

---

Ciências Biológicas

---

**Mileni Norberto de Souza**

**Efetividade da biorremediação de lodo de  
esgoto aeróbio bioestimulado, avaliada pelo  
ensaio de *Allium cepa***



Rio Claro  
2018

Mileni Norberto de Souza

Efetividade da biorremediação de lodo de esgoto aeróbio bioestimulado, avaliada pelo ensaio de *Allium cepa*

Orientador: Dânia Eliza Christofolletti Mazzeo Morales

Co-orientador: Maria Aparecida Marin Morales

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de Licenciada em Ciências Biológicas

Rio Claro  
2018

S729e

Souza, Mileni Norberto de

Efetividade da biorremediação de lodo de esgoto aeróbio bioestimulado, avaliada pelo ensaio de *Allium cepa* / Mileni Norberto de Souza. -- Rio Claro, 2018

48 p. : tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso ( - ) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Dânia Eliza Christofoletti Mazzeo Morales

Coorientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Genotoxicidade. 2. *Allium cepa*. 3. Biorremediação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

*Dedico este trabalho à  
minha querida família,  
especialmente aos meus  
pais.*

## AGRADECIMENTOS

Certamente durante todos estes anos de graduação eu não teria enfrentado tudo o que foi necessário sem o apoio de muitas pessoas, as quais foram fundamentais no meu desenvolvimento pessoal e profissional durante este período, e gostaria de agradecer profundamente:

Aos meus pais, Joaquim e Aparecida, os quais sempre foram minha base e minha inspiração como pessoas, pelo caráter, humildade, alegria e me transmitiram valores que carregarei sempre comigo, que fazem de mim, uma pessoa melhor. Pelos quais eu resgatei forças para resistir aos problemas enfrentados durante a graduação sem perder-me pelo caminho, à eles eu dedico todo o meu esforço, e agradeço de todo o coração por confiarem e dar-me suporte por este período e por toda a vida, sempre com muito amor. Obrigada por serem os melhores pais do mundo, amo vocês!

Ao meu irmão César, por acreditar no meu potencial e estar sempre disposto a ajudar-me e mostrar que a vida pode ser simples e não precisa ser sempre levada tão a sério. Agradeço por todos os momentos juntos, os conselhos e até mesmo as discussões, você sempre foi uma inspiração pra mim, e continuará sendo até o fim da vida.

À toda minha família, tios, tias, avós, primos... Por me apoiarem na decisão de mudar-me de cidade, por se preocuparem com meu bem estar, me dar conselhos e se disporem a sempre ajudar, sou muito grata à todos.

Ao meu namorado, Nicolas, por ser incrível, me aturar à flor da pele em provas e finais de semestres, muitas vezes chorando de desespero, sempre acreditando em mim e me lembrando de acreditar também. Agradeço pelas risadas, atenção, carinho, por nossas conversas à qualquer hora do dia, sobre qualquer coisa e por sonhar um futuro junto comigo. Obrigada por todo amor e atenção dedicados durante esse tempo, amo você.

À minha família de amigos, Jé, Nanda, Gudi, Mari, Rapha, Rodrigo, Ruan, Carol e Diego por todos esses (muitos) anos que estiveram ao meu lado me fazendo feliz, pelos roles inusitados, rodízios, bares, festas, EJC e por sempre entenderem quando a graduação não me permitia ter tempo, estando comigo mesmo nos momentos mais difíceis. Agradeço imensamente por ter vocês ao meu lado, obrigado por nunca me abandonarem.

À minha família Rio Clarense, Ana, Mel e Sá, pessoas tão especiais, às quais tenho muito a agradecer, por serem sempre tão amigas e gentis comigo, e tornarem a vivência em Rio Claro maravilhosa. Obrigada por dividirem todas as angustias e alegrias durante todos esses anos, vocês são extremamente importantes na minha vida, e com certeza nossa amizade

durará para sempre. Agradeço também ao Léo, ao Pumba e à toda turma do CBN14 por todos os momentos incríveis que foram vividos juntos. Vocês todos deixaram esses anos de faculdade um pouquinho mais leves.

Às minhas companheiras de república, todas foram muito importantes durante cada fase da minha graduação, desde o início quando cheguei perdida em Rio Claro (Bia, Bruna, Ane e Ju), até a reta final, me auxiliando inclusive na escrita deste trabalho (Camila e Paulinha), e claro às que me acompanharam durante todos esses anos (Isa e Sá). Inspiro-me em cada uma de vocês, por serem todas mulheres fortes e determinadas.

À todos os mutagênicos, os quais não citarei nomes para não correr o risco de esquecer, pois somos muitos (rs), agradeço por tornar o trabalho no laboratório mais prazeroso e sempre estarem dispostos a ajudar em qualquer momento.

À minha orientadora, Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo, à qual devo toda evolução profissional adquirida durante esses anos, com quem aprendi a fazer ciência. Uma mulher dedicada, forte e inspiradora, que acreditou em mim quando eu mesma não acreditei. Agradeço de coração por esses anos de ensinamentos e paciência.

À minha co-orientadora Maria Aparecida Marin Morales, por ser sempre tão gentil e prestativa. Foi um enorme prazer trabalhar com uma pessoa que admiro tanto, com quem aprendi muito durante os anos que estive no laboratório.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido para a execução deste trabalho.

## RESUMO

O presente trabalho propôs a utilização do processo de bioestimulação para reduzir a toxicidade do LE aeróbio, de origem sanitária, proveniente da ETE da cidade de Americana/SP, utilizando bagaço de cana-de-açúcar (BAG) e borra de café (BO) como agentes bioestimulantes. O estudo foi realizado por meio de diluições do LE nas seguintes proporções volumétricas: LE+SOLO (S) (3:3), LE+S+BO (3:3:1) e LE+S+BAG (3:3:1), as quais foram analisadas no tempo inicial (T0) e a cada dois meses da realização processo de biorremediação, por um período total de 6 meses, sendo T1 (2 meses), T2 (4 meses) e T3 (6 meses). No tempo inicial, foi avaliado também o LE e o S puros, individualmente. A eficácia do processo foi avaliada a partir da análise da fitotoxicidade em bioensaio com *Lactuca sativa* e do índice de germinação, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das amostras por meio do bioensaio de *Allium cepa*, em células meristemáticas e F1. Quanto à fitotoxicidade em *L. sativa*, as amostras de LE puro inibiram totalmente a germinação de sementes. Já as raízes crescidas nas amostras de LE+S, LE+S+BAG e LE+S+BO apresentaram tamanhos significativamente menores durante os 4 primeiros meses. No entanto, tiveram seus efeitos atenuados após 6 meses de bioestimulação (T3), apresentando crescimento das raízes em tamanhos semelhantes ao CN. Em T0, as amostras de LE puro e LE+S+BO inibiram significativamente a germinação das sementes de *A. cepa*. No entanto, esse parâmetro foi normalizado em T1. Quanto à citotoxicidade, as amostras LE+S e LE+S+BO ocasionaram um efeito significativo em T2, sendo este efeito também observado para a amostra LE+S+BO em T3. Todas as amostras induziram genotoxicidade e mutagenicidade nas células meristemáticas do organismo teste em T0, no entanto, não houve correspondência desses resultados para as células F1, com exceção da amostra de LE puro. Para esta amostra, foi possível verificar uma fixação dos danos observados para as células meristemáticas nas células filhas (F1), evidenciando o alto potencial mutagênico deste resíduo. Após dois meses de bioestimulação, o potencial mutagênico e genotóxico foi significativamente reduzido para as amostras LE+S e LE+S+BAG, contudo, ainda foi observado um efeito mutagênico significativo para a amostra LE+S+BO, o qual foi atenuado após quatro meses de bioestimulação. Desse modo, para o período estudado, o BAG parece se caracterizar como um agente bioestimulante bastante efetivo na detoxificação do LE, pois, após dois meses de processo, os efeitos ecotoxicogenéticos da amostra contendo BAG foram atenuados. Portanto, a bioestimulação utilizando este composto parece ser eficaz para promover a detoxificação do LE, sendo possível transformá-lo em um recondicionante de solos e, assim, utilizá-lo na agricultura de forma a não comprometer a saúde ambiental.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2 OBJETIVOS .....</b>	<b>12</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Caracterização da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Descrição e coleta dos materiais .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Preparo das amostras para os ensaios de biorremediação .....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Ensaios de biorremediação para detoxificação das amostras de LE .....</b>	<b>16</b>
<b>3.5 Obtenção dos extratos aquosos .....</b>	<b>17</b>
<b>3.6 Teste de toxicidade aguda com sementes de <i>Lactuca sativa</i> .....</b>	<b>18</b>
<b>3.7 Avaliação da toxicidade do LE por meio do organismo teste <i>Allium cepa</i> .....</b>	<b>19</b>
<b>3.7.1 Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos (MN).....</b>	<b>19</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Avaliação do potencial fitotóxico das amostras em <i>L. sativa</i> .....</b>	<b>22</b>
<b>4.2 Avaliação do potencial fitotóxico das amostras em <i>A. cepa</i> .....</b>	<b>24</b>
<b>4.2 Avaliação da citotoxicidade das amostras .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Avaliação do potencial genotóxico das amostras .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Avaliação do potencial mutagênico das amostras.....</b>	<b>33</b>
<b>4.5 Discussões Gerais .....</b>	<b>36</b>
<b>5 CONCLUSÕES.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>41</b>



