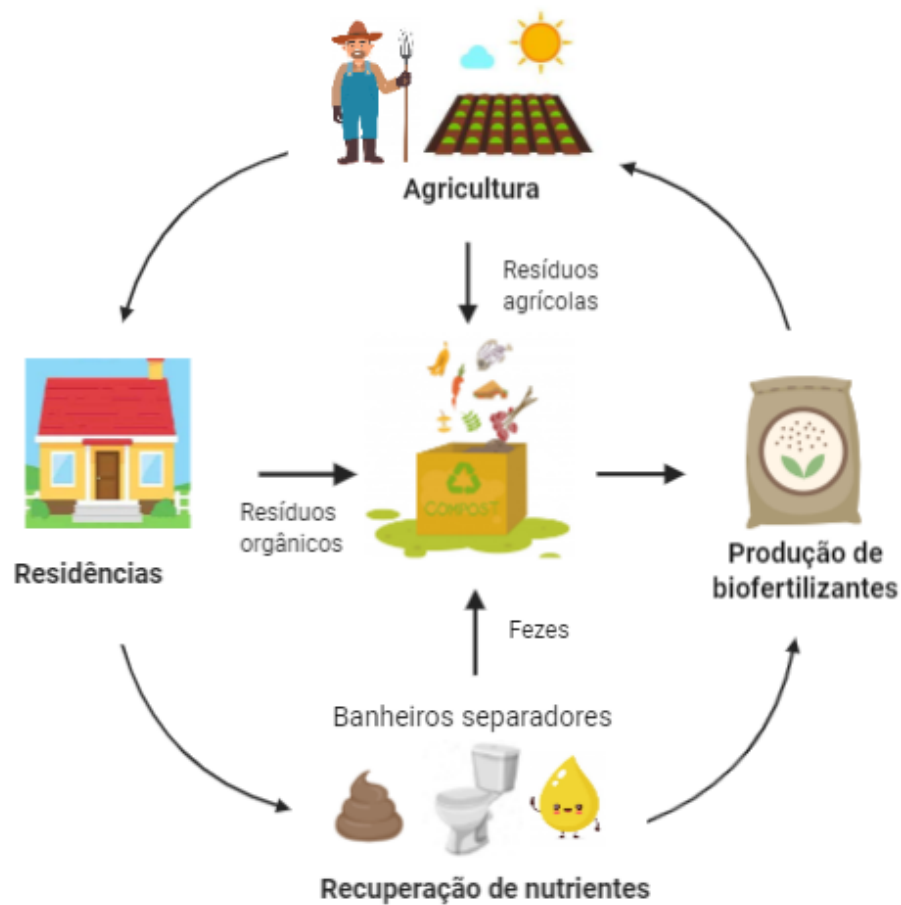
Entretanto, as excretas humanas sempre foram tema de grande polêmica, devido ao potencial de disseminação de doenças entéricas, uma vez que as fezes são a via de excreção da maioria dos patógenos do corpo (SCHÖNNING, STENSTRÖM, 2004). Na história, diversas crises sanitárias envolvendo a falta de higiene e de acesso a saneamento ocorreram. Doenças como: cólera, febre tifoide, diarreias, dentre outras, foram responsáveis pela morte de milhares de pessoas e até nos dias de hoje atingem em suma os mais pobres, principalmente, mulheres e crianças. (UNESCO, UN WATER, 2020). Diante de tantos problemas, sistemas sanitários do tipo “*Flushing and Discharging*” e “*Drop and Store*” foram adotados para conter a disseminação de doenças entéricas. Paradoxalmente, embora esses sistemas tenham colaborado para a diminuição da disseminação de doenças, eles possuem custos elevados, principalmente se forem pensados de forma centralizada com necessidade de diluição e transporte por longas distâncias até uma estação de tratamento, (ROCKEFELLER, 1998; ESREY et al. 1998; ESREY et al. 2001).

Os sistemas em questão podem ser considerados um problema do ponto de vista econômico e ambiental por diversos fatores, sobretudo pelo fato de utilizar grande quantidade de água potável para a diluição de uma pequena quantidade de excretas, misturando-as com outros tipos de águas servidas de outras residências e indústrias, transformando-o em um efluente de muito mais difícil tratamento, além de interromper o fechamento do ciclo de nutrientes (HARDER, 2020).

Embora a mudança de paradigma no modo de pensar sobre o saneamento na sociedade esbarre em muitos obstáculos e seja um processo vagaroso, o benefício tanto para a segurança alimentar através da fertilização e condicionamento do solo, quanto com a economia de água

potável, é considerável. Deste modo, em sistemas de saneamento sustentável, os banheiros secos têm por objetivo a economia de água e a diminuição da demanda por fertilizantes minerais através do reciclo de excretas, partindo da premissa de higienizar e reciclar. Desta forma, as excretas são sanitizadas ainda na fonte geradora, tornando-se um produto seguro para ser utilizado na agricultura (Figura 1).

Figura 1: Fluxo de nutrientes do sistema de saneamento ecológico aplicado na pesquisa.



Fonte: Adaptado de Shimha, Zabaniotou e Ganesapillai (2018)

Estima-se que cada habitante gaste anualmente entre 15.000 e 20.000 L de água potável para levar suas excretas ao esgoto (ESREY et al. 2001, VINNERAS; JÖNSSON, 2003). Em uma cidade do tamanho de Florianópolis, levando em consideração a população de 500 mil habitantes, haveria uma economia de valores significativos de água potável, na margem dos 7,5 bilhões de L/ano, caso 100% da população optasse por utilizar banheiros secos. Todavia, além da economia de água poderiam ser gerados aproximadamente 2,25 milhões de kg de nitrogênio

e 250.000 kg de fósforo, seguindo as estimativas de produção de nutrientes por habitante/ano (VINNERAS, 2002; MAGRI, 2013). Deste modo, o saneamento sustentável possui múltiplos benefícios, pois previne doenças, protege o meio ambiente, economiza água além de recuperar e reciclar nutrientes e matéria orgânica (ESREY et al., 1998; HARDER et al., 2020).

3.2 CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS EXCRETAS HUMANAS

Para que o objetivo do Saneamento Ecológico seja alcançado, se faz necessário a compreensão de que a urina e as fezes são materiais diferentes que devem ser separadas ainda na fonte. Enquanto as fezes são ricas em matéria orgânica e concentram a maior parte dos patógenos, a urina concentra a maior parte dos nutrientes e micro poluentes, como fármacos e hormônios (ESREY et al. 2001; VINNERAS, 2002; MAGRI, 2013; NORDIN, 2010). Devido estas características distintas e complementares das excretas, cada uma é capaz de produzir um tipo de biofertilizante diferente. Enquanto a urina é recomendada para culturas que exigem maior quantidade de nitrogênio, como milho e espinafre, as fezes são melhores utilizadas em culturas com menor demanda de nitrogênio, como leguminosas (JÖNSSON et al., 2004).

Diante dessas particularidades, banheiros secos devem ter como base, a utilização de tecnologias que permitam a separação da urina e fezes na origem. Esse procedimento melhora o gerenciamento das excretas de acordo com suas composições individuais: a urina sendo tratada como fonte de nutrientes na agricultura e as fezes como condicionante do solo e potencial fonte de contaminação por micro-organismos patogênicos (SIMHA et al., 2018; JÖNSSON, 2003, ESREY et al. 2001). Deste modo, é necessário adotar tecnologias sanitárias adequadas aos hábitos dos usuários, sempre levando em consideração a coleta, transporte e tratamento das excretas, para que o último ocorra o mais próximo possível da fonte geradora, tornando mínimo o contato ao manusear as excretas em qualquer sistema (ESREY et al. 1998, SCHÖNNING, STENSTRÖM, 2004).

Neste sentido, a pesquisadora Magri (2013), caracterizou e quantificou excretas humanas com o intuito de verificar o potencial agrônomo das fezes, analisando a quantidade de nutrientes presentes e seus parâmetros microbiológicos de forma a otimizar métodos de higienização para a inativação de patógenos, visando o uso posterior como biofertilizantes. Como resultado de sua pesquisa, quantificou-se que uma pessoa adulta produz em média 47 kg de fezes e 549 L de urina em um ano. Tais dados corroboram com a quantificação realizada por Vinnerås (2002).

Desta forma, a quantidade de nutrientes excretados por uma pessoa em um ano é em média de 550 g de nitrogênio (N) e 183 g de fósforo (P) nas fezes e 4000 g de N e 365 gramas de P na urina, totalizando cerca de 4,5 kg de nitrogênio e 0,5kg de fósforo (P) por pessoa anualmente (VINNERÅS, 2002; MAGRI, 2013).

3.3 BANHEIROS SECOS COM SEPARAÇÃO DE URINA

Com a finalidade de separar a urina na fonte e facilitar o tratamento das excretas, os banheiros secos separadores têm ganhado destaque no uso em sistemas ecológicos em diversas partes do mundo, como Suécia, África do Sul, Zimbábue, Uganda e México. Atualmente, diversos modelos de banheiros com separação de urina têm sido utilizados, tais modelos costumam variar de acordo com o padrão socioeconômico dos usuários do sistema, sendo diferentes em cada região de acordo com os hábitos e cultura dos usuários (SIMHA; MATHEW; JAIN; GANESAPILLAI, 2016, ESREY et al. 2001).

Figura 2: Banheiros secos separadores em áreas rurais



Figura 3: Banheiros secos separadores em áreas urbanas

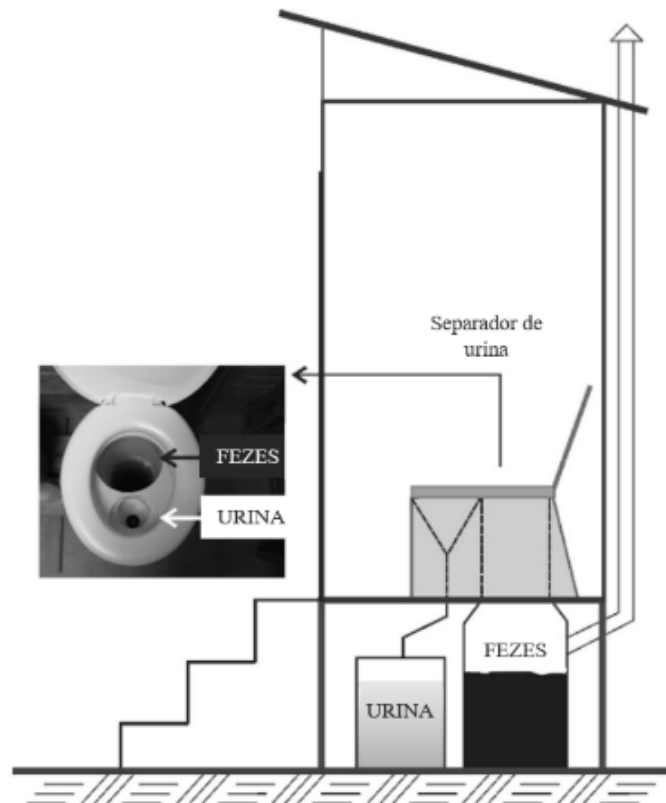


Fonte: MAGRI (2013)

O funcionamento dos banheiros secos separadores é simples. Como os sistemas operam sem água, é necessário que o usuário deposite um material com potencial desidratador nas

fezes após cada defecação, que pode ser cal, cinzas ou conchas de ostras trituradas. Ademais, o uso é similar ao de um sanitário comum, bastando o usuário se sentar corretamente para que as excretas sejam separadas e acondicionadas em bombonas e/ou câmaras, como pode ser exemplificado na Figura 4 :

Figura 4: Estrutura exemplificada de um banheiro seco separador.



Fonte: Arquivo RReSSa (2020)

3.3.1 Tratamento da Urina

Acerca dos resíduos produzidos pelas pessoas no âmbito doméstico a maior proporção de nitrogênio, fósforo e potássio está concentrada na urina, cerca de 80-90% do total de nitrogênio, 50-80% do total de fósforo e 80-90% do total de potássio (VINNERÅS, 2002; NORDIN, 2010; MAGRI, 2013). Entretanto, embora o alto nível de nutrientes, a urina humana não apresenta patógenos, a não ser em casos específicos de infecções (SIMHA, ZANANIOTOU, GANESAPILLAI, 2018).

A urina representa apenas 1% do volume total das águas residuárias domésticas e contém em média 95% de água (ESREY et al. 2001). Sua composição pode variar de acordo com fatores fisiológicos, como: idade, peso, gênero, hábitos alimentares e condições ambientais.

Neste sentido, Jönsson e Vinnerås (2004) realizaram um estudo de quantificação dos nutrientes presentes nas excretas em diferentes países, demonstrando as diferenças nutricionais da urina entre elas. Os resultados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1: Nutrientes na urina em diferentes países.

País	Nitrogênio (kg/hab/ano)	Fósforo (kg/hab/ano)	Potássio (kg/hab/ano)
China	3,5	0,4	1,3
Haiti	1,9	0,2	0,9
India	2,3	0,3	1,1
África do sul	3,0	0,3	1,2
Uganda	2,2	0,3	1,0
Brasil	3,0	0,6	-

Fonte: Adaptado de Jönsson et al. (2004); Magri (2013).

Diversos modos de tratamento podem ser utilizados para conservar os nutrientes da urina, mas em suma, os tratamentos podem ser divididos de acordo com suas funções: higienização, estabilização, redução de volume, recuperação de fósforo e de nitrogênio e remoção de nutrientes e de micro poluentes, como pode ser observado no Quadro 1.

Quadro 1: Processos de tratamento da Urina

Função	Processo
Higienização e/ ou estabilização	Estocagem ou Armazenamento
	Acidificação
	Nitrificação
Recuperação de nutrientes	Precipitação da Estruvita
	Troca Iônica
	Stripping de amônia
Redução de volume	Evaporação
	Congelamento
	Osmose reversa
Remoção de micro poluentes	Eletrodíálise
	Nano filtração
	Ozonização e oxidação avançada

Fonte: Adaptado de MAGRI (2013)

3.3.2 Tratamento das fezes

As fezes caracterizam-se pela elevada concentração de matéria carbonácea e pela presença de diversos micro-organismos, como bactérias, vírus, protozoários e helmintos. Estes patógenos são encontrados em altas concentrações nas fezes e causam diversas doenças entéricas (MAGRI, 2013). Dentre os micro-organismos presentes nas fezes, dois deles têm sido tradicionalmente considerados os principais causadores de doenças gastrointestinais, principalmente em países em desenvolvimento: os vírus e as bactérias. Cerca de 120 diferentes tipos de vírus podem ser excretados pelas fezes, sendo os grupos de *enterovírus*, *rotavírus*, *adenovírus*, *norovírus* e *hepatite* os mais comuns. Em relação às bactérias, as mais comuns são *Salmonella*, *E. coli*, *Vibrio cholerae* e *Shigella*. Ademais, protozoários e helmintos merecem atenção, sobretudo em locais em desenvolvimento, com prevalência de doenças deste tipo na população (SCHÖNNING; STENSTRÖM, 2004). Os principais micro-organismos presentes nas fezes e suas doenças relacionadas podem ser observados no Quadro 2.

Diante o exposto, considerando os riscos, a exposição às fezes não tratadas é sempre considerada insegura, devido à presença potencial de patógenos (SCHÖNNING; STENSTRÖM, 2004). Deste modo, a inativação dos patógenos é o principal desafio no uso das fezes em sistemas agrícolas.

Para preencher essa lacuna, diversos tratamentos vêm sendo empregados nas fezes, como: armazenamento, incineração, sanitização com amônia, desidratação e compostagem (MAGRI, 2013, NORDIN, 2010). O objetivo de tais tratamentos, é a preparação de um material que seja estável em termos de atividade biológica e que esteja higienizado ou sanitizado para que o reciclo das fezes possa ocorrer de forma segura (MAGRI, 2013). A desidratação e a compostagem são os métodos escolhidos para a inativação dos patógenos nesta pesquisa devido a eficiência e simplicidade dos processos envolvidos.

Quadro 2: Principais micro-organismos excretados nas fezes

Grupo	Patógeno	Doenças relacionadas
Bactéria	<i>Aeromonas</i> spp.	Enterite
	<i>Campilobacter jejuni/coli</i>	Enterite
	<i>Escherichia coli</i> (EHEC, EIEC, EPEC, ETEC)	Enterite
	<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Enterite
	<i>Salmonella typhi/paratyphi</i>	Febre tifóide, paratifóide
	<i>Salmonella</i> spp.	Salmonelose
	<i>Shigella</i> spp.	Shigelose
	<i>Vibrio cholerae</i> (O1, O139)	Cólera
	<i>Yersinia</i> spp.	Enterite
Vírus	Adenovirus enterico	Enterite
	Astrovirus	Enterite
	Calcivirus	Enterite
	Coxsackievirus	Doença respiratória, Enterite, Meningite viral
	Echovirus	Meningite, Encefalite
	Enterovirus tipos 68-71	Meningite, Encefalite, Paralisias
	Virus da Hepatite A	Hepatite A
	Virus da Hepatite E	Hepatite E
	Poliovirus	Poliomielite
	Norovirus	Enterite
Rotavirus	Enterite	
Protozoários parasitários	<i>Balantidium coli</i>	Enterite
	<i>Cryptosporidium parvum</i>	Criptosporidíase
	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Enterite
	<i>Entamoeba histolytica</i>	Amebíase
	<i>Giardia intestinalis</i>	Giardiase
	<i>Toxoplasma gondi</i>	Toxoplasmose
Helmintos parasitários	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Ascariíase
	<i>Ancylostoma duodenale/Necator americanus</i>	Ancilostomíase
	<i>Schistosoma mansoni</i>	Esquistossomose
	<i>Taenia solium/saginata</i>	Teníase
	<i>Trichuris trichiura</i>	Tricuríase

Fonte: MAGRI (2013)

3.3.2.1 Desidratação

Os micro-organismos são afetados pelo tempo e pelas condições predominantes no meio ambiente, e, diversos fatores físico-químicos e biológicos têm influência sobre eles, como temperatura, pH, umidade, nutrientes, radiação solar, dentre outros. A maioria dos patógenos presentes nas fezes preferem um pH neutro, em torno de 7. Isto significa que um pH alcalino, em torno de 9 ou superior é capaz de reduzir a carga de patógenos com o tempo. A inativação dos patógenos é proporcional à elevação do pH, ocorrendo de forma mais rápida em pH em torno de 11-12 (SCHÖNNING; STENSTRÖM, 2004). Na desidratação diversos tipos de materiais são utilizados, como cal, cinzas e conchas de ostras. Tais materiais elevam o pH, diminuindo a umidade das fezes de acordo com o tempo. Esses materiais também reduzem o mau cheiro e o risco de moscas, cobrindo o material fecal a cada defecação (ESREY, 1998).

A desidratação é um método simples, que além de cobrir o material fecal, evitando odores e moscas, inativa os micro-organismos de forma eficaz. Estudos realizados por Magri (2013) apontam o potencial de inativação dos patógenos em banheiros secos separadores em processos de desidratação com uma combinação de conchas de ostras e cinzas + ureia. Nesse trabalho foram estudados a inativação das bactérias *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis*, e bacteriófagos MS2 e $\Phi X 174$ com inativação de 7 unidades logarítmicas em 30 dias para *Salmonella Typhimurium*, 6 Log₁₀ para *Enterococcus faecalis* em 100 dias, 6,5-7,5 Log₁₀ em 130 dias para bacteriófagos MS2 e 5,2 Log₁₀ em 50 dias para ΦX . Para os helmintos, como *Ascaris sum* e *Ascaris lumbricoides* o tempo de inativação foi mais longo com cerca de 120 dias.

3.3.2.2 Compostagem

A Compostagem é a biotransformação de substratos orgânicos na presença de oxigênio. Essa transformação biológica inclui a mineralização e humificação de materiais orgânicos e a redução de sua massa e volume através da degradação microbiana, gerando um composto estável, de pH neutro e livre de patógenos (COFIE, 2016).

Os micro-organismos presentes nas fezes e nos resíduos orgânicos são responsáveis pela metabolização do carbono, liberando calor no processo. Desta forma, o processo de compostagem pode ser dividido em três fases, de acordo com a variação de temperatura. Inicialmente o processo começa na fase mesofílica (0-40°C), atingindo a fase termofílica (40-70°C) no decorrer do processo até a redução da temperatura para temperatura ambiente na fase de

maturação. A máxima decomposição e estabilização da matéria orgânica é obtida na fase termofílica (BUZIE; KÖRNER, 2015). Além da temperatura, a qualidade do composto final depende do controle de vários fatores, como: composição nutricional da matéria-prima, relação C:N, tamanho de partícula, pH, umidade, aeração e parâmetros operacionais, como revolvimento do material e monitoramento (COFIE et al. 2016).

Na compostagem com excretas humanas, a maior preocupação é a contaminação do material final com patógenos. Entretanto, a maioria dos patógenos se reproduzem em temperaturas de até 35°C, sendo o aumento da temperatura um fator limitante para viabilidade desses organismos. Deste modo, o fato de a compostagem ocorrer em temperaturas acima dos 50°C auxilia no objetivo de inativação dos patógenos à um nível seguro (VINNERÅS; AGOSTINI; JÖNSSON, 2010). Neste sentido, Vinnerås (2002) expressa a importância da manutenção da fase termofílica por cerca de uma semana para garantir um composto estável.

Por esta razão, a compostagem de pequenas quantidades de material fecal pode não ser indicada, devido à dificuldade de obtenção da temperatura ideal. Desta forma, é indicado na compostagem com fezes, a adição de materiais volumosos como cascas de árvores, e lascas de madeiras e materiais ricos em energia como restos de alimentos, de forma que permita a aeração do composto e o equilíbrio entre as taxas de C:N para o sucesso do procedimento (VINNERÅS, 2002).

Neste sentido, a proporção de C:N é um fator de grande importância para o sucesso da compostagem. É indicado que o teor de carbono seja de pelo menos 50% do peso seco total (COFIE et al. 2016). Preferencialmente, o material deve ser passível de decomposição microbiana e de fácil obtenção. Desta forma, a inclusão de materiais orgânicos, como restos de alimentos pode ser uma opção viável para a compostagem das fezes, uma vez que a mistura alcança temperaturas elevadas, assegurando a inativação de patógenos (VINNERÅS, 2002).

Consoante o exposto, a compostagem oferece a possibilidade de reciclar nutrientes das excretas humanas e resíduos sólidos urbanos orgânicos para o uso na agricultura. Tal prática, se adotada em grande escala, tem potencial de melhorar a gestão dos resíduos, aumentar a fertilidade do solo, além de economizar e conservar a água potável.

3.4 POTENCIAL AGRONÔMICO DAS EXCRETAS HUMANAS

Todas as plantas necessitam de diversos elementos em seu ciclo de crescimento, tais elementos são obtidos através do ar, da luz do sol, da água, e principalmente, do solo. Para que o crescimento ocorra de forma adequada, é necessário que macro e micronutrientes estejam

presentes no solo em quantidades ideais ao desenvolvimento da planta (JÖNSSON et al. 2004). Os 6 principais macronutrientes requeridos pelas plantas são: nitrogênio, fósforo, potássio, magnésio, cálcio e enxofre. Da mesma forma, os principais micronutrientes, são: ferro, zinco, cobre, manganês, boro e molibdênio (ESREY et al 2001).

Os nutrientes nitrogênio, fósforo e potássio, são essenciais para o equilíbrio da planta, cada um com seu papel dentro do ciclo de crescimento. O nitrogênio é essencial para o crescimento das folhas e do caule, e é responsável pela cor verde escura do caule das plantas. O nitrogênio ainda afeta o acesso dos demais nutrientes às plantas. O fósforo por sua vez, ajuda a tornar as plantas mais resistentes à seca, acelera a maturação, ajuda na formação de sementes e frutos e estimula o crescimento das raízes. O potássio, é o responsável por aumentar a resistência das plantas a pragas e doenças (ESREY et al. 2001). Tais nutrientes passam do solo para os vegetais e são consumidos pelas pessoas, parte destes nutrientes são excretados através da urina e das fezes. Desta forma, como as excretas humanas possuem os principais nutrientes para o crescimento das plantas, elas podem ser classificadas como compostos fertilizantes e para sustentabilidade deveriam retornar ao solo (MAGRI, 2013).

Paradoxalmente, estima-se que no período entre 2015 e 2019 houve o aumento na demanda por nutrientes fertilizantes à base de N, P e K. Conforme dados da FAO cerca de 199 milhões de toneladas de fertilizantes foram consumidos em todo mundo em 2019. Desta quantidade, foram 118 milhões de toneladas de nitrogênio, 45,5 milhões toneladas de fósforo e 35,5 milhões toneladas de potássio. Considerando as excretas de 7,7 bilhões de pessoas e a quantidade de nutrientes que as excretas possuem podem ser obtidos cerca de 35 milhões de toneladas de nitrogênio e 3,85 milhões de toneladas de fósforo. Desta forma, cerca de 30% da demanda por fertilizantes minerais poderia ser suprida com o uso de excretas humanas provindas de sistemas de saneamento EcoSan (FAO, 2016; WORLDOMETERS, 2019).

3.5 USO DE BIOFERTILIZANTES NA AGRICULTURA

A comunidade científica tem demonstrado interesse no potencial fertilizante de produtos de sistemas de saneamento ecológicos. Neste sentido, diversos autores estudaram o potencial fertilizante de excretas humanas em diferentes culturas. Tal fato enfatiza a diversidade de combinações possíveis entre os produtos de sistemas ecológicos presentes na literatura, conforme Quadro 3:

Quadro 3: Autores que investigaram o uso de produtos de sistemas de saneamento na produção agrícola e as culturas utilizadas.

Autor	Ano	Biofertilizante	Cultura
Guzha; Nhapi; Rockstrom	2005	Urina e Fezes	Milho
Jovita Triastuti et al.	2009	Serragem, urina e fezes (Composto Bio-Toilet)	Pinhão manso
Kutu et al.	2011	Urina e Fezes separadamente e Combinadas	Espinafre
Chripim et al.	2017	Urina	Milho; Alface
Amoah, Adamtey, Cofie	2017	Urina, Lodo fecal	Repolho
Kassa; Zewdie, Ali	2018	Urina	Milho
Viskari et al.	2018	Urina	Cevada
Girija; Shettigar; Parama et al.	2019	Lodo de esgoto compostado com resíduos orgânicos.	Batata doce, Feijão
Moya et al.	2019	Digestato, Composto e Vermicomposto	Milho

Fonte: A autora (2020)

Desta forma é de suma importância destacar os bons resultados obtidos através do uso das excretas. Os biofertilizantes apresentaram rendimentos maiores se comparados aos controles negativos e rendimento similar ao de fertilizantes minerais. Autores como Guzha, Naphi e Rockstrom (2005), apresentam ainda, resultados de melhora no condicionamento do solo e na eficiência hídrica em cultivos fertilizados com excretas humanas.

3.6 RISCOS ASSOCIADOS AO USO DE BIOFERTILIZANTES PRODUZIDOS A PARTIR DE EXCRETAS HUMANAS

O maior risco na produção e no uso de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas são os organismos patogênicos que podem estar presentes neste tipo de produto. Os patógenos entéricos podem acumular no solo tendo como consequência a contaminação da água

e dos cultivos (FONGARO et al., 2017). Deste modo, é de suma importância, analisar como esses agentes patogênicos podem se comportar quando em contato com o solo e com os cultivos, quais são as rotas usuais de contaminação, qual é o tempo de decaimento, além dos processos envolvidos na internalização dos micro-organismos nos tecidos vegetais antes que esse tipo de produto seja amplamente difundido na agricultura.

3.6.1 Percolação dos micro-organismos patogênicos

A percolação, sobrevivência e lixiviação de micro-organismos patogênicos no solo depende de diversos fatores, entre eles o pH, tipo de solo, teor de matéria orgânica, precipitação e principalmente, dos níveis de saturação do solo (FONGARO et al., 2017).

Deste modo, o estudo de Fongaro et al. (2017) avaliou o comportamento de quatro micro-organismos no solo, sendo eles: *Escherichia coli*, *Salmonella Enterica*, ΦX , e *mengovírus* em solos argilosos e arenosos a fim de verificar a percolação, lixiviação e sobrevivência dos micro-organismos após a aplicação de digestato suíno como biofertilizante. Para isto, foram inoculados $7 \text{ Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$ de bactérias *E. coli* e *Salmonella* e $5 \text{ Log}_{10}.\text{UFP}.\text{g}^{-1}$ dos vírus ΦX e *mengovírus*. Como resultado, o estudo concluiu que os vírus tiveram sobrevivência maior que as bactérias utilizadas, sendo observada a sobrevivência do ΦX após 120 dias. Assim, ele pode ser utilizado como biomarcador em estudos de persistência dos patógenos no solo. A *Escherichia coli* por sua vez, demonstrou percolação e lixiviação para as camadas mais profundas do solo, servindo como potencial biomarcador microbiológico em estudos de percolação e lixiviação. Como conclusão, o estudo demonstrou que o coeficiente de lixiviação foi maior em solos arenosos para os 4 organismos analisados e maior para as duas bactérias.

Os dados obtidos no trabalho de Fongaro et al. (2017) corroboram com os dados obtidos por Johannessen et al. (2005), que inoculou *Escherichia coli* junto ao fertilizante na concentração de $3,8 \times 10^4 \text{ UFC}.\text{g}^{-1}$ e obteve amostras positivas de *E. coli* até a 8ª semana, sendo a completa inativação estimada entre 10 e 12 semanas.

3.6.2 Internalização dos patógenos no tecido vegetal

Há basicamente três modos dos micro-organismos interagirem com a planta. O primeiro é a aderência na superfície (Epifítico), onde o micro-organismo pode ganhar acesso ao interior da planta através de danos físicos no tecido ou por meio dos estômatos (Internalização). Por fim, o modo endótico, onde os patógenos podem se internalizar as plantas através de colo-

nização das raízes (WARRINER et al., 2003). O mais comum é que os micro-organismos fiquem aderidos na superfície dos vegetais, no entanto, os patógenos também podem adentrar nos tecidos vegetais, em um processo de internalização, que pode ocorrer através das sementes, do solo, do fertilizante ou esterco e da água de irrigação utilizados durante todo o processo de crescimento (NDUIHIU et al., 2018; BERNSTEIN et al., 2007; SOLOMON, YARON, MATTHEWS, 2002).

O crescimento das bactérias na superfície vegetal é suportado pelos aminoácidos depositados durante a transpiração. Assim, os patógenos humanos, tendem a se agregar entre as ranhuras das camadas epidérmicas e como a superfície da folha tem numerosos estômatos, isto pode proporcionar a entrada na cavidade subestomatal, onde as bactérias passam a residir, protegidas de tratamento de lavagem biocida (WARRINER et al., 2003; DEERING; MAUER; PRUITT, 2012).

Os vírus por sua vez, devido a suas diferenças intrínsecas entre as bactérias, como tamanho, estrutura da superfície, podem se comportar de forma distinta das bactérias no processo de internalização. Outros fatores como persistência viral e motilidade também podem afetar os resultados de internalização pelo sistema de raízes em solos ou em sistemas hidropônicos (HIRNEISEN ET AL., 2011).

As rotas de internalização normalmente são: raízes, folhas, aberturas naturais nos estômatos e danos físicos, como fissuras e cortes em toda extensão do tecido vegetal. O processo depende ainda de diversos fatores, como idade e condição nutricional da planta, além da concentração de exposição aos patógenos e condições ambientais (NDUIHIU et al., 2018; DEERING; MAUER; PRUITT, 2012; MITRA et al., 2009). A lavagem dos vegetais após a colheita também pode intervir na aderência e internalização dos patógenos (IBARRA-SANCHEZ et al., 2004).

Ademais, a internalização de patógenos tem definições diferentes, dependendo da área em que é utilizada. Nas ciências biológicas, refere-se ao processo pelo qual um item atravessa a superfície de uma massa e é incorporado dentro dessa massa. A classificação de que um item é internalizado depende da metodologia utilizada para discriminar entre a superfície e os diversos locais possíveis de internalização (ERICKSON, 2012).

De modo a evitar a influência de patógenos aderidos na superfície vegetal no resultado de internalização, o emprego de diferentes produtos para a desinfecção do tecido vegetal é reportado na literatura, como: nitrato de prata (MURPHY et al., 2016), hipoclorito (NDUHIU et

al., 2018), cloro, dodecilsulfato de sódio, sulfato de sódio (ERICKSON, 2012), e etanol (SOLOMON; YARON; MATTHEWS, 2002; JOHANNESSEN et al., 2005). Neste sentido, o nitrato de prata é um desinfetante efetivo da superfície, com eficácia de 99,9993% (ERICKSON et al., 2014).

3.6.3 Fitotoxicidade das fezes co-compostadas

Para além da segurança microbiológica dos biofertilizantes produzidos a partir de excretas, a avaliação de seus efeitos nos seres vivos e comunidades naturais, é de suma importância antes da aplicação deste tipo de produto em cultivos. Uma forma utilizada na literatura para avaliar a toxicidade de compostos, incluindo biofertilizantes, são ensaios de fitotoxicidade que podem ser conduzidos utilizando sementes de diversas plantas. Sementes de *Lactuca sativa*, popularmente conhecido como alface é uma das plantas mais indicadas para este tipo de teste devido à alta sensibilidade à baixos níveis de toxicidade (MENDES et al., 2021).

O teste consiste em analisar a germinação relativa das sementes da amostra de biofertilizante (GRS) e calcular o comprimento relativo da raiz (CRR) em relação a um controle (água mineral) (PRIAC et al., 2017).