A concentração populacional nos centros urbanos tem causado um grande aumento na geração de diversos resíduos, que acarretam em graves impactos ambientais quando não são descartados e tratados de maneira adequada. Entre esses resíduos, o lodo de esgoto (LE), resultante do processo de tratamento de efluentes, destaca-se pela sua constituição tóxica e por sua crescente produção, representando um sério problema ambiental (PATHAK; DASTIDAR; SREEKRISHNAN, 2009; RATHOD et al., 2008). No Brasil, onde apenas 42,7% do esgoto da população urbana é devidamente tratado (SNIS, 2016), estima-se que a geração de LE, em matéria seca, esteja por volta de 200 mil toneladas por ano (PEDROZA et al., 2010). No Estado de São Paulo, dos 87% de esgoto coletado, apenas 62% deste são tratados (CETESB, 2017), evidenciando uma expectativa de aumento na produção deste resíduo. Calcula-se que a quantia de LE produzido seja correspondente a 2% do volume de esgoto tratado por uma ETE (ANDREOLI, 1999), valor este, diretamente relacionado ao processo de tratamento empregado, já que quanto mais moderno e eficiente for o tratamento, maior será a quantidade de LE gerada, devido à sua maior eficiência na remoção de nutrientes e contaminantes do efluente líquido (CORRÊA; FONSECA; CORRÊA, 2007). O tipo de tratamento aplicado ao esgoto depende de suas características físicas e químicas, sendo que em algumas regiões do estado de São Paulo, o método mais utilizado é por meio de lodo ativado, um processo estritamente biológico e aeróbico (SÃO PAULO, 2017).

Atualmente, a maior parte do LE produzido pelas Estações de Tratamento de Esgoto (ETEs) vem sendo descartado em aterros sanitários próprios. No entanto, esta prática representa inúmeras desvantagens, uma vez que, além de ser bastante onerosa, também contribui para a geração de gases de efeito estufa, introdução de microrganismos patogênicos e compostos tóxicos no ambiente, bem como para a ocupação e inviabilização de espaços úteis que poderiam ser destinados a outro tipo de atividade mais nobre (GRAY, 2010; WALTER; MARTÍNEZ; CALA, 2006).

O lodo ativado é formado por diferentes bactérias agregadas, que formam flocos bioativos que permitem a separação entre a biomassa e o efluente tratado (CORDI et al., 2008). Além de bactérias, a microbiota desse lodo também é composta por protozoários e micrometazoários que agem como bioindicadores (VAZOLLÉR et al., 1991). A composição do LE pode variar de acordo com o processo de tratamento utilizado. Um LE típico contém 40% de matéria orgânica, 4% de nitrogênio, 2% de fósforo e 0,4% de potássio, além de alguns micronutrientes como ferro, cobre, zinco e manganês (BETTIOL; CAMARGO, 2000). Por conter altas concentrações de matéria orgânica e macronutrientes, o uso do LE como

recondicionante de solo na agricultura vem sendo incentivado, pois possibilita uma reciclagem de nutrientes e uma redução do consumo de fertilizantes sintéticos, além de uma diminuição de uma fonte potencial de poluição (ÇİFCİ; KINACI; ARIKAN, 2013; GIANICO et al., 2013; MCGEEHAN, 2012; SINGH; AGRAWAL, 2008; ENGWALL; HJELM, 2000). Entre os benefícios atribuídos a aplicação de LE ao solo, incluem-se a diminuição da densidade do solo com o aumento da estabilidade dos agregados; aumento da retenção hídrica; correção de pH; aumento da porosidade, condutividade hidráulica e elétrica; aumento dos teores e da retenção de nutrientes essenciais às plantas; diminuição de processos erosivos; aumento do carbono orgânico e do teor de ácido húmico (SINGH; AGRAWAL, 2008; MELO et al., 2001).

No entanto, em decorrência do próprio processo de tratamento do esgoto, o LE tende a acumular uma ampla variedade de contaminantes, incluindo metais e substâncias orgânicas tóxicas (SHAHBAZI et al., 2017; GIUDICE; YOUNG, 2011; HARRISON et al., 2006), os quais encontravam-se, originalmente, no efluente líquido. Deste modo, a aplicação do LE no solo pode levar à contaminação por compostos orgânicos como fenóis, benzenos, antracenos, alquilbenzenos linear sulfonados, etc. (PARAIBA; SAITO, 2005; HOLMSTRUP et al., 2001), e inorgânicos, como alguns metais tóxicos, por exemplo, zinco, cobre, níquel, chumbo, cádmio e mercúrio (LOPES et al., 2005), além de introduzir microrganismos patogênicos no ambiente (CESAR et al., 2008). Portanto, sua aplicação em solos agrícolas envolve cuidados especiais para que sejam evitados danos ao ambiente, à saúde humana e aos organismos expostos (CLARKE; SMITH, 2011).

Com a finalidade de se promover a detoxificação do LE e, assim, possibilitar sua aplicação segura em solos agrícolas, o processo de biorremediação vem sendo proposto como uma tecnologia eficiente e de baixo custo a ser empregada na mineralização de contaminantes presentes neste resíduo (SOMMAGGIO et al., 2018; MAZZEO et al., 2016a; MAZZEO et al., 2016b; MAZZEO et al., 2015). Tal processo utiliza-se da capacidade de um consórcio microbiano, contendo inúmeras vias enzimáticas, em metabolizar poluentes e transformá-los em substâncias não tóxicas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Outro ponto favorável é que este processo pode ser realizado em ambientes abertos, não estéreis (WATANABE, 2001), o que facilita a sua implementação em larga escala, podendo ser realizado na própria ETE, onde o LE foi produzido.

A adição de agentes estimulantes durante o processo de biorremediação pode favorecer o crescimento dos microrganismos e, assim, contribuir para um aumento da eficiência e rapidez do processo (MAZZEO et al., 2014). O bagaço de cana-de-açúcar,

resultante da extração do caldo da cana-de-açúcar, após esmagamento nas moendas, representa um dos maiores resíduos da agroindústria brasileira, sendo bastante representativo no Estado de São Paulo (TEIXEIRA et al., 2007). Quando empregado em processo de bioestimulação, este material pode atuar como agente descompactante, proporcionando uma maior aeração do sistema, além de ser fonte de carboidratos, o que favorece o crescimento microbiano (SOMMAGGIO, 2013; PANDEY et al., 2000). Outro resíduo bastante expressivo em termos de produção, é a borra de café, resultante do preparo da bebida em cafeterias, restaurantes ou residências (CRUZ et al., 2014). Por conter altas concentrações de nitrogênio, fósforo e potássio, a incorporação deste material ao LE também pode contribuir para o incremento da população microbiana (MURTHY; NAIDU, 2012; KASONGO et al., 2011) e, como consequência, para o aumento da degradação de substâncias orgânicas tóxicas. Desse modo, o aproveitamento de resíduos agroindustriais e domésticos como agentes estimulantes é bastante interessante, pois possibilita a melhoria do processo de bioestimulação sem acarretar em um aumento nos custos do processo (SELLAMI et al., 2008).

Pelo fato do LE ser considerado uma matriz complexa e pela dificuldade da identificação química de todos os contaminantes presentes, o uso de bioensaios vem sendo proposto para melhor compreender os riscos ecológicos associados ao uso de LE em solos, principalmente por possibilitarem a avaliação do efeito sinérgico dos contaminantes e sua biodisponibilidade para os organismos (ALVARENGA et al., 2007; CHENON et al., 2003).

Em estudos relacionados com a contaminação de solos, as plantas se caracterizam como um importante material biológico para a avaliação de danos ecotoxicogenéticos induzidos por contaminantes presentes neste meio físico, uma vez que o solo é o substrato de crescimento para a grande maioria delas (WHITE; CLAXTON, 2004). Dentre os vegetais mais utilizados para avaliação da eficiência de processos de biorremediação, a espécie *A. cepa* vem sendo considerada como um excelente organismo teste para este fim (MAZZEO et al., 2015; MIRANDA et al., 2013; SOUZA et al., 2013; MAZZEO; FERNANDES; MARIN-MORALES, 2011; MAZZEO et al., 2010), destacando-se pela sua facilidade de cultivo e desenvolvimento do ensaio; exposição direta à amostra a ser testada, incluindo misturas complexas, sem a necessidade de se realizar procedimentos de extração ou pré-tratamento das amostras; disponibilidade durante o ano todo; alta sensibilidade e boa correlação com outros sistemas-teste, incluindo os de mamíferos (KURÁS et al., 2006; MATSUMOTO et al., 2006; RANK; NIELSEN, 1998; GRANT, 1982). Adicionalmente, as raízes de *A. cepa* possuem um meristema que se espalha facilmente nas lâminas, facilitando o reconhecimento dos núcleos celulares e cromossomos em fases mitóticas, aberrantes e/ou normais em microscópio de luz

(ARAÚJO et al., 2015). Além da análise das células meristemáticas desse organismo-teste, também é possível realizar a análise de células da geração subsequente (F1), a fim de se verificar se os danos cromossômicos encontrados nas células meristemáticas foram fixados no organismo, progredindo para as células F1 na forma de micronúcleos (MA et al., 1995).