3.7 REGULAMENTAÇÃO DO USO DE EXCRETAS HUMANAS NA AGRICULTURA

O uso de excretas na agricultura apesar dos riscos, tem fundamento na recuperação dos macronutrientes e matéria orgânica que são imprescindíveis ao crescimento das plantas. Desta forma, ao regulamentar o uso das excretas animais e humanas na agricultura, as normas definem os requisitos mínimos para que estes biofertilizantes sejam aplicados de forma segura. É de suma importância salientar que embora as normas abordadas não tratem exclusivamente de excretas humanas, estas podem servir como norte para a utilização deste tipo de resíduo, além de fornecer diretrizes para classificação do biofertilizante de origem humana.

À nível mundial, a agência de proteção ambiental estadunidense (USEPA) regulamentou o reuso de lodo de esgoto em 1994. Esta norma, classifica o lodo de esgoto em classe A e B. Sendo como requisito para aplicação no solo ou disposição, a redução da carga patogênica. Mais de 10 anos mais tarde, em 2006, a OMS produziu dois manuais com diretrizes para o reuso de excretas, águas cinzas e águas negras na agricultura. Além das diretrizes, o documento aborda temas como impactos ambientais e socioeconômicos, riscos à saúde humana e monitoramento (WHO, 2006).

Neste sentido no Brasil, a regulamentação das excretas de forma específica é ainda hoje, inexistente. Em relação ao lodo de esgoto, em 2005 foi criada a Resolução nº 369 de 2006,

do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) que define os critérios para seu uso agrícola e disposição. Nesta resolução o lodo é definido como biossólido e classificado de acordo com a concentração de patógenos em A (contaminação até 10^3 UFC.g⁻¹) e B (10^4 – 10^6 UFC.g⁻¹). Sendo os biossólidos classe A mais restritos em relação à presença de coliformes, *Salmonella*, ovos de helmintos e vírus entéricos (CONAMA, 2006).

A resolução apresentava diversas restrições quanto ao uso, local e tempo de disposição. Em relação ao local, era proibido o uso em áreas de preservação permanente, unidades de conservação, proximidade de poços rasos e áreas de lençol freático com profundidade inferior a 1,5m. Quanto ao uso, era vedado a aplicação de biossólidos de qualquer classe no cultivo de olerícolas, tubérculos, pastagens, raízes, culturas inundadas, bem como culturas cuja parte comestível entre em contato com o solo. Ademais, a resolução ainda previa restrições em relação ao tempo de aplicação. Sendo vedada a utilização em pastagens 24 meses antes do pastoreio e 48 meses antes do plantio de culturas olerícolas, tubérculos, raízes e demais culturas. Respeitadas as condições acima, o lodo classe A poderia ser utilizado em qualquer cultura, enquanto o lodo de classe B ficaria com seu uso reservado ao cultivo de café, silvicultura e culturas para fabricação de fibras e óleos com aplicação mecanizada (CONAMA, 2006).

Apoiada em estudos de avaliação quantitativa de risco microbiológico (AQRM) aplicados ao uso de biossólidos, em 2020 foi sancionada a resolução nº 498 da Conama, revogando a resolução 369/2006. De forma geral, a resolução nº 498/2020 é menos restritiva que a resolução anterior, o que pode ampliar as possibilidades de reuso do lodo. Nela é previsto que para ser enquadrado como classe A o lodo deve atender ao limite de *Escherichia coli* de 10^3 UFC.g.ST⁻¹ e classe B de 10^6 UFC.g.ST⁻¹, além do cumprimento dos requisitos de tratamentos previstos para cada classe.

Dentre os processos de tratamento do lodo fecal previstos na legislação, destaca-se a compostagem. As exigências mínimas do processo variam de acordo com a classe do lodo, sendo os requisitos mínimos para obtenção do lodo de classe A: Compostagem confinada ou em leiras aeradas (3 dias a 55°C no mínimo) ou com revolvimento das leiras (15 dias a 55°C no mínimo, com revolvimento mecânico da leira durante pelo menos 5 dias, ao longo dos 15 do processamento) e para o lodo classe B: compostagem por qualquer um dos métodos citados anteriormente, desde que a biomassa atinja uma temperatura mínima de 40°C, durante pelo menos cinco dias, com a ocorrência de um pico de 55°C, ao longo de quatro horas sucessivas durante este período. Deste modo, é interessante ressaltar que as fezes co-compostadas atendem

os requisitos apresentados para o lodo classe A, como leiras aeradas, temperatura e padrão microbiológico estabelecido pela legislação.

Em relação ao uso, o biossólido classe A pode ser utilizado em cultivos de alimentos consumidos crus ou que a parte comestível entre em contato com o solo, desde que aplicados no mínimo 30 dias antes da colheita. O biossólido classe B permanece com a restrição de utilização em alimentos consumidos crus, bem como a restrição de 4 meses entre aplicação e a colheita de produtos não consumidos crus, 4 meses antes da colheita de forrageiras e 2 meses antes do pastejo. As alterações em relação ao local de uso também são menos restritivas, sendo a aplicação permitida em áreas degradadas e áreas protegidas e vedada em área de preservação permanente e de recursos hídricos (CONAMA, 2020).

Deste modo, para nortear a criação de normas específicas ao reuso de excretas humanas proveniente de banheiros secos, avaliações quantitativas de riscos microbiológicos devem ser desenvolvidas para os cenários que envolvem a coleta, tratamento e o uso desse material na agricultura, de forma a estimar os riscos para a saúde humana em toda a cadeia de reuso deste produto.

3.8 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO (AQRM)

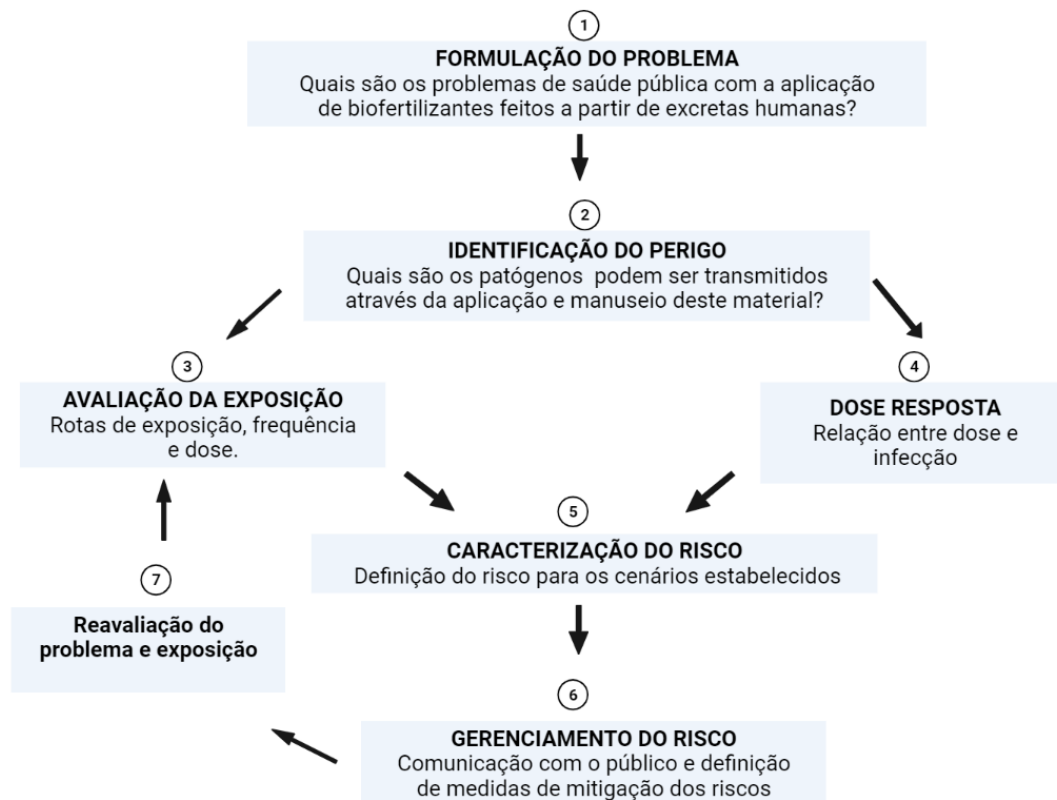
A Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM) é uma metodologia que oferece a possibilidade de estimar risco de efeitos adversos na saúde (infecção ou doença) que determinados patógenos oferecem com base em cenários de exposição e informações sobre a dose-resposta (HAAS, ROSE, GERBA, 2014).

A metodologia foi criada por volta da década de 70, para estimar os riscos ambientais no uso de compostos químicos e auxiliar o governo na elaboração de leis de proteção ambiental. Em 1983, com os métodos e princípios da metodologia já refinados, a NRC publicou o “*Red Book - Risk Assessment in the Federal Government Managing the Process*” livro que marca as diretrizes da avaliação de risco. A partir da necessidade de estabelecer diretrizes para riscos associados a agentes microbiológicos como bactérias, protozoários, helmintos e vírus, a avaliação de riscos ecológicos foi estabelecida pela EPA em 1992 (HAAS, ROSE, GERBA, 2014).

Embora seja uma área relativamente nova, a AQRM é uma importante ferramenta de apoio na tomada de decisões, sejam elas na área ambiental ou de saúde. A metodologia pode-se utilizar de dados quantitativos ou qualitativos, sendo denominada Avaliação Semiquantitativa de Risco Microbiológico quando utilizada com dados qualitativos e quantitativos conjuntamente (FAO, 2009).

Estabelecidos os cenários de forma criteriosa e consistente, é de suma importância que o sistema seja abastecido por informações que representem a realidade local de estudo de forma fidedigna. O processo envolve quatro etapas principais: identificação do perigo, avaliação da exposição, avaliação da dose-resposta e caracterização do risco.

Figura 5: Figura esquemática das etapas da Avaliação Quantitativa de Risco Microbiológico (AQRM)



Fonte: Adaptado de Sano, Haas, Rose (2019)

3.8.1 Identificação do Perigo

A caracterização do risco consiste na identificação do agente patogênico bem como do espectro de doenças associadas a este patógeno específico. Os resultados clínicos da infecção podem variar de assintomáticos até a morte. Tais dados podem ser definidos através de dados obtidos em ensaios laboratoriais, bem como dados obtidos a partir da literatura. Para identificar o risco é necessário conhecer a patogenicidade e virulência do agente, espectros de doenças causadas por este agente, a resposta do hospedeiro (imunidade), vias de exposição, além de modelos indicadores adequados ao estudo e impactos humanos causados.

Para este trabalho, o risco será caracterizado com base nos micro-organismos: *Escherichia coli* ATCC, *Salmonella* spp. e *Adenovírus Humano tipo -2 (HAdV-2)*.

3.8.1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria da família *Enterobacteriaceae* que faz parte do grupo de Coliformes Totais, na qual abrange bastonetes Gram negativos de 2 µm de comprimento e 1 µm de largura. Dentro deste grupo há um subgrupo chamado de coliformes termotolerantes, de ocorrência mais restrita às fezes humanas e animais homeotermos no qual a *E. coli* está inserida, sendo a integrante mais numerosa desse subgrupo (CEBALLOS; DINIZ, 2017).

Os coliformes termotolerantes, são bactérias que fermentam a lactose em temperaturas de 37°C a 44,5° C, com produção de ácido, aldeídos e gás. São consideradas oxidases negativas e reduzem nitratos a nitritos. Em razão de sua abundância no intestino como comensais e mutualistas e por serem eliminadas em grande quantidade nas fezes, coliformes termotolerantes têm sido empregados como indicadores ambientais nos últimos 120 anos, sendo a *E. coli* a única do grupo dos coliformes termotolerantes que confirma a contaminação fecal.

A *E. coli* caracteriza-se pela presença da enzima β -glucuronidase, que age sobre o substrato *4-Methyl-Umbilipheril- β -D-Glucoronosídeo* (MUG) liberando *4-Methyl-Umbilipheril* que produz luminescência azul sob luz UV de λ 360 nm, auxiliando na identificação através de testes cromogênicos. Ademais, produzem Indol a partir do aminoácido triptofano (CEBALLOS; DINIZ, 2017). Embora as espécies de *E. coli* que fazem parte da biota intestinal não sejam patogênicas, existem linhagens ou cepas patogênicas, veiculadas por sistemas hídricos, alimentos e contato pessoa a pessoa que podem causar doenças no trato urinário e sepse, além de diversos surtos diarreicos associados a estirpes de *E. coli*, diferenciados pela presença de fatores de virulência, tais quais: adesinas fimbriais e afimbriais, toxinas e invasinas (SOUZA et al, 2016). As estirpes patogênicas diarreicas atualmente conhecidas são: *EPEC*: *E. coli* enteropatogênica, *EHEC*: *E. coli* enterohemorrágica, *EAEC*: *E. coli* enteroagregativa, *ETEC*: *E. coli* enterotoxigênica, *DAEC*: *E. coli* aderente difusa e *EIEC*: *E. coli* enteroinvasora (NATARO; KAPER, 1998). A excreção da *E. coli* nas fezes giram em torno de 10^6 a 10^9 (HAAS, ROSE, GERBA, 2014).

3.8.1.1.1 *EHEC: E. coli enterohemorrágica*

E. coli enterohemorrágica também é conhecida como produtora da toxina *Shiga* ou *STEC*. Essa estirpe foi descrita pela primeira vez em 1982, após um surto de colite no EUA. Um sorotipo conhecido de *EHEC* é a *E. coli O157:H7*. Esse organismo produz toxinas chamadas de *verotoxinas I e II*. A produção desta toxina depende da presença de um bacteriófago, que

insere seu DNA dentro do cromossomo bacteriano codificando o plasmídeo para um novo tipo de fimbrias que se aderem na parede intestinal iniciando a doença. Sua forma de transmissão é através de alimentos, contato pessoal, água e transmissão por animais (HAAS, ROSE, GERBA. 2014). O período de incubação é de 72 a 120 h. A duração da doença é de 2-12 dias. A Infectividade é de ID 50: $2.11E+06$ e α : $1.55E-01$.

3.8.1.2 *Salmonella*

A *Salmonella* faz parte da família *Enterobacteriaceae* e existem mais de 1800 serovares conhecidos. A bactéria se caracteriza por um bacilo gram-negativo anaeróbico facultativo que está presente nos humanos e animais. Nos seres humanos, a contaminação por *Salmonella* assume a forma de uma intoxicação alimentar autolimitada (gastroenterite). Ocasionalmente, pode se manifestar como uma infecção sistêmica grave (febre entérica). Espécies de *Salmonella* não tifoide tem os animais como o principal reservatório, e a doença é geralmente de origem alimentar, embora possa ser disseminada de pessoa para pessoa. As salmonelas que causam a febre tifoide e outras febres entéricas propagam-se principalmente de pessoa para pessoa através da via fecal-oral e não têm reservatórios animais significativos (GIANNELLA, 1996).

O período de incubação da *Salmonella gastroenteritis* (intoxicação alimentar) depende da dose. Os sintomas começam geralmente 6 a 48 horas após a ingestão de alimentos ou água contaminados e geralmente tomam a forma de náuseas, vômitos, diarreia, e dores abdominais. Sintomas como: mialgia, febre (38°C a 39°C), câibras abdominais, calafrios e dor de cabeça são comuns; no entanto, a principal manifestação é diarreia. A duração dos sintomas é de 2 a 7 dias.

Para a *Salmonella typhi*, causadora da febre tifoide, os sintomas começam após um período de incubação de 10 a 14 dias. As febres entéricas podem ser precedidas por gastroenterite. Os sintomas não são específicos e incluem febre, anorexia, dores de cabeça, mialgias e obstipação (CDC, 2022). A infectividade ID50 é de: $1.11E+06$ e α : $1.75E-01$

3.8.1.3 *Adenovirus*

O adenovírus é um vírus pertencente à família *Adenoviridae*, dividida em 4 filós de acordo com seus hospedeiros: *mastadenovirus* (mamíferos), *aviadenovirus* (aves), *atadenovirus* (ruminantes, répteis e marsupiais) e *siadenovirus* (aves, anfíbios e peixes). Possui formato icosaédrico, sem envelope. Mede cerca de 70 a 100 nm de diâmetro e é formado por um DNA

de fita dupla. Existem cerca de 90 diferentes sorotipos de *adenovirus* (*AdV*), dos quais 57 afetam exclusivamente humanos (*HAdV*) (SMITH, 2015).

Os Adenovirus humanos foram inicialmente isolados por Rowe et al. (1953) em tecido adenoide removidos cirurgicamente de crianças em estados febris. Ele foi descrito como um agente patógeno causador de degeneração espontânea em células epiteliais, podendo se replicar no trato respiratório e na mucosa do olho, trato intestinal e urinário. Dentre as doenças associadas ao *Adenovirus* estão: gastroenterites, diarreias, doenças do trato urinário, conjuntivite, febre aguda, infecções em imunodeprimidos além de infecções respiratórias, como: pneumonia, faringite febril aguda e meningoencefalite (HAAS, ROSE, GERBA, 2014).

Os *AdEVs* são a terceira causa mais comum de gastroenterite viral em crianças. Sua concentração nas fezes de infectados por chegar a 10^{11} por grama de fezes (SRIWANNA et al., 2013). A transmissão ocorre por ingestão de água contaminada, contato direto e aerossóis. Seu período de incubação é de 8-10 dias e a duração da doença é de 8 dias. A infectividade ID50 é de: $1.14E+00$ e α : $6.07E-01$

3.8.2 Avaliação da exposição

A avaliação da exposição consiste na determinação do tamanho e natureza da população exposta, bem como a rota, concentrações, distribuições dos micro-organismos e duração da exposição. A definição da exposição não se baseia apenas na concentração e sim na prevalência (quão frequentemente os micro-organismos são encontrados) e em sua distribuição no tempo e no espaço. A análise de exposição depende dos métodos corretos para recuperar, detectar e quantificar a viabilidade e os marcadores de virulência. Destarte, são necessários estudos sobre os micro-organismos e suas fontes no ambiente, taxas de sobrevivência, transporte, capacidade de recrescimento, destino e em casos de algumas bactérias, a resistência à fatores ambientais (temperatura, umidade, salinidade, incidência solar), bem como o movimento através do ar, solo e água (HAAS et al. 2014).

Para este estudo, o modelo de exposição é aplicado ao uso agrícola de biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas no plantio e manejo, bem como do consumo das hortaliças fertilizadas com esse tipo de produto. Desta forma, os cenários são estipulados com base nos grupos de risco associados a tal prática e compreensão da dinâmica de contato do material patógeno com os envolvidos do plantio até a colheita. Assim, para a estimativa da dose através do plantio de vegetais biofertilizados com excretas humanas, se torna necessária a obtenção dos seguintes dados: (i) concentração de patógenos no biofertilizante; (ii) taxas de aplicação (iii)

decaimento no solo; (iv) modo de aplicação (manual ou mecanizada); (v) ingestão acidental de partículas de biofertilizante durante aplicação e (vi) ingestão acidental de partículas de solo durante o manejo do sistema solo-planta, (vii) quantidade de solo aderido na cultura, (viii) redução após processo de lavagem, (ix) quantidade de hortaliça consumida por dia (MAGALHÃES, 2012).

3.8.3 Análise da Dose-Resposta

O objetivo do modelo de dose-resposta é a caracterização matemática da relação entre a dose administrada e a probabilidade da infecção, doença ou morte na população exposta. Desta forma, a dose ingerida (d) e o risco (P_i) são calculados com base na relação de dose-resposta, resultando na probabilidade de infecção decorrente da exposição (REGLI et al., 1991; HAAS et al., 2014).

A princípio na literatura, sustentava-se o conceito de “dose mínima infectante”. Dados obtidos por meio de estudos experimentais levavam à ideia de que era necessário um nível mínimo de patógenos a ser ingerido para desencadear uma infecção ou doença. No entanto, em abordagens mais recentes, os modelos são baseados no fundamento que mesmo um único organismo viável é capaz de causar uma infecção ou doença, devido ao potencial de se multiplicar no hospedeiro (MAGALHÃES, 2012).

Matematicamente, a probabilidade de um patógeno superar as barreiras impostas pelo hospedeiro e desencadear uma infecção ou doença tem valor (r) diferente de zero. Desta forma, admitindo que o comportamento de cada patógeno seja independente dentro do hospedeiro, a probabilidade de infecção pode ser descrita como um processo binomial, ou seja, infecção ou não infecção. Logo, se a probabilidade de infecção é r , a probabilidade de não infecção pode ser definida como $1-r$. Desta forma, em uma série de ensaios (n) independentes de acordo com o número de micro-organismos ingeridos a probabilidade de não infecção $(1-r)^n$. A partir destas equações básicas que expressam a possibilidade binomial de infecção, uma série de modelos de dose resposta foram criados, sendo os modelos Exponencial e Beta-Poisson os mais utilizados (HAAS et al, 2014).

3.8.3.1 Modelo Exponencial:

O modelo exponencial assume que os micro-organismos patogênicos são distribuídos aleatoriamente no ambiente. E que para um dado patógeno, cada organismo dentro do hospedeiro tem a mesma possibilidade constante de sobrevivência. Assim, neste modelo, ignora-se a

probabilidade de cada organismo de sobreviver e iniciar uma infecção, considerando que todo organismo tem a mesma probabilidade infecciosa (HAAS et al., 2014). O modelo é representado de acordo com a Equação 1:

$$P_i(d) = 1 - e^{-r} \text{ (eq. 1)}$$

Onde: $P_i(d)$: probabilidade de infecção associada a uma única exposição à dose d ; d = dose ingerida de patógenos; e r = parâmetro característico da interação agente- hospedeiro.

3.8.3.2 Modelo Beta-Poisson

O modelo Beta-Poisson, por sua vez, assume que há variação na probabilidade de sobrevivência e reprodução do micro-organismo dentro do hospedeiro. Essas variabilidades podem ser relacionadas ao patógeno (infecciosidade, patogenicidade e viabilidade), bem como ao hospedeiro (imunidade, estado nutricional e condições socioeconômicas) (HAAS et al., 2014).

Desta forma, o parâmetro r deixa de ser constante e assume uma variabilidade de acordo com a distribuição de probabilidade. Essas variabilidades são representadas matematicamente pelos parâmetros α e β conforme modelo matemático expressado pela equação 2:

$$P(i) = 1 - \left(1 + \frac{d}{\beta}\right)^{-\alpha} \text{ (eq. 2)}$$

Onde $P(i)$ = probabilidade de infecção; d = dose ingerida; α e β = parâmetros característicos da interação agente- hospedeiro.

Para obter os dados necessários para mensuração da dose resposta, os micro-organismos devem, preferencialmente, serem mensurados em ensaios laboratoriais através meios de cultura em ágar seletivos para bactérias, culturas celulares para vírus e contagem direta em microscópio para protozoários e helmintos, além de técnicas moleculares como PCR.

3.8.4 Caracterização do risco

A caracterização de risco é uma integração dos dados das etapas anteriores e a estimativa da magnitude do problema de saúde pública com base na probabilidade de que ocorra a infecção ou doença com base nos cenários estabelecidos, bem como a variabilidade e incerteza dos resultados preditivos. Durante a avaliação de risco as incertezas e variabilidades devem ser levadas em consideração. As incertezas podem estar relacionadas ao modelo escolhido, parâmetros da análise, concentração dos micro-organismos e o volume ingerido em cada exposição. As

variabilidades, por sua vez, podem estar relacionadas com as características dos indivíduos e dos micro-organismos patogênicos.

A probabilidade de distribuições alcançadas com a AQRM abrange principalmente 4 entradas principais (HAAS et al., 2014):

I- O espectro dos efeitos adversos na saúde: A população pode ser assintomática ou sintomática, pode ainda procurar ou não um serviço de saúde, desenvolver ou não doenças crônicas ou morrer.

II- Os intervalos de confiança que baseiam a dose-resposta: Limitados por dados experimentais utilizados para desenvolver os modelos.

III- A distribuição e a ocorrência dos micro-organismos patogênicos que podem elevar a dose inicial, sejam elas mudanças espaciais e temporais, sobrevivência, recrescimento, inativação e recuperação.

IV- A distribuição da exposição: A quantidade de água ou comida ingerida, ar ou solo inalado.

A estimativa de risco é normalmente interpretada em base anual, através de curvas de probabilidade de infecção ou através do DALY (Disability Adjusted Lost Years). Entretanto, pode se referir ao risco de um período mais curto ou mais longo. Por exemplo: um número n de exposições durante x meses (MAGALHÃES, 2012).

O DALY é uma medida proposta pela OMS que pode expressar a quantidade de anos de vidas que são perdidos em decorrência de uma contaminação microbiológica. O DALY varia entre 0 e 1, sendo 0 a representação do melhor cenário, onde nenhum ano de vida é perdido e 1 o pior cenário, onde ocorre o óbito em decorrência da contaminação. O DALY se baseia no conceito de carga de doença, ou seja, possibilita a transformação de uma incapacidade vivenciada em decorrência de uma doença (ex. quatro dias de internação por diarreia ou óbito) em anos de vida saudáveis perdidos através da soma dos anos de vida perdidos por morte precoce (YLL – Years of Life Lost) e dos anos de vida vividos com alguma limitação de saúde (YLD – Disability Life Years). A carga tolerável de doença estipulada pela OMS é de 1×10^{-6} DALY pppa (WHO, 2013).

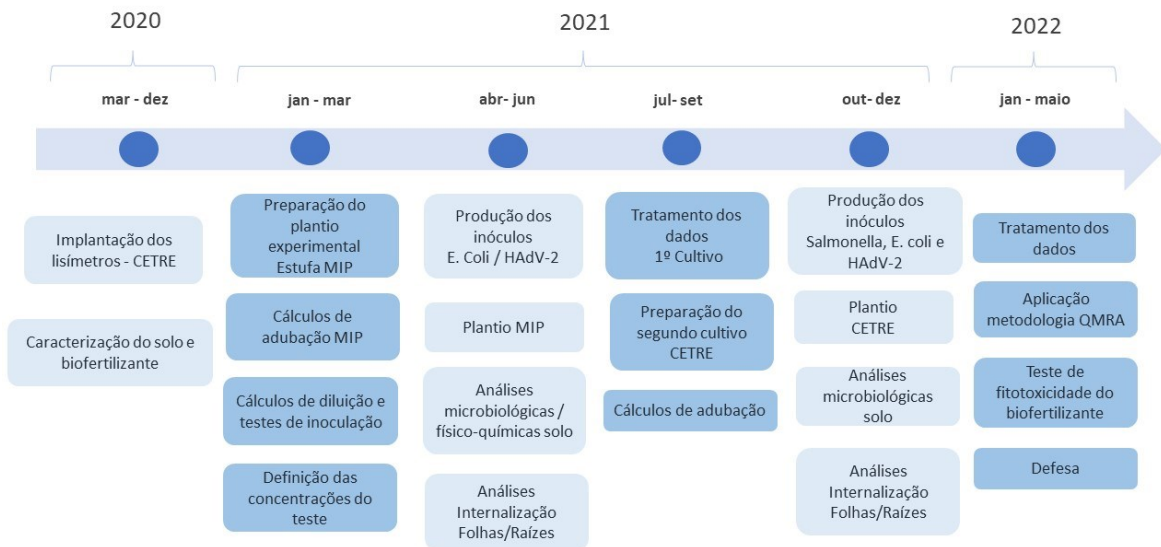
4 MATERIAIS E MÉTODOS

A presente pesquisa está inserida na área de tratamento de efluentes domésticos, agropecuários e industriais, voltada para a recuperação de recursos desses sistemas de forma segura. O grupo de pesquisas em Recuperação de Recursos de Sistemas de Saneamento (RReSSa) está localizado no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) do Centro Tecnológico (CTC) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), campus de Florianópolis-SC. O laboratório foi idealizado pela pesquisadora Dra. Magri como continuação da pesquisa desenvolvida em sua tese, intitulada: Aplicação de processos de estabilização e higienização de fezes e urina humanas em banheiros secos segregadores (2013). O laboratório está em operação desde 2017 e neste período tem desenvolvido pesquisas sobre o potencial agronômico das excretas humanas, contaminação e inativação dos micro-organismos patogênicos ao longo do processo de tratamento e posterior uso no solo como fertilizante.

Dentre os trabalhos produzidos pelo grupo, destaca-se a pesquisa de Franco (2020), que analisou o processo de inativação de patógenos durante o processo de precipitação da estruvita. A pesquisa de mestrado de Carlon (2021) e o trabalho de conclusão de curso de Silveira (2021), que testaram o potencial agronômico dos biofertilizantes produzidos a partir de excretas humanas e a contaminação do solo e lixiviado após a aplicação. Além do trabalho de conclusão de curso de Andrade (2020), que estudou o processo de co-compostagem das fezes com resíduos orgânicos e a inativação dos patógenos durante o processo.

Para a realização deste estudo, a presente pesquisa foi dividida em etapas, totalizando dois experimentos de cultivo para obtenção de dados microbiológicos do solo e plantas, avaliação da fitotoxicidade das fezes co-compostadas e avaliação quantitativa de risco microbiológico. O fluxograma com distribuição de atividades ao longo do tempo pode ser visto na figura 6.

Figura 6: Fluxograma de distribuição de atividade no tempo aplicado à pesquisa



Fonte: A autora 2022

4.1 COLETA E TRATAMENTO DAS FEZES CO-COMPOSTADAS COM RESÍDUOS ORGÂNICOS

A co-compostagem foi realizada em parceria com o grupo RReSSa no Hotel SESC, localizado no bairro Cacupé em Florianópolis, sob as coordenadas geográficas de referência: 27°32'34.8" de latitude (S) e 48°31'25.3" de longitude (O). O pátio de compostagem está localizado na área de Educação Ambiental do hotel e possui capacidade para compostar 500 kg de resíduos orgânicos diariamente.

As excretas foram coletadas no banheiro seco localizado no espaço de Educação Ambiental (Figura 7). O modelo utilizado é uma cabine adaptada que conta com um mictório para os homens e um vaso sem separação para as mulheres. Sendo assim, é considerado um banheiro seco sem separação de urina. O material utilizado para recobrimento foi a serragem. As fezes foram coletadas entre outubro de 2018 e dezembro de 2019 e foram armazenadas em bombonas fechadas, à sombra para posterior co-compostagem. No total, foram 960 kg de fezes com serragem distribuídas em 30 bombonas. Os resíduos orgânicos, por sua vez, eram provenientes do restaurante também localizado no hotel (ANDRADE, 2020).

A compostagem foi realizada através do método UFSC de compostagem (INÁCIO, MILLER, 2009). Para isto, foi utilizada uma área de 40 m², onde foi realizada a limpeza do terreno e o assentamento de uma leve inclinação para coleta de lixiviado junto a um contentor.

Então, foram instaladas lonas para a impermeabilização da área, de modo a evitar a contaminação do solo.

Foram montadas 3 leiras de 3,00 m de comprimento por 1,5 m de largura. A montagem das leiras, respeitou a ordem estabelecida pelo método UFSC, iniciando a leira com materiais fibrosos como galhos e folhas, seguida por palha que servirá de base. Em seguida, é adicionada a maravalha. A partir deste ponto, foi realizada a primeira adição de resíduos orgânicos, seguida por uma camada de maravalha, e, por fim, a palha como telhado da leira.

Figura 7: Banheiro seco sem segregação de urina, Hotel SESC, Cacupé, Florianópolis-SC.



Fonte: ANDRADE, 2020

As leiras receberam resíduos orgânicos do dia 06 de dezembro até o dia 16 de dezembro (2019), a cada 3 dias. Após este período, quando as leiras atingiram a fase termofílica, as excretas puderam então ser inseridas no sistema. Assim, três adições de excretas foram realizadas seguindo um intervalo de 11 dias entre elas. Durante os intervalos, 6 bombonas de resíduos orgânicos foram adicionadas, seguindo a proporção de resíduos orgânicos e fezes de 4:1, com última adição de resíduos em 16 de janeiro de 2020. No total, cerca de 4 mil kg de resíduos foram utilizados no processo de co-compostagem. O processo de reviramento teve duração aproximada de 5 semanas, seguido pelo processo de maturação, que consiste na regulação do pH e temperatura do composto, oscilando de acordo com as condições ambientais.

Figura 8: a) Leira de compostagem de resíduos orgânicos e fezes humanas. b) Bombonas de armazenamento de fezes para co-compostagem com resíduos orgânicos, Hotel SESC – Cacupé, Florianópolis.



Fonte: ANDRADE, 2020

Ao final do processo de maturação, se obteve um material estável, sem odor, com pH 5,8, 37,6 g.kg⁻¹ de Nitrogênio, 53,20 g.kg⁻¹ de P₂O₅ e 33,48 g.kg⁻¹ de Potássio. As análises dos teores de N P K foram realizadas pelo laboratório Solanálise, em Cascavel/PR.

4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROBIOLÓGICA DO BIOFERTILIZANTE

As análises microbiológicas das fezes co-compostadas foram realizadas no laboratório de microbiologia do Grupo RReSSa para os seguintes micro-organismos: *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Enterococcus faecalis* e bacteriófagos *Colifago somático* e *RNA F-específico*. Para a preparação das amostras, foi realizada a diluição de 1 g de biofertilizante em 9 mL de solução salina peptonada, seguida de diluição seriada e plaqueamento em ágares específicos. As bactérias *E. coli* e *Salmonella* foram plaqueadas em ágar MacConkey e ágar XLD (Xilose Lisina Desoxicolato), respectivamente, e incubadas a 37°C±2 por 24 h. *Enterococcus faecalis* foram plaqueadas em ágar SLABA (Slanetz-Bartley) e incubadas a 44,5 °C ± 2 por 48 h.

Para as análises dos bacteriófagos foi utilizado o método de duplo ágar de Adams (1959). As bactérias hospedeiras foram cultivadas em caldo nutriente por 3- 5 h a 37°C. Colifagos somáticos foram cultivados utilizando a hospedeira *Escherichia Coli* e plaqueados em

placas de ágar MSA (Modified Scholtens' Agar), *RNA F-específico* foram cultivados utilizando a hospedeira *Salmonella entérica* e plaqueados em placas de ágar TYGA (Tryptone Yeast Extract Glucose Agar), ambos incubados a $37^{\circ}\text{C} \pm 2$ por até 18 h. As análises foram realizadas conforme metodologia prevista na ISO 10705-2 (2000) e ISO 10705-1 (1995). Os resultados foram obtidos em unidades formadoras de colônias para as bactérias (UFC.g^{-1}), e unidades formadoras de placa por grama de amostra para os bacteriófagos (UFP.g^{-1}).

4.3 ENSAIO DE FITOTOXICIDADE DAS FEZES CO-COMPOSTADAS

O teste foi conduzido utilizando placas de petri de 90mm forradas com papel filtro quantitativo com 10 sementes de alface (*Lactuca Sativa*) de tamanhos idênticos distribuídas de forma uniforme. Como as fezes co-compostadas se encontram na forma sólida com peso específico baixo, o biofertilizante foi misturado em água mineral nas proporções de 10, 25 e 50 % para obtenção da solução utilizada no teste. A solução foi filtrada e então uma alíquota de 2 ml de cada concentração foi utilizada nas placas. Um controle foi realizado com água mineral, em conformidade com a ISO 17126. A incubação das sementes ocorreu por 5 dias a 22°C . Ao final a contagem das sementes germinadas e do tamanho das raízes foram conduzidas (PRIAC et al. 2017). Os cálculos para a determinação da germinação relativa das sementes (Equação 3), cálculo do comprimento relativo da raiz (CCR) (Equação 4) foram conduzidos através do software Excel. Os dados foram tratados estatisticamente através de análise de variância ANOVA, de forma a verificar a diferença estatística entre as diferentes concentrações e o controle. E teste de *Tukey* para verificar as diferenças estatísticas entre as médias.

$$GRS(\%) = \frac{n^{\circ} \text{ sementes germinadas na amostra}}{n^{\circ} \text{ sementes germinadas no controle}} \quad (\text{eq. 3})$$

Onde: GRS: Germinação relativa das sementes.

$$CRR(\%) = \frac{\text{Comprimento total das raízes germinadas na amostra}}{\text{Comprimento total das raízes germinadas no controle}} \quad (\text{eq. 4})$$

Onde: CRR: Crescimento relativo das raízes.

$$IG\% = \frac{GRS * CRR}{100} \quad (\text{eq.5})$$

Onde: IG: Índice de germinação.

4.4 CÁLCULO DA DEMANDA DE BIOFERTILIZANTE

A demanda de fertilização foi calculada conforme os teores nutricionais indicados para a cultura analisada e de acordo com os teores nutricionais do solo. Assim, a adubação foi realizada em função do nutriente limitante, ou aquele que primeiro atinge as demandas de fertilização. Para as fezes co-compostadas o nutriente limitante é o fósforo. Ademais, o fósforo é o nutriente com menor motilidade no solo, se comparado ao nitrogênio e potássio e seu excesso pode ser prejudicial à absorção dos nutrientes pelas plantas (LOURENZI; SCHERER; CERETTA, 2016).

4.4.1 Adubação dos vasos para o primeiro experimento

Uma vez que os cálculos de adubação consideram a área em m², e que a profundidade para aplicação é de 0,2m, a adubação para os vasos foi dimensionada considerando que 1 há corresponde a 2000 m³ ou 2⁶ dm³. Assim, é realizada a conversão dos valores necessários de nutrientes de quantidade de N ou P por vaso para quantidade de biofertilizante em g por vaso (Equações 6 e 7). Para garantir o crescimento das alfices até o final do ciclo de cultivo sem a perda de nenhuma planta, a quantidade de fezes co-compostadas neste experimento foi maior, totalizando 550 kg de P por hectare.

$$\text{Quant. necessária de N ou P / vaso} = \frac{\text{g biof.ha}^{-1} \times \text{área vaso (dm}^3\text{)}}{2.000.000 \text{ dm}^3 \text{.ha}^{-1}} \quad (\text{eq. 6})$$

$$\text{g de biofertilizante/vaso} = \frac{1000 \times \text{Quant. de nutriente por vaso}}{\text{Quant. nutriente no biof.} * \text{Índice de eficiência}} \quad (\text{eq. 7})$$

4.4.2 Fertilização dos lisímetros para o segundo experimento

Para realizar o cálculo de demanda de biofertilizantes do segundo experimento, foi utilizado o valor em g em relação a massa do biofertilizante. Assim, 1 kg de fezes co-compostadas possui 53,20 g de P₂O₅. Deste modo, os valores devem ser convertidos para o teor nutricional sugerido para a cultura com base nos teores nutricionais do solo que constam no Manual de Adubação e Calagem (2016). O cálculo de fertilizante por hectare pode ser visto na equação 8.

$$\text{g de biofertilizante por hectare} = \frac{100 \times \text{teor nutr. sugerido para a cultura}}{\text{P}_2\text{O}_5 \text{ (\%)}} \quad (\text{eq. 8})$$

O resultado é obtido em quilo por hectare (kg. ha^{-1}), sendo necessário a conversão para a área do lisímetro que é de $1,8 \text{ m}^2$, conforme equação (9):

$$\text{kg de biofertilizante por lisímetro} = \frac{\text{kg biof. ha}^{-1} \times \text{área lisímetro}(\text{m}^2)}{10.000 \text{ m}^2/\text{ha}} \quad (\text{eq. 9})$$

É importante ressaltar que devido às diferenças de solubilidade e disponibilidade dos nutrientes os resultados obtidos na equação acima devem ser divididos pelo índice de eficiência do biofertilizante. Como os fertilizantes produzidos a partir de excretas não possuem índice de eficiência optou-se por admitir índice de eficiência de 0,8 (80%) para fósforo, 0,6% (60%) para nitrogênio e 1,0 (100%) para potássio para as fezes co-compostadas, conforme biofertilizantes correlatos que constam no Manual de Calagem e Adubação dos Estados de SC e RS (2016).

4.5 INOCULAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS NOS BIOFERTILIZANTES

Neste estudo optou-se por realizar a inoculação dos micro-organismos nos biofertilizantes, ao invés da água de irrigação ou no solo. O motivo é a possível simulação do comportamento dos patógenos presentes em um biofertilizante contaminado e aplicado na adubação de culturas agrícolas. Para isto, foram utilizados os micro-organismos modelos: *Escherichia coli* ATCC13706, *Salmonella entérica* WG49 NCTC12484, e *Adenovírus Humano tipo 2*(HAdV-2).

4.5.1 Preparação da solução inóculo

O inóculo das bactérias *Escherichia coli* ATCC13706 e *Salmonella entérica* WG49 NCTC12484 foram produzidos no Laboratório do RReSSa, no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

A propagação das bactérias foi realizada por meio da adição de uma alíquota de 2 mL da bactéria congelada em aproximadamente 50 mL de meio MSB (Modified Scholtens' Broth) para *Escherichia coli* ATCC13706 e TYGB (Tryptone Yeast Extract Glucose Broth) para *Salmonella entérica* WG49 NCTC12484, com posterior incubação a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ com agitação a 40 s^{-1} overnight, com nova adição de meio 12 h após o início do crescimento.

A propagação do Adeno vírus humano tipo 2 (HAdV2) foi realizada no Laboratório de Virologia Aplicada (LVA) no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP) da UFSC, conforme metodologia proposta por Moresco (2016). Para a produção do es-

toque viral é necessário realizar o cultivo celular. Para isto foram utilizadas células A549 (células epiteliais derivadas de carcinoma de pulmão humano). O crescimento e manutenção foram realizados em garrafas de cultura celular com meio de crescimento DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium), suplementado com 5% de soro fetal bovino [(SFB) (Gibco)] e 1% de antibióticos e antifúngico [PSA (penicilina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$; anfotericina B 0,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (Cultilab)]. As células foram então mantidas em estufa a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂.

Para a produção do estoque viral, foi realizada a infecção in vitro de 1mL de fluido original (estocado a -80°C) de *HAdV-2* em uma monocamada confluyente de células A549 cultivadas em garrafas de 75 cm². A infecção foi monitorada em microscópio invertido para visualização dos efeitos citopáticos e detecção de mudanças morfológicas ocorridas nas células devido a infecção viral e lise celular. Estes efeitos ocorrem em cerca de 80% da monocamada celular. As garrafas foram então congeladas (-80 °C) e descongeladas três vezes de forma a liberar os vírus intracelulares. O fluido foi então centrifugado (350xg, 5min) para remoção dos restos celulares e então aliquoteado e congelado a -80°C (MORESCO, 2016).

A determinação do título do estoque viral de *HAdV-2* foi realizada por meio de ensaio de formação de placa de Lise de acordo com metodologia de Cromeans et al. (2008). Os valores obtidos estão expressos em Unidades Formadoras de Placa por mL (UFP mL⁻¹).

4.5.2 Incorporação das soluções de inóculo nos biofertilizantes

A incorporação dos micro-organismos nos biofertilizantes foi realizada de forma manual. Após a incorporação, foram deixados 24 horas a 20 °C, em local escuro para aclimação e posterior aplicação nos lisímetros (MURPHY et al., 2016). Após aclimação os biofertilizantes contaminados foram incorporados no solo manualmente. (JOHANNESSEN et al., 2005).

4.6 PLANTIO EXPERIMENTAL 1: RELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE CONTAMINAÇÃO DO BIOFERTILIZANTE E A CONTAMINAÇÃO NO SOLO E PLANTAS.

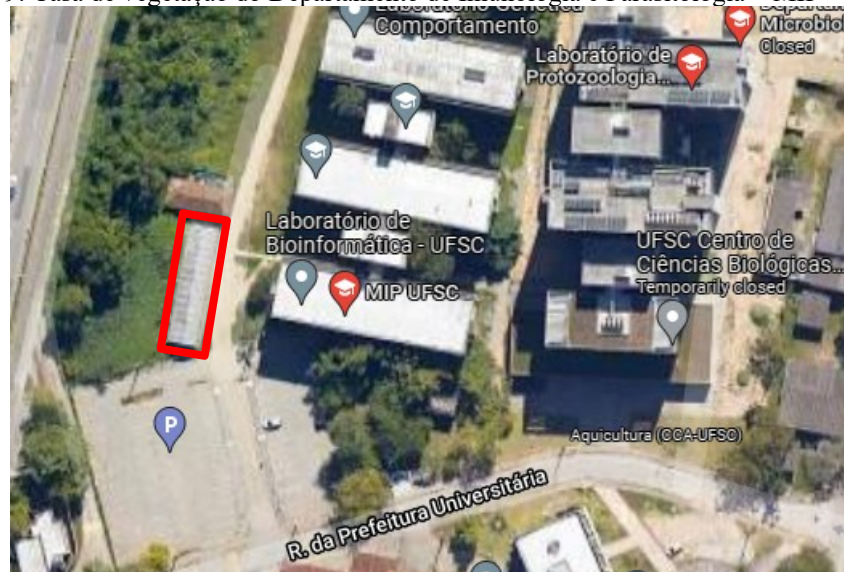
Na fase inicial da pesquisa foi realizado o primeiro cultivo experimental cujo objetivo foi analisar a relação entre a concentração de micro-organismos no biofertilizante e o processo de internalização e a contaminação do solo durante o ciclo de cultivo.

4.6.1 Localização e Design experimental

O experimento foi realizado na casa de vegetação do Departamento de imunologia e parasitologia (MIP) da UFSC, localizado em Florianópolis sob as coordenadas 27° 34' 51,0" de latitude (S) e 48° 30' 24,0" de longitude (O) (Figura 9).

O experimento consistiu em 36 vasos com capacidade de 2,5 kg cada, biofertilizados com fezes co-compostadas e inoculados com 3 concentrações distintas dos patógenos modelos: *Escherichia coli* e *Adenovirus Humano (HAdV-2)*. As soluções de inóculo nas devidas concentrações foram definidas e produzidas em laboratório por meio de cultivo/propagação, e inoculadas nos vasos onde foram transplantadas as mudas de alface da subespécie *Vera* com 33 dias de idade. A distribuição dos vasos e da amostragem semanal foi definida através de randomização simples realizada com o programa *Microsoft Excel*®. As amostras foram destrutivas, portanto, não houve análise de produtividade ao final do experimento.

Figura 9: Casa de vegetação do Departamento de Imunologia e Parasitologia – MIP

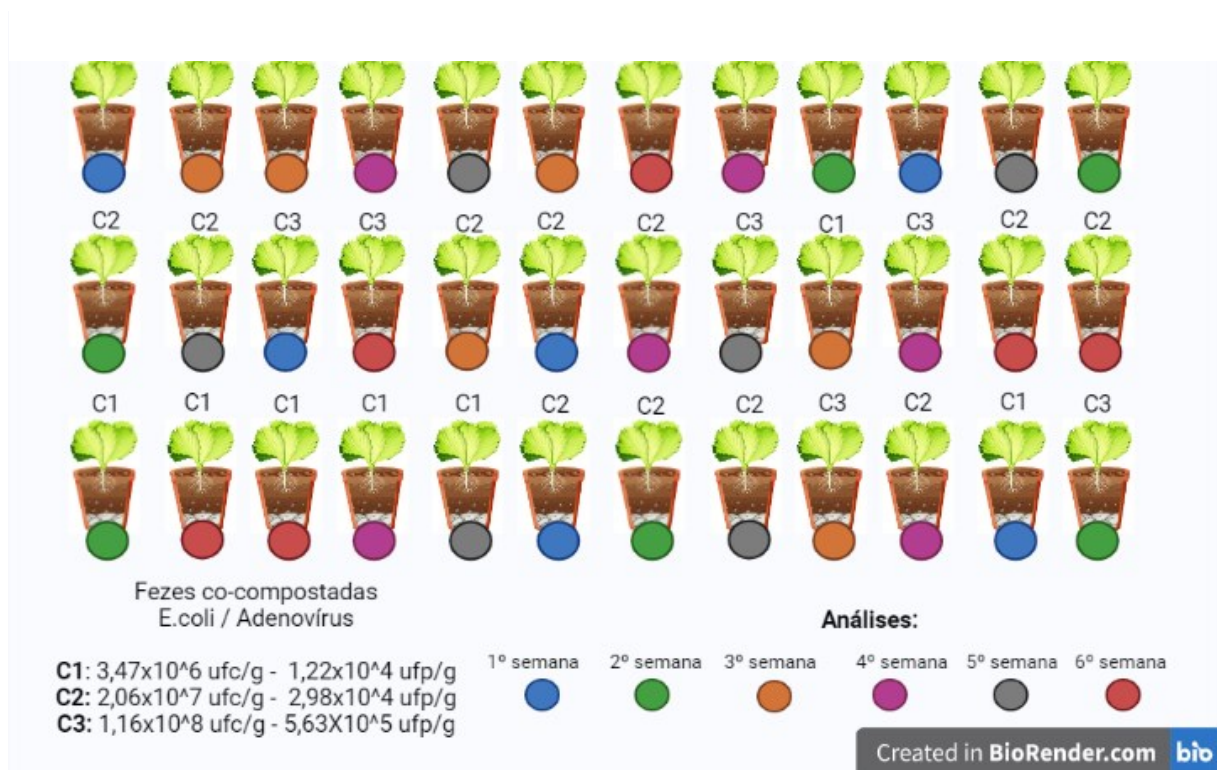


Fonte: A Autora (2021)

O cultivo foi realizado entre os meses de abril e maio de 2021, sendo a temperatura média do período registrada em 19 °C. A irrigação do cultivo foi realizada conforme as necessidades das plantas. Assim, as regas eram realizadas apenas nos vasos que apresentavam o solo seco. Eram dispensados cerca de 100-200 mL de água potável por vaso em cada rega. As análises microbiológicas de internalização foram conduzidas de forma semanal nas folhas e raízes das 3 concentrações em duplicata, totalizando 6 amostras (vasos) por semana, durante 6 semanas de experimento (Figura 10). No mesmo período, foram conduzidas análises microbiológicas

do solo de forma a determinar o decaimento da bactéria *E. coli* entre o plantio e a colheita. Análises relacionadas aos parâmetros físico-químicos do solo, pH e umidade foram conduzidas na mesma frequência. Os círculos coloridos abaixo de cada vaso indicam a semana em que ele foi analisado (Figura 10).

Figura 10: Layout ensaio de definição da relação entre o processo de internalização e concentração.



Fonte: A autora (2021)

4.6.2 Solo

O solo utilizado possuía CTC de 4,09, pH 6,9 e teores de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) 1,7 e 1,5 cmolc.dm^3 , respectivamente. Teores de fósforo (P) de 2,3 mg.dm^3 , potássio (K) 18 mg.dm^3 e matéria orgânica 0,7 mg.dm^3 . conforme Manual de Adubação e Calagem Dos Estados de Santa Catarina e Rio Grande Do Sul (2016), os níveis nutricionais no solo eram considerados como muito baixo. O cálculo da demanda de biofertilizante foi realizado conforme cálculo descrito na sessão 4.3.1. Considerando a área do vaso de 11 cm de altura e 17 cm de diâmetro e o teor de fósforo do biofertilizante em 53,20 g.kg. A quantidade de fósforo sugerido para a cultura segundo manual de adubação e calagem era de 240 kg. ha^{-1} . Entretanto, visando garantir o crescimento das alfaces apenas com o uso do biofertilizante, optou-se por utilizar no

experimento em vasos a taxa de aplicação de 550 kg. ha⁻¹. Assim, a quantidade de fezes co-compostadas necessária para fertilizar cada vaso de 2,5 kg foi de 22g.

4.6.3 Inoculação das fezes co-compostadas para obtenção de diferentes concentrações de contaminação.

Para a produção dos inóculos de *E. coli* e *HAdV-2*, o procedimento foi realizado conforme sessão 4.5.1. Para se obter diferentes concentrações, os micro-organismos foram inoculados em diferentes porcentagens em relação ao peso do biofertilizante. O volume de cada micro-organismo utilizado para inoculação foi de 0,44 mL, 1,11 mL e 5,6 mL alcançando as porcentagens de 2% (C1), 5% (C2) e 25% (C3). As concentrações finais de patógenos nos biofertilizantes foram de: 3,47 x 10⁰⁶, 2,06 x 10⁰⁷ e 1,03x10⁰⁸ UFC.g⁻¹ para *E. coli* e 6,50 x 10⁰³, 9,50 x 10⁰³ e 8,50 x 10⁰⁵ UFP.g⁻¹ para *HAdV-2* nas concentrações C1, C2 e C3 respectivamente. Após a inoculação, os biofertilizantes atingiram 68,22%, 65,64% e 48% de sólidos totais para as concentrações C1, C2 e C3, respectivamente.

4.7 EXPERIMENTO 2 – CONTAMINAÇÃO DO SOLO E INTERNALIZAÇÃO DE PATÓGENOS NO PLANTIO DE ALFACE COM FEZES CO-COMPOSTADAS

O segundo experimento de campo foi elaborado e implementado pelo grupo de pesquisa de Recuperação de Recursos em Sistemas de Saneamento (RReSSa) em 2020 para o trabalho de Carlon (2021). Este experimento teve como objetivo testar a segurança das fezes co-compostadas no cultivo de alface através de um plantio em um ambiente aberto simulando o plantio em canteiros e solos.

4.7.1 Localização

O experimento de plantio foi instalado no Centro de Treinamento da Empresa de Pesquisa e Extensão Rural de Santa Catarina (CETRE/Epagri), em Florianópolis/SC, sob as coordenadas 27º 34' 51,0" de latitude (S) e 48º 30' 24,0" de longitude (O), conforme Figura 11.

Figura 11: Campo experimental (18 lisímetros) - Centro de Treinamento da EPAGRI.



Fonte: A autora, adaptado de Google Earth (2020)

4.7.2 Clima

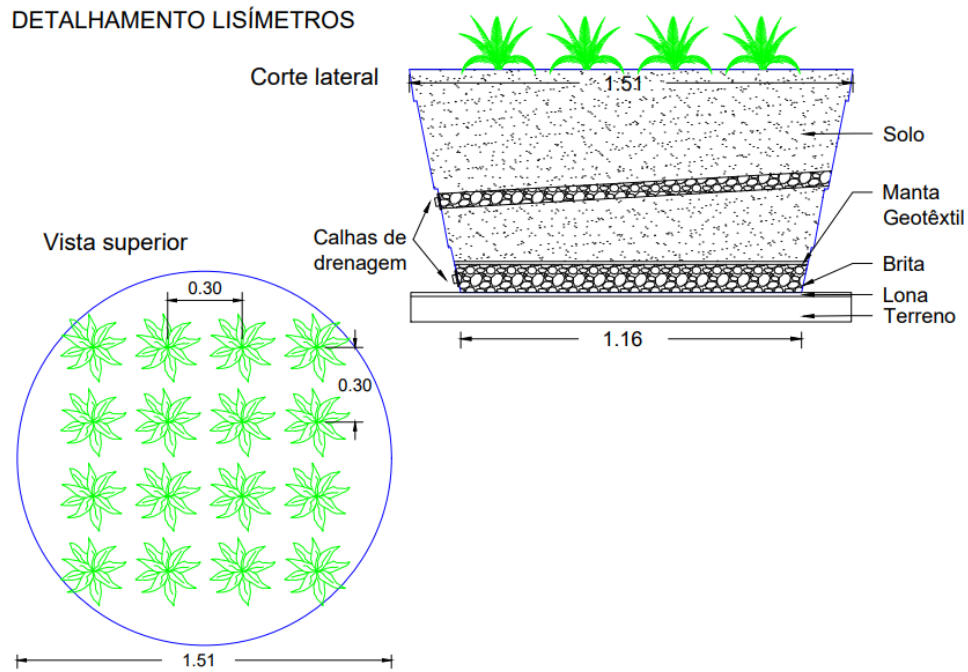
Conforme a classificação de Köppen, o clima de Florianópolis é definido mesotérmico úmido, já na classificação NIMER o clima é definido como sendo clima do tipo Tropical Temperado subsequente, super úmido, apresentando verão quente e inverno ameno, sub-seco. A insolação anual pode variar entre 2.200 e 2.400 horas, dependendo da região analisada e a pluviosidade apresenta um índice de precipitação anual de 1600 mm no norte da ilha e 1400 mm no sul. A umidade relativa anual é de 85%, com aproximadamente 140 dias de chuva ao ano enquanto a temperatura média anual situa-se em torno de 20°C (ELETROBRAS, 2020; SECRETARIA MUNICIPAL DE HABITAÇÃO E SANEAMENTO AMBIENTAL – SMHSA, 2010).

4.7.3 Lisímetros

Os lisímetros foram construídos utilizando caixas d'água de 1000 litros conforme metodologia da FAO (1982). Cada lisímetro possui 1 m³ de volume, 1,78 m² de área superior e 0,8m de profundidade. O experimento foi construído de forma a recolher o lixiviado do fundo e do meio da caixa. Para isto, o fundo foi composto por cerca de dez centímetros de brita número dois, coberto com manta geotêxtil (bidim) de forma a impedir a passagem de sólidos para a tubulação de drenagem, que conta com uma torneira no fundo e no meio da caixa para coleta do lixiviado. O solo foi colocado até o meio da caixa e então foi montada e acomodada uma calha no interior, que consiste em canos PVC com diâmetro de 50 mm cortados em formato de

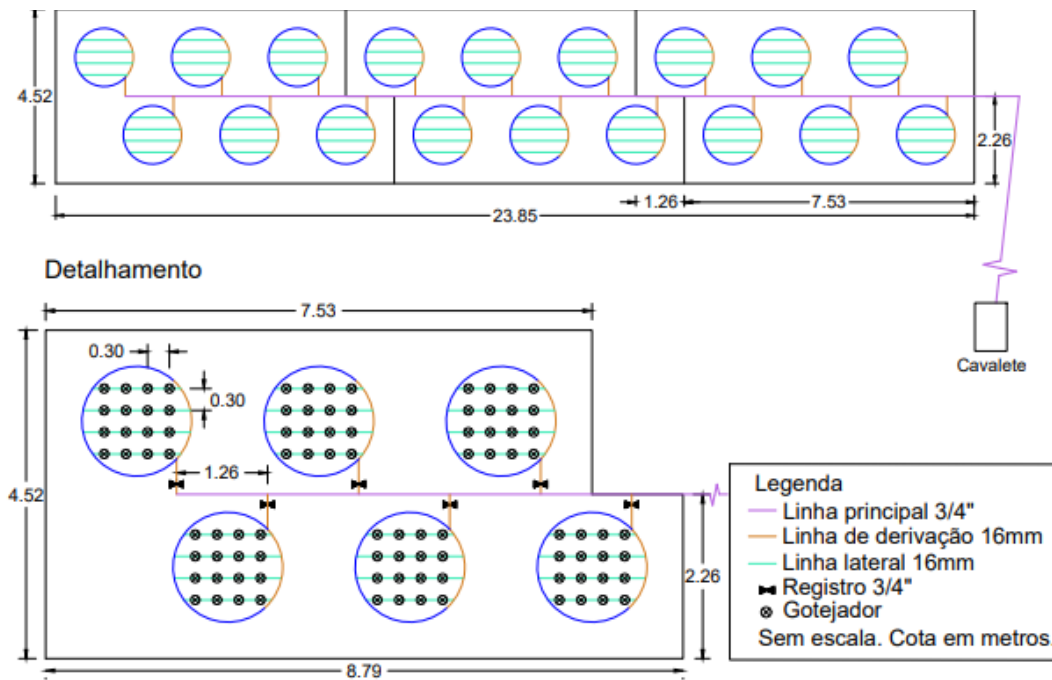
calha, preenchido com brita e envolto em bidim, conectados também a uma torneira no meio da caixa (Figura 12). Foram construídos 18 lisímetros no campo experimental, divididos em 3 blocos de 6 lisímetros cada (Figura 14). Cada lisímetro possui sistema de irrigação composto por mangueiras com gotejadores (Figura 13).

Figura 12: Esquema de drenagem lisímetros.



Fonte: CARLON (2021)

Figura 13: Esquema de irrigação lisímetros



Fonte: Carlon (2021)

4.7.4 Solo

O solo dos lisímetros foi retirado do município de Antônio Carlos e transportado até o local do experimento por uma empresa de terraplanagem. O solo é franco siltoso, composto por 47,6% de areia e 52,4% de silte. Os teores de fósforo, potássio e matéria orgânica e granulometria do solo foram analisados pelo Laboratório de Análise de Solos da EPAGRI, em Ituporanga/SC. Assim, as condições iniciais do solo do presente trabalho são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Teores nutricionais, pH e interpretação dos teores de fósforo conforme Manual de adubação e calagem para os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina 2016.

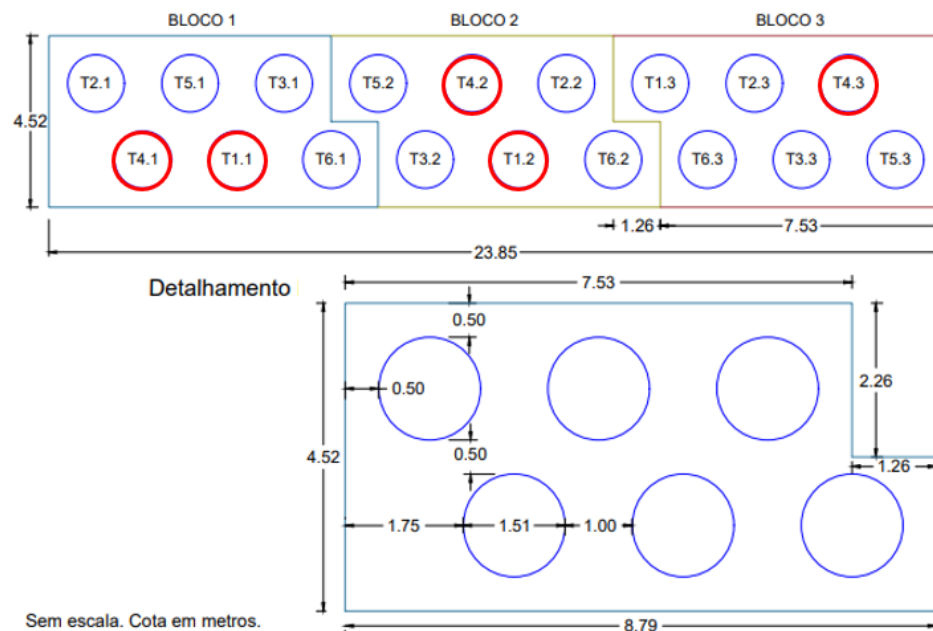
Tratamentos	Fósforo mg.dm ³	Potássio mg.dm ³	Interpretação (P)	M.O %	pH
Controle 1	3,1	19,8	muito baixo	0,9	7,54
Controle 2	2,3	13,9	muito baixo	0,2	7,61
Lisímetro 1	9,3	21,8	baixo	1,3	7,31
Lisímetro 2	18,0	27,7	médio	0,4	7,47
Lisímetro 3	3	11,9	muito baixo	0,6	7,51

A autora (2021)

4.7.5 Esquema Experimental e amostral

Os lisímetros T4.1, T4.2 e T4.3 correspondem a um sistema de triplicata, denominados lisímetros 1, 2 e 3. O lisímetro T1.1 consistiu em um controle com fertilização e inóculo sem plantas e T1.2 um controle com sistema de plantas e fertilização sem inóculo, denominados de controle 1 e 2, respectivamente (Figura 14). O plantio aconteceu entre novembro e dezembro com o transplante de mudas da espécie *Vera* de aproximadamente 33 dias de idade. A espécie escolhida é uma variedade de alface crespa, com ciclo de aproximadamente 65 dias entre a semeadura e colheita. As mudas utilizadas no experimento foram produzidas pela floricultura Flor & Cultura, localizada em Florianópolis – SC.

Figura 14: Vista superior lisímetros CETRE

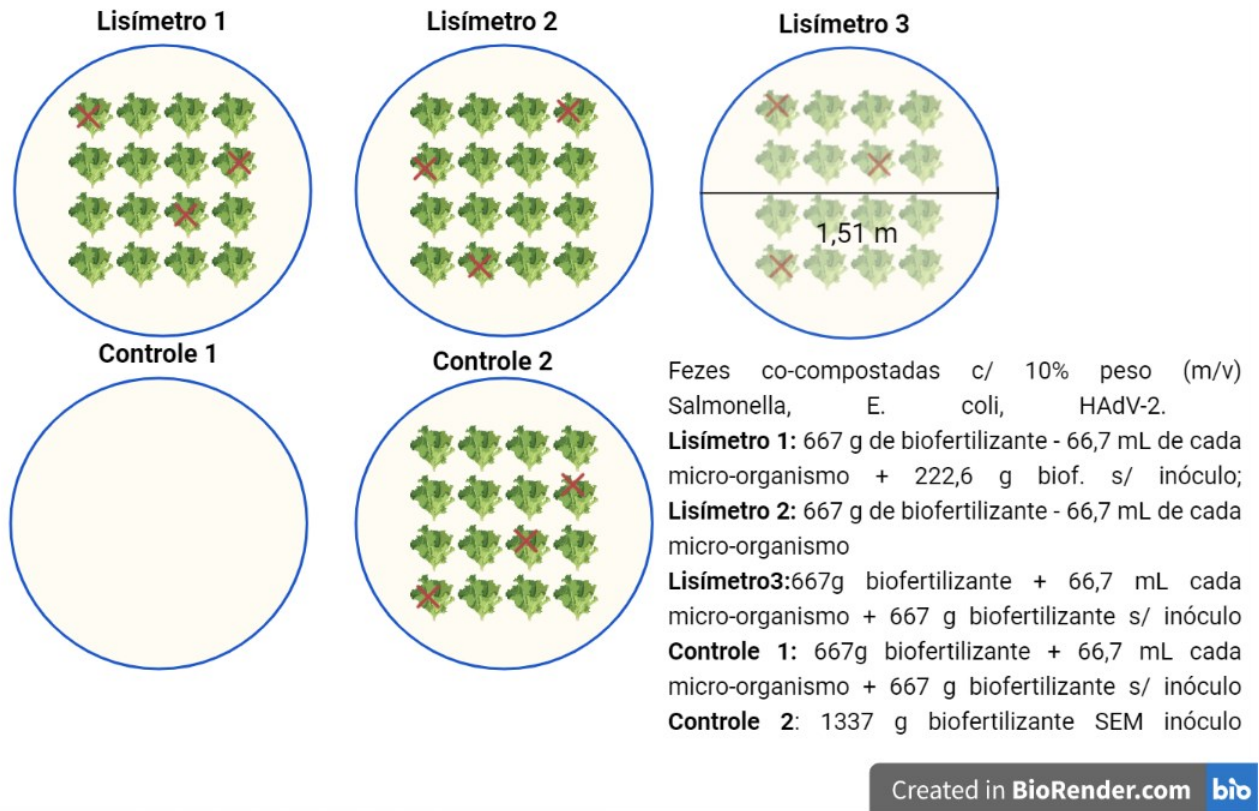


Fonte: Adaptado de Carlon (2021)

A amostragem das plantas foi realizada através de um sorteio, onde as plantas eram enumeradas de 1 a 16. Semanalmente, 3 plantas de cada lisímetro eram retiradas com luvas estéreis. Cada um dos lisímetros correspondeu a uma parcela experimental, composta por 16 plantas (Figura 15). O composto foi inoculado com os modelos patogênicos: *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* e *Adenovirus humano tipo 2 (HAdV-2)* na concentração de 10^6 UFP.g⁻¹. A adubação foi realizada conforme condição do solo em cada lisímetro, assim de forma a igualar a aplicação do inóculo à menor necessidade de aplicação (120 kg. ha⁻¹ P para o lisímetro 2) foi aplicada uma correção de adubação 15 dias antes do plantio, equivalente a 120 kg.ha⁻¹ de P para

controle 1 e 2 e para o lisímetro 3. Para o lisímetro 1 foram aplicados 40 kg. ha⁻¹ de P na correção.