A alface (*Lactuca sativa*) também tem sido um organismo vegetal muito utilizado em ensaios ambientais, sendo considerada uma espécie bastante adequada para a realização de estudos ecotoxicológicos pela simplicidade e rapidez na execução do teste (PALMIERE et al., 2014). Dentre os parâmetros de análise, a avaliação da germinação de sementes e de alterações no padrão de crescimento da radícula e hipocótilo dessa planta vem sendo recomendada por fornecerem resultados confiáveis para mensurar a toxicidade aguda de uma ampla variedade de amostras (SOBRERO; RONCO, 2004).

A legislação brasileira, prescrita no Artigo 11 da Resolução nº 375 do CONAMA, de 29 de agosto de 2006, estabelece uma série de parâmetros para que o LE de origem sanitária possa ser disposto em áreas agrícolas (BRASIL, 2006). No entanto, o não enquadramento do LE nessas exigências inviabiliza o seu uso agrícola e prevê o seu descarte em aterros sanitários apropriados. Assim, pela expressiva tendência de aumento da produção de LE, bem como pelo seu potencial altamente detrimental ao ambiente, pesquisas que visam desenvolver metodologias que permitam aproveitar sua alta quantidade de matéria orgânica e nutrientes e, transformá-lo em um material com potencialidade de uso agrícola, devem ser incentivadas.

***2 OBJETIVOS***

Frente ao exposto anteriormente, este projeto buscou avaliar a efetividade do processo de bioestimulação de LE aeróbio, com o emprego de subprodutos da agroindústria (bagaço de cana-de-açúcar) e doméstico (borra de café), a fim de se obter, a partir do LE, um aditivo de solos agrícolas. Desse modo, o presente estudo teve como objetivos específicos:

- caracterizar o potencial ecotoxicogenético de amostras de LE aeróbio, derivado de tratamento de efluente sanitário, antes e após 6 meses de bioestimulação, avaliando o processo a cada 2 meses;

- comparar a eficiência do bagaço de cana-de-açúcar e da borra de café como agentes bioestimulantes na tentativa de biorremediação do LE;

- avaliar o potencial de detoxificação do LE, bem como a efetividade do processo de bioestimulação utilizado, em diferentes períodos (2, 4 e 6 meses), por meio de ensaios com *L. sativa* e *A. cepa*;

- comprovar a eficiência dos organismos testes *A. cepa* e *L. sativa* como uma ferramenta promissora para detecção do potencial tóxico de amostras de LE aeróbio bioestimulados.

***3 MATERIAL E MÉTODOS***

### 3.1 Caracterização da Estação de Tratamento de Esgoto (ETE)

A ETE escolhida para o fornecimento das amostras de LE foi a ETE Praia Azul, localizada no município de Americana, no interior do Estado de São Paulo. O município de Americana está inserido na Unidade de Gerenciamento de Recursos Hídricos - UGRHI 5, a qual compreende a bacia dos rios Piracicaba/Capivari/Jundiaí (PCJ). De todo o esgoto coletado por esta unidade (91%), apenas 73% recebe tratamento apropriado (CETESB, 2017).

Dentre as ETEs localizadas neste município, a ETE Praia Azul é responsável pelo tratamento de esgoto sanitário proveniente do bairro Praia Azul, atendendo cerca de 20.000 habitantes, apresentando uma vazão média de 32 L/s (cerca de 83.000 m<sup>3</sup>/mês). Esta ETE emprega um processo convencional de tratamento de esgotos, por lodo ativado, incluindo gradeamento grosseiro e grade fina com removedor automático tipo rosca-sem-fim, caixa de areia, valo de oxidação circular com aeradores superficiais, decantador secundário, recirculação de lodo, tanque de contato para desinfecção por cloro gasoso e centrífuga para desidratação do lodo. O efluente líquido tratado é lançado nas águas da Represa Salto Grande e o lodo excedente da recirculação é descartado, encaminhado à centrífuga para desidratação e, posteriormente, destinado para aterro sanitário específico para resíduos não inertes (classe IIA). Atualmente, a ETE gera cerca de 115 m<sup>3</sup> de LE aeróbio por mês, com um teor de sólidos em torno de 25% (DAE Americana – comunicação pessoal, 2016).

### 3.2 Descrição e coleta dos materiais

As amostras de LE aeróbio, provenientes da ETE Praia Azul, constituíram de amostras compostas obtidas da amostragem de 3 diferentes campanhas realizadas em dias distintos, a fim de garantir a representatividade destas.

O bagaço de cana-de-açúcar foi adquirido em indústrias sucroalcooleiras, após o processo de moagem da cana. Esse subproduto foi triturado grosseiramente e utilizado como agente descompactante nos ensaios de biorremediação.

Outro material utilizado foi a borra de café, a qual foi obtida em cafeterias locais e empregada neste estudo como agente descompactante e estimulante do processo de biorremediação.

O solo utilizado para diluição das amostras de LE foi coletado no Jardim Experimental da UNESP, Campus Rio Claro, o qual caracteriza-se por sua textura argilosa e condutividade elétrica de 146,7 µS/cm.

### 3.3 Preparo das amostras para os ensaios de biorremediação

As amostras estudadas foram preparadas utilizando proporções volumétricas, já pensando na facilidade de extrapolação destas medidas quando esta tecnologia vir a ser utilizada em escala real (por exemplo, 3 caçambas de LE + 3 caçambas de solo, etc), como segue:

- LE + solo (3:3 – v/v);
- LE + solo + bagaço de cana-de- açúcar (3:3:1 – v/v/v);
- LE + solo + borra de café (3:3:1 – v/v/v).

A proporção de solo e LE escolhida foi baseada em trabalhos prévios desenvolvidos por este grupo de pesquisa (MAZZEO, 2013; MAZZEO et al. 2015; 2016a; 2016b), os quais constataram que esta proporção foi a que melhor respondeu aos ensaios de biorremediação, já que a realização de ensaios com LE puro, sem a adição do solo, mostraram-se muito demorados e pouco efetivos na diminuição da toxicidade desse resíduo.

A umidade das amostras foi ajustada para 70% da capacidade de campo, umidade esta que garante a ação dos microrganismos. Esta umidade foi reajustada a cada semana, para compensar as perdas por evaporação, por se tratar de um sistema aberto.

### 3.4 Ensaios de biorremediação para detoxificação das amostras de LE

A tecnologia empregada na biorremediação de LE foi o processo de bioestimulação, visando promover um aumento da biomassa microbiana pela introdução de agentes estimulantes ao sistema (bagaço de cana-de- açúcar ou borra de café).

O processo de biorremediação foi desenvolvido em escala piloto, acondicionando as amostras em caixas de aço inox (14 L), mantidas no Jardim Experimental da UNESP de Rio Claro, em local coberto sob temperatura ambiente. O experimento foi desenvolvido em triplicata (Figura 1).

Os períodos avaliados foram de 0, 2, 4 e 6 meses. Decorrido cada tempo, uma parte das amostras foi coletada para a verificação do seu potencial tóxico, pelo ensaio com o organismo teste *A. cepa*, bem como para a preparação dos extratos aquosos.



**Figura 1.** A. Cuba de inox contendo esferas de vidro, as quais atuam como primeira camada antes da adição das amostras; B. Cuba de inox contendo amostra; C. Disposição das amostras para realização do processo de biorremediação em escala piloto, no jardim experimental da Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, campus de Rio Claro.

### 3.5 Obtenção dos extratos aquosos

As etapas para a obtenção dos extratos aquosos das amostras de LE, bem como das misturas com solo e agentes estimulantes, antes e após processo de bioestimulação, foram baseadas na norma NBR 10.006 (ABNT, 2004), que visa o preparo de solubilizados a partir de resíduos sólidos. Em suma, os procedimentos consistiram de:

- solubilização de 125 g de cada uma das amostras (referente ao peso seco) em 500 mL de água ultra pura;
- agitação constante das soluções, em baixa velocidade, por 5 minutos;
- decantação do material em suspensão, por 7 dias, em frascos cobertos com filme de PVC, em temperatura de 22 °C;
- coleta do sobrenadante (parte líquida);
- filtração em membrana com 0,45 µm de porosidade.

Os extratos aquosos foram avaliados quanto à sua toxicidade por meio do bioensaio com *L. sativa*, a fim de se verificar o potencial risco de contaminação dos recursos hídricos

pela disposição de LE nos solos receptores, em decorrência da presença de compostos tóxicos solúveis em água.

### 3.6 Teste de toxicidade aguda com sementes de *Lactuca sativa*

Este teste foi realizado seguindo os procedimentos propostos por Sobrero e Ronco (2004). Para a realização do ensaio, foram germinadas 20 sementes de *L. sativa* (variedade buttercup) em placas de Petri individuais, contendo papel filtro umedecido com 4 mL de extrato aquoso de cada uma das amostras. O controle negativo (CN) foi realizado com água ultrapura e o controle positivo (CP) com sulfato de zinco heptahidratado (0,005 M -  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ). As sementes foram dispostas nas placas deixando um espaço uniforme entre elas para que estas pudessem se desenvolver de modo adequado. Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD, na ausência de luz, por um período de 120 h (cinco dias), a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C. O experimento foi realizado em triplicata, para cada um dos períodos do processo de bioestimulação.

Após a incubação, foram realizadas as medições do hipocótilo e da radícula de cada uma das sementes germinadas, com o auxílio de um paquímetro digital (Figura 2).

Os valores obtidos foram analisados estatisticamente por meio do teste Kruskal-Wallis, a 0,05 de nível de significância, utilizando o programa BioEstat 5.1.



**Figura 2.** Paquímetro utilizado para medição das raízes de *L. sativa*, diferenciando hipocótilo e radícula.

### 3.7 Avaliação da toxicidade do LE por meio do organismo teste *Allium cepa*

Para a realização do ensaio, 50 sementes de *A. cepa* (variedade Baia Periforme; 2n=16) foram submetidas à germinação em placas de Petri individuais contendo as amostras brutas especificadas anteriormente. As placas foram incubadas em BOD a 22°C, com fotoperíodo de 12h, por cerca de 7 dias. Todos os testes com germinação de sementes foram realizados em triplicata, após cada período estipulado do processo de biorremediação.

Decorrido esse período, foram contabilizadas as sementes germinadas e as radículas, com cerca de 2,0 cm de comprimento, as quais foram coletadas e fixadas em álcool e ácido acético (3:1 – v/v) por 6 h em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a troca por fixador recém-preparado, para posterior armazenamento das raízes a 4°C, até a sua utilização na confecção das lâminas.

Os tratamentos controles negativo e positivo foram realizados em água ultra pura e em metilmetano sulfonato a 10 mg/L (MMS, Sigma-Aldrich, CAS 66-27-3), respectivamente.

#### 3.7.1. Teste de Aberrações Cromossômicas e Micronúcleos (MN)

Este teste foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com algumas modificações. As raízes previamente fixadas foram submetidas a três banhos em água destilada, hidrolisadas em HCl 1 N a 60°C por 11 minutos e submetidas à metodologia de Feulgen. Para o preparo das lâminas, os meristemas das raízes e células da região F1 foram dispostos em lâminas contendo uma gota de carmim acético (2%) e recobertos com lamínulas, sendo, suavemente, esmagados. As lamínulas foram retiradas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas com resina sintética, para serem, posteriormente, analisadas.

Foram confeccionadas 5 lâminas de cada triplicata, totalizando 15 lâminas para cada tratamento, em cada um dos períodos estabelecidos para a biorremediação. Para cada lâmina, cerca de 500 células foram contabilizadas, a fim de observar e quantificar as irregularidades celulares. A análise foi realizada em microscópio de luz, em um aumento de 400X a 1000X.

Para a avaliação da eficiência do processo de biorremediação empregado, foram considerados diferentes *endpoints*. O índice de germinação, representativo dos efeitos tóxico das amostras, foi obtido pela razão entre o número de sementes germinadas e total de sementes na placa.

O índice mitótico (IM), obtido pela razão do número de células em divisão sobre o número total de células analisadas, constituiu o *endpoint* de citotoxicidade das amostras. A

figura 3 apresenta as diferentes fases de divisão celular mitótica contabilizadas para a espécie *A. cepa*.

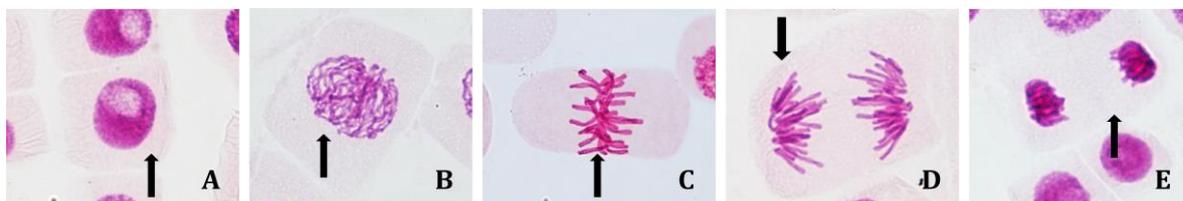
Foi considerado como *endpoint* de genotoxicidade, todas as diferentes aberrações cromossômicas observadas, incluindo perdas, quebras, pontes, atrasos e aderências cromossômicas nas diferentes fases da divisão celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase). As anormalidades nucleares (broto nuclear, núcleo lobulado, ponte nuclear), analisadas nas células interfásicas, também foram consideradas como efeito genotóxico. O índice de genotoxicidade de cada amostra foi obtido pela razão entre a soma de todas as alterações quantificadas pelo número total de células analisadas.

A presença de MN foi considerada como outro parâmetro de avaliação (*endpoint* de mutagenicidade). Este índice foi calculado dividindo o total de células portadoras de MN pelo número total de células observadas.

O índice mitótico e o índice de genotoxicidade foram avaliados pela contagem das células do meristema radicular de *A. cepa*. Já, o índice de mutagenicidade, além de ser avaliado pela contagem das células meristemáticas, também foi quantificado nas células da região F1.

A análise de todos estes parâmetros foi realizada pela contagem de cerca de 7500 células por tratamento. As análises estatísticas foram feitas por meio do teste de Mann-Whitney a 0,05 de nível de significância, utilizando o programa BioEstat 5.1.

A comprovação da efetividade da biorremediação foi avaliada pela comparação entre os efeitos induzidos por uma mesma amostra, após seus diferentes tempos de bioestimulação, em relação ao seu tempo 0, a fim de se verificar a possível diminuição dos efeitos observados.



**Figura 3.** Fases da divisão celular mitótica em *A. cepa*. **A.** Interfase; **B.** Prófase; **C.** Metáfase; **D.** Anáfase; **E.** Telófase.

## ***4. RESULTADOS E DISCUSSÕES***

Os resultados aqui apresentados referem-se às atividades de pesquisas realizadas com as amostras coletadas nos períodos propostos para a aplicação do processo de bioestimulação, sendo estes, inicial (T0), dois meses (T1), quatro meses (T2) e seis meses (T3). Neste estudo, o organismo teste *L. sativa* foi utilizado para avaliar o efeito fitotóxicos das amostras contendo LE e, o organismo teste *A. cepa* foi empregado para caracterizar o efeito do LE em diferentes níveis, incluindo seu efeito tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico.

#### 4.1 Avaliação do potencial fitotóxico das amostras em *L. sativa*

O bioensaio com *L. sativa* é um dos testes mais comumente utilizados para avaliar efeitos tóxicos de amostras ambientais em plantas (PASCUAL et al., 1997), por isso, neste estudo, esta espécie foi utilizada como indicador de fitotoxicidade das amostras contendo LE. No T0, foi possível observar que o LE puro inibiu totalmente a germinação das sementes, evidenciando seu alto potencial fitotóxico (Tabela 1). Esse mesmo efeito também foi relatado por Adamcová; Vaverková e Břoušková (2016), que observaram uma inibição no comprimento de raízes de *Sinapis alba* (mostarda-branca) entre 70,45% e 100% quando germinadas em LEs. Resultados semelhantes foram encontrados por Fuentes et. al. (2006), onde amostras de 4 tipos de LE submetidos a diferentes tipos de estabilização inibiram significativamente a germinação e o crescimento de raízes de *Hordeum vulgare* e *Lepidium sativum*.

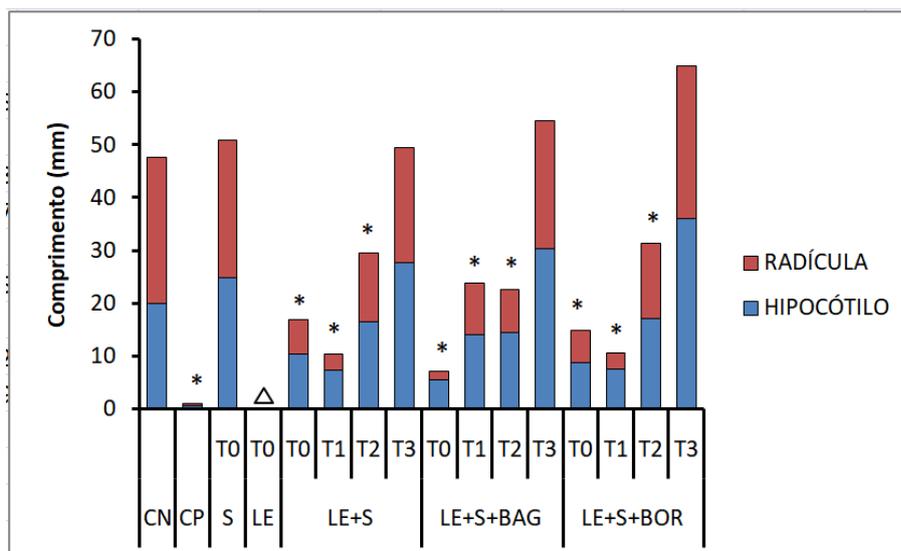
Quanto aos tratamentos LE+S, LE+S+BAG e LE+S+BO, nenhum inibiu a germinação das sementes de alface, porém induziram um crescimento de raiz significativamente menor com relação ao CN, apresentando uma diminuição significativa do comprimento do hipocótilo e da radícula (Tabela 1). Após dois meses de bioestimulação (T1), todas as amostras continuaram a apresentar um potencial fitotóxico, mostrando uma redução significativa no comprimento total da raiz e nos tamanhos da radícula e do hipocótilo. No T2, o comprimento da radícula permaneceu significativamente mais baixo para todas as amostras, enquanto do hipocótilo foi semelhante ao CN para todas as amostras analisadas. No T3, após seis meses de bioestimulação do LE, o efeito fitotóxico observado nos demais períodos foi significativamente atenuado em todas as amostras analisadas (Figura 4), sendo que o comprimento da radícula e do hipocótilo apresentaram tamanhos semelhantes ou maiores que do grupo controle (Figura 5). Desse modo, este período de bioestimulação foi suficiente para

que todas as amostras avaliadas (LE+S, LE+S+BAG e LE+S+BO) se tornassem inóxias quanto à fitotoxicidade para *L. sativa*.