Figura 15: Layout experimental e amostral do 2º experimento



Fonte: A autora (2022)

4.8 ANÁLISE DE LIXIVIAÇÃO E PERCOLAÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PATO-GÊNICOS

4.8.1 Percolação e persistência de micro-organismos patogênicos

Para analisar a percolação e persistência dos micro-organismos patogênicos no solo, as amostras foram coletadas semanalmente com uma colher esterilizada a cada vaso para o primeiro experimento e por um trado do tipo holandês na profundidade de 10 cm para o segundo experimento. Entre uma coleta e outra, o trado era higienizado com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,05%. As coletas foram realizadas semanalmente durante 5 semanas.

Para a análise, realizou-se a diluição de 10 g de amostra de solo em 90 mL de solução salina peptonada (1:9 m/v). Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas de base 10 e

então semeadas alíquotas de 0,1 mL em placas de ágar específicos. Para a bactéria *E.coli* foi utilizado o Ágar MacConkey e para *Salmonella* o Ágar XLD com incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas e quantificação em Unidades Formadoras de Colônia por grama (UFC.g^{-1}) conforme ISO10705-1 parte um (1995) e parte dois (2000).

4.8.2 Lixiviação dos micro-organismos patogênicos

A coleta de lixiviado ocorreu apenas no segundo experimento. Para a coleta, o líquido da drenagem principal dos lisímetros foi coletado semanalmente em garrafas plásticas de 500 ml, devidamente higienizadas. Para as análises microbiológicas do lixiviado foram realizadas as diluições seriadas de interesse e o procedimento de análise é o mesmo descrito na sessão 4.8.1

4.9 ANÁLISE DE INTERNALIZAÇÃO DE MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS NOS TECIDOS VEGETAIS

4.9.1 Tratamento da amostra vegetal e análise de internalização nas raízes e folhas

No laboratório, a planta foi lavada com água destilada para retirar qualquer resquício de solo ou fertilizante, 1g de amostra da folha e da raiz foram cortadas assepticamente com lâmina estéril, pesadas em balança de precisão e armazenadas em sacos estéreis separadamente.

Para a verificação da internalização através de meios de cultura, as plantas foram tratadas seguindo a metodologia proposta por Murphy et al. (2016) e Erickson et al. (2014). As superfícies vegetais analisadas foram esterilizadas em solução de 1% de nitrato de prata (AgNO_3) por 10 s e em seguida enxaguadas em água destilada. As amostras foram então maceradas em mortar de porcelana e suspensas em 9 mL de solução salina peptonada estéril e depois transferidas em tubos estéreis de 15 ml. A cada maceração o mortor e pistilo eram desinfetados com solução de Hipoclorito de Sódio a 10% e em seguida, enxaguadas com água destilada. As amostras foram homogeneizadas mecanicamente por um agitador orbital durante 15 minutos a 200 rpm. As diluições relevantes de cada amostra foram realizadas de acordo com a necessidade. Para controle microbiológico da efetividade da desinfecção no tecido vegetal e da esterilidade do mortor e pistilo entre as amostras, a água de enxágue das plantas e do mortor foram recolhidas para análise.

Para as bactérias as amostras foram analisadas conforme metodologia já indicada na sessão 4.8.1. Para amostras sem detecção através do método direto, foi utilizado o método de

enriquecimento. Uma alíquota da amostra (1 ml) era adicionada aos meios seletivos ou solução salina peptonada (9 ml) e incubadas por 24 h e então, plaqueadas. Os resultados foram expressos em presença ou ausência do micro-organismo na amostra e para fins estatísticos considerados como $1 \text{ Log}_{10} \cdot \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$ (MURPHY et al., 2016).

Para análise do patógeno HAdV2 as amostras foram analisadas através do ensaio de formação de placa de lise conforme metodologia proposta por Cromeans et al. (2008). As células A549 foram semeadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células mL^{-1} em placas de seis cavidades. Após a confluência (24 h) as cavidades foram infectadas com 250 μL de amostra por cavidade com as diluições (em meio MEM) das amostras, em replicata. As amostras foram então incubadas por 1 h 37°C para a adsorção viral. Posteriormente o inóculo foi removido delicadamente com aspiração e a monocamada celular foi recoberta com uma camada contendo 0,6% de Bacto Ágar diluída em meio DMEM com alta concentração de glicose $2\times$ concentrado, suplementado com 2% de SFB, 0,1 mM piruvato de sódio, 1% de antibióticos e antifúngico [PSA (penicilina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; sulfato de estreptomicina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$; anfotericina B $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$)] e 26 mM de MgCl_2 .

As amostras foram então incubadas a 37°C , 5% CO_2 pelo período de 6-7 dias. Durante esse período as placas foram monitoradas diariamente em microscópio óptico invertido para a avaliação da formação das placas de lise e controle da citotoxicidade. Após este período, a camada de bacto ágar foi removida e as monocamadas celulares coradas com cristal violeta (0,4%). As placas formadas foram contadas macroscopicamente sendo os valores de HAdV-2 infecciosos expressos em Unidades Formadoras de Placas por mL (UFP mL^{-1}), utilizando a equação 10.

$$UFP = \frac{\text{Média nº placas} \times \text{recíproca da diluição}}{\text{inóculo inicial semeado na amostra (0,25 mL)}} \quad (\text{Eq.10})$$

4.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS OBTIDOS NOS CULTIVOS EXPERIMENTAIS.

Os dados de pH, umidade do solo, decaimento bacteriano no solo e internalização nas folhas e raízes foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificação da normalidade da série de dados através do software BioEstat®. Para determinar os coeficientes de decaimento bacteriano no solo foram realizadas análises de regressão linear através do software GraphPad®.

4.11 ANÁLISE QUANTITATIVA DE RISCO MICROBIOLÓGICO APLICADO (QMRA)

Para realizar uma estimativa de risco do plantio de alface fertilizado com fezes co-compostadas, a metodologia de avaliação quantitativa de risco microbiológico foi aplicada aos dados obtidos no plantio experimental. Nesta etapa experimental foram recolhidos os dados de contaminação inicial do biofertilizante e realizada uma simulação de contaminação em diferentes concentrações através da inoculação de micro-organismos de interesse. Os dados de decaimento da bactéria *Escherichia coli* no solo entre o plantio e a colheita foram obtidos por ensaios experimentais e utilizados para o cálculo da dose de patógenos ingerida nos cenários estipulados. Para o cálculo de dose do *HAdV-2*, bem como os cálculos de dose resposta para *E. coli* e *Salmonella*, os parâmetros microbiológicos de decaimento foram estimados a partir da literatura (QMRAWIKI, 2022). Ademais, dados como: frequência de exposição, tempo de exposição, quantidade de partículas ingeridas de forma involuntária via solo ou aerossóis também foram definidos através da literatura. A metodologia AQRM foi conduzida através das quatro etapas apresentadas na sequência.

4.11.1 Identificação do perigo

Para a identificação do perigo, o estudo buscou encontrar grupos de patógenos que tenham como hospedeiro humanos e que normalmente são transmitidos via fecal-oral, inalação e através de alimentos. Assim, foram escolhidos os patógenos: *Escherichia coli*, *Salmonella* e Adenovírus humano tipo 2.

4.11.1.1 *Escherichia Coli*:

Das doenças transmitidas via fecal oral, a diarreia é a que causa mais anos de vida perdidos (DALY's), principalmente em crianças e idosos (BUTTE, NIWAGABA, NORDIN, 2021). Desta forma, este estudo buscou a cepa de *E. coli* com mais casos associados de internações e mortalidades. Assim, conforme dados da WHO (2018) a cepa STEC é a maior causa de internações e obtidos entre cepas. Esta cepa pode ser representada pela estirpe O157:H7, que é responsável por 40% de internações e morte nos EUA.

Para esta avaliação de risco, utilizou-se os valores de contaminação obtidos na inoculação do biofertilizante nos dois experimentos. Portanto, as concentrações iniciais de *E. coli* no biofertilizante do experimento do MIP foram de $3,4E+06$, $2,06E+07$ e $1,03E+08$ (6,54, 7,31 e 8,01 $\text{Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$, respectivamente) e do experimento do CETRE de $7,0E+06$ (6,85 $\text{Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$). As taxas de decaimento decimal (K) obtidas pelo estudo foram de -0,1054, -

0,1154 e -0,1424 (dia^{-1}), respectivamente, para cada uma das concentrações utilizadas no MIP e de -0,06117 (dia^{-1}) para a concentração utilizada no CETRE. Os valores de dose infectante média (N_{50}) e dose infecciosa em 50% dos hospedeiros (ID_{50}) são de $2,11E+06$ (QMRAWiki, 2021). Cabe salientar, que conforme dados fornecidos pela WHO (2016) considera que 95% dos coliformes termotolerantes são *E. coli* e desta porcentagem, cerca de 8% são patogênicas. Em relação a CEPA O157:H7, conforme Haas, Rose e Gerba (1999) a proporção é de 1:0.08. Portanto, nos cálculos de dose esse percentual será utilizado. Em relação ao *HAdV-2*, modelos conservadores consideram a proporção de 1:1 (WHO, 2016).

4.11.1.2 *Salmonella typhi*

A *Salmonella* é um grande problema de saúde pública devido ao seu grande e variado reservatório em animais. Segundo estimativas do CDC (2022), a febre tifoide é a forma mais severa de Salmonelose. Causada pela *Salmonella thypi*, afeta cerca de 17 milhões de pessoas anualmente, com cerca de 600.000 mortes. Casos não tratados resultam em taxa de mortalidade de 12-30%, enquanto casos tratados adequadamente tem taxa de sobrevivência de 99%. A transmissão ocorre via fecal-oral de indivíduos contaminados para indivíduos saudáveis. Falta de higiene e a ingestão de alimentos e água contaminada é a maior via de transmissão de *Salmonella*.

O período de incubação é de 4 a 7 dias, A dose infectante ID_{50} e N_{50} são de $1.11E+06$ e o parâmetro microbiológico (α) é igual a $1.75E-01$ (QMRAWiki, 2022). O decaimento microbiológico da *Salmonella* no solo foi obtido através dos cultivos de alface nos lisímetros, sendo $K = -0.0575$.

4.11.1.3 *Adenovirus humano tipo-2*

Um total de 428 infecções respiratórias foram estudadas de 1991 a 2007 em crianças coreanas. A taxa de mortalidade foi de 5,1% conforme estudos de Lee, Choi e Lee (2010). Crianças mexicanas não hospitalizadas com mais de cinco anos de idade apresentaram uma taxa de infecção pelo AdV de 23% (ROSETTE et al. 2010). Ademais, α foi definido em 0,61 e ID_{50} em $1,14E+00$ (QMRAWiki, 2021). Para taxa de decaimento no solo, foi considerado o valor obtido através de cultivo experimental nas mesmas condições de fertilização e solo deste experimento para o bacteriófago RNA F-específico MS2, realizado por Carlon (2021). Portanto, o K é definido em: -0.045

4.11.2 Avaliação da exposição

Nesta etapa o objetivo foi a definição da população exposta ao risco, cenários de exposição ao risco e dose de micro-organismos ingerida por um indivíduo em determinado cenário estabelecido. Neste trabalho, os cenários foram definidos para simular a manipulação do biofertilizante no processo de fertilização, plantio e manejo do sistema solo-planta em cultivos não mecanizados de alface em pequenas propriedades rurais, além do consumo da hortaliça após processo de desinfecção.

4.11.2.1 População exposta e cenários aplicados

A população exposta ao cenário foi definida como um adulto de 18-65 anos. Os cenários escolhidos para a aplicação da AQRM são:

I - Aplicação do biofertilizante: Durante a aplicação do biofertilizante, estima-se que sejam ingeridas acidentalmente cerca de 50 a 150 mg de partículas (HAWLEY, 1985; EISENBERG et al., 2008). Considerando um ciclo de 60 dias para a alface, a estimativa neste trabalho é que o trabalhador rural seja exposto de 4- 6 vezes ao ano na prática de fertilização.

II – Plantio e atividade de manejo: Durante o cultivo de alface adubada com as fezes co-compostadas foi assumido que o trabalhador estaria sujeito à ingestão de 50- 150 mg de solo por exposição. Considerando que o agricultor esteja exposto de 3 a 5 dias por semana, temos entre 160 e 260 dias de exposição anual.

III – Consumo das hortaliças fertilizadas com excretas humanas: O processo de desinfecção das hortaliças, seguida de enxágue com água potável pode reduzir cerca de 2 logs de micro-organismos presentes nas plantas (WHO, 2016). Conforme Nag et al. (2022) a quantidade média de sólidos aderidos na cultura é de 2 mg por grama de alface. No Brasil, a média do consumo de alface gira em torno $2,6 \text{ g.dia}^{-1}$ para habitante urbano e 2 g.dia^{-1} para habitantes rurais com frequência de 6,7 a 4%. (POF – IBGE, 2018).

No segundo cenário, o tempo de decaimento dos patógenos no cálculo foi estipulado com base na resolução CONAMA 498/2020, que considera um intervalo de 4 meses entre a aplicação e a colheita para lodo de classe B, lodo que se enquadra na simulação de contaminação realizada neste trabalho. Deste modo, para a construção do modelo utilizado para o cálculo da dose do cenário 2, o tempo considerado foi de 120 dias, que se refere ao período de espera entre a aplicação do biofertilizante e a colheita prevista pela resolução, ao invés de 45-60 dias referente ao ciclo da alface.

4.11.2.2 Dose:

Os cálculos foram definidos através de uma adaptação do trabalho de Eisenberg e colaboradores (2004) e Magalhães (2012) para aplicação de fezes co-compostadas no solo e manejo do plantio, e adaptados de Nag et. al. (2022) para o consumo das hortaliças.

Os modelos matemáticos que representam os cenários construídos são descritos através das equações 11,12,13 e 14.

$$d = C \text{ pat. biof} \times I. \text{ biof} \text{ (Eq. 11)}$$

Onde: **d** = dose, **Cpat.biof** = concentração de patógenos no biofertilizante, **I.biof** = quantidade de biofertilizante ingerida acidentalmente.

$$d = C \text{ pat. solo} \times 10^{-k.t} \times I. \text{ solo} \text{ (Eq. 12)}$$

Onde: **d** = dose de patógenos ingerida por evento de exposição; **C pat.solo** = concentração de patógenos no solo em org.(gST)⁻¹ (5 dias após a aplicação do biofertilizante); **K** = coeficiente de decaimento dos patógenos no solo (d⁻¹) e **t** = tempo entre aplicação do biofertilizante e colheita previsto pela CONAMA 498/2020 (120 dias); **Isolo** = ingestão acidental de partículas de solo (g).

No segundo cenário a concentração de patógenos no solo foi estimada em laboratório apenas para *E. coli*. Para o *HAdV-2* a dose foi estimada utilizando a concentração final no biofertilizante multiplicado pelo fator de diluição do biofertilizante no solo e fatores de decaimento e tempo

$$C \text{ pat. cultura} = S. \text{ aderido} \times C \text{ pat. solo} \times 10^{-k.t} R. \text{ lavagem} \text{ (Eq. 13)}$$

$$d = C \text{ pat. cult.} \times C \text{ hort.} \text{ (Eq. 14)}$$

Onde: **C pat.cultura**: concentração de patógenos na cultura em org.(gST)⁻¹, **S. aderido**: Quantidade de sólidos aderidos na cultura no momento da colheita (mg.g⁻¹), **Cpat.solo**: concentração estimada de patógenos no solo após 40 dias de aplicação do biofertilizante, **K**: coeficiente de decaimento no solo, **t**: tempo de restrição entre aplicação e colheita menos 40 dias referente a análise da concentração patogênica no solo (80 dias), **R.lavagem**: Redução dos

micro-organismos após desinfecção e lavagem com água potável em $\text{Log}_{10}.\text{UFC.g}^{-1}$ **d**: dose de patógenos ingerida por evento de exposição; **C hortaliças**: Consumo anual de hortaliças em g.hab.ano^{-1} .

Neste cenário, a concentração de patógenos na cultura foi calculada através da estimativa da quantidade de solo aderida na cultura e da concentração de patógenos encontradas no solo após 40 dias de plantio. Como a concentração no solo foi avaliada apenas para a *E. coli*, os valores encontrados foram extrapolados para o *HAdV-2*, considerando contaminação no solo após 40 dias de plantio entre $5,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^2 \text{ UFC.g}^{-1}$. De forma a apresentar consonância com a Resolução 498/2020, no cálculo de dose o tempo de decaimento dos patógenos no solo foi estipulado em 80 dias, uma vez que dados da contaminação do solo foram obtidos após 40 dias da fertilização, totalizando os 120 dias entre aplicação e colheita requeridos pela CONAMA.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 TESTE DE FITOTOXICIDADE DAS FEZES CO-COMPOSTADAS

Após 5 dias de incubação, as sementes germinadas e seus respectivos tamanhos foram analisados. Os valores médios para a quantidade de sementes germinadas, o índice de germinação das sementes (GRS), e o comprimento relativo das raízes (CRR) para as 3 concentrações de biofertilizantes às quais foram expostas, e o controle podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Média de sementes germinadas e do tamanho das raízes com desvio padrão, GRS (%), CRR (%) e IG (%).

	Controle	10%	25%	50%
Média de sementes germinadas	$9,8 \pm 0,44$	$8,6 \pm 1,51$	$2 \pm 1,41$	0
GRS (%)	-	87,75%	20,40%	0%
Média do tamanho das raízes	$140 \pm 0,12$	$106 \pm 0,22$	$70 \pm 0,24$	0
CRR (%)	-	75,85 %	50,35%	0%
IG (%)	100%	66.55%	10.27 %	0%

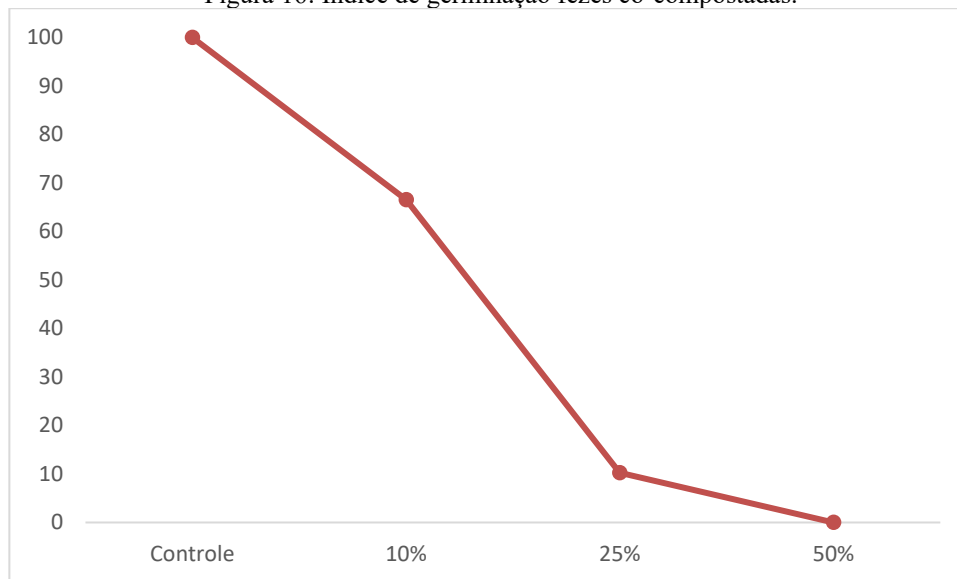
Fonte: A autora (2022)

A distribuição da série de dados foi considerada normal para os dados de germinação das raízes ($p \geq 0,05$) e para o tamanho das raízes ($p > 0,05$). Desta forma, para a análise estatística foi utilizado análise de variância ANOVA One Way e teste *post hoc* de Tukey para comparação entre as médias. Para os dados de germinação das sementes, houve variância entre as

concentrações ($p < 0,001$). Na comparação entre as médias a variância está entre o controle e a concentração 25% ($p < 0,01$) e entre a concentração 10 % e 25% ($p < 0,01$) Entre o controle e a concentração de 10 % não houve diferença estatisticamente significativa ($p: 0,3961$). Em relação ao tamanho das radículas houve variância significativa entre as concentrações ($p < 0,01$). As variâncias se referem ao controle e à concentração de 25% ($p < 0,01$) e entre as concentrações 10% e 25% ($p < 0,05$). Não houve variância entre o controle e a concentração 10%.

É possível observar que as fezes co-compostadas na concentração de 10% já foram capazes de diminuir o índice de germinação em cerca de 33%. Aumentando a concentração para 25%, temos uma redução de cerca de 89% na germinação. As fezes co-compostadas na concentração de 50% apresentaram alta fitotoxicidade neste ensaio, sem a germinação de nenhuma das sementes (Figura 16).

Figura 16: Índice de germinação fezes co-compostadas.



Fonte: A autora (2022)

Estes valores estão compreensíveis dentro dos reportados na literatura. Consoante o exposto no trabalho de Manãs e De las Heras (2018), efluentes brutos de estações de tratamento de esgoto na concentração de 10% apresentaram índice de germinação de 53,6 % para sementes de alface e de 1,4 % para sementes de agrião. Os valores de índice de germinação são menores que os obtidos neste trabalho para as fezes co-compostadas na mesma concentração.

Venegas et al. (2019) em um estudo com diferentes tipos de lodo de esgoto aplicados no solo, alcançaram índices de germinação menores que 50% para a aplicação de lodo de esgoto

não digerido e índices maiores que 70% para aplicação de lodos de esgoto com digestão anaeróbia convencional e avançada, nas concentrações de 5 e 50g por kg de solo. Entretanto, para a aplicação de 100 g.kg⁻¹ de solo, o índice de germinação caiu para menos que 10% para o lodo não digerido. Tais valores, corroboram com os obtidos neste trabalho, com índice de germinação superior à 60% para a concentração de 10%, e menor que 10% para a concentração de 25%.

No trabalho de Priac e colaboradores (2017), além de testar a sensibilidade de diversas espécies de sementes de alface e diversos tipos de água para a germinação, os autores analisaram também 4 concentrações de 3 tipos de efluentes. Obtiveram, para a variedade Appia e efluente industrial tratado através de eletrólise, taxa de germinação de 47% para a concentração de 25%, 7% para 50%, e 2% para 75%, valores próximos aos obtidos neste trabalho, mesmo com um diferente tipo de efluente.

Para interpretação dos resultados, o índice de germinação é classificado em: efeito benéfico ($IG \geq 100$), sem presença de substâncias fitotóxicas ($100 > IG \geq 80$), toxicidade moderada ($80 > IG > 50$) e alta toxicidade ($50 \geq IG$) (Roig et al., 2012). Conforme essa classificação, as fezes co-compostadas na concentração de 10% apresentam toxicidade moderada, enquanto as demais concentrações apresentam alta toxicidade. Deste modo, sugere-se para ensaios futuros o teste em concentrações menores, variando de 1 – 10% para melhor compreensão dos efeitos fitotóxicos.

5.2 EXPERIMENTO DE CULTIVO EM VASOS: CASA DE VEGETAÇÃO MIP

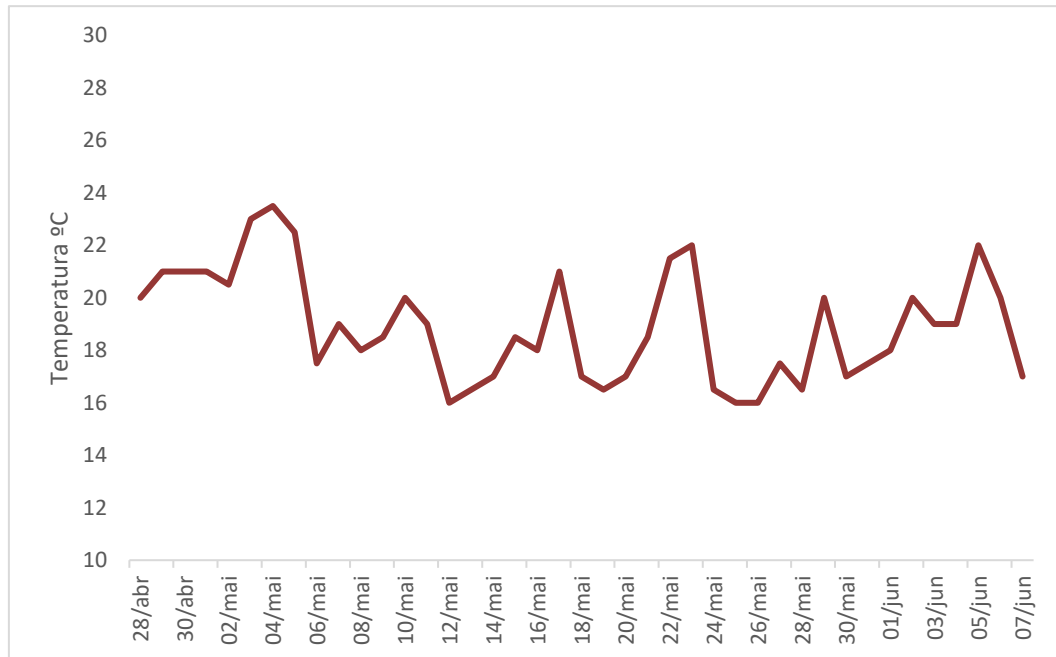
5.2.1 Contaminação microbiológica das fezes co-compostadas, solo e mudas de alface antes do plantio

De modo a verificar o nível de contaminação microbiológica antes do processo de inoculação e plantio e garantir um amplo entendimento das condições de contaminação iniciais, análises microbiológicas foram conduzidas nas amostras em triplicata. As fezes co-compostadas não apresentaram contaminação para as bactérias *E. coli* e *Salmonella* e para bacteriófagos RNA-f específicos e colifagos somáticos. O solo não apresentou contaminação para *E. coli*, *Salmonella* e bacteriófagos RNA-f específicos e colifagos somáticos. Em relação as plantas, foram conduzidas análises nas raízes e folhas, além do substrato de crescimento das mudas presente na rizosfera. Todas as amostras de raízes e folhas foram negativas para *E. coli* e *Salmonella*. A contaminação média por *E. coli* no substrato presente na rizosfera das mudas com 33 dias foi de $2,72 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, a bactéria *Salmonella* por sua vez, não foi detectada no substrato.

5.1.2 Temperatura da estufa, pH e umidade do solo durante o plantio

O primeiro cultivo experimental foi realizado no outono com média de temperatura de 19 °C. A temperatura durante o experimento variou de 16°C a 24°C. A variação durante os dias do cultivo pode ser observada na Figura 17.

Figura 17: Média de temperatura na casa de vegetação do MIP durante o primeiro cultivo.



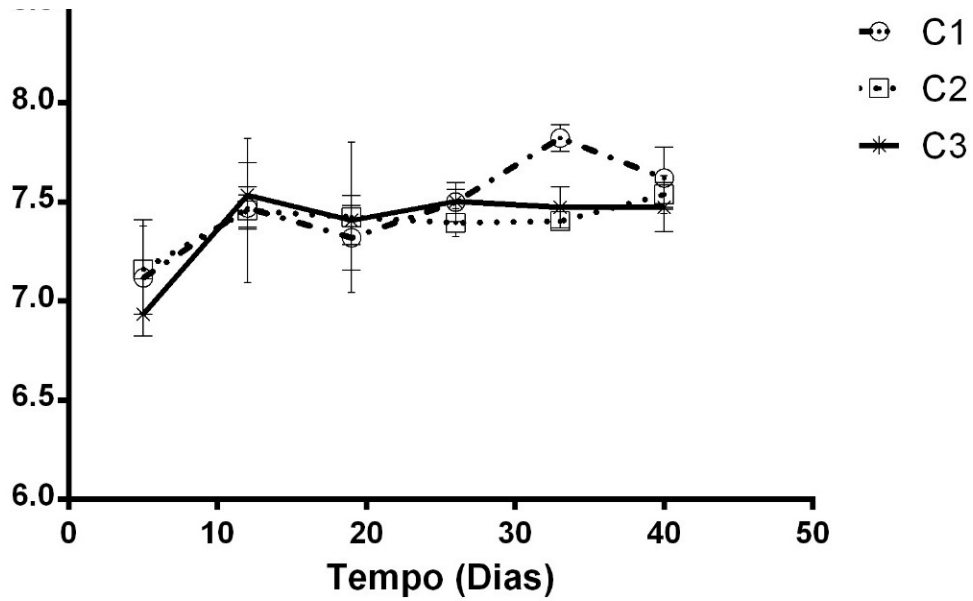
Fonte: A autora (2022)

Com relação ao pH do solo, no dia do plantio, a média foi de 6,9 para as concentrações C1 e C3, e de 7,1 para C2. Na primeira semana de cultivo o pH variou de 7,1 para C1 e C2 e 6,9 para C3. Na segunda semana a média do pH foi de aproximadamente 7,5 para todas as concentrações. Na terceira, quarta, quinta e sexta semana as três concentrações mantiveram a média de 7,4 a 7,5 de pH (Figura 18).

Em relação a normalidade dos dados de pH, as concentrações C1 e C2 apresentaram normalidade dos dados ($p > 0,05$). Os valores de p foram de 0,99 e 0,85, para C1 e C2 respectivamente. A concentração 3 não apresentou normalidade dos dados ($p < 0,05$) com p de 0,0094. Os valores mínimos e máximos das médias das concentrações C1, C2 e C3 com desvios padrões podem ser observados na figura 19.

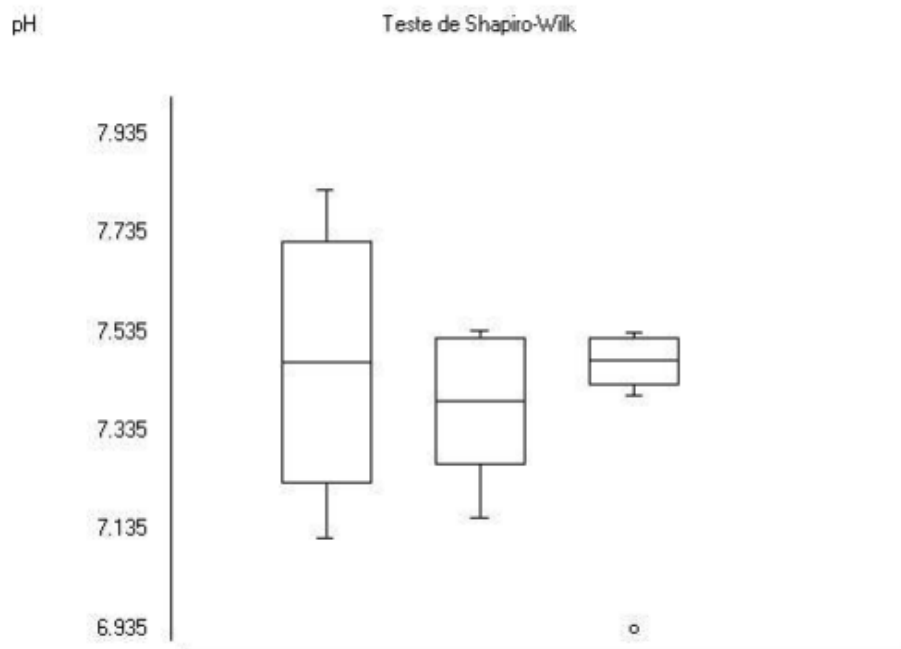
Não houve variância significativa entre o pH das concentrações ($p > 0,05$). Em relação ao fator tempo, a variância foi significativa, com $p = 0,0038$. Variâncias significativas foram encontradas entre as médias dos dias: 5 e 12 ($p < 0,05$), 5 e 26 ($p < 0,05$), 5 e 33 ($p < 0,01$) e 5 e 40 ($p < 0,01$).

Figura 18: Média dos valores de pH para o solo dos vasos do cultivo na casa de vegetação do MIP



Fonte: A autora (2022)

Figura 19: Gráfico tipo blox-pot com os valores mínimos e máximo das médias (barras) e desvio padrão (caixas) do pH no solo das concentrações C1, C2 e C3.