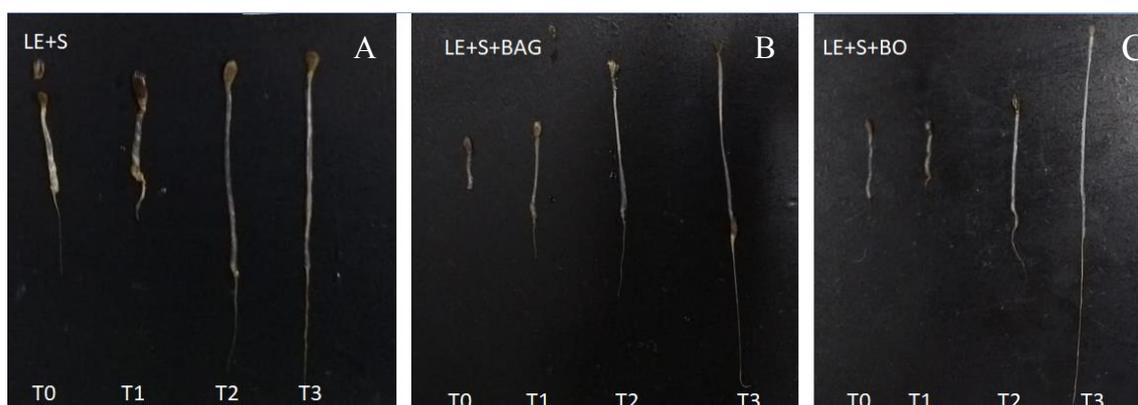
**Tabela 1.** Comprimento (mm) de raízes em *L. sativa* expostas á amostras diferentes contendo LE, no período inicial (T0), após dois meses (T1), após quatro meses (T2) e após seis meses (T3) de bioestimulação.

	T0			T1			T2			T3		
	HIP	RAD	Total	HIP	RAD	Total	HIP	RAD	Total	HIP	RAD	Total
<b>CN</b>	19,9 ± 10,36	27,6 ± 15,55	47,5 ± 23,97	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>CP</b>	0,6 ± 0,38*	0,4 ± 0,24*	1 ± 0,61*	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>S</b>	24,7 ± 9,26*	26 ± 12,18*	50,8 ± 19,71*	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>LE</b>	△	△	△	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
<b>LE+S</b>	10,4 ± 7,64*	6,4 ± 5,6*	16,8 ± 12,5*	7,3 ± 4,15*	2,9 ± 2,43*	10,3 ± 5,9*	16,4 ± 7,83	13 ± 7,60*	29,4 ± 14,49*	27,6 ± 10,44#	21,9 ± 7,99	49,5 ± 18,17
<b>LE+S+ BAG</b>	5,5 ± 4,59*	1,4 ± 1,25*	7 ± 5,49*	14 ± 8,14*	9,8 ± 5,65*	23,8 ± 13,34*	14,4 ± 8,02	8,1 ± 5,4*	22,6 ± 12,82*	30,2 ± 13,3#	24,4 ± 11,7	54,6 ± 24,52
<b>LE+S+ BO</b>	8,8 ± 6,17*	6 ± 4,97*	14,9 ± 10,35*	7,6 ± 4,43*	2,9 ± 2,70*	10,5 ± 6,29*	17,1 ± 7,56	14,2 ± 14,44*	31,4 ± 18,68*	36,1 ± 11,9#	28,8 ± 10	64,9 ± 24,42#

\*diminuição estatisticamente significativa em relação ao CN ( $p < 0,05$ ); #aumento estatisticamente significativo em relação ao CN ( $p < 0,05$ ), N.A.: amostra não avaliada para o período. HIP: Hipocótilo; RAD: Radícula; CN: controle negativo; CP: controle positivo; LE: lodo de esgoto; S: Solo; BA: bagaço de cana-de-açúcar; BO: borra de café.



**Figura 4.** Comprimento de raízes de *L. sativa* expostas a diferentes misturas de LE, antes (T0) e após 2 meses (T1), 4 meses (T2) e 6 meses (T3) de bioestimulação. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Amostra provocou inibição de germinação das sementes.



**Figura 5.** Comprimento de raízes de *L. sativa* em diferentes amostras e tempos de bioestimulação. A. L+S (T0, T1, T2 e T3); B. L+S+BAG (T0, T1, T2 e T3); e C. L+S+BO (T0, T1, T2 e T3).

#### 4.2 Avaliação do potencial fitotóxico das amostras em *A. cepa*

O ensaio de germinação de sementes é um dos testes mais comumente utilizados para a avaliação do potencial tóxico de materiais gerados a partir da compostagem de resíduos sólidos, visando sua reciclagem na agricultura (KAPANEN; ITÄVAARA, 2001), incluindo para a avaliação de lodo de esgoto (ITÄVAARA et al., 2010). No presente estudo, o índice de germinação de sementes de *A. cepa* foi empregado para avaliar a toxicidade inicial (T0) e após bioestimulação das amostras contendo LE, nos períodos indicados acima. No T0, foi possível observar que houve diminuição significativa da germinação para as amostras de LE e LE+S+BO (Tabela 2). Além disso, a amostra LE+S+BO promoveu inibição do crescimento

das radículas, as quais apresentaram um meristema radicular bastante reduzido, impossibilitando a confecção de lâminas para análise da citotoxicidade, aberrações cromossômicas e nucleares e MN no T0 (Figura 6).

Assim como os resultados aqui obtidos, diversos estudos apontam um alto potencial fitotóxico para amostras de lodo bruto sem tratamento. Estudos realizados por Martins, Souza e Souza (2016) com sementes de *A. cepa* submetidas à germinação em um LE de origem anaeróbia e em um biossólido obtido a partir de um LE de origem aeróbia e tratado com óxido de cálcio para redução de organismos patogênicos revelaram que estes LEs promoveram uma completa inibição da germinação das sementes, o que levou a esses autores a classificarem esses materiais como altamente fitotóxico. Mazzeo et al. (2015) também observaram inibição da germinação e do crescimento das radículas em sementes de *A. cepa* expostas ao LE anaeróbio gerado a partir do tratamento de esgoto sanitário. Desse modo, esses resultados indicam que o LE pode exercer um efeito prejudicial sobre o organismo teste empregado e, por isso, seu uso como fertilizante agrícola não é ambientalmente seguro, devendo ser previamente submetido a um tratamento de detoxificação.

No entanto, nos ensaios realizados com as amostras bioestimuladas por dois meses (T1), nenhum resultado fitotóxico foi observado (Tabela 2), inclusive para a amostra LE+S+BO (Figura 7), onde os índices de germinação e o crescimento das radículas foram normalizados, demonstrando que o processo de bioestimulação favoreceu o aumento da germinação das sementes e contribuiu para a eliminação do efeito fitotóxico observado no T0. Resultados semelhantes foram observados por Walter, Martínez e Calab (2006) para sementes de rúculas germinadas em LE antes e após compostagem com casca de pinheiros. Os autores relataram que o tratamento empregado contribuiu para um aumento do índice de germinação para níveis similares ao controle negativo, o qual havia sido completamente inibido no ensaio com o LE não tratado.

Ao analisar as propriedades ecotoxicológicas de 28 amostras de LE provenientes de ETEs de diferentes regiões da Espanha, Roig et al. (2012) notaram um efeito fitotóxico significativo para sementes de *A. cepa*, *Lolium perenne* e *Raphanus sativus* quando expostas à essas amostras. No entanto, a toxicidade diminuiu significativamente para LEs que passaram por processo de compostagem.

Nos ensaios realizados após quatro meses de bioestimulação (T2) a ausência de efeito fitotóxico permaneceu em todas as amostras, demonstrando que não houve regressão na eficiência do tratamento aplicado ao longo do tempo. Além disso, houve aumento significativo nos índices de germinação das amostras de LE+S e LE+S+BO (Tabela 2),

provavelmente devido ao acréscimo de matéria orgânica e nutrientes que favoreceram a germinação e desenvolvimento dos indivíduos de *A. cepa* submetidos ao teste (Figura 8).

O favorecimento da germinação pela presença de matéria orgânica em solos foi também apresentado por outros trabalhos, como Traversa et. al. (2014), onde foi avaliada a influência dos ácidos húmicos, principais componentes orgânicos de solos, na germinação de *Panicum vigatum L.* Neste estudo, todos os três ácidos húmicos avaliados apresentaram resultados favoráveis quanto à estimulação da germinação de indivíduos da espécie *Panicum vigatum L.* Jain et al. (2014) também observaram efeitos favoráveis sob a germinação de diversas espécies de plantas, como *Glicine max*, *Oriza sativa*, *Triticum aestivum*, *Lens culinaris*, *Vigna unguiculata*, *Cicer arietinum*, *Vigna radiata*, *Vigna aconitifolia*, *Pisum sativum* e *Phaseolus vulgaris* a partir do uso de diferentes concentrações de um suplemento orgânico (Panchgavya).

As amostras relativas aos seis meses de bioestimulação (T3) permaneceram ocasionando maior índice de germinação às sementes de *A. cepa* (Figura 9). Neste período, os índices foram estatisticamente significativos para todos os tratamentos (LE+S, LE+S+BO e LE+S+BAG), em relação ao grupo controle (Tabela 2).

Assim, a partir dos resultados obtidos para esse parâmetro, foi possível verificar que a tecnologia empregada para a detoxificação do LE aeróbio estudado foi satisfatória para promover a redução da toxicidade desse resíduo, pois já após 2 meses de bioestimulação (T1) as amostras apresentaram índices de germinação similares ao controle negativo. Como esses resultados permaneceram favoráveis para os períodos de 4 e 6 meses após o tratamento, sugere-se que sua utilização não acarretará em efeito fitotóxico à cultura a ser cultivada.

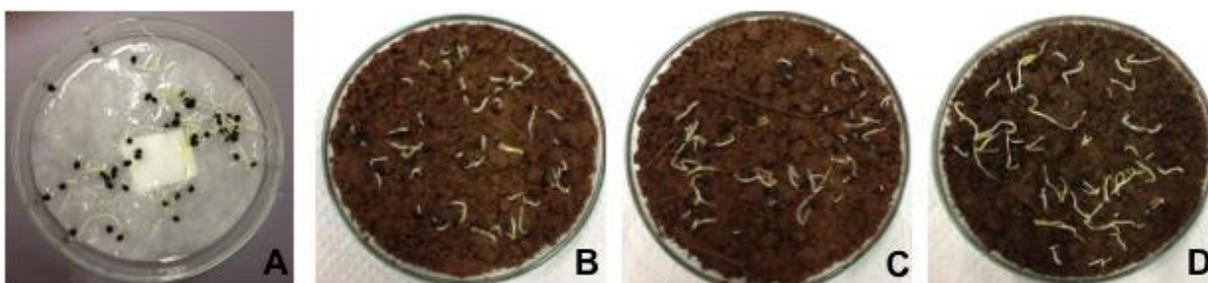
**Tabela 2.** Índice de germinação (%) de sementes de *A. cepa* expostas a diferentes misturas de LE, nos quatro períodos de bioestimulação estudados.

Amostra	CN	CP	SOLO	LE	LE+S+BA	LE+S+BO	LE+S
T0	82,6 ± 3,05	80,6 ± 3,78	91,3 ± 2,30	34,0 ± 9,84 <sup>a</sup>	90,0 ± 0,57	36,0 ± 7,21 <sup>a</sup>	86,6 ± 3,05
T1	74,6 ± 2,12	73 ± 2,12	N.A.	N.A.	66,0 ± 14,84	83,3 ± 2,12	92,0 ± 0,70
T2	58,66 ± 1,52	56 ± 1	N.A.	N.A.	60,6 ± 1,52	84,0 ± 5,29 <sup>b</sup>	80,0 ± 1,73 <sup>b</sup>
T3	37,3 ± 2,08	44 ± 3,78	N.A.	N.A.	78,6 ± 4,51 <sup>b</sup>	76 ± 2,64 <sup>b</sup>	72 ± 7,54 <sup>b</sup>

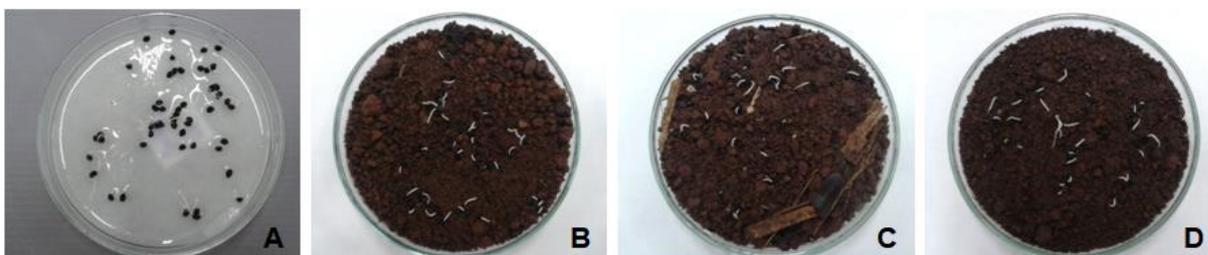
<sup>a</sup>diminuição estatisticamente significativa em relação ao CN; <sup>b</sup>aumento estatisticamente significativo em relação ao CN; (p<0,05); N.A.: amostra não avaliada para o período. CN: controle negativo; CP: controle positivo; LE: lodo de esgoto; S: Solo; BA: bagaço de cana-de-açúcar; BO: borra de café.



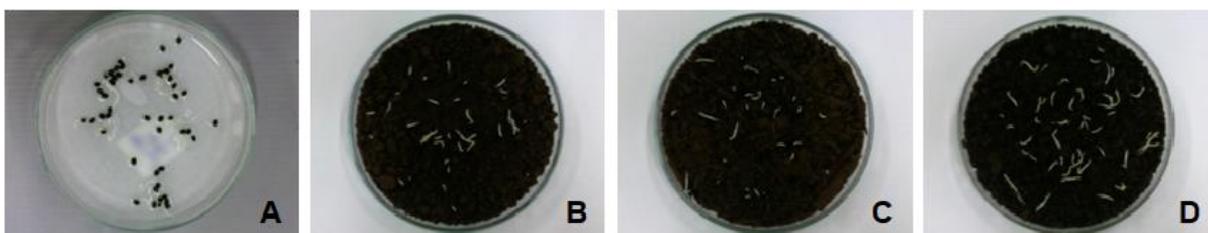
**Figura 6.** Crescimento de radículas de *A. cepa* expostas a diferentes misturas de LE, no período inicial (T0). **A.** Germinação em controle negativo (água ultrapura); **B.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto e solo; **C.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e borra de café; **E.** Germinação na amostra de lodo de esgoto puro.



**Figura 7.** Crescimento de radículas de *A. cepa* expostas a diferentes misturas de LE, após 2 meses (T1) de biostimulação com bagaço de cana-de-açúcar (BAG) e borra de café (BO). **A.** Germinação em controle negativo (água ultrapura); **B.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto e solo; **C.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e borra de café.



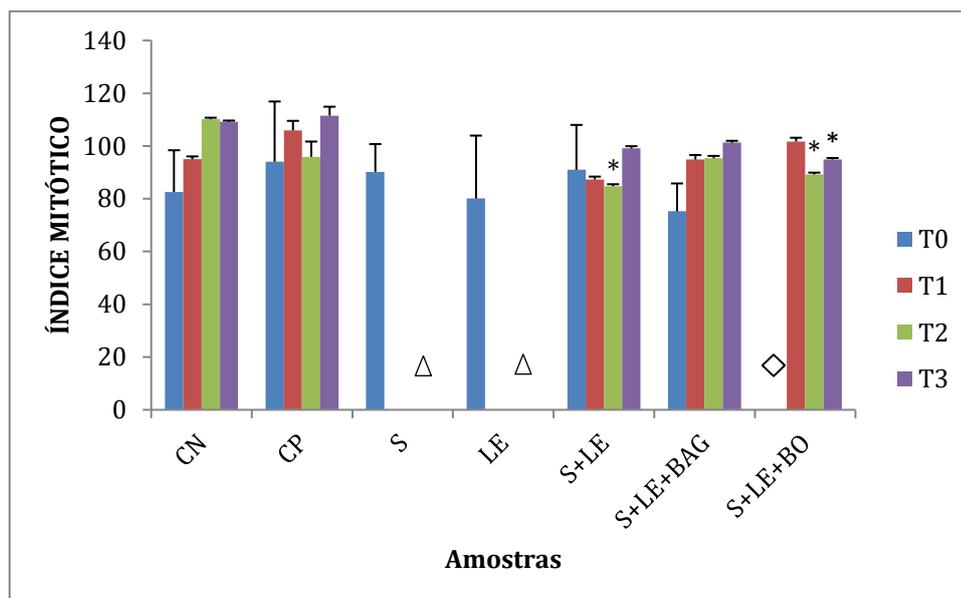
**Figura 8.** Crescimento de radículas de *A. cepa* expostas a diferentes misturas de LE, após 4 meses (T2) de biostimulação com bagaço de cana-de-açúcar (BAG) e borra de café (BO). **A.** Germinação em controle negativo (água ultrapura); **B.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto e solo; **C.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e borra de café.