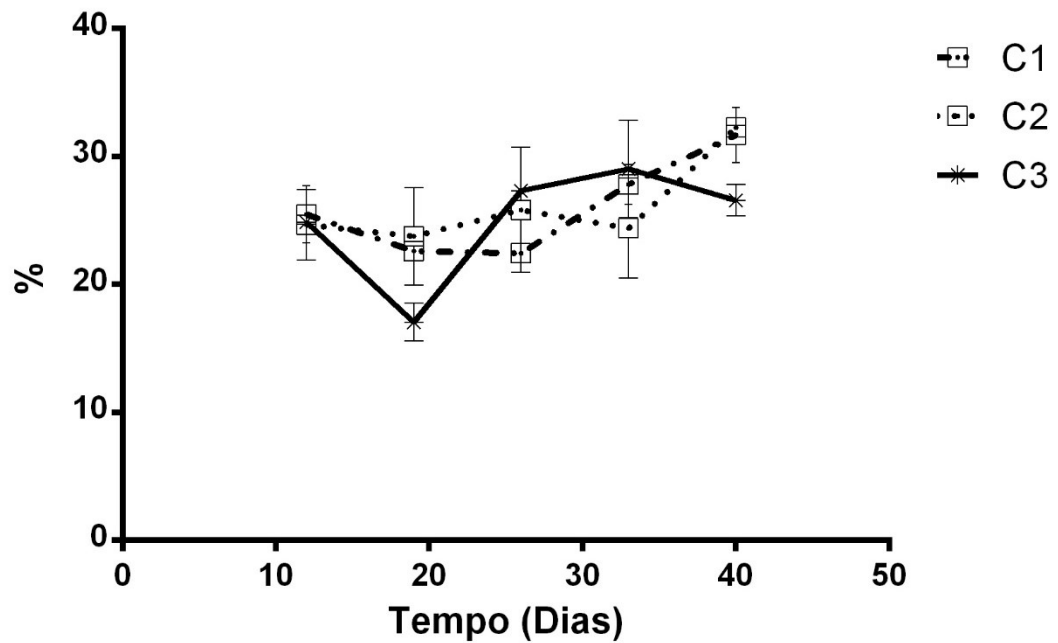


Fonte: A autora (2022)

Em relação a umidade do solo durante o experimento, a umidade média das duplicatas na primeira semana de análise foi de 23,4% para C1 e 25% para C2 e C3. Na segunda semana de análise, a umidade esteve próxima de 25% para todas as concentrações. A partir da terceira semana, as duplicatas apresentaram grande variação de umidade, com valores de 19,42% para C1, 23,8% para C2 e 17,6 para C3. Na quarta semana as amostras apresentaram os valores de 22,43 % para C1, 25,82% para C2 e 27% para C3. Na quinta semana, C1 apresentou umidade de 27,8%, C2 24,39% e C3 29%. Na última semana de análise C1 e C2 apresentaram umidade média de 32% e C3 de 26,5%. Estas variações a partir da terceira semana se devem ao fato de a rega não ter sido padronizada durante todo o experimento, levando em consideração apenas a condição visual do solo e da planta e não a efetiva evapotranspiração.

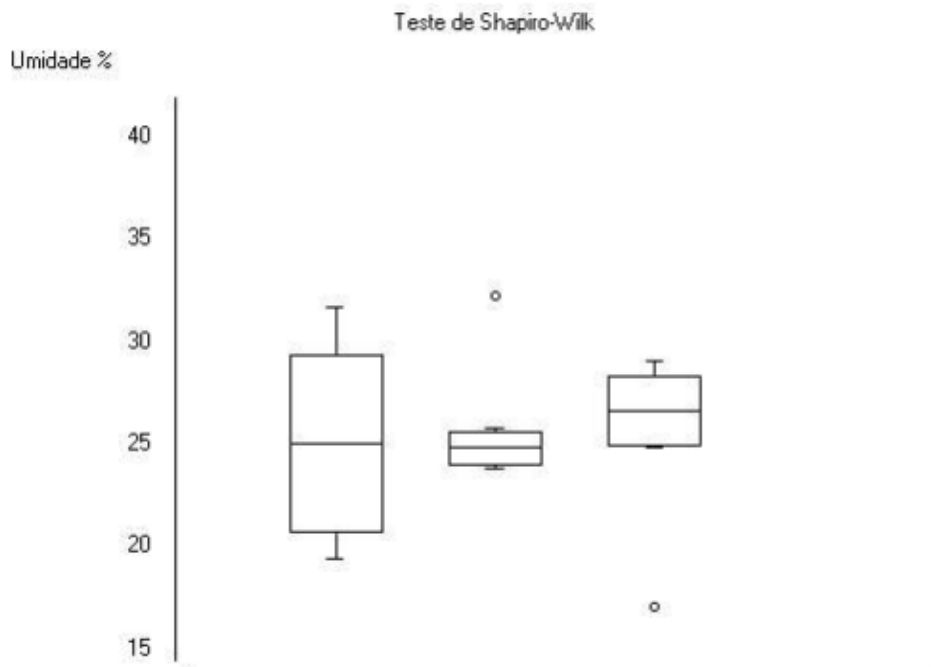
Em relação a normalidade dos dados de umidade das concentrações, C1 e C3 apresentaram normalidade dos dados ($p = 0,9787$ e $0,1087$, respectivamente), para C2 o valor de p foi de $0,0118$. Em relação a variância do teor de umidade, não houve variância significativa entre as concentrações ($p > 0,05$). Entretanto, houve variância entre o fator tempo ($p = 0,0152$). Neste sentido a variância significativa refere-se às diferenças entre as médias da 3ª e da 6ª semana ($p < 0,01$).

Figura 20: Média dos valores de umidade do solo nos vasos do cultivo na casa de vegetação do MIP



Fonte: A autora (2022)

Figura 21: Gráfico tipo blox-plot com valores mínimos e máximos das médias (barras) e desvios padrões (caixas) da umidade no solo das concentrações C1, C2 e C3.

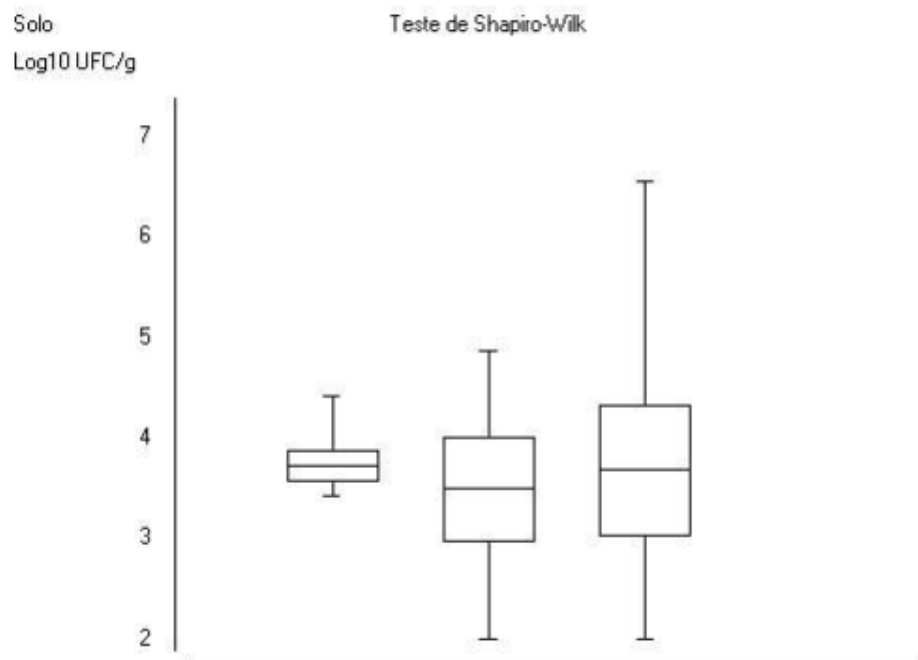


Fonte: A autora (2022)

5.1.3 Decaimento da bactéria *E. coli* no solo

As amostras de solo foram analisadas nos dias 5, 12, 19, 26, 33 e 40 do ciclo da planta. Em relação a normalidade da distribuição dos dados, a concentração 1 apresentou série de dados fora da normalidade ($p = 0,0375$) enquanto as concentrações 2 e 3 apresentaram distribuição normal $p = 0,2731$ e $p = 0,3404$, respectivamente. Os valores do erro padrão e as mínimas e máximas podem ser observados no gráfico blox-plot (Figura 22)

Figura 22: Gráfico tipo Blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) para a contaminação de *E. coli* no solo das concentrações C1, C2 e C3, respectivamente.



Fonte: A autora (2022)

Considerando a concentração inicial de *E. coli* nas fezes co-compostadas de $3,47 \times 10^6$ ($6,54 \text{ Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$), $2,06 \times 10^7$ ($7,31 \text{ Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$) e $1,03 \times 10^8$ ($8,01 \text{ Log}_{10}.\text{UFC}.\text{g}^{-1}$) para C1, C2 e C3, respectivamente. Cinco dias após a aplicação do biofertilizante contaminado houve uma redução de 2,12 unidades logarítmicas para C1, 2,44 logs para C2 e 1,5 logs para C3. Após 40 dias do transplântio a *E. coli* não foi detectada no solo nas amostras C1 e C3 e detectada em $4,0 \times 10^2 \text{ UFC}.\text{g}^{-1}$ para C2. O decaimento ao longo do ciclo foi de 3,42 unidades logarítmicas para C1, 2,18 logs para C2 e 5,55 logs para C3, mostrando decaimento mais rápido para concentrações mais altas de *E. coli*.

O comportamento log linear de decaimento possibilita examinar a relação linear entre duas variáveis contínuas: a concentração (y) e o tempo (x). Desta forma, a relação entre estas duas variáveis tornam possível prever o comportamento do micro-organismo analisado ao longo do tempo, possibilitando assim, o cálculo do período necessário para o decaimento de 1 unidade logarítmica, denominada de T90, bem como conhecer as taxas dos coeficientes de decaimento (K) para cada concentração analisada

As taxas de coeficiente de decaimento (K), valores de r^2 e p , tempo de inativação de 1 unidade logarítmica (T90), e o tempo para inativação de 99,99% (4 logs) estão apresentados na tabela 4. As retas de decaimento também foram traçadas para cada concentração (Figura 23), bem como os valores de R^2 e as equações da reta.

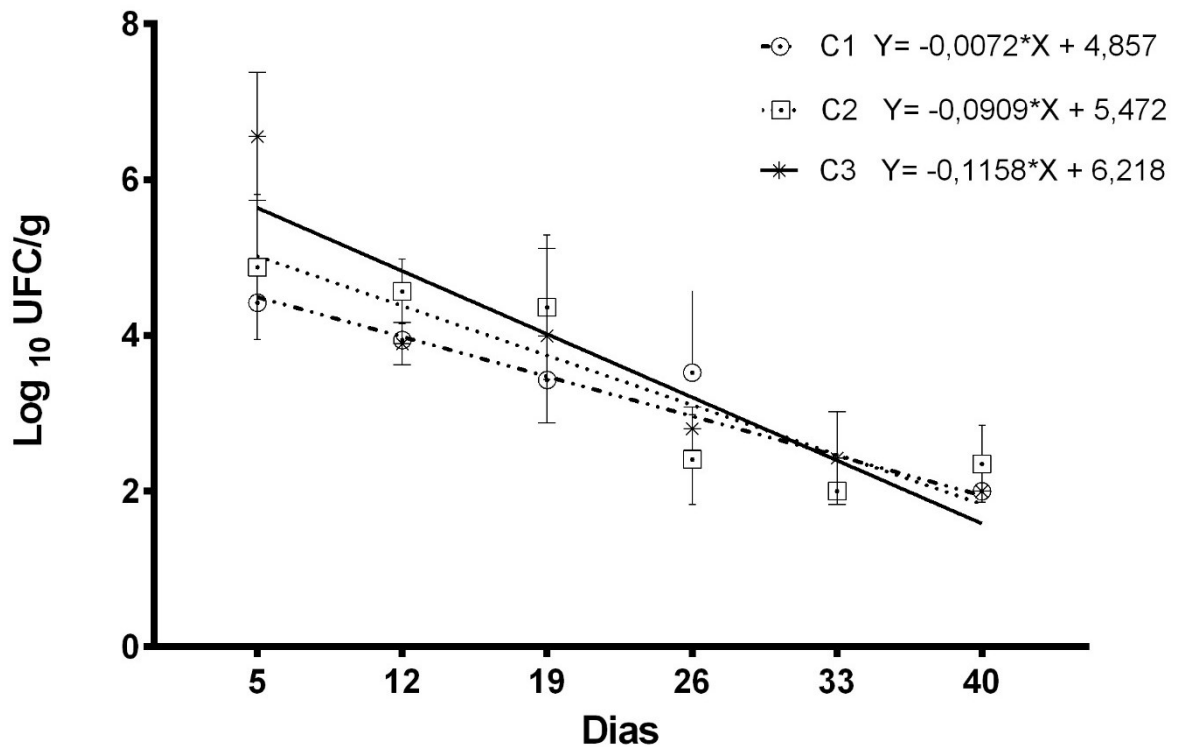
Tabela 4: Coeficiente de decaimento, T90, intervalo de confiança 95% para T90 e tempo de decaimento de 4 unidades logarítmicas para as três concentrações de *E. coli*.

Concentração	R²	p	K	T90 (dias)	4 Log₁₀
3,47.10⁶ (C1)	0,8954	0,0043	-0,07279	13,74	54,96
2,06.10⁷ (C2)	0,8340	0,0110	-0,09092	11,00	44,00
1,03.10⁸ (C3)	0,8490	0,0090	-0,1158	08,63	34,52

Fonte: A autora (2022)

Ao observar os dados é possível correlacionar o aumento da concentração com o decaimento da *E. coli*. Sendo que quanto maior a concentração, mais rápido o decaimento. Estes dados são corroborados com os valores dos coeficientes de decaimento e T90 que seguem a mesma tendência (Figura 23). Neste sentido, Jiang e colaboradores (2002) testaram a diferença na adubação com compostos contaminados em solos autoclavados e não autoclavados. O declínio da bactéria *E. coli* O157:H7 foi mais rápido em solos não autoclavados, o que pode ter ocorrido devido às interações antagônicas entre as cepas utilizadas no estudo e os micro-organismos já presentes no solo. Ainda conforme Jiang e colaboradores (2002) aplicações intensivas de composto no solo também tendem a aumentar a inativação de *E. coli* O157:H7.

Figura 23: Retas de decaimento da bactéria *E. coli* no solo e equação da reta para cada concentração.



Fonte: A autora (2021)

Islam e colaboradores (2004), estudaram o decaimento da bactéria *E. coli* O157:H7 no solo circundante às raízes de alface e salsinha que foram fertilizados com biofertilizantes produzidos a partir de fezes bovinas e de aves inoculados com 10^8 .UFC.g⁻¹ de *E. coli* O157:H7. Os resultados obtidos pelos pesquisadores, diferem deste estudo que obteve amostras positivas no solo apenas até o 33º dia. Os pesquisadores obtiveram amostras positivas no solo que circundava as raízes para ambos os biofertilizantes até o 154º dia em cultivos realizados entre o outono e inverno.

Conforme Oliveira e colaboradores (2012). As condições de temperatura também podem influenciar no decaimento microbiano, sendo o decaimento mais lento em períodos mais frios. Cabe ressaltar que o experimento de Islam et al. (2004), foi conduzido no estado da Geórgia-EUA, com temperaturas no outono que variam de 10 a 26° C e no inverno -1° C a 10° C, temperaturas mais baixas que as observadas neste experimento (16 -24° C) (SPARK, 2022). Ademais, as condições iniciais do solo não foram descritas, podendo haver diferenças do solo utilizado neste trabalho, além da cepa utilizada pelos autores, que também pode apresentar comportamento distinto daquela analisada neste experimento.

5.1.4 Internalização da *E. coli* nas raízes da alface

A bactéria *E. coli* ATCC foi encontrada nas raízes da concentração C2 através do método de detecção direta na ordem de $1,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ apenas na terceira semana, sendo este o limite de detecção do método. Em relação ao enriquecimento das amostras, na segunda e terceira semana, as concentrações C2 e C3 apresentaram presença de *E. coli*. Na quarta semana apenas C2 apresentou presença de *E. coli* através do enriquecimento. Nas demais concentrações e análises não foram encontradas *E. coli* ATCC nas amostras de raízes após a desinfecção.

Os valores médios (Log₁₀.UFC.g⁻¹) entre as duplicatas podem ser observados na tabela 5. O valor de 1 unidade logarítmica se refere a detecção através de enriquecimento da amostra em ambas as duplicatas. O valor de 0,5 log refere-se a presença de *E. coli* em apenas uma das duplicatas.

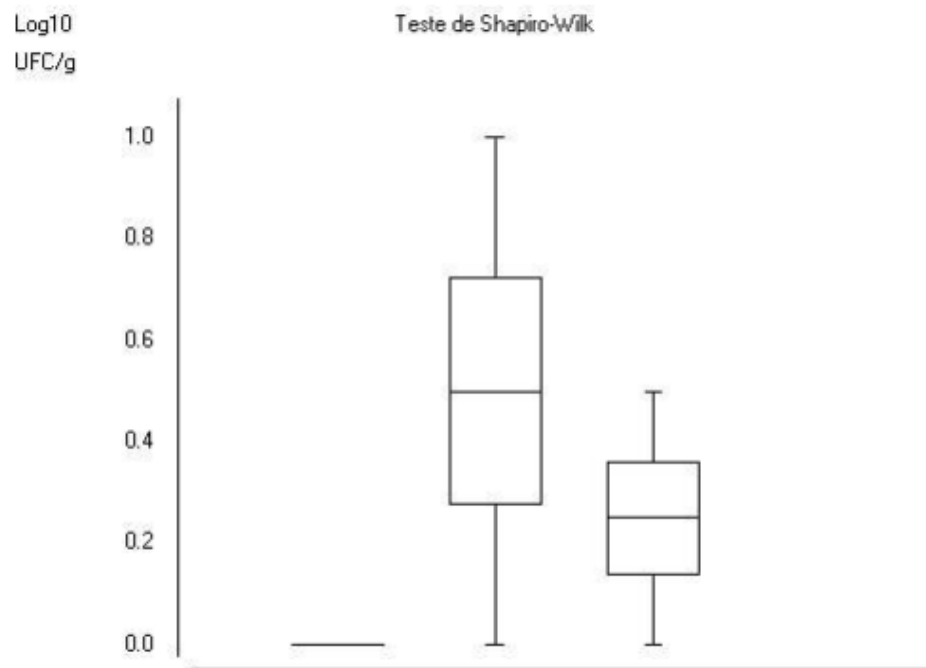
Tabela 5: Concentração de *E. coli* ATCC nas raízes ao longo do período de cultivo.

TEMPO (DIAS)	C1	C2	C3
5	0	0	0
12	0	1	0.5
19	0.5	1	0.5
26	0	1	0.5
33	0	0	0
40	0	0	0
Média	0,08	0,5	0,25

Fonte: A autora (2021)

Nenhuma das concentrações apresentaram distribuição normal de dados para a internalização nas raízes. Com $p = 0,0070$ para C1, $0,0096$ para C2 e $0,0096$ para C3. Os valores de erro padrão e mínimas e máximas podem ser observados através da Figura 24.

Figura 24: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas de concentração de *E. coli* internalizadas nas raízes das alfaces.



Fonte: A autora (2022)

Entretanto, embora a presença de *E. coli* ATCC tenha sido baixa, as raízes apresentaram contaminação por bactérias indígenas nas três concentrações ao longo das análises. Na primeira semana de análise, foram detectadas nas amostras da C1 bactérias indígenas na ordem de $6,92 \times 10^2$. Nas concentrações C2 e C3 os resultados não apresentaram contaminação. Na segunda semana as amostras foram negativas para as três concentrações. Na terceira semana, foram detectadas bactérias indígenas nas raízes nas três concentrações. Sendo: $9,52 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para C1, $,37 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para C2 e $2,35 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ para C3. Na quarta e quinta semana foram detectadas bactérias indígenas para a concentração C2, sendo $2,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ na quarta semana e $5,20 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ na quinta semana. Na sexta e última semana não foram detectadas bactérias em nenhuma das amostras. Para as amostras da água de lavagem da planta e da lavagem do mortiar entre as amostragens todos os resultados foram negativos para o crescimento de bactérias.

5.1.5 Internalização da bactéria *E. coli* nas folhas de alface

A internalização da *E. coli* nas folhas foram observadas na primeira semana para as concentrações de $2,06 \times 10^7$ e $1,03 \times 10^8$, C2 e C3, respectivamente. Sendo a contaminação

da C2 de $1,50 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ em apenas uma das duplicatas e C3 com média de $3,75 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ entre as duplicatas. Na segunda semana nenhuma concentração apresentou contaminação através da detecção direta. Após o enriquecimento apenas uma duplicata da concentração C3 foi positiva para a presença de *E. coli*. Na terceira semana, através da detecção direta, apenas uma duplicata da concentração C3 apresentou contaminação de $2,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹. Entretanto, no enriquecimento as concentrações C1, C2 e C3 apresentaram presença de *E. coli* em pelo menos uma das duplicatas. Na quarta semana, através da detecção direta, apenas a concentração C2 apresentou contaminação média $1,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ entre as duplicatas. No enriquecimento, a concentração C1 apresentou amostra positiva em uma das duplicatas e a concentração C3 apontou a presença de *E. coli* em ambas as duplicatas. Na quinta e sexta semana não houve amostras positivas através do método de detecção direta e enriquecimento. A média da contaminação nas folhas durante todo o experimento foi de 0,25 UFC.g⁻¹ para C1, $2,93 \times 10^1$ para C2 e $7,95 \times 10^1$ para C3, considerando a média das 6 análises realizadas no decorrer do cultivo. Em relação às amostras da água de lavagem da planta e da lavagem do mortor, todos os resultados foram negativos para o crescimento de bactérias. Os valores ao longo do cultivo são apresentados na tabela 6. Para fins estatísticos, para as amostras positivas através de enriquecimento é considerado o valor de detecção de 1 Log₁₀ UFP.g⁻¹ ($1,0 \times 10^1$ UFC.g⁻¹).

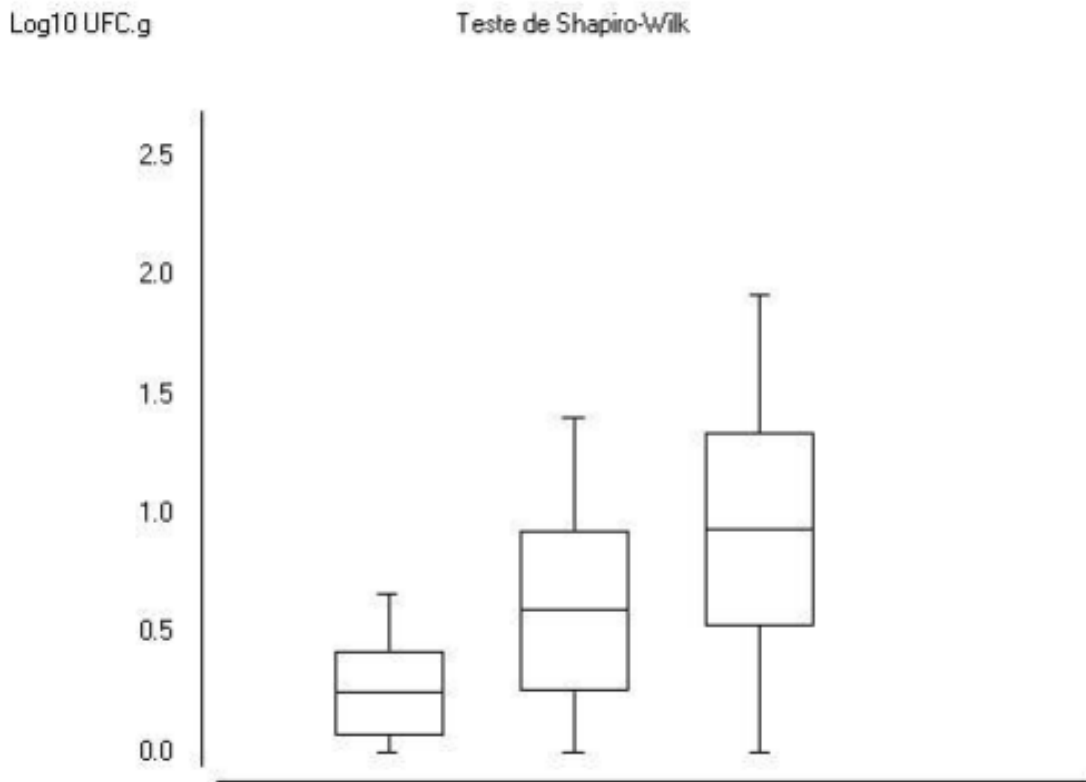
Tabela 6: Concentração de *E. coli* ATCC nas folhas durante o cultivo.

TEMPO (DIAS)	C1	C2	C3
5	0	1.08	2.47
12	0	0	0.5
19	1	0.5	1.65
26	0.5	2	1
33	0	0	0
40	0	0	0
Média	0,25	0,59	0,93

Fonte: A autora (2021)

Os dados apresentaram distribuição normal para as concentrações C2 e C3 ($p= 0,0932$ e $p= 0,4430$, respectivamente). Para a concentração 1 (C1) o valor de p foi de 0,0098, portanto sem normalidade na distribuição. Os valores do erro padrão e mínimas e máximas podem ser observadas no gráfico tipo blox-plot (Figura 25).

Figura 25: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) da internalização de *E. coli* na folha de alface.



Fonte: A autora (2022)

Diferentemente de outras pesquisas reportadas na literatura, neste estudo buscou-se analisar o processo de internalização da *E. coli* via adubação do solo durante todo o ciclo de cultivo de forma a garantir um completo panorama da contaminação interna com o uso deste biofertilizante. Alguns autores como Bernstein et al 2007; Ge et al, 2012 e Gorbatshevich et al. 2013 obtiveram resultados de internalização na estrutura das raízes e translocação para partes comestíveis da planta. Outros, entretanto, reportam a inabilidade de internalização dentro das plantas de alface (Johannessen et al, 2005; Erickson et al 2014).

Assim como no presente estudo, Muphy e colaboradores (2016) ao analisar a internalização de *E. coli* O157:H7 em folhas e raízes de alface obteve grande variação de resultado. As amostras de resíduos sólidos compostados e digestato anaeróbico inoculadas na concentração de 5 Log₁₀ CFU g. Nesse estudo, a bactéria *E. coli* foi encontrada até o 50º dia no solo em concentrações médias de 3 log para o composto feito a partir de resíduos orgânicos compostados. As plantas de alface apresentaram contaminação para *E. coli* nas folhas e raízes durante o

experimento com grande variação. O digestato anaeróbio apresentou amostras positivas nas raízes nos dias 7, 21 e 50. Já para as folhas os resultados foram positivos nos dias 7, 21, 28, 42 e 50 em pelo menos uma das replicatas.

NDUHIU e colaboradores (2018) testaram fezes humanas tratadas e inoculadas com duas concentrações diferentes de *E. coli*, *Campylobacter Jejuni* e *Salmonella entérica* (10^3 e 10^{10}) em cultivos de alface e coentro. Como resultado, apenas as plantas inoculadas com concentração de 10^{10} apresentaram amostras positivas para todos os patógenos testados. Para a bactéria *E. coli*, as folhas apresentaram contaminação interna média de 0,57 logs e as raízes apresentaram internalização de 0,67 logs quando analisadas após a colheita. Em um comparativo com este trabalho, valores semelhantes de internalização média foram encontrados nas folhas (0,25 logs para C1, 0,59 logs para C2 e 0,93 logs para C3).

As variações dos resultados obtidos neste estudo podem ser devidas a diversos fatores, entre eles a variedade utilizada, maturidade das plantas, além de danos físicos no tecido vegetal ocasionados pela manipulação dos cultivos no plantio, ao longo do período ou na retirada das plantas para análise. Neste sentido, Mitra e colaboradores (2009), estudaram o efeito das rotas de exposição aos patógenos *E. coli* O157:H7 e o processo de internalização em folhas de espinafre de diversas variedades. Neste estudo foram testados diferentes tipos de inoculação como água de irrigação, inoculação no solo e cortes e/ou pressão nas folhas com material contendo inóculo. Como resultado plantas inoculadas através de inserção do inóculo no tecido vegetal por pressão, apresentaram contaminação similar a concentração utilizada para inoculação. Enquanto as plantas que haviam recebido o inóculo pelo solo apresentaram baixa contaminação, plantas inoculadas através de gotas aspergidas com inóculos não apresentaram contaminação. Segundo os autores, a pressão exercida para a infiltração do inóculo causa danos na superfície das plantas, o que força a bactéria a adentrar no interior dos espaços intracelulares. Os autores também observaram que os níveis de contaminação decaíram em todos os tipos de inoculação, exceto por pressão. Esse decaimento suporta a ideia de que a rizosfera pode ser um ambiente com menos suporte para os patógenos humanos. As variedades testadas também apresentaram diferentes níveis de contaminação nesse estudo.

Neste sentido, o estudo de Wright e colaboradores (2017) mostra que a internalização está fortemente relacionada ao tipo de planta cultivada e os níveis de contaminação aplicados no inóculo. Nesse estudo em questão, os pesquisadores obtiveram resultados que mostram níveis de internalização diferentes para a alface, espinafre e tabaco sob concentrações de 10^3 e 10^7 . Enquanto as raízes e folhas de espinafre apresentaram 2,31 e 3,66 unidades logarítmicas,

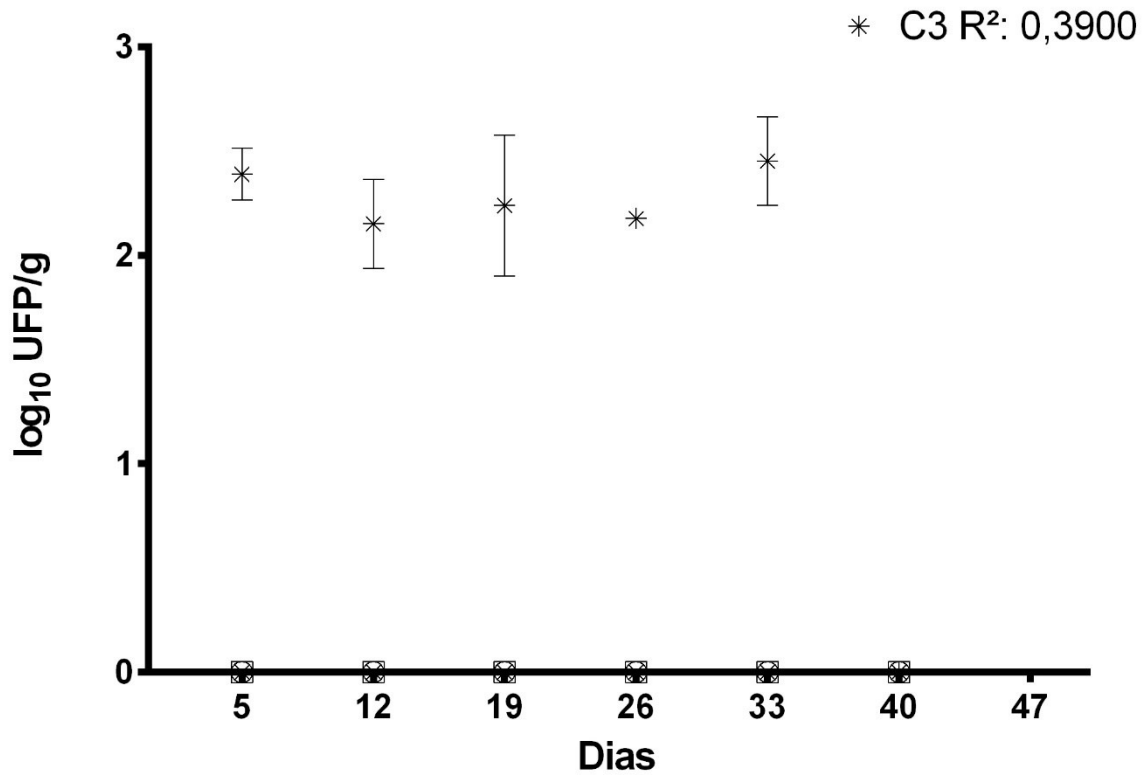
respectivamente, as alfaces apresentaram contaminação de 2,19 logs para as raízes, com inóculo de 10^7 . Como pode ser observado, nesse estudo, as folhas apresentaram contaminação mais alta que as raízes, corroborando com os dados de internalização das raízes apresentados na seção 5.1.4 deste trabalho, o que pode sugerir que a internalização não ocorre somente a partir das raízes.

Ainda em relação com a variedade da planta e o processo de internalização, Jacob e Melotto (2020) testaram 11 tipos de alfaces e a diferença de contaminação entre as espécies. Uma solução bacteriana com 10^8 UFC.mL foi utilizada nos potes de plantio para o estudo. As plantas foram submersas em 50 ml de água com inóculo. Os autores observaram que a *Salmonella* e *E. coli* foram significativamente afetadas pela diversidade genética da planta. A população de bactérias localizadas no apoplásto decaíram significativamente em 9 das 11 espécies de alface. A variedade genética está ligada a diferenças no sistema de respostas imunológicas das plantas. Os autores concluíram que os traços morfológicos dos poros estomatais, como área e densidade, contribuem para a penetração bacteriana nas folhas de alface. As variedades genéticas da alface possuem extensivas variações nos traços das folhas, como fenóis superficiais, proteínas, ceras e açúcares, ângulo de contato e densidade estomatal que afetam significativamente o processo de internalização dos patógenos.

5.1.6 Internalização do vírus *HAdV-2* nas folhas e raízes

O Adenovírus humano tipo – 2 (*HAdV-2*) não foram detectados nas folhas de alface durante o ciclo de cultivo em nenhuma das concentrações após a desinfecção das folhas. As raízes por sua vez, apresentaram contaminação apenas para a C3 em 5 das 6 semanas analisadas. A Figura 26 mostra a contaminação da raiz no decorrer do experimento. Os resultados estão expressos em log de micro-organismos viáveis. Os dados não apresentaram distribuição normal na série ($p = 0,0070$).