**Figura 9.** Crescimento de radículas de *A. cepa* expostas a diferentes misturas de LE, após 6 meses (T3) de biostimulação com bagaço de cana-de-açúcar (BAG) e borra de café (BO). **A.** Germinação em controle negativo (água ultrapura); **B.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto e solo; **C.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e bagaço de cana-de-açúcar; **D.** Germinação na mistura contendo lodo de esgoto, solo e borra de café.

## 4.2 Avaliação da citotoxicidade das amostras

Quanto ao efeito citotóxico, no presente estudo, não houve redução significativa do índice mitótico para nenhuma das amostras testadas no período inicial (T0) e após 2 meses (T1) de biorremediação (Figura 10), indicando que o LE estudado não exerceu um efeito prejudicial sobre o índice de divisão celular do organismo teste *A. cepa* nesses períodos. No entanto, após 4 meses (T2), houve uma redução significativa do índice mitótico para as amostras de LE+S e LE+S+BO, o que pode ter ocorrido devido à biodisponibilização de compostos tóxicos após o processo de bioestimulação, ou até mesmo, pela degradação parcial de algumas substâncias orgânicas que podem terem tornado-se tóxicas (SOMMAGGIO, 2013). A biodisponibilidade de cada substância é variável (TELHADO, 2009), por isso, a alteração da composição das amostras pode ter induzido à degradação de diferentes compostos, resultando em efeitos citotóxicos para alguns compostos, como o LE+S e LE+BO, e ausência desses efeitos para outros, como o LE+S+BAG. Após 6 meses (T3), os índices encontrados na amostra de LE+S+BO permaneceram sendo significativos (Figura 10), apontando que para este parâmetro a utilização da borra de café como bioestimulante não foi eficiente. Outros trabalhos citam uma alteração significativa do índice de divisão mitótica induzida por LE na espécie *A. cepa* (MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016; MAZZEO et al., 2015; SOMMAGGIO, 2013; 2016). Sommaggio et al. (2018) avaliaram o extrato aquoso de amostras lodo de esgoto puro e lodo diluído com bagaço de cana, submetidos ao processo de biorremediação e verificaram uma redução significativa no índice mitótico de *A. cepa* após 1 e 3 meses do processo, os índices ainda foram baixos, mas não chegaram a ser significativos após 6 meses de biorremediação. Para este parâmetro, o tratamento utilizando BAG como bioestimulante apresentou-se mais eficiente comparado aos outros, pois para essas amostras não houve nenhum resultado significativo, indicando que quando estimulado com o BAG, o LE não foi citotóxico para a espécie *A. cepa*.



**Figura 10.** Índice mitótico em células meristemáticas de *A. cepa*, induzidas por diferentes misturas de LE, antes (T0), após 2 meses (T1), 4 meses (T2) e 6 meses (T3) de bioestimulação. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).  $\Delta$  Parâmetro não avaliado para T1, T2 e T3;  $\diamond$  Parâmetro não avaliado para essa amostra no T0, devido à inibição da germinação.

### 4.3 Avaliação do potencial genotóxico das amostras

Ao avaliar a genotoxicidade, na qual foram consideradas aberrações cromossômicas e nucleares, foi possível aferir que, no T0, os resultados foram significativos para todas amostras analisadas (Figura 11). Esses resultados apontaram alto potencial de danos celulares causados pelas amostras, à espécie *A. cepa*. Para este período, a amostra LE+S+BO não foi analisada quanto ao parâmetro de genotoxicidade, pois a mesma inibiu a formação de células meristemáticas. Além disso, também foi possível observar que o solo puro (S), o qual foi utilizado como controle ambiental, não induziu alterações genotóxicas significativas, indicando que a utilização deste solo para diluição do LE não contribuiu para os efeitos prejudiciais apresentados pelas amostras testadas (Figura 11). Esses resultados apontaram alto potencial de danos celulares causados pelas amostras, à espécie *A. cepa*. Deste modo, os resultados genotóxicos significativos em LE+S, LE+S+BAG e LE ocorreram certamente devido ao efeito tóxico do LE, pois neste período ainda não havia iniciado de fato o processo de biorremediação.

Dentre as anormalidades nucleares mais frequentes contabilizadas no presente estudo, foi possível observar uma predominância de brotos nucleares (Tabela 3). Sua formação está relacionada com um atraso na migração do cromossomo para o pólo da célula e a reorganização do envoltório nuclear, antes que este esteja totalmente incorporado ao núcleo celular (SERRANO-GARCIA; MONTERO-MONTOYA, 2001). Esses mesmos autores

afirmam ainda que esse atraso pode ser decorrente de eventos clastogênicos como quebras cromossômicas, pontes cromossômicas ou rearranjos cromossômicos, que dificultam a reorganização adequada da cromatina no núcleo. Ainda, segundo Caritá (2010), os brotos formados, eventualmente, desprendem-se do núcleo, originando micronúcleos.

Quanto às aberrações cromossômicas, destacaram-se pontes, quebras e perdas cromossômicas (Tabela 3). De acordo com Leme e Marin-Morales (2009), pontes e quebras cromossômicas indicam efeitos clastogênicos (induzem danos diretos ao DNA), enquanto, perdas caracterizam efeitos aneugênicos (induzem alterações nos componentes celulares, como por exemplo, no fuso mitótico). As pontes cromossômicas (Figura 12 F) são formadas a partir da união das pontas dos cromossomos, cujas extremidades encontram-se “pegajosas” (MARCANO et al., 2004). Ainda, segundo esses mesmos autores, a progressão da divisão em células com pontes cromossômicas leva a uma tensão no local de união dos cromossomos que constituem a ponte, culminando com a formação de uma quebra cromossômica. Já as perdas cromossômicas (Figura 12 D e G) são decorrentes de distúrbios no fuso mitótico, que dificultam a ligação entre o fuso e um ou mais cromossomos, impedindo o correto deslocamento deste(s) cromossomo(s) para o polo, o(s) qual(is) tende(m) a permanecer disperso(s) no citoplasma (SHAMINA; SILKOVA; SERIUKOVA, 2003). Além de perdas, algumas outras alterações de efeito aneugênico, como C-metáfase e aderência cromossômica (Figura 12 C), também foram encontradas, porém, em menor proporção (Tabela 3).

Após dois meses do processo de bioestimulação (T1), foi possível avaliar, além das amostras de LE+S e LE+S+BAG, o potencial genotóxico da amostra de LE+S+BO. Neste tempo, nenhuma das amostras apresentou resultados significativos, indicando que os efeitos genotóxicos sob *A. cepa* foram atenuados após dois meses do processo. As alterações genotóxicas permaneceram não sendo significativas após 4 (T2) e 6 meses (T3) de bioestimulação (Figura 11). Os resultados destes períodos para este parâmetro foram ainda menores do que no período anterior (2 meses), o que indica que a bioestimulação é um processo eficiente para detoxificação do LE utilizado.

A utilização de cascas vegetais e turfa para a compostagem de LE também levou à uma redução dos efeitos genotóxicos induzidos por este resíduo, avaliados pelo teste de Vitotox™ (KAPANEN et al., 2013). No entanto, apesar dessa redução significativa, esses autores continuaram a observar valores significativos de genotoxicidade, mesmo após 124 dias de compostagem. Isso indica que o processo de tratamento empregado no presente estudo, utilizando bagaço de cana, foi mais eficiente, pois, em apenas 60 dias, eliminou o efeito tóxico, citotóxico e genotóxico do LE. Uma redução significativa de alterações

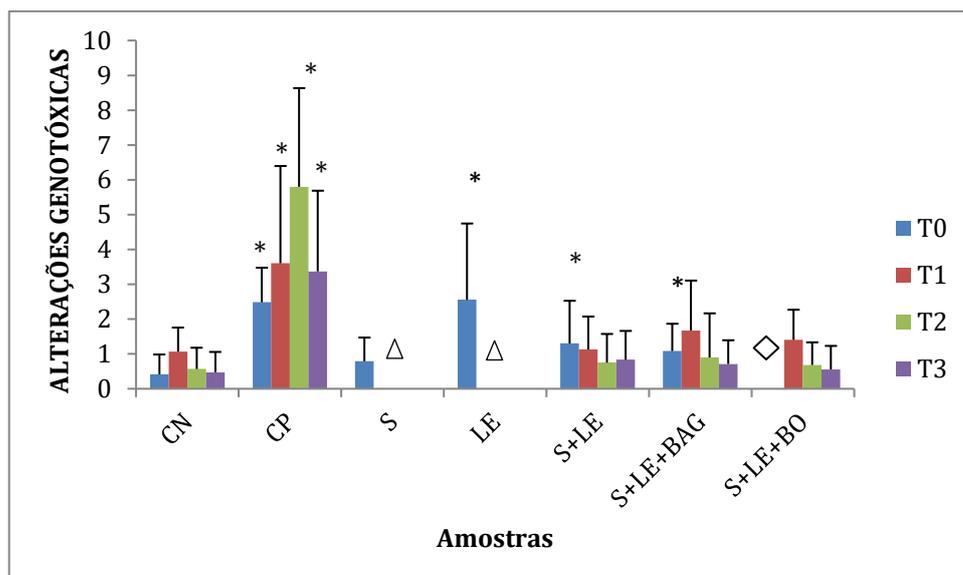
genotóxicas em *A. cepa* foi encontrada por Christofolletti et al. (2013) em biossólidos obtidos de uma estação de tratamento de esgoto do estado de São Paulo, essas amostras foram analisadas inicialmente por meio de testes com *A. cepa*, no qual apresentaram potencial genotóxico. Após 30 dias sob bioprocessamento com a utilização de diplópodos da espécie *Rhinocricus padbergi* este potencial foi significativamente reduzido.

Nossos resultados corroboram os observados por Sommaggio (2016), nos quais a diluição de amostras de LE de origem sanitária com solo e adição de casca de arroz como agente bioestimulante levou à uma inibição significativa dos danos genotóxicos em células meristemáticas de *A. cepa*, evidenciando que o processo de bioestimulação se mostrou bastante eficiente para a redução da genotoxicidade de LEs. A adição de BAG ao LE, contribui para o aumento bacteriano (Sommaggio et al. 2018), este pode ser relacionado com a efetividade do processo de biorremediação com as amostras analisadas neste estudo, embora aqui, a taxa de microrganismos não tenha sido avaliada.

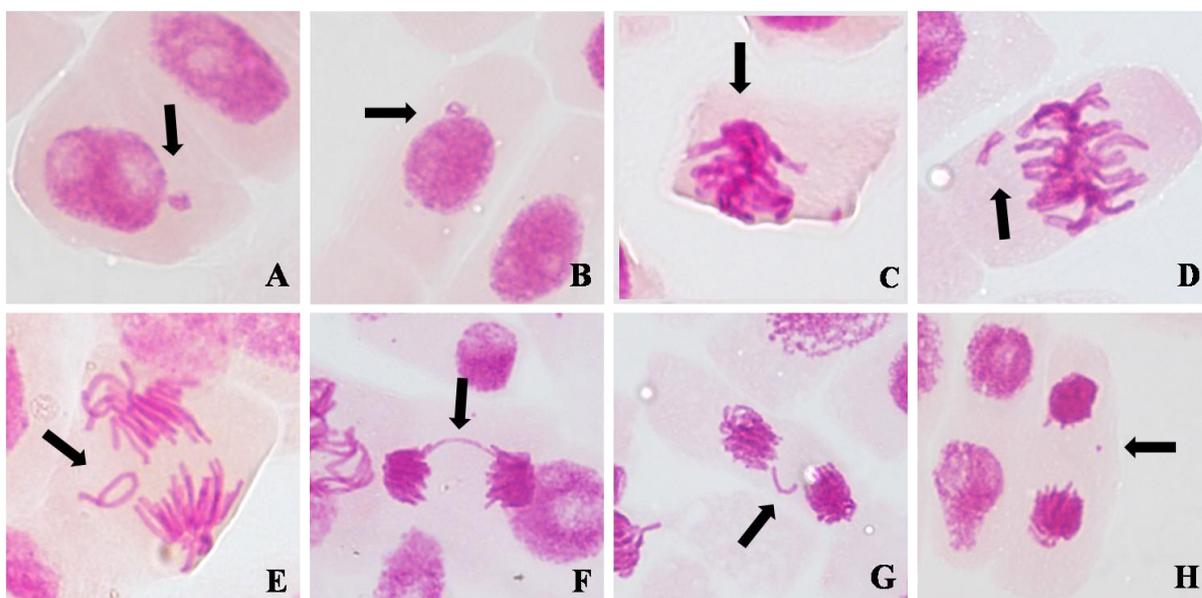
**Tabela 3.** Frequência de alterações nucleares e aberrações cromossômicas encontradas no período inicial (T0), após dois meses (T1), quatro meses (T2) e seis meses (T3) de biorremediação.

Alterações	Tempo	CN	CP	S	LE	S+LE	S+LE+BAG	S+LE+BO
<b>QC</b>	T0	0,121 ± 0,31	0,342 ± 0,70	0,057 ± 0,70	0,237 ± 0,51	0,330 ± 0,68	0,174 ± 0,36	◇
	T1	0,171 ± 0,35	0,733 ± 1,39	+	+	0,122 ± 0,32	0,127 ± 0,49	0,551 ± 0,77
	T2	0	0,753 ± 1,24*	+	+	0	0	0
	T3	0	0,643 ± 1,3	+	+	0,619 ± 0,23	0	0,057 ± 0,23
<b>BN</b>	T0	0,121 ± 0,31	0,992 ± 1,01*	0,240 ± 0,41	1,272 ± 1,98*	0,457 ± 0,76	0,119 ± 0,31	◇
	T1	0,304 ± 0,66	1,526 ± 1,49*	+	+	0,571 ± 0,69	0,476 ± 1,41	0,372 ± 0,75
	T2	0,195 ± 0,40	4,317 ± 2,77*	+	+	0,505 ± 0,71	0,574 ± 0,88	0,432 ± 0,57
	T3	0,295 ± 0,55	1,89 ± 1,9*	+	+	0,591 ± 0,83	0,615 ± 0,62	0,469 ± 0,58
<b>AC</b>	T0	0	0	0,128 ± 0,34	0,056 ± 0,21	0	0,053 ± 0,20	◇
	T1	0	0,243 ± 0,41	+	+	0,121 ± 0,32	0,350 ± 0,44	0
	T2	0,119 ± 0,31	0,130 ± 0,34	+	+	0	0	0
	T3	0	0	+	+	0	0	0
<b>PoC</b>	T0	0,058 ± 0,22	0,473 ± 0,58	0,111 ± 0,29	0,301 ± 0,44	0,109 ± 0,28	0,359 ± 0,564	◇
	T1	0,160 ± 0,44	0,487 ± 0,84	+	+	0,057 ± 0,22	0,121 ± 0,32	0,056 ± 0,22
	T2	0	0,428 ± 0,56	+	+	0,060 ± 0,23	0,064 ± 0,24	0,058 ± 0,22
	T3	0	0,379 ± 0,48	+	+	0,057 ± 0,22	0	0
<b>PeC</b>	T0	0,112 ± 0,29	0,214 ± 0,48	0,252 ± 0,43	0,169 ± 0,65	0,220 ± 0,38	0,126 ± 0,33	◇
	T1	0,314 ± 0,46	0,306 ± 0,44	+	+	0,127 ± 0,34	0,056 ± 0,22	0,246 ± 0,42
	T2	0	0,869 ± 0,64*	+	+	0	0,064 ± 0,24	0,131 ± 0,34
	T3	0,179 ± 0,37	0,191 ± 0,39	+	+	0,061 ± 0,23	0,060 ± 0,24	0
<b>C-M</b>	T0	0	0,061 ± 0,24	0	0,053 ± 0,21	0	0	◇
	T1	0	0,0706 ± 0,27	+	+	0	0,243 ± 0,55	0,059 ± 0,22
	T2	0	0,053 ± 0,20	+	+	0	0,128 ± 0,33	0,123 ± 0,32
	T3	0	0,095 ± 0,302	+	+	0	0	0

\*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ); + Parâmetro não avaliado para T1; ◇ Parâmetro não avaliado para essa amostra no T0, devido à inibição da germinação; **QC**: quebra cromossômica; **BN**: broto nuclear; **AC**: aderência cromossômica; **PoC**: ponte cromossômica; **PeC**: perda cromossômica; **C-M**: C-metáfase.



**Figura 11.** Presença de alterações genotóxicas em células meristemáticas de *A. cepa*, induzidas por diferentes misturas de LE, antes (T0) e após 2 meses (T1), 4 meses (T2) e 6 meses (T3) de bioestimulação. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ); Parâmetro não avaliado para T1, T2 e T3; △ Parâmetro não avaliado para essa amostra no T0, devido à inibição da germinação.

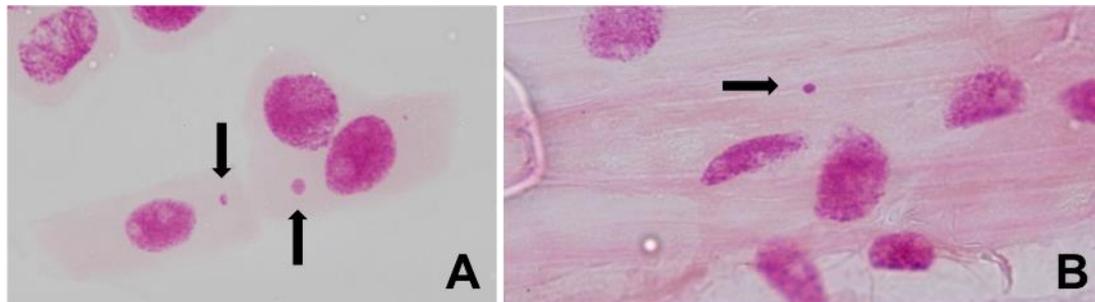


**Figura 12.** Anormalidades nucleares e aberrações cromossômicas mais visualizadas durante as análises com o organismo teste