Figura 26: Internalização *HAdV-2* nas raízes das alfaces durante o ciclo de cultivo com erro padrão.



Fonte: A autora (2021)

Resultados semelhantes foram reportados por Hirneisen e colaboradores (2010), que analisaram os vírus da Hepatite A e Murinovírus na cebola e espinafre em solo e em sistemas hidropônicos. Para esse estudo, houve internalização em apenas uma amostra de espinafre no sistema com solo de 10 amostras analisadas. Em sistemas hidropônicos ambos os vírus foram encontrados em ambas as plantas na concentração de 4 log CG/planta.

Carducci e colaboradores (2015) analisaram a possível internalização de vírus entéricos nas folhas de tomates cultivados em sistemas hidropônicos. Para esse estudo, os autores inocularam três concentrações do vírus Coxsackie B2 na solução de nutrientes utilizados para o cultivo hidropônico do tomate, atingindo as concentrações: 11, 9 e 7 unidades logarítmicas. Os vírus foram observados nas folhas no primeiro dia pós inoculação para as duas maiores concentrações nas análises analíticas na concentração de 3 e 2 Log₁₀ UFP.mL⁻¹. A contaminação apresentou leve decaimento até o quarto dia em que foram detectados vírus apenas para a

concentração mais alta. Embora os autores não tenham analisado as raízes do tomate, as folhas mostraram contaminação nos quatro dias analisados para as duas concentrações mais altas. Entretanto, os dados obtidos por Carducci e colaboradores diferem dos obtidos neste trabalho, onde a concentração viral nas raízes se manteve entre 2 e 3 unidades logarítmicas durante 5 semanas do ciclo de cultivo. Tal diferença é esperada e se deve ao tipo de cultivo, planta, concentrações virais e forma de inoculação. Desta forma, conforme Hirnesein et al 2012, sistemas hidropônicos podem apresentar maior internalização se comparados à sistemas com solo com a mesma quantidade de inoculação.

5.3 EXPERIMENTO DE CULTIVO EM LISÍMETROS CETRE

O segundo experimento de cultivo das alfaces nos lisímetros do CETRE durou 35 dias, compreendendo 6 semanas de análises microbiológicas do solo e 5 semanas de análises microbiológicas nas plantas.

5.3.1 Contaminação microbiológica das fezes co-compostadas, solo e mudas de alface antes do plantio

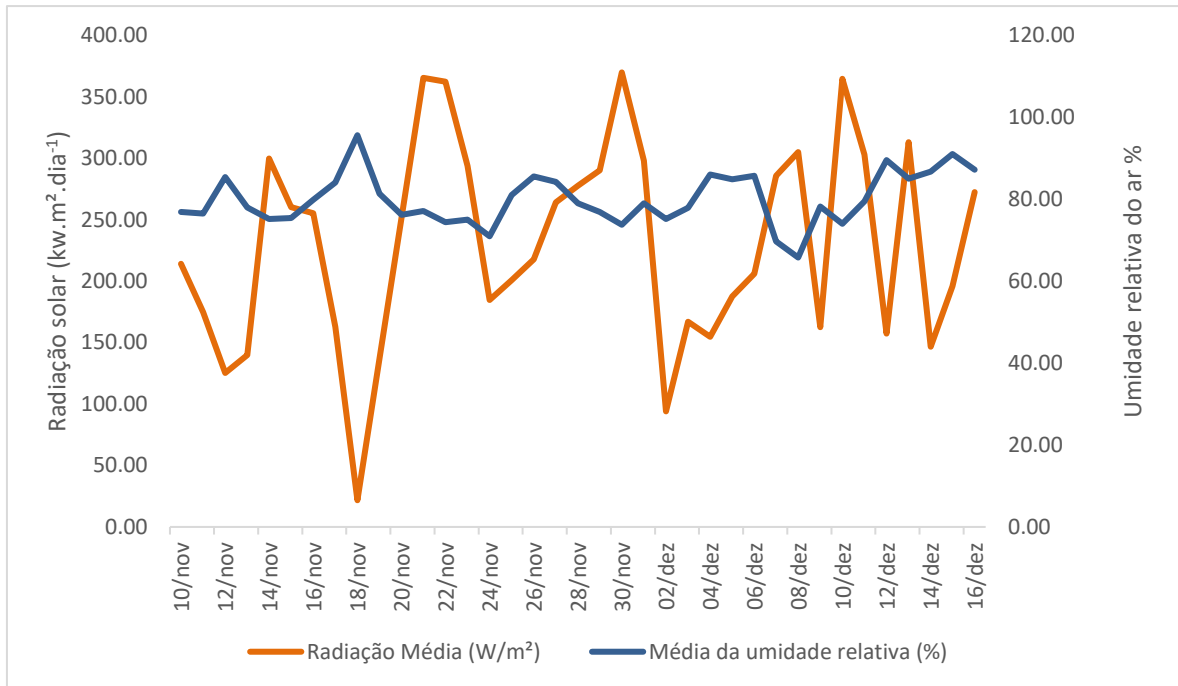
As fezes co-compostadas não apresentaram contaminação para as bactérias *E. coli* e *Salmonella*. O solo não apresentou contaminação para *E. coli* e *Salmonella* nos cinco lisímetros (1, 2, 3, controle 1 e controle 2).

Em relação as plantas, foram conduzidas análises nas raízes e folhas além do substrato de crescimento das mudas presente na rizosfera. Todas as amostras de raízes e folhas foram negativas para *E. coli* e *Salmonella*, através dos métodos de detecção direta e enriquecimento. A contaminação média por *E. coli* das triplicatas de substrato presente na rizosfera das mudas com 33 dias de idade foi de $4,43 \times 10^3$ UFC.g⁻¹.

5.3.2 Condições climatológicas do plantio

Os dados de radiação solar (w.m². dia⁻¹), temperatura (° C), precipitação diária acumulada (mm) e umidade relativa do ar (%) do segundo cultivo foram obtidos através da estação meteorológica 1006, localizada no Centro de Treinamento da Epagri – CETRE em Florianópolis/SC (Figura 27).

Figura 27: Radiação solar e umidade relativa do ar durante o plantio.

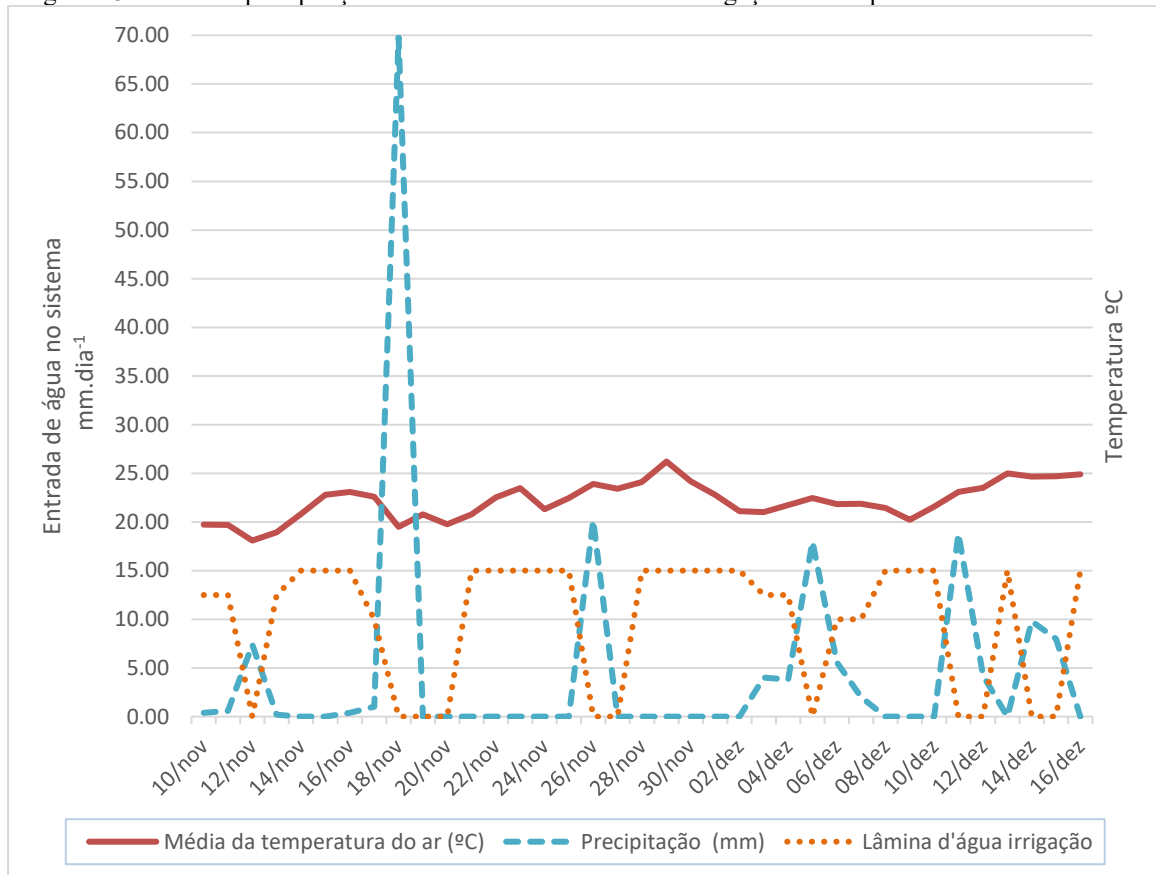


Fonte: A autora, adaptado de EPAGRI (2022)

A radiação solar variou de $21 \text{ w.m}^2. \text{ dia}^{-1}$ a $364,64 \text{ w.m}^2. \text{ dia}^{-1}$ durante o período do cultivo, mantendo uma média de $220 \text{ w.m}^2. \text{ dia}^{-1}$ durante o segundo cultivo das alfaces. A umidade relativa do ar variou entre 60% e 90%, com média de 80% durante todo o ciclo (Figura 27). A temperatura do ar variou de 18° C a 25° C , com média de $22,5^\circ \text{ C}$. Durante o cultivo apenas 8 dias tiveram precipitação maior que 5 mm.

A precipitação no período variou de 0 mm a 69,80 mm. Este evento de precipitação ocorreu no 8º dia do ciclo. A soma acumulada de precipitação foi de 174 mm. Nos dias em que a precipitação era insuficiente para suprir a demanda hídrica das alfaces, lâminas de água eram aplicadas nos lisímetros. As lâminas de água foram calculadas em razão da vazão dos gotejadores dos lisímetros e o tempo de irrigação para cada dia de cultivo (Figura 28). Os valores apresentados são estimativas aproximadas da relação entre a vazão e o tempo. As lâminas foram aplicadas conforme a necessidade do solo, não houve manejo da irrigação através de cálculos de evapotranspiração ou demanda hídrica da planta. Foram aplicadas lâminas de 10 mm nos dias 8, 27 e 28, lâminas de 12,5 mm no 1º, 2º, 4º, 24 e 25º dia e lâminas de 15 mm nos dias 5, 6, 7, 12, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 22, 23, 29, 30, 31 e 34 do ciclo das alfaces (Figura 28).

Figura 28: Dados de precipitação combinados com lâminas de irrigação e a temperatura média do 2º cultivo.



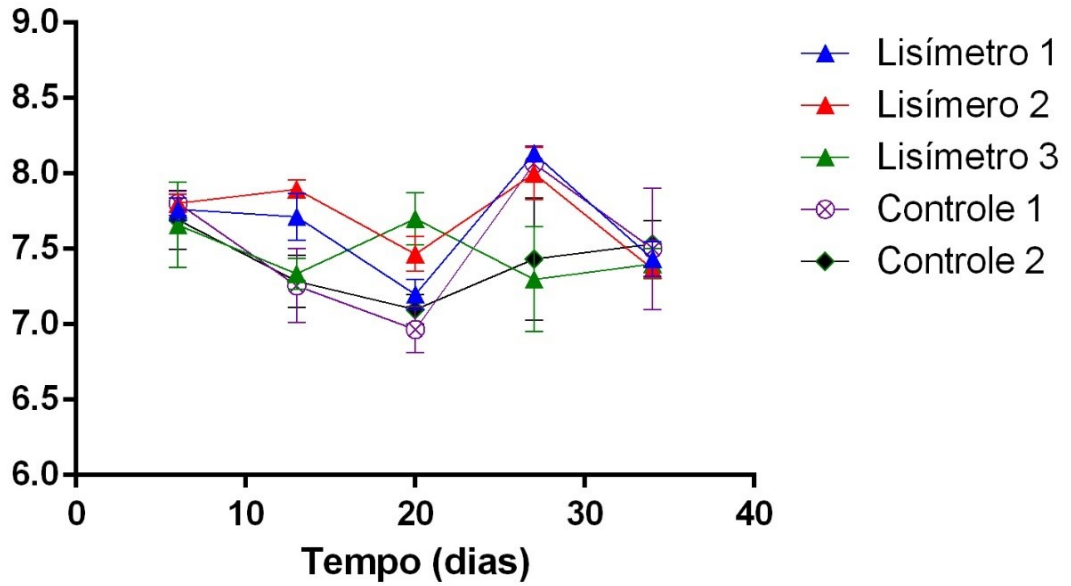
Fonte: A autora (2022)

5.3.3 Umidade e pH do solo

Em relação ao pH, na primeira semana os lisímetros 1, 2 e 3 apresentaram pH de 7,7, 7,8 e 7,6, respectivamente. O controle 1 com inóculo e sem plantas obteve média de 7,80 e 7,7 para o controle 2 sem inóculo e com plantas. Na segunda semana a média dos valores para os lisímetros foram de 7,7, 7,9 e 7,3, para os lisímetros 1, 2 e 3, respectivamente. O controle 1 apresentou a média de 7,25 e o controle 2 o valor de 7,3. Na terceira semana os valores variaram de 7,2 a 7,7 nos lisímetros 1, 2 e 3. O controle 1 apresentou valor de 6,9 e o controle 2 de 7,1. Na quarta semana os lisímetros 1 e 2 apresentaram pH de 8,1 e 8, respectivamente. O lisímetro 3 apresentou pH de 7,3, enquanto nos controles 1 e 2 o valor foi de 8 e 7,43, respectivamente. Na quinta semana os valores foram de 7,4 para os lisímetros 1, 2 e 3 e 7,5 para os controles 1 e 2 (Figura 29).

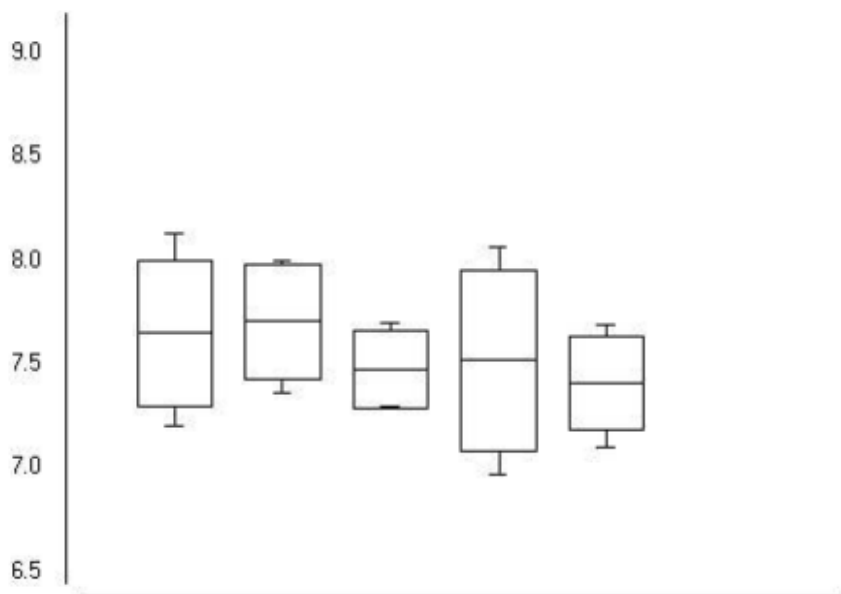
Em relação a normalidade dos dados de pH, todos os lisímetros foram considerados normais ($p > 0,05$). A distribuição do desvio padrão (caixas) e das mínimas e máximas podem ser observadas no gráfico do tipo blox-plot (figura 30).

Figura 29: Variação dos dados de pH ao longo do ciclo de cultivo nos lisímetros



Fonte: A autora (2022)

Figura 30: Gráfico tipo blox-plot com a distribuição dos dados de desvio padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) dos valores de pH para os lisímetros 1, 2 e 3, controle 1 e controle 2, respectivamente.

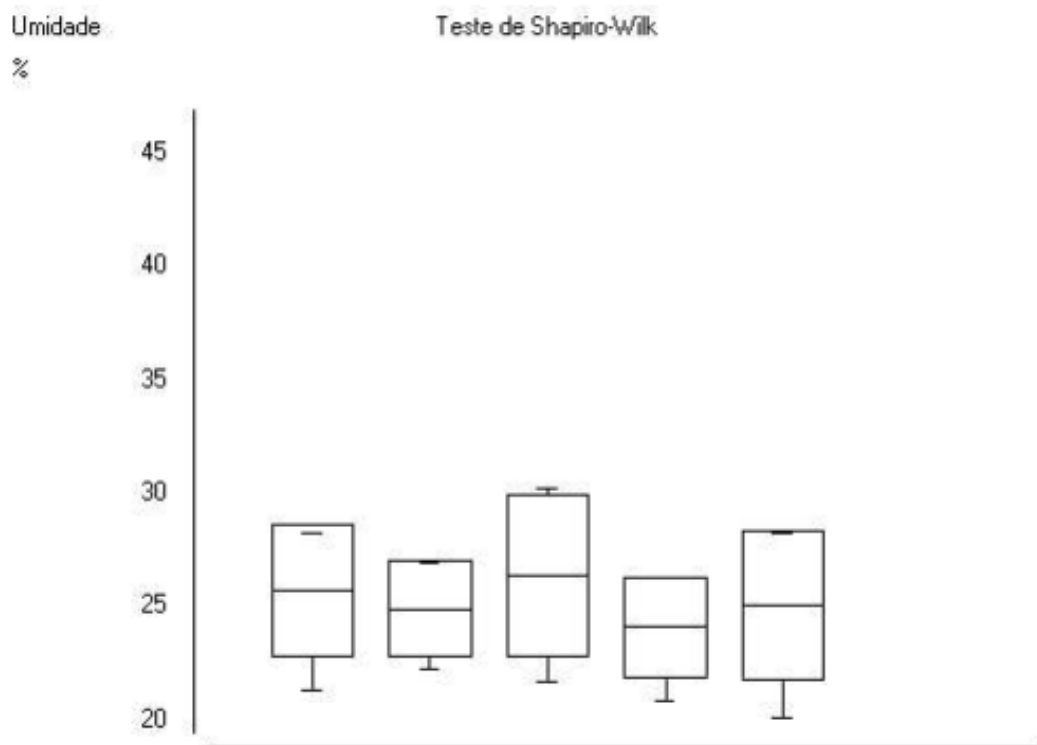


Fonte: A autora (2022)

Não houve variância estatística entre os valores de pH dos lisímetros ($p > 0,05$). Entretanto, houve variância entre a interação tempo e lisímetros. Neste sentido, as médias da 3ª e 4ª semanas de análise, diferiram estatisticamente ($p = 0,0322$).

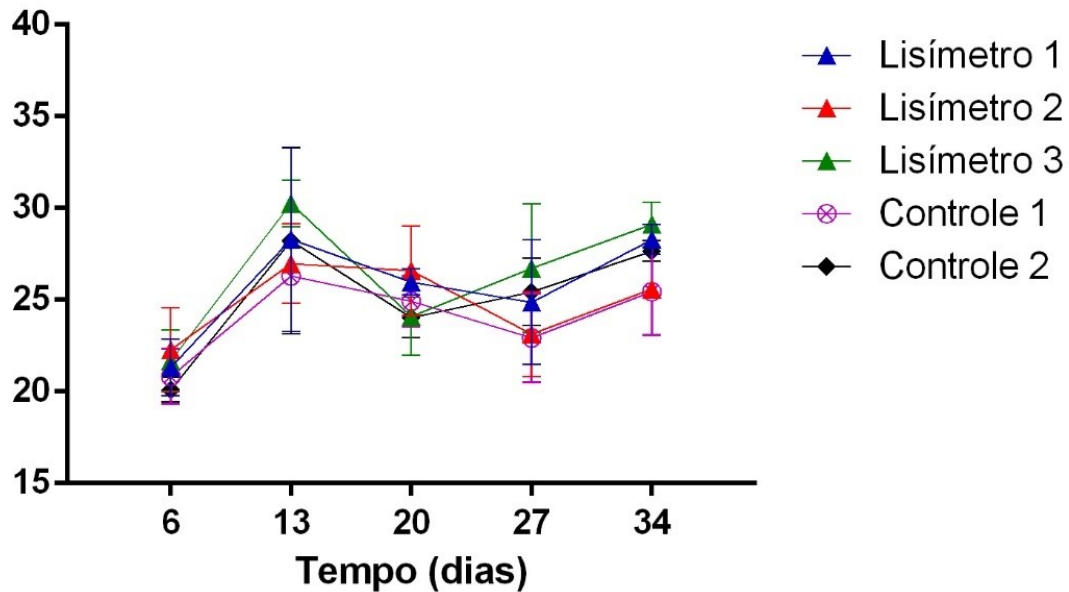
Em relação a umidade, a variância entre as médias dos lisímetros ficou próxima do limiar significativo ($p = 0.0572$). Entre a interação lisímetros x tempo, a variância foi de $p = 0.0003$. Com variância significativa entre as médias da primeira semana e das 2ª, 3ª e 4ª semanas ($p < 0.01$). Também houve variância entre as médias da 2ª semana e as médias da 3ª e 4ª semana ($p < 0.05$). A 4ª semana também apresentou variância das médias da 5ª semana ($p < 0.05$) (Figura 32). A série de dados foi considerada normal para todos os lisímetros ($p > 0,05$). A distribuição dos dados de desvio padrão e mínimas e máximas podem ser observadas através do gráfico tipo blox-plot (Figura 31).

Figura 31: Gráfico tipo blox-plot da série de dados de umidade do solo com desvio padrão (caixas) e mínimas e máximas (barras) dos lisímetros 1, 2 e 3 e controles 1 e 2., respectivamente.



Fonte: A autora (2022)

Figura 32: Variação dos dados de umidade ao longo do ciclo de cultivo nos lisímetros



Fonte: A autora (2022)

5.3.4 Decaimento bactéria *Salmonella* no solo

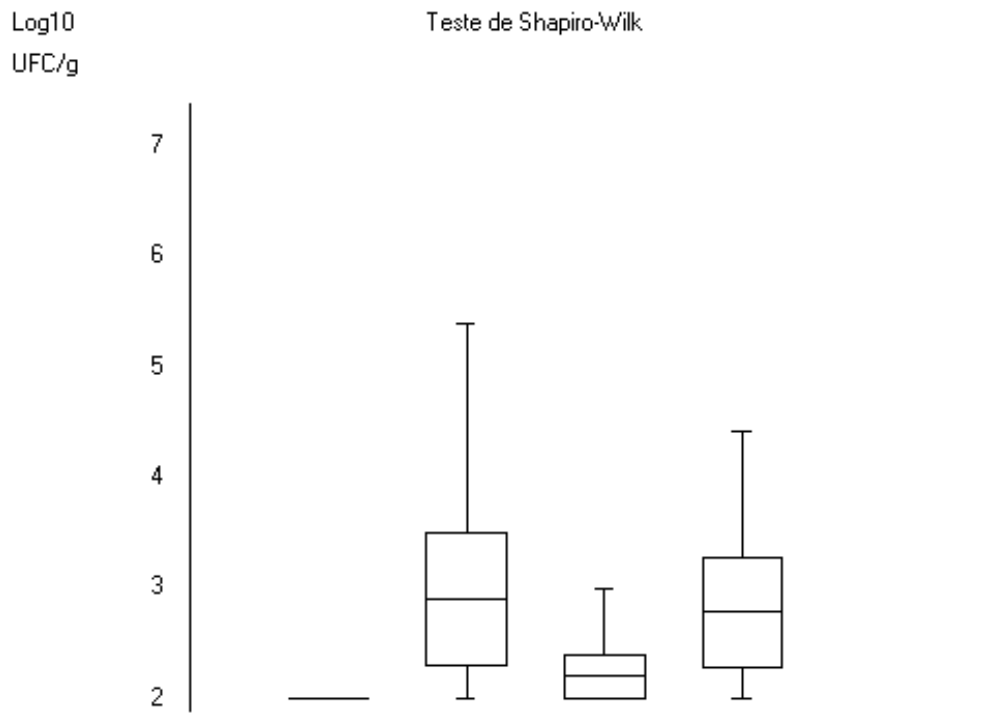
Considerando a contaminação das fezes co-compostadas inoculadas com *Salmonella* como $7,1 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (6,86 unidades logarítmicas), a média de decaimento nos três lisímetros com fezes co-compostadas ao 6º dia foi de 2,34 unidades logarítmicas. No 27º dia, a redução foi de 4,35 unidades logarítmicas. No 35º dia não foi detectada *Salmonella* em nenhuma das amostras.

Para o controle 1 sem plantas e com fertilização e inóculo o decaimento ao longo do ciclo foi de 2,57 log. A *Salmonella* foi detectada no controle até o 13º dia, em concentração de $2,60 \times 10^4$ (4,41 logs). No 27º, 35º e 42º dias do ciclo as amostras foram negativas. O controle 2, com plantas e com fertilização sem inoculação, não apresentou amostras positivas em nenhuma das cinco coletas.

Em relação a normalidade, a série de dados foi considerada fora da distribuição normal ($p < 0,01$) para todos os lisímetros. As distribuições dos erros padrões e mínimas e máximas de contaminação do solo por salmonela podem ser observados no gráfico tipo blox-plot (Figura 33). Os coeficientes de determinação (r^2), p , tempo de decaimento para 1 unidade logarítmica

(T90), coeficiente de decaimento (K) e o tempo previsto para o decaimento de 4 unidades logarítmicas podem ser observados na tabela 7. O decaimento da bactéria *Salmonella* no solo dos lisímetros, bem como as retas de regressão linear podem ser observados através da Figura 34.

Figura 33: Gráfico tipo blox-plot com erro padrão (caixas) e mínimas e máximas das médias de contaminação do solo por *Salmonella* nos lisímetros 1,2 e 3 e controle sem planta.



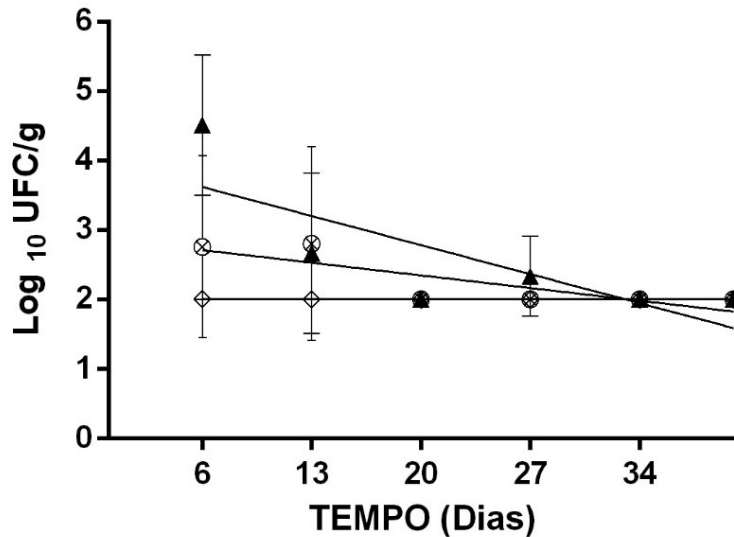
Fonte: A autora (2022)

Tabela 7: Coeficientes de determinação (r^2), coeficientes de decaimento (K), T90, Tempo para decaimento de 4 logs, e valores de p para a bactéria *Salmonella*.

	r^2	p	K	T90	4 Log ₁₀
Fezes co-compostadas	0,6115	0,0661	-0,0575	16,74	66,96
Controle sem planta	0,6856	0,0418	-0,02605	38,39	153,56

Fonte: A autora (2022)

Figura 34: Retas de regressão e equações de decaimento da *Salmonella* no solo dos lisímetros em triplicata e do controle 1



- ▲ Fezes co-compostadas $Y = -0,05975 \cdot X + 3,979$
- ⊗ FC sem planta com inóculo $Y = -0,02605 \cdot X + 2,868$
- ◊ FC sem inóculo com planta

Fonte: A autora (2022)

Fongaro e colaboradores (2017) estudaram o decaimento e percolação de quatro micro-organismos no solo após fertilização com digestato suíno contaminado com 7 logs de bactéria *Salmonella*, o coeficiente de decaimento obtido foi de -0,084, levando 11,90 dias para o decaimento de 1 log. No trabalho de Carlon (2021) utilizando fezes co-compostadas inoculadas com 7 logs de *Salmonella* nos mesmos lisímetros e com a mesmo tipo de planta (*Lactuca Sativa*), obteve um coeficiente de decaimento de -0,0838, com a redução de 1 log estimada em 11,9 dias. Roberts et al. (2016) obtiveram K: -0,0757 para um estudo realizado com biossólidos inoculados com 6 logs de *Salmonella entérica*, obtendo T90 de 13,21 dias. Desta forma, os valores encontrados na literatura são ligeiramente mais altos que o coeficiente obtido na presente pesquisa com K: -0,0597 e 16,76 dias para o decaimento de 1 log no sistema com planta. A diferença nos valores pode ter ocorrido em função das condições ambientais do cultivo,

como: tipo do solo, temperatura, teor de umidade, pH do solo e estação do ano em que o experimento ocorreu.

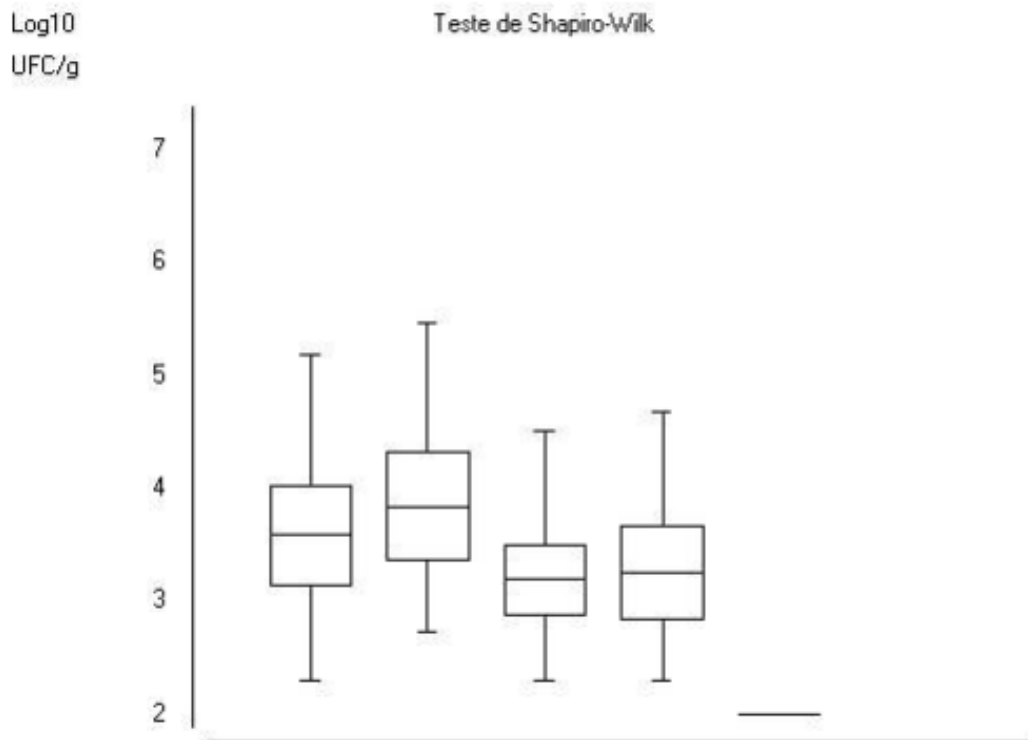
5.3.5 Decaimento bactéria *E. coli* no solo

O decaimento da bactéria *E. coli* apresentou comportamento similar ao da *Salmonella*. Considerando a concentração inicial de inoculação das fezes co-compostadas como $7,0 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ (6,84 unidades logarítmicas), o decaimento da *E. coli* para os três lisímetros com fezes co-compostadas 6 dias após a aplicação do biofertilizante foi de 1,78 unidades logarítmicas. Até o 35º dia do ciclo de cultivo o decaimento observado foi de 4,07 logs. No 42º dia de cultivo a *E. coli* apresentou recrescimento com média de contaminação de $8,33 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, e redução de 3,82 logs do começo do ciclo até o 42º dia.

Para o controle 1 (sem planta e com fertilização e inóculo), o decaimento nos 6 primeiros dias foi de 1,87 unidades logarítmicas. Até o 42º dia do ciclo de plantio, o decaimento foi de 4,54 logs. O segundo controle com plantas e fertilização sem inóculo não apresentou contaminação por *E. coli* até o 35º dia, quando se verificou contaminação de $2,00 \times 10^2$ UFC.g⁻¹. No 42º dia do plantio, o segundo controle não apresentou contaminação (Figura 36). A ausência de contaminação no controle 2 no decorrer do cultivo, com exceção para o 35º dia pode indicar contaminação cruzada no controle, o que pode ter ocorrido através de uma falha humana na troca das luvas no manuseio das amostras no momento de retirada do solo do trado.

Todos os lisímetros apresentaram normalidade na série de dados, exceto o controle 2 com fezes co-compostadas sem inóculo ($p = 0,0070$). As mínimas e máximas e erro padrão das médias de contaminação do solo por *E. coli* pode ser observada através do gráfico blox-plot (Figura 35)

Figura 35: Gráfico do tipo Blox-plot com os erros padrões (caixas) e mínimas e máximas (barras) da distribuição dos dados de contaminação do solo por *E. coli* dos lisímetros 1, 2 e 3 e controles 1 e 2, respectivamente.



Fonte: A autora (2022)

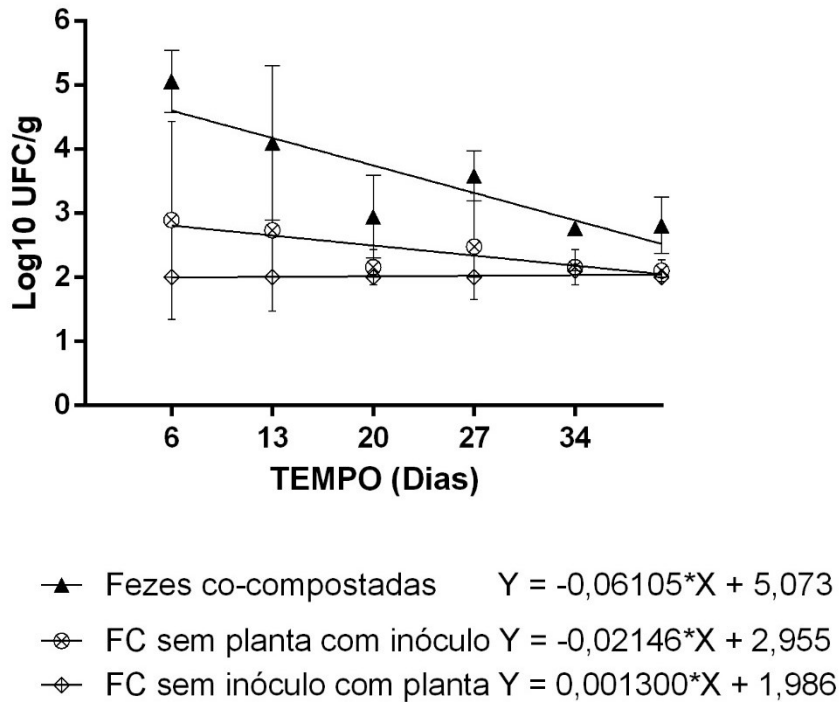
As retas de regressão linear para o decaimento da bactéria *E. coli* no solo foram traçadas e podem ser observadas na Figura 36. Os valores de R^2 , K , p , $T90$ e tempo para inativação de 4 Log_{10} podem ser observados na tabela 8.

Tabela 8: Valores de R^2 , k , p , $T90$ e tempo de inativação para 4 Log_{10} para a bactéria *E. coli*

	R^2	p	K	$T90$	4 Log_{10}
Fezes co-compostadas	0,7499	0,0257	-0,06117	13,24	52,96
Controle sem planta	0,7336	0,0294	-0,02233	40,85	163,4

Fonte: A autora (2022)

Figura 36: Retas de decaimento e equações da reta dos lisímetros de fezes co-compostadas em triplicatas e controle 1 e 2.



Fonte: A autora (2022)

Ao comparar o coeficiente de decaimento entre os dois experimentos realizados nesta pesquisa, pode-se observar que os valores são similares. No experimento realizado em vasos, os valores de K para as fezes co-compostadas com 10^6 UFC.g⁻¹ de *E. coli* foi de -0,07279, levemente mais alto ao obtido no experimento realizado nos lisímetros, K : -0,0611. Os coeficientes de decaimento (K) obtidos neste trabalho também foram levemente mais baixos que os obtidos por Carlon (2021) nos mesmos lisímetros, K : -0,0985 para as fezes co-compostadas inoculadas com 10^7 UFC.g⁻¹ de *E. coli*.

Em comparação a coeficientes de decaimento em estudos com biofertilizantes feitos a partir de fontes animais, encontramos valores de K próximos aos obtidos neste trabalho. Fongaro e colaboradores (2017) utilizaram digestato suíno inoculado com 10^7 UFC.g⁻¹ de bactérias *E. coli* em solo arenoso e argiloso. Para solos arenosos, o coeficiente de decaimento obtido para *E. coli* foi de 0,093, demorando 10,30 dias para o decaimento de 1 unidade logarítmica. Roberts e colaboradores (2016), em um experimento realizado com aplicação diversos compostos e bio sólidos em um microcosmos com incubação em câmaras de crescimento em ciclo

de claro/escuro de 14h/10h e umidade constante de 25% realizado por obtiveram K de -0,0809 para *E. coli* O157:H7.

A sobrevivência microbiana depende de vários fatores como tipo de solo, umidade, pH e temperatura atividade de água, potencial de redução e oxidação, características genéticas da planta, interações microbianas, além de presença de rizosfera (MURPHY et al., 2016; BERNSTEIN et al., 2007). Neste trabalho, pode-se observar que a presença da rizosfera influenciou significativamente no decaimento dos patógenos neste estudo. Enquanto os lisímetros com plantas fertilizadas com fezes co-compostadas inoculadas apresentaram decaimento de 1 log em 13,45 dias, o tempo para decaimento de 1 log no sistema com fertilização, porém sem plantas foi de 40,85 dias.

Neste sentido, é possível encontrar, principalmente em estudos relacionados à colonização de bactérias nas plantas que a rizosfera, bem como as folhas podem ser um ambiente com menos suporte para os patógenos humanos. Isto se deve à mecanismos naturais de reconhecimento de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMP's) pelas células vegetais que desencadeiam a produção de respostas de defesa associadas a Imunidade Acionada por Padrões (PTI), o que pode explicar as diferenças de decaimento entre o solo com e sem plantas encontradas neste estudo (JACOB e MELOTTO, 2020; MITRA et al. 2009). Desta forma, mais estudos comparativos de decaimento entre cultivos e solos sem plantas são requeridos.

5.3.6 Presença de *E. coli* e *Salmonella* no lixiviado

A coleta de lixiviado ocorreu nos dias 6, 13, 20, 27 e 35 após o transplântio das mudas. Após coletadas, as amostras foram mantidas a 4 °C por 3 dias até a análise. É importante ressaltar que a coleta do lixiviado foi realizada conforme a disponibilidade de lixiviado nas bombas coletoras. Sendo na primeira semana coletado lixiviado apenas no lisímetro 1, na segunda semana analisadas amostras dos lisímetros 3 e controle 1 (sem plantas). Na terceira semana o lisímetro 2, na quarta semana os lisímetros 1 e 2 e na quinta e última semana os lisímetros 1, 2 e 3. Em relação a *Salmonella*, nenhuma das amostras citadas acima apresentaram contaminação através do método direto de detecção. Em relação a *E. coli*, as amostras foram negativas até o 27º dia. No 35º dia do ciclo foram detectados $7,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^2$ UFC.mL⁻¹ para os lisímetros 1 e 3, respectivamente.

A lixiviação da bactéria *E. coli* na 5ª semana não é explicada por nenhum evento de precipitação ou rega excessiva na semana de coleta, as condições de umidade também se mantiveram na média para os lisímetros com amostras positivas.

Fongaro e colaboradores em estudo em solos arenosos e argilosos analisaram a lixiviação proveniente da entrada de 300mm de água no sistema, 120 dias após a fertilização com digestato suíno inoculado com 10^7 UFC.g⁻¹ de *E. coli* O157:H7. Como resultado, a *E. coli* demorou 1 dia para chegar à profundidade de 50 cm no solo, onde permaneceu detectável até o 20º dia. Em relação a lixiviação, a *E. coli* foi detectada após 4h após o evento de precipitação, aumentando a concentração até 48h. Em comparação com este trabalho, é possível observar que a precipitação máxima ocorrida durante o ciclo foi de 69mm, valor cerca de 4 vezes menor que o utilizado no trabalho de Fongaro e colaboradores.

Ademais, a lixiviação de bactérias, depende dos macroporos do solo e dos caminhos preferenciais da água para o transporte de micro-organismos, deste modo, destaca-se a importância da manutenção das condições ambientais do experimento, de forma a manter o solo intacto e a preservar os macroporos e o transporte de micro-organismos. (FORSLUND; PLAU-BORG et al., 2011).

5.3.7 Internalização de *Salmonella* nas raízes e folhas de alface

Três amostras de alface de cada lisímetro foram analisadas nos dias 6, 13, 27 e 35 após o transplântio das mudas.

5.3.7.1 Raízes

Em relação a internalização nas raízes, não foram encontradas bactérias típicas de *Salmonella* ATCC durante as 5 semanas de análise. Entretanto, foram encontradas bactérias não típicas no decorrer das análises. Os valores apresentados se referem as médias da triplicata em cada lisímetro.

No 6º dia foram encontradas bactérias não típicas na ordem de $3,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ nos lisímetros 1 e 2. O lisímetro 3 foi negativo através de detecção direta e enriquecimento. No 13º dia de cultivo os lisímetros 1 e 2 apresentaram média de contaminação de $6,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ e $2,50 \times 10^2$ UFC.g⁻¹. O lisímetro 3 não apresentou contaminação. No 27º nenhum dos lisímetros apresentou contaminação nas raízes. No 35º dia os lisímetros 1, 2 e 3 apresentaram contaminação de $4,0 \times 10^2$, $8,67 \times 10^2$ e $5,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹, respectivamente. As raízes do controle 2 não apresentaram contaminação através do método de detecção direta ou enriquecimento durante o experimento.

Os resultados obtidos podem demonstrar que a capacidade de internalização está relacionada com idade e maturidade das plantas. Neste estudo, nota-se o aumento da concentração

de bactérias indígenas nas raízes entre a primeira e a quinta semana de experimento. Neste sentido, Bernstein, Sela e Von-Nader (2009) estudaram o comportamento e a capacidade da bactéria *Salmonella* entérica de entrar nos sistemas de raízes da alface e se locomover para partes comestíveis das plantas sob duas concentrações diferentes de patógenos (10^6 e 10^8 CFU.g⁻¹). Para avaliar o papel potencial da superfície da raiz no processo de internalização, no segundo conjunto de experimentos procurou-se *Salmonella* nas partes aéreas das plântulas de alface de 17 e 33 dias de idade das quais tinham sido removidos os 5 mm basais de algumas pontas radiculares. Tal ferida radicular expõe o cilindro vascular e pode facilitar a penetração direta de bactérias no fluxo de transpiração.

O estudo mostrou que plantas com as raízes intactas tiveram uma contaminação de 500 CFU/g, enquanto as raízes com danos 5.130 CFU/g em plantas de 33 dias de maturidade. Entretanto, em plantas de 17 dias de maturidade, nenhum patógeno foi encontrado. A ausência do patógenos nos tecidos de mudas mais jovens (17 dias) e o aumento do número de células de *Salmonella* em folhas de plantas com raízes danificadas versus intactas sustentam a ideia de que a contaminação da parte aérea das mudas de 33 dias de idade resultou da internalização via sistema radicular. Neste sentido, quanto mais maduras são as plantas, maior a chance de internalização de bactérias.

5.3.7.2 Folhas

Não foram detectadas bactérias típicas *E. coli* ATCC durante o experimento. Contudo, bactérias não típicas foram encontradas. No 6º dia, os lisímetros 1 e 3 apresentaram contaminação na ordem de $5,50 \times 10^3$ e $5,0 \times 10^3$ UFC.g⁻¹, respectivamente. No 13º e 27º dia, não foram detectadas bactérias em nenhuma das amostras através de métodos de detecção direta e enriquecimento. No 35º dia, foram detectadas bactérias na ordem de $1,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹ nos lisímetros 1 e 2. O controle 2 fertilizado com fezes co-compostadas sem inóculo não apresentou contaminação nas folhas no decorrer do estudo.

5.3.8 Internalização *E. coli* nas raízes e folhas de alface

As raízes e folhas de alface não apresentaram contaminação por *E. coli* ATCC. Entretanto, bactérias não típicas foram encontradas no decorrer do cultivo. Os valores correspondem a média da triplicata de cada lisímetro em UFC.g⁻¹.

Em relação às raízes, no 6º dia, a contaminação foi de $3,0 \times 10^2$ para o lisímetro 1, $3,50 \times 10^2$ para o lisímetro 2, $1,0 \times 10^2$ para o lisímetro 3. No 13º dia, o lisímetro 1 apresentou

contaminação de $3,0 \times 10^2$ UFC.g⁻¹. Os demais lisímetros não apresentaram contaminação. No 27º dia nenhum lisímetro apresentou contaminação. No 35º dia apenas o lisímetro 2 apresentou contaminação de $7,00 \times 10^2$ nas raízes da alface.

Em relação às folhas, no 6º dia, apenas o lisímetro 1 apresentou contaminação de 3,75 logs. Nas quatro coletas seguintes nenhuma amostra dos de folhas de alface dos lisímetros trabalhados neste estudo apresentaram contaminação por bactérias não típicas.

Os valores obtidos nesta pesquisa para internalização na folha na primeira semana, podem ser referentes ao processo de internalização através de danos físicos nas plantas e não necessariamente internalização a partir das raízes, uma vez que a contaminação das folhas foi levemente mais alta que a das raízes. Entretanto, em relação a contaminação das raízes é possível que esta tenha ocorrido através do modo endótico (via raízes), visto sua alta concentração no começo do ciclo e seu decaimento na maioria dos lisímetros com o avanço do cultivo. Neste sentido, mais estudos são necessários para diferenciar a contaminação endótica da internalização via estômatos ou danos no tecido.

5.3.9 Contaminação do solo e Internalização do Adeno vírus humano tipo 2 (*HAdV-2*) nas raízes e folhas de alface.

A contaminação final das fezes co-compostadas inoculadas com *HAdV-2* foi de 10^6 UFP.g⁻¹ (6 Log_{10} UFP.g⁻¹) após 24 horas de inoculação. Em relação às amostras de solos, os lisímetros 1, 2 e 3 e controle 1 apresentaram efeitos citopáticos, porém não contáveis, até o 13º dia.

Em relação as raízes, as amostras apresentaram contaminação de $4,4 \text{ Log}_{10}$ UFP.g⁻¹ para o lisímetro 1 e $3,4 \text{ Log}_{10}$ UFP.g⁻¹ para os lisímetros 2 e 3 no 6º dia após o transplântio. As demais amostras não apresentaram contaminação.

As amostras de folhas, por sua vez, foram positivas para o lisímetro 1 com contaminação de 6 Log_{10} UFP.g⁻¹ e para o lisímetro 2 com $5,5 \text{ Log}_{10}$ UFP.g⁻¹. Nas demais análises, as amostras estavam abaixo do limite de detecção do método. A concentração de internalização nas folhas e raízes dos lisímetros 1 e 2 no 6º dia após o processo de desinfecção, são consideradas altas e estão próximas da concentração inicial do inóculo.

Tal resultado pode sugerir, conforme Bernstein, Sela e Von-Nader (2009), que houvesse feridas ou fissuras na planta devido ao manuseio de plantio e manejo, facilitando a entrada de grande quantidade de micro-organismos, o que resulta em valores próximos à quantidade inicial de inóculo. Isto se deve ao fato de na primeira semana de cultivo as plantas tenham

passado pelo transplântio e fertilização, além de serem pequenas e usadas em sua totalidade para análise, o que não permite escolher a amostra sem danos no tecido.

5.4 AVALIAÇÃO DE RISCO MICROBIOLÓGICO (AQRM)

Para o cenário de fertilização, os cálculos de dose resposta apresentaram resultados de probabilidade de infecção (PI) por *E. coli* para uma única exposição entre 9,47%, 25% e 40,34%, para as concentrações de (6,54, 7,31 e 8,01 logs). Em relação a probabilidade de infecção anual esses valores foram de 23,22, 40,34 e 53,31% para as 3 concentrações, respectivamente. Para o *HAdV-2* a probabilidade de infecção por única exposição e anual nas 3 concentrações foi de 100%. Para o plantio realizado no CETRE a inoculação de 6,8 logs de *E. coli* e *Salmonella* resultou em um risco de infecção por única exposição de 14.92% e de infecção anual de 30.21% e 44.06% e 57.57% para *E. coli* e *Salmonella* respectivamente. Em relação ao *HAdV-2* para o plantio no CETRE, o risco de infecção por única exposição e anual foram de 100%.

Consoante aos resultados obtidos para este cenário Eisenberg et al. (2008) analisaram biossólidos classe B tratados a partir do processo de digestão. Para o cenário de fertilização, obteve risco por única exposição ao Rotavírus de 0.46 ou 46%, valores mais baixos que os reportados neste trabalho para *HAdV-2*. Magalhães (2012) em estudo com biossólidos no cultivo de hortaliças e culturas anuais em diferentes cenários, também reporta resultados similares para o cenário de fertilização, com risco anual de 5,83E-5 para *Salmonella* e 2,84E-01 para rotavírus para biossólidos classe A. Para o lodo classe B o risco anual foi estimado em 3,29E-04 para *Salmonella* e 8,36E-01 para rotavírus.

Para o cenário de plantio e manejo do sistema de cultivo, devido às limitações de aplicação impostas pela resolução CONAMA 498/2020 correspondente ao tempo de espera entre a fertilização e colheita, o risco foi considerado baixo. Para o primeiro cultivo no MIP, o risco de infecção por *E. coli* por única exposição foi estimado em 0,000000000247%, 0,000000000112% e 0,0000000000466% e o risco de infecção anual em 0,0000000519%, 0,0000000235% e 0,00000000991% para as concentrações de inoculação de 6,8, 7,3 e 8,0 unidades logarmicas. Para o *HAdV-2*, os valores de risco através de única exposição observados foram de 0,01546%, 0.1834% e 1,4%. O risco de infecção anual foi estimado em 3,19%, 32% e 94,83% para as concentrações de 3,81, 3,97 e 5,92 logs, respectivamente. Para o cultivo no CETRE para o mesmo cenário, obteve-se risco de infecção por única exposição de 0,000000037% e probabilidade de infecção anual de 0,00000777% para uma inoculação de 6,8

logs de *E. coli*. Para a bactéria *Salmonella*, os riscos por única exposição foram estimados em 0,000000036% enquanto o risco anual foi estimado em 0,00000077%. Para o *HAdV-2* o risco estimado para única exposição foi de 0,028% e risco anual de 5,90% para uma concentração de 6 logs.

Para o cenário de manejo do sistema solo-planta, Magalhães (2012) obteve riscos anuais mais baixos que o desta pesquisa, sendo estimado em $1.0E-14$ para *Salmonella* e $5,59E-10$ para rotavírus em plantio com lodo classe A, realizado em pequena propriedade. Para lodo classe B, os riscos anuais foram estimados em $5,24E-13$ para *Salmonella* e $3,70E-09$ para rotavírus. É importante ressaltar que os resultados obtidos para o modelo aplicado por Magalhães, considera um intervalo de 4 a 6 meses entre a aplicação e a colheita, tempo previsto pela CONAMA 369/2006. Para fins de comparação neste cenário, o autor realizou os cálculos ignorando o período previsto entre a aplicação e o plantio, obtendo resultados de riscos anuais de $5,14E-07$ para *Salmonella* e $7,32E-03$ para rotavírus com lodo classe A. E riscos anuais de $5,79E-06$ e $3,86E-2$, para os mesmos micro-organismos, respectivamente.

Para o cenário de ingestão das alfaces cultivadas com as fezes co-compostadas após processo de lavagem vigorosa em água corrente obteve-se para o primeiro cultivo em vasos, probabilidade de infecção por *E. coli* para única exposição de $1,93E-12$, $3,55E-13$ e 0% e risco de infecção anual de $3,86E-11$, $6,86E-12$ e 0% para as concentrações de 6,54, 7,31 e 8,01 logs, respectivamente. Para o *HAdV-2* a probabilidade de infecção por única exposição foi de 0,0003857% para todas as concentrações e a probabilidade de risco anual foi de 0,007714% também para todas as concentrações. Para o segundo cultivo no CETRE o risco de infecção por *E. coli* em uma única exposição é de $2,054E-10$ e a probabilidade de infecção anual de $4,10E-09$. Para a *Salmonella* o risco por única exposição foi estimado em $5,16 E-10$ e risco anual de $1,03E-08$. Para o *HAdV-2* neste cultivo o risco por única exposição foi de 0,0003857% e risco anual de 0,007714%.

Os resultados obtidos para este cenário são corroborados pelos dados obtidos na pesquisa de Magalhães (2012), onde o risco anual médio para *Salmonella* foi estimado em $4,86E-12$ e $7,8E-08$ para o rotavírus para biossólidos classe A. Para o lodo de classe B, o risco foi estimado em $6,42E-11$ para *Salmonella* e $4,46E-7$ para rotavírus.

No trabalho de Nag e colaboradores (2022), os autores realizaram um estudo de QMRA concernente ao uso de composto animal e digestato e os riscos envolvidos no consumo das hortaliças. Como resultado, obtiveram um risco de infecção anual para *E. coli*, estimado em $2,27E-4$ para esterco animal não pasteurizado, $3,77E-5$ para digestato sem pasteurização e $3,0E-$

11 para digestato pasteurizado. Cabe ressaltar, que neste trabalho, os autores incluíram dados de inativação dos micro-organismos das hortaliças e embalagens por UV após a lavagem e antes da comercialização, além do recrescimento dos micro-organismos referente ao armazenamento na geladeira do consumidor por 5 dias.

Tabela 9: Doses ingeridas por exposição única e anual e risco por única exposição e anual para os cenários de fertilização, plantio e manejo e consumo das hortaliças fertilizadas com fezes co-compostadas.

Cenário 1: Fertilização e Plantio							
	Patógeno	Dose por exposição	Dose anual	Dose resposta exposição anual	Dose resposta única exposição	PI (%) ANUAL	PI (%) ÚNICA EXPOSIÇÃO
PLANTIO MIP	E. coli: 6,54 logs	2.20E+04	1.10E+05	2.32E-01	9.47E-02	23.22272828	9.471200582
	E. coli: 7,31 logs	1.32E+05	6.59E+05	4.03E-01	2.50E-01	40.34946254	25.01481397
	E. coli: 8,01 logs	6.59E+05	3.30E+06	5.33E-01	4.03E-01	53.31008461	40.34946254
	HAdV-2: 3,1 logs	5.20E+02	2.60E+03	1.00E+00	1.00E+00	100	100
	HAdV-2: 3,97 logs	7.60E+02	3.80E+03	1.00E+00	1.00E+00	100	100
	HAdV-2: 5,92 logs	5.84E+04	2.92E+05	1.00E+00	1.00E+00	100	100
PLANTIO CETRE	E. coli: 6,5 logs	4.48E+04	2.24E+05	3.02E-01	1.49E-01	30.21492253	14.92453962
	Salmo: 6,8 logs	5.74E+05	2.87E+06	0.575759	0.440628	57.57590361	44.06276142
	HAdV-2: 6 logs	8.00E+04	4.00E+05	1.00E+00	1.00E+00	100	100
Cenário 2: Manejo sistema solo planta							
	Patógeno	Dose por exposição	Dose anual	Dose resposta exposição anual	Dose resposta única exposição	PI (%) ANUAL	PI (%) ÚNICA EXPOSIÇÃO
PLANTIO MIP	E. coli: 6,54 logs	3.88E-07	8.16E-05	5.19E-10	2.47E-12	5.19E-08	2.47E-10
	E. coli: 7,31 logs	1.76E-08	3.70E-06	2.35E-11	1.12E-13	2.35E-09	1.12E-11
	E. coli: 8,01 logs	7.43E-10	1.56E-07	9.91E-13	4.66E-15	9.91E-11	4.66E-13
	HAdV-2: 3,1 logs	2.55E-04	5.35E-02	3.20E-02	1.55E-04	3.20E+00	1.55E-02
	HAdV-2: 3,97 logs	3.03E-03	6.35E-01	3.20E-01	1.83E-03	3.20E+01	1.83E-01
	HAdV-2: 5,92 logs	2.32E-02	4.88E+00	9.48E-01	1.40E-02	9.48E+01	1.40E+00
PLANTIO CETRE	E. coli: 6,5 logs	5.82E-05	1.22E-02	7.77E-08	3.70E-10	7.77E-06	3.70E-08
	Salmo: 6,8 logs	1.60E-04	3.37E-02	2.74E-07	1.30E-09	2.74E-05	1.30E-07
	HAdV-2: 6 logs	4.78E-04	1.00E-01	5.91E-02	2.90E-04	5.91E+00	2.90E-02
Cenário 3: Consumo das hortaliças							
	Patógeno	Dose por exposição	Dose anual	Dose resposta anual	Dose resposta única exposição	PI (%) ANUAL	PI (%) ÚNICA EXPOSIÇÃO
PLANTIO MIP	E. coli: 6,54 logs	3.04E-09	6.08E-08	3.87E-13	1.93E-14	3.8658E-11	1.9318E-12
	E. coli: 7,31 logs	5.39E-10	1.08E-08	6.86E-14	3.55E-15	6.8612E-12	3.5527E-13
	E. coli: 8,01 logs	1.10E-12	2.20E-11	0.00E+00	0.00E+00	0	0
	HAdV-2: 3,1 logs	6.36E-06	1.27E-04	7.71E-05	3.86E-06	0.007714761	0.000385752
	HAdV-2: 3,97 logs	6.36E-06	1.27E-04	7.71E-05	3.86E-06	0.007714761	0.000385752
	HAdV-2: 5,92 logs	6.36E-06	1.27E-04	7.71E-05	3.86E-06	0.007714761	0.000385752
PLANTIO CETRE	E. coli: 6,8 logs	2.59E-08	5.17E-07	3.29E-12	1.64E-13	3.28715E-10	1.64313E-11
	Salmo: 6,8 logs	6.36E-07	1.27E-05	1.03E-10	5.16E-12	1.03201E-08	5.16009E-10
	HAdV-2: 6 logs	6.36E-06	1.27E-04	7.71E-05	3.86E-06	0.007714761	0.000385752

Fonte: A autora (2022)

6 RESUMO DOS RESULTADOS

Em linhas gerais, o presente estudo fez possível a compreensão de aspectos importantes para a segurança no reuso de biofertilizante feito a partir de excretas humanas em cultivos de hortaliças. A análise integrada de diversos fatores, como: fitotoxicidade nas sementes, contaminação microbiológica no solo e nas plantas e avaliação quantitativa de risco microbiológico aplicado aos cenários de fertilização, plantio, manejo e consumo de alfaces fertilizadas com fezes co-compostadas, permitiram a determinação do comportamento da bactéria *E. coli* e *Salmonella* no solo e nas plantas, bem como do vírus *HAdV-2* nas plantas, além de uma estimativa do risco do reuso de fezes co-compostadas e de sua fitotoxicidade.

As fezes co-compostadas apresentaram fitotoxicidade moderada para as sementes de alface na concentração de 10% (IG: 66,3%) e alta fitotoxicidade para as concentrações de 25%, (IG: 10%) e 50% (IG:0%). A concentração de 10% apresentou GRS de 87,75% e a concentração 25% de 20,40%. O crescimento relativo das raízes foi de 75,65% para 10% e 50,35% para 25%. A concentração de 50% não apresentou germinação e crescimento, sendo considerada altamente fitotóxica.

No primeiro experimento, conduzido em estufa, 3 concentrações de *E. coli* (6,58 7,31 e 8,01 Log₁₀.UFC.g⁻¹) e *HAdV-2* (3,81, 3,97, 5,92 Log₁₀.UFP.g⁻¹) inoculadas nas fezes co-compostadas foram testados quanto à contaminação no solo e nas plantas. Obteve-se para a bactéria *E. coli* um decaimento no solo mais rápido em concentrações mais altas, confirmado pelos coeficientes de decaimento (K) (-0,07279 para inóculo com 6,58 logs, -0,09092 para 7,31 logs e -0,115 para 8,01 logs) e da estimativa de inativação (T90) obtidos (13,74 dias para 6,5 logs, 11 dias para 7,31 logs e 08,63 dias para 8,01 logs). Em relação a contaminação das plantas, a bactéria *E. coli* foi encontrada em maior quantidade na parte interna das folhas das concentrações mais altas (7,31 e 8,01 logs), durante as 3 primeiras semanas de experimento. O coeficiente de correlação de Spearman mostrou correlação do decaimento da bactéria *E. coli* internalizadas na folha em relação ao tempo de -0,79, com *p* de 0,0347. Entretanto, este estudo não encontrou correlação entre a internalização nas raízes e nas folhas, sugerindo que a internalização pode não ter ocorrido somente através do modo endótico (via raízes), mas principalmente, através de danos físicos ou fissuras no tecido vegetal que permitem a internalização da bactéria *E. coli* na parte interna do tecido vegetal, protegida do processo de desinfecção com AgNO₃. Em relação ao *HAdV-2*, mesmo em concentrações menores (5 Log₁₀.UFP.g⁻¹), o vírus foi encontrado nas raízes em concentração constante (2-3 Log₁₀ UFP.g⁻¹) durante 5 semanas do cultivo. Neste pri-

meio experimento os períodos estimados para inativação de 4 unidades logarítmicas de bactéria *E. coli* no solo são superiores ao período de cultivo para todas as concentrações estudadas (6,58 7,31 e 8,01 Log₁₀.UFC.g⁻¹).

Para o experimento conduzido em lisímetros em ambiente aberto e fertilizado com fezes co-compostadas inoculadas com 6,84 logs de *E. coli*, 6,85 logs de *Salmonella* e 6 logs de *HAdV-2*, pode se perceber, em relação a *E. coli* e *Salmonella*, que o controle sem plantas, obteve um coeficiente de decaimento no solo de -0,0244 para *E. coli* e -0,0331 para *Salmonella*, valores menores que os obtidos pelo sistema com plantas, com K: -0,0728 para *E. coli* e -0,07651 para *Salmonella*. O T90 foi estimado em 16,46 dias para a *Salmonella* para o sistema com plantas e 38,39 dias para o sistema sem plantas. Para *E. coli*, este valor foi de 13,24 dias e 40,85 dias, respectivamente. Tais valores podem indicar que as raízes auxiliam o processo de inativação dos patógenos no solo.

Em comparação ao experimento em estufa, com a mesma concentração (7 logs) o coeficiente de decaimento da *E. coli* foi maior nos vasos em estufa (K: 0,07279) que nos lisímetros em ambiente aberto (K: -0,06117). Em relação a internalização das bactérias *E. coli* e *Salmonella* nas folhas e raízes das alfaces, não foram encontradas bactérias típicas. Entretanto, a presença de bactérias não típicas (indígenas) nas raízes pôde ser observada nos lisímetros 1 e 2 na primeira e segunda semanas e nos lisímetros 1, 2 e 3 na terceira semana. Em relação as folhas na primeira semana os lisímetros 1 e 3 e lisímetros 1 e 2 na 5ª semana. Tal resultado pode indicar internalização via raízes e através de estômatos expostos ou ranhuras no tecido vegetal. Em relação ao *HAdV-2* nas plantas foi observada internalização apenas nas folhas na ordem de 6 logs na primeira semana no sistema de triplicatas, o que pode sugerir que ranhuras nas plantas podem causar níveis de contaminação próximas aquelas aplicadas ao biofertilizante via inoculação.

A utilização da metodologia AQRM permitiu estimar o risco para os cenários de fertilização e plantio, manejo e consumo das hortaliças fertilizadas com fezes co-compostadas inoculadas com *E. coli* e *HAdV-2* referente aos dois ciclos de cultivo realizados nesta pesquisa. Como resultado, os maiores riscos estão no cenário de aplicação do biofertilizante com probabilidade de infecção anual por *E. coli* que variam entre 23,22% e 53,31% com as concentrações estudadas neste trabalho. Para a bactéria *Salmonella* o risco variou de 44,06% a 57,57%. A probabilidade de infecção anual por *HAdV-2* foi de 100% para todas as concentrações estudadas nesse trabalho, o que se configura um risco elevado.

Para os cenários de manejo do sistema solo-planta os riscos foram considerados baixos, apresentando probabilidade de infecção anual por *E. coli* entre 0,00000000991 e 0,000000518%. O risco por única exposição variou entre 0,00000000000466 e 0,000000000246%. Para a *Salmonella*, o risco por única exposição foi de 0,000000013 e o risco anual 0,0000027%. Os riscos obtidos para única exposição por *HAdV-2* variaram entre 1,4 e 0,0015% e o risco anual entre 3,19 e 94,83% para os dois ciclos de cultivo, apresentando risco muito superior às bactérias *E. coli* e *Salmonella* mesmo em concentrações menores.

O cenário de consumo das hortaliças após processo de lavagem, apresentou riscos anuais quase nulos para *E. coli*, variando entre 6,6E-12 e 0%. Para *Salmonella* o risco foi levemente mais alto que o apresentado para *E. coli* com risco anual de 0,0000000103%. Para *HAdV-2* o risco anual de consumo foi estimado em 0,0077% enquanto o risco por única exposição foi de 0,000385752%.

7 CONCLUSÃO

Para fins de segurança microbiológica no uso de biofertilizantes feitos a partir de excretas humanas é necessário entender o comportamento de patógenos adicionados ao solo via fertilização, de forma a fornecer dados de seu decaimento no solo e sua agregação nas hortaliças que serão consumidas cruas. Neste sentido, modelos bacterianos e virais auxiliam nesse processo por possuírem metodologia de análise já desenvolvida em laboratório.

Esta pesquisa demonstrou tempo de inativação de 4 logs das bactérias *E. coli* e *Salmonella* superiores ao período de cultivo. Corroborando os resultados obtidos através de experimentos laboratoriais, a avaliação quantitativa de risco microbiológico demonstrou riscos elevados de infecção por *E. coli*, *Salmonella* e *HAdV-2* para o cenário de fertilização nas condições de inoculação deste trabalho. Desta forma, a proposição de barreiras de segurança ao trabalhador rural é requerida, destacando-se o uso dos EPI's como luvas, máscaras e óculos de proteção durante a aplicação. Ademais, a contaminação viral se mostrou superior à contaminação bacteriana mesmo em concentrações mais baixas.

O risco de manejo dos cultivos foi considerado baixo para *E. coli*, se mantendo consideravelmente abaixo do limite estabelecido como seguro. Para *Salmonella* é possível observar que os riscos são próximos dos toleráveis mesmo em concentrações mais altas de contaminação para a bactéria. O modelo viral *HAdV-2*, por sua vez, apresentou riscos mais elevados que ultrapassaram o limite estabelecido pela Organização Mundial de Saúde como tolerável. Ainda em relação ao manejo dos cultivos, destaca-se a importância da recomendação prevista pela

CONAMA 498/2020 entre a aplicação do biofertilizante e a colheita para o decaimento dos organismos patogênicos que possam estar presente no material.

Para a contaminação das plantas e seu consumo, os riscos apresentados estão bem abaixo do limite tolerável para os modelos bacterianos. Para os modelos virais, o risco está acima do risco anual tolerável definido pela WHO (2016) como 10^{-6} hab. ano. Ainda, é de suma importância destacar a importância do processo de higienização das plantas, além de necessária atenção com a manipulação destas em campo, de forma a minimizar os danos físicos nas folhas, principalmente próximo ao solo, pois este é um fator que pode aumentar as chances de internalização de patógenos que estarão protegidos da ação de lavagem e desinfecção.

Ademais, destaca-se a importância de seguir a recomendação de adubação em conformidade com a condição atual do solo, de modo a não causar efeitos tóxicos para as plantas e/ou efeitos indesejados no solo, como acumulação de fósforo.

8 RECOMENDAÇÕES FINAIS

Como recomendação para trabalhos futuros provenientes dos resultados obtidos, temos:

- Avaliação da aplicação de fezes co-compostadas em diferentes tipos de solo de forma a compreender as variações do decaimento decimal dos modelos bacterianos e virais em diferentes cenários de aplicação;
- Avaliação da fitotoxicidade em concentrações mais baixas de biofertilizantes, preferencialmente de 1 a 10%;
- A avaliação do decaimento de *HAdV-2* e outros modelos virais no solo durante o período de cultivo de forma a estabelecer coeficientes de decaimento decimais sob diferentes concentrações;
- Avaliação da internalização nas plantas de forma mais frequente durante as duas primeiras semanas após a fertilização e plantio;
- Avaliação mais detalhada do processo de internalização dos modelos bacterianos e virais, suas principais vias de acesso ao tecido vegetal e contribuição para a concentração final;
- Avaliação quantitativa de risco microbiológica em cenários que englobem toda a cadeia produtiva das fezes co-compostadas até o consumo das hortaliças;
- Quantificação de contaminantes emergentes, como fármacos nas fezes co-compostadas, além do solo e plantas após a fertilização.

9 REFERÊNCIAS

ADAMS, Mark Hancock. Bacteriophages. New York (& London): Inter-science Publishers., 1959.

AMOAH, P.; ADAMTEY, N.; COFIE, O. Effect of urine, poultry manure, and dewatered faecal sludge on agronomic characteristics of cabbage in Accra, Ghana. **Resources**, v. 6, n. 2, p. 1–14, 2017.

ANDRADE. I. T. **Tratamento de Excretas Humanas e Resíduos Sólidos Orgânicos em Leiras de Compostagem Estáticas, Termofílicas e de Aeração Passiva**, 2020. Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/211993/TCC_Isabela_Tsutiya_Andrade_Versao_Repositorio_assinado_assinado.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.

BOTTO, M.; MUNIZ, L.; AQUINO, B.; DOS SANTOS, A. Produtividade Da Mamona Cultivar Brs Nordestina Fertilizada Com Urina Humana Na Agricultura De Pequeno Porte. **Revista AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales. Investigación, desarrollo y práctica**, v. 10, n. 1, p. 113–124, 2017.

BUTTE, G.; NIWAGABA, C.; NORDIN, A. Assessing the microbial risk of faecal sludge use in Ugandan agriculture by comparing field and theoretical model output. **Water Research**, v. 197, p. 117068, 2021. Elsevier Ltd. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117068>>.

BRASIL; Ministério Do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução CONAMA nº 498/2000. **Resolução CONAMA nº 498** p. 21, 2020.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente, Conselho Nacional de Meio Ambiente, Resolução CONAMA nº 369. **Resolução CONAMA nº 369**, v. 1, p. 1–32, 2006.

BUZIE, Christopher; KÖRNER, Ina. Chapter Iv: Composting Of Bioresources For Terra Preta-inspired Products In: OTTERPOHL, Ralf et al. **Terra Preta Sanitation 1: background, principles and innovations**. Alemanha: Dbu, 2015. p. 86-119.

CARDUCCI, A.; CAPONI, E.; CIURLI, A.; VERANI, M. Possible internalization of an enterovirus in hydroponically grown lettuce. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 7, p. 8214–8227, 2015.

CARLON, P. **Aplicação de biofertilizantes de excretas humanas para o cultivo de alimentos: eficiência agrônômica e comportamento microbiológico**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

(CDC) Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Foodborne, Waterborne, and Environmental Diseases (DFWED). Disponível em: <https://www.cdc.gov/Salmonella/index.html>.

CEBALLOS, B. S. O. de; DINIZ, C. R. **Técnicas de Microbiologia Sanitária e Ambiental**. Campina Grande: Editora da Universidade Estadual da Paraíba, 2017. Disponível em: <https://www.uepb.edu.br/download/ebooks/Tecnicas-de-Microbiologia.pdf>. Acesso em: 18 jun. 2021.

COFIE, O.; Nikiema, J.; Impraim, R.; Adamtey, N.; Paul, J.; Koné, D. 2016. Co-composting of solid waste and fecal sludge for nutrient and organic matter recovery. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute (IWMI). CGIAR Research Program on Water, Land and Ecosystems (WLE). 47p. (Resource Recovery and Reuse Series 3). doi: 10.5337/2016.204

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 357, DE 29 DE AGOSTO DE 2006**: RESOLUÇÃO Nº 357, Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2006. 4 p. Disponível em: <<http://www2.mma.gov.br/port/conama/res/res06/res37506.pdf>>

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **RESOLUÇÃO Nº 498, DE 19 DE AGOSTO DE 2020**: RESOLUÇÃO Nº 498, DE 19 DE AGOSTO DE 2020. 1 ed. Brasil: Ministério do Meio Ambiente, 2020. 4 p. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-n-498-de-19-de-agosto-de-2020-273467970>. Acesso em: 30 jul. 2021.

CHRISPIM, M. C.; TARPEH, W. A.; SALINAS, D. T. P.; NOLASCO, M. A. The sanitation and urban agriculture nexus: Urine collection and application as fertilizer in São Paulo, Brazil. **Journal of Water Sanitation and Hygiene for Development**, v. 7, n. 3, p. 455–465, 2017. Doi: 10.2166/washdev.2017.163.

CROMEANS, T. L.; LU, X.; ERDMAN, D. D.; HUMPHREY, C. D.; HILL, V. R. Development of a plaque assay for adenoviruses 40 and 41. **Journal of Virological Methods**, v.151, p.140-145, 2008.

DEERING, Amanda J.; MAUER, Lisa J.; PRUITT, Robert E. Internalization of *E. coli* O157:h7 and *Salmonella* spp. in plants. **Food Research International**, [s.l.], v. 45, n. 2, p. 567-575, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.058>.

ELETROBRAS (Santa Catarina). **Caracterização climática de Florianópolis - Geral**. Disponível em: <http://www.eletrosul.gov.br/ampnbsp/casa-eficienteambiente-academico-caracterizacao-climatica-de-florianopolis-geral>. Acesso em: 30 maio 2020.

ERICKSON, M. C. Internalization of Fresh Produce by Foodborne Pathogens. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p. 283–310, 2012. Doi: 10.1146/annurev-food-022811-101211.

ERICKSON, M. C.; WEBB, C. C.; DAVEY, L. E.; et al. Biotic and Abiotic Variables Affecting Internalization and Fate of *Escherichia coli* O157:H7 Isolates in Leafy Green Roots. **Journal of Food Protection**, v. 77, n. 6, p. 872–879, 2014. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/77/6/872/174219/Biotic-and-Abiotic-Variables-Affecting>>.

EISENBERG, J. N. S.; MOORE, K.; SOLLER, J. A.; EISENBERG, D.; COLFORD, J. M. Microbial risk assessment framework for exposure to amended sludge projects. **Environmental Health Perspectives**, v. 116, n. 6, p. 727–733, 2008.

EISENBERG, J. N. S.; SOLLER, J. A.; SCOTT, J.; EISENBERG, D. M.; COLFORD, J. M. A Dynamic Model to Assess Microbial Health Risks Associated with Beneficial Uses of Biosolids. **Risk Analysis**, v. 24, n. 1, p. 221–236, 2004.

ESREY, Steven A.; ANDERSSON, Ingvar; HILLERS, Astrid; SAWYER, Ron. CLOSING THE LOOP: ecological sanitation for food security.: Ecological sanitation for food security. **Water Resources**, Mexico, v. 8, p. 107, abr. 2000. Disponível em: < http://www.ecosanres.org/pdf_files/closing-the-loop.pdf>.

ESREY, Steven A.; GOUGH, Jean; RAPAPORT, Dave; SAWYER, Ron; SIMPSON-HEBERT, Mayling; VARGAS, Jorge; WINBLAD, Uno. **ECOLOGICAL SANITATION**. Swedish International Development Cooperation Agency, Stockholm, 1ª ed. P 100, 1988. Disponível em: <http://www.ecosanres.org/pdf_files/Ecological_Sanitation.pdf>. Acesso em: 15 Abr. 2020.

FAO: FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; ABOUKHALED, A. **FAO Irrigation and drainage paper**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1977. Disponível em: < http://www.fao.org/tempref/SD/Reserved/Agromet/PET/FAO_Irrigation_Drainage_Paper_56.pdf>. Acesso em: 12 Abr. 2020.

FAO, IFAD, UNICEF, WFP and WHO. 2019. **The State of Food Security and Nutrition in the World 2019. Safeguarding against economic slowdowns and downturns**. Rome, FAO. Disponível em: < <http://www.fao.org/3/ca5162en/ca5162en.pdf>>.

FAO. Semi-quantitative risk characterization. **Risk characterization of microbiological hazards in food**, p. 37–52, 2009. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/012/i1134e/i1134e.pdf>>.

FAO. **World fertilizer trends and outlook to 2019: SUMMARY REPORT**. Rome: FAO, 2016. 38 p. Disponível em: <http://www.fao.org/3/a-i5627e.pdf>. Acesso em: 19 maio 2020.

FIORIN, J.E.; VOGEL, P.T.; BORTOLOTTI, R. P.. Métodos de aplicação e fontes de fertilizantes para a cultura da soja. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias - Brazilian Journal Of Agricultural Sciences**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 92-97, 30 jun. 2016. Revista Brasileira de Ciências Agrárias. Doi: 10.5039/agraria.v11i2a5371.

FINLEY, B.; PROCTOR, D.; SCOTT, P.; et al. Recommended Distributions for Exposure Factors Frequently Used in Health Risk Assessment. **Risk Analysis**, v. 14, n. 4, p. 533–553, 1994.

FONGARO, G.; GARCÍA-GONZÁLEZ, M. C.; HERNÁNDEZ, M.; et al. Different behavior of enteric bacteria and viruses in clay and sandy soils after biofertilization with swine digestate. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JAN, p. 1–9, 2017. Doi: 10.3389/fmicb.2017.00074.

FRANCO, L. C. **Otimização do processo de precipitação de estruvita com adição de sal marinho por meio de delineamento composto central: recuperação de nutrientes e ensaios microbiológicos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

GIANNELLA RA. *Salmonella*. In: **Baron S, editor. Medical Microbiology**. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 21. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8435/>>

GIRIJA, R.; SHETTIGAR, N. A.; PARAMA, V. R. R.; GAGANA, S. Evaluation of co-composted faecal sludge application in agriculture. **WIT Transactions on Ecology and the Environment**, v. 238, p. 701–711, 2019.

GORBATSEVICH, E.; SELA (SALDINGER), S.; PINTO, R.; BERNSTEIN, N. Root internalization, transport and in-planta survival of *Salmonella* enterica serovar Newport in sweet basil. **Environmental Microbiology Reports**, v. 5, n. 1, p. 151–159, 2013.

GUZHA, E.; NHAPI, I.; ROCKSTROM, J. An assessment of the effect of human faeces and urine on maize production and water productivity. **Physics and Chemistry of the Earth**, v. 30, n. 11-16 SPEC. ISS., p. 840–845, 2005.

HARDER, R. et al. “Reframing Human Excreta Management as Part of Food and Farming Systems”. **Water Research**, vol. 175, maio de 2020, p. 11, Doi: 10.1016/j.watres.2020.115601.

HAAS, C. N. et al. Risk assessment of virus in drinking water. *Risk Analysis*, v. 13, n. 5, p. 545-552, 1993

HAAS, Charles N.; ROSE, Joan B.; GERBA, Charles P. **Quantitative microbial risk assessment**. John Wiley & Sons, 2014.

HAWLEY, J. K. Assessment of Health Risk from Exposure to Contaminated Soil. **Risk Analysis**, v. 5, n. 4, p. 289–302, 1985.

HIRNEISEN, K. A.; SHARMA, M.; KNIEL, K. E. Human enteric pathogen internalization by root uptake into food crops. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 5, p. 396–405, 2012.

IBARRA-SÁNCHEZ, L. S.; SÁNCHEZ, S.; ALVARADO-CASILLAS, S.; et al. **Internalization of Bacterial Pathogens in Tomatoes and Their Control by Selected Chemicals**. 2004. Disponível em: <<https://meridian.allenpress.com/jfp/article/67/7/1353/171163/Internalization-of-Bacterial-Pathogens-in-Tomatoes>>. Acesso em: 18 Set. 2020.

IBGE. **Pesquisa de Orçamentos Familiares 2017-2018: análise de consumo alimentar pessoal no Brasil**. 2020. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101742.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

INÁCIO, C. DE T.; MILLER, P. R. M. **Compostagem: ciência e prática aplicadas a gestão de resíduos**. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2009.

ISLAM, M.; DOYLE, M. P.; PHATAK, S. C.; MILLNER, P.; JIANG, X. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, v. 22, n. 1, p. 63–70, 2005.

JACOB, C.; MELOTTO, M. Human Pathogen Colonization of Lettuce Dependent Upon Plant Genotype and Defense Response Activation. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, n. January, p. 1–17, 2020.

JIANG, X.; MORGAN, J.; DOYLE, M. P. Population Dynamics of Generic *E. coli* and Naturally Occurring Listeria in Manure-Amended Soils in the Northeastern U.S. **Applied and Environmental Microbiology**, v. Abstract, n. 5, p. 2605–2609, 2016.

JOHANNESSEN, G. S.; BENGTSSON, G. B.; HEIER, B. T.; et al. Potential uptake of Escherichia coli O157:H7 from organic manure into crisphead lettuce. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 2221–2225, 2005. Doi: 10.1128/AEM.71.5.2221–2225.2005.

JÖNSSON, Hakan; STINTZING, Anna R.; VINNERÅS, Bjorn.; SALOMON, Eva. (2004). Guidelines on the Use of Urine and Faeces in Crop Production. EcoSanRes Publications Series Report 2004-2. Disponível em: < http://www.ecosanres.org/pdf_files/ESR_Publications_2004/ESR2web.pdf>.

KASSA, K.; ZEWDIE, W.; ALI, Y. Human urine as a source of nutrients for maize and its impacts on soil quality at Arba Minch, Ethiopia. **Journal of Water Reuse and Desalination**, v. 8, n. 4, p. 516–521, 2018.

KUTU, F. R.; MUCHAONYERWA, P.; MNKENI, P. N. Complementary nutrient effects of separately collected human faeces and urine on the yield and nutrient uptake of spinach (*Spinacia oleracea*). **Waste Management and Research**, v. 29, n. 5, p. 532–539, 2011.

LANGERGRABER, Günter; MUELLEGGER, Elke. Ecological Sanitation—a way to solve global sanitation problems? **Environment International**, [s.l.], v. 31, n. 3, p. 433–444, abr. 2005. Elsevier BV. Doi: 10.1016/j.envint.2004.08.006.

LEE J, CHOI EH, LEE HJ. Clinical severity of respiratory adenoviral infection by serotypes in Korean children over 17 consecutive years (1991–2007). **J Clin Virol**. 2010 Oct;49(2):115–20. doi: 10.1016/j.jcv.2010.07.007. Epub 2010 Aug 6. PMID: 20692203.

LOURENZI, C. R.; SCHERER, E. E.; CERETTA, C. A.; et al. Atributos químicos de Latossolo após sucessivas aplicações de composto orgânico de dejetos líquidos de suínos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 51, n. 3, p. 233–242, 2016.

MAGALHÃES, T. D. B. Uso Agrícola De Biossólidos: Análise Crítica Da Resolução Conama 375/2006 na Perspectiva Da Metodologia De Avaliação Quantitativa De Risco Microbiológico, 2012. Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: < <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/3782>>. Acesso em 05 jun. 2020.

MAGRI, Maria Eliza. **Aplicação de processos de estabilização e higienização de fezes e urina humanas em banheiros secos segregadores**. 2013. 200 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Ambiental e Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/107416>. Acesso em: 10 mar. 2020.

MAÑAS, P.; DE LAS HERAS, J. Phytotoxicity test applied to sewage sludge using *Lactuca sativa* L. and *Lepidium sativum* L. seeds. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 15, n. 2, p. 273–280, 2018.

Manual de adubação e de calagem para os Estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. Comissão de Química e Fertilidade do Solo. 400P, 10. ed. Porto Alegre, 2004. Disponível em: < http://www.sbcs-nrs.org.br/docs/manual_de_adubacao_2004_versao_internet.pdf>. Acesso em 20 Ago. 2020.

MELOTTO, M.; PANCHAL, S.; ROY, D. Plant innate immunity against human bacterial pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. AUG, p. 1–12, 2014.

MENDES PM, RIBEIRO JA, MARTINS GA, LUCIA T Jr, ARAUJO TR, FUENTES-GUEVARA MD, CORRÊA LB, CORRÊA ÉK. Phytotoxicity test in check: Proposition of methodology for comparison of different method adaptations usually used worldwide. **J Environ Manage.** 2021 Aug 1;291:112698. doi: 10.1016/j.jenvman.2021.112698. Epub 2021 May 7. PMID: 33971513.

MITRA, R.; CUESTA-ALONSO, E.; WAYADANDE, A.; et al. Effect of Route of Introduction and Host Cultivar on the Colonization, Internalization, and Movement of the Human Pathogen *Escherichia coli* O157:H7 in Spinach. **Journal of Food Protection**, v. 72, n. 7, p. 1521–1530, 2009. Disponível em: <http://meridian.allenpress.com/jfp/article-pdf/72/7/1521/1680309/0362-028x-72_7_1521.pdf>.

MORESCO, V. **Estabilidade térmica de vírus entéricos em águas de superfície**, 2016. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2016.

MORITA, Dione Mari; AVILA, Renan de Luca; AIDAR, Fernando Ngan. Nucleação na formação de estruvita: estado da arte. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [s.l.], v. 24, n. 4, p. 637-654, ago. 2019. FapUNIFESP (SciELO). Doi:10.1590/s1413-41522019113711.

MOYA, B.; PARKER, A.; SAKRABANI, R.; MESA, B. Evaluating the Efficacy of Fertilisers Derived from Human Excreta in Agriculture and Their Perception in Antananarivo, Madagascar. **Waste and Biomass Valorization**, v. 10, n. 4, p. 941–952, 2019. Springer Netherlands. Doi: 10.1007/s12649-017-0113-9.

MURPHY, S.; GAFFNEY, M. T.; FANNING, S.; BURGESS, C. M. Potential for transfer of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Senftenberg from contaminated food waste derived compost and anaerobic digestate liquid to lettuce plants. **Food Microbiology**, v. 59, p. 7–13, 2016. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.04.006>>.

NAG, R.; RUSSELL, L.; NOLAN, S.; et al. Quantitative microbial risk assessment associated with ready-to-eat salads following the application of farmyard manure and slurry or anaerobic digestate to arable lands. **Science of the Total Environment**, v. 806, p. 151227, 2021. Elsevier B.V. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.151227>>.

NAGY, J.; MIKOLA, A.; PRADHAN, S. K.; ZSENI, A. The Utilization of Struvite Produced from Human Urine in Agriculture as a Natural Fertilizer: A Review. **Periodica Polytechnica Chemical Engineering**, p. 6, 2019. Disponível em: <<https://pp.bme.hu/ch/article/view/12689>>.

NASCIMENTO, M. A.; MAGRI, M. E.; SCHISSI, C. D.; BARARDI, C. R. M. Recombinant adenovirus as a model to evaluate the efficiency of free chlorine disinfection in filtered water samples. **Virology Journal**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2015.

NATARO, James P.; KAPER, James B.. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, American Society for Microbiology. Baltimore, p. 144-201. Jan. 1998.

NORDIN, Annika. **Ammonia Sanitisation of Human Excreta Treatment**: treatment technology for production of fertiliser. 2010. 67 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agricultural Sciences, Department Of Energy And Technology And National Veterinary Institute Uppsala, Faculty Of Natural Resources And Agricultural Sciences, Uppsala, 2010. Disponível em: <https://pub.epsilon.slu.se/2361/>. Acesso em: 24 ago. 2020.

NDUHIU, G.; GICHERU, M. M.; GATHURA, P. B.; et al. Internalization of enteropathogenic human bacteria in lettuce and coriander plant tissue. **ISABB Journal of Health and Environmental Sciences**, v. 5, n. 3, p. 28–32, 2018. Academic Journals. Doi: 10.5897/ISAAB-JHE2018.0043.

OLIVEIRA, M.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Presence and survival of *Escherichia coli* O157:H7 on lettuce leaves and in soil treated with contaminated compost and irrigation water. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, n. 2, p. 133–140, 2012. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.014>>.

ONGENG, D.; MUYANJA, C.; GEERAERD, A. H.; SPRINGAEL, D.; RYCKEBOER, J. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* enterica serovar Typhimurium in manure and manure-amended soil under tropical climatic conditions in Sub-Saharan Africa. **Journal of Applied Microbiology**, v. 110, n. 4, p. 1007–1022, 2011.

OTTERPOHL, Ralf et al. **Terra Preta Sanitation 1**: background, principles and innovations. Alemanha: DBU, 2015. 148 p. Disponível em: < <https://www.dbu.de/phpTemplates/publikationen/pdf/180615110354odmi.pdf>>.

PRADO, T.; MIAGOSTOVICH, M. P. Virologia ambiental e saneamento no Brasil: Uma revisão narrativa. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1367–1378, 2014. Doi: 10.1590/0102-311X00109213.

PRIAC, A., BADOT, P.-M., & CRINI, G. (2017). Treated wastewater phytotoxicity assessment using *Lactuca sativa*: Focus on germination and root elongation test parameters. **Comptes Rendus Biologies**, 340(3), 188–194. doi:10.1016/j.crv.2017.01.002.

QMRAWIKI. Adenovirus: dose response models. Dose Response Models. 2022. Michigan State University, College of Engineering, Department of Biosystems and Agricultural Engineering. Disponível em: <http://qmrawiki.org/pathogens/adenovirus>. Acesso em: 12 dez. 2021.

QMRAWIKI. *Escherichia coli*: dose response models. Dose Response Models. 2022. Michigan State University, College of Engineering, Department of Biosystems and Agricultural Engineering. Disponível em: <http://qmrawiki.org/pathogens/adenovirus>. Acesso em: 24 Oct. 2021.

QMRAWIKI. *Salmonella*: dose response models. Dose Response Models. 2022. Michigan State University, College of Engineering, Department of Biosystems and Agricultural Engineering. Disponível em: <http://qmrawiki.org/pathogens/adenovirus>. Acesso em: 19 jan. 2022.

REGLI, S. et al. Modeling the risk from Giardia and viruses in drinking water. *Journal of American Water Works Association*, v. 83, n. 11, p. 76-84, 1991

ROCKEFELLER, A. A. Civilization and sludge: Notes on the history of the management of human excreta*. **Capitalism Nature Socialism**, v. 9, n. 3, p. 3–18, 1998. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10455759809358806>>.

ROIG, N., SIERRA, J., NADAL, M., MARTÍ, E., NAVALÓN-MADRIGAL, P., SCHUHMACHER, M., DOMINGO, J.L., 2012. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Sci. Total Environ.** 425, 99–109. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.018>.

ROSETE; DP, MANJARREZ; ME, BARRÓN; BL. Adenoviruses C in non-hospitalized Mexican children older than five years of age with acute respiratory infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2008 Mar;103(2):195-200. doi: 10.1590/s0074-02762008000200012. PMID: 18425273.

ROWE WP, HUEBNER RJ, GILMORE LK, PARROTT RH, WARD TG. Isolation of a Cytopathogenic Agent from Human Adenoids Undergoing Spontaneous Degeneration in Tissue Culture. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine.** 1953;84(3):570-573. doi:10.3181/00379727-84-20714

SANO, D., HAAS, C.N. AND ROSE, J.B. 2019. A QMRA Framework for Sanitation Treatment Decisions. In: J.B. Rose and B. Jiménez-Cisneros, (eds) *Water and Sanitation for the 21st Century: Health and Microbiological Aspects of Excreta and Wastewater Management (Global Water Pathogen Project). Part 1: The Health Hazards of Excreta: Theory and Control*) Michigan State University, E. Lansing, MI, UNESCO, <https://doi.org/10.14321/waterpathogens.3>.

Secretaria Municipal de Habitação e Saneamento Ambiental – SMHSA. **Plano Municipal Integrado De Saneamento Básico – PMISB**: Produto 2: Diagnóstico Da Caracterização Física Das Unidades Territoriais De Análise E Planejamento. Florianópolis: Prefeitura Municipal de Florianópolis, 2010. 336 p. Disponível em: http://portal.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/06_06_2012_14.04.25.da52287614078c9d7de177baaa656c8f.pdf. Acesso em: 25 jul. 2020.

SIMHA, Prithvi; MATHEW, Melvin; JAIN, Pulak; GANESAPILLAI, M. Resource Recovery and Recycling in Sanitation is Key to Health, **Water and Food Security. Procedia Technology**, [s.l.], v. 25, p. 201-207, 2016. Elsevier BV. Doi: 10.1016/j.protcy.2016.08.098.

SIMHA, Prithvi; ZABANIOTOU, A.; GANESAPILLAI, M. Continuous urea–nitrogen recycling from human urine: a step towards creating a human excreta based bioeconomy. *Journal Of Cleaner Production*, [S.L.], v. 172, p. 4152-4161, jan. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2017.01.062>.

SMITH, Vanessa Cavaleiro. **Detecção e genotipagem de adenovírus humano em águas destinadas à recreação, provenientes da ilha de Mosqueiro, região metropolitana de Belém, estado do Pará, Brasil, janeiro de 2012 a dezembro de 2014**. 2015. 88 f. Dissertação (Doutorado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em Virologia, Instituto Evandro Chagas, Ananindeua-Pará, 2015. Disponível em: <https://patua.iec.gov.br/bitstream/handle/iec/3110/> Acesso em: 19 jun. 2021.

SOUZA, Cintya de Oliveira et al. Escherichia coli enteropatogênica: uma categoria diarréiogênica versátil. *Rev Pan-Amaz Saude*, Ananindeua, v. 7, n. 2, p. 79-91, jun. 2016. Disponível em http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-2232016000200079&lng=pt&nrm=iso. Acesso em 18 jun. 2021.

SRIWANNA, P. et al. Molecular characterization of human adenovirus infection in Thailand, 2009–2012. *Virology Journal*, v. 10, n. 193, p. 1-10, 2013.

SOLOMON, E. B.; YARON, S.; MATTHEWS, K. R. Transmission of Escherichia coli O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, n. 1, p. 397–400, 2002. Doi: 10.1128/AEM.68.1.397-400.2002.

SPARK, Weather. Winter Weather in Atlanta Georgia, United States. 2022. Disponível em: <https://weatherspark.com/s/15598/3/Average-Winter-Weather-in-Atlanta-Georgia-United-States#Figures-Temperature>. Acesso em: 31 mar. 2022.

TRIASTUTI, J.; SINTAWARDANI, N.; IRIE, M. Characteristics of Composted Bio-Toilet Residue and Its Potential Use as a Soil Conditioner. *Indonesian Journal of Agricultural Science*, v. 10, n. 2, p. 73, 2016. Doi: 10.2495/SC190601.

UDERT, K. M.; LARSEN, T. A.; BIEBOW, M.; GUJER, W. Urea hydrolysis and precipitation dynamics in a urine-collecting system. *Water Research*, v. 37, n. 11. Doi: 10.1016/S0043-1354(03)00065-4.

UNESCO, UN-Water, 2020: **United Nations World Water Development Report 2020: Water and Climate Change**, Paris, UNESCO. Disponível em: < <https://en.unesco.org/themes/water-security/wwap/wwdr/2020>>.

UNITED NATIONS. **TRANSFORMING OUR WORLD: THE 2030 AGENDA FOR SUSTAINABLE DEVELOPMENT**. 2015. Disponível em: <https://sustainabledevelopment.un.org/content/documents/21252030%20Agenda%20for%20Sustainable%20Development%20web.pdf>. Acesso em: 16 abr. 2020.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **EPA-832/R-93/003: A Plain English Guide to the EPA Part 503 Biosolids Rule.** 1 ed. Washington: United States Environmental Protection Agency, 1994. 183 p. Disponível em: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2018-12/documents/plain-english-guide-part503-biosolids-rule.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2021.

VENEGAS, M.; LEIVA, A. M.; BAY-SCHMITH, E.; SILVA, J.; VIDAL, G. Phytotoxicity of biosolids for soil application: Influence of conventional and advanced anaerobic digestion with sequential pre-treatment. **Environmental Technology and Innovation**, v. 16, 2019.

VINNERÅS, Björn. **Possibilities for Sustainable Nutrient Recycling by Faecal Separation Combined with Urine Diversion.** 2002. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agricultural Engineering, Department of Agricultural Engineering, Swedish University Of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden, 2002. Disponível em: <https://www.susana.org/en/knowledge-hub/resources-and-publications/library/details/1685>. Acesso em: 20 maio 2020.

VINNERÅS, Björn; AGOSTINI, F.; JÖNSSON, Hakan. Sanitation by Composting. **Microbes At Work**, [s.l.], p. 171-191, 3 dez. 2009. Springer Berlin Heidelberg. Doi: 10.1007/978-3-642-04043-6_9.

VINNERÅS, Björn; JÖNSSON, Håkan. Separation of faeces combined with urine diversion - function and efficiency. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ECOLOGICAL SANITATION, 2., 2003, Sweden. **Proceedings [...]**. Sweden: Iwa, 2003. v. 1, p. 579-586. Disponível em: https://pdfs.semanticscholar.org/129f/584ab12c8e96860e4f9a38b42d40d2e6d5c3.pdf?_ga=2.25550013.1098888923.1598614769-107883440.1598614769. Acesso em 06 abr. 2020.

VISKARI, E. L.; GROBLER, G.; KARIMÄKI, K.; et al. Nitrogen Recovery with Source Separation of Human Urine—Preliminary Results of Its Fertiliser Potential and Use in Agriculture. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, n. June, p. 1–14, 2018.

WARRINER, K.; IBRAHIM, F.; WAITES, W. M.; DICKINSON, M.; WRIGHT, C. Internalization of Human Pathogens within Growing Salad Vegetables. **Biotechnology and Genetic Engineering Reviews**, v. 20, n. 1, p. 117–136, 2003. Doi: 10.1080/02648725.2003.10648040

WHO. *E. coli* - Key facts. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>. Acesso em: 12 dez. 2021.

WHO. Estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne disease burden epidemiology reference group 2007-2015. **Encyclopedia of Parasitology**, p. 1–1, 2015. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf;jsessionid=B0FE3917E37279F2FD04363C254AB236?sequence=1. Acesso em: 05 Nov. 2020.

WHO. **Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater.** World Health Organization, Switzerland, 2006. 114 pg. Disponível em: file:///C:/Users/User/Downloads/9241546824_eng.pdf

WHO, UNICEF. **Progress on household drinking water, sanitation and hygiene 2000-2017**: New York: Richard Steele, 2019. Disponível em: <https://www.unicef.org/media/55276/file/Progress%20on%20drinking%20water,%20sanitation%20and%20hygiene%202019%20.pdf>. Acesso em: 15 abr. 2020.

WHO. Quantitative Microbial Risk Assessment: Application for Water Safety Management. **Who**, p. 187, 2016.

WORLDOMETERS. **World Population Projections**. 2021. Disponível em: <https://www.worldometers.info/world-population/world-population-projections/>. Acesso em: 20 mar. 2021.

WRIGHT, K. M.; CROZIER, L.; MARSHALL, J.; et al. Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*. **Microbial Biotechnology**, v. 10, n. 3, p. 555–569, 2017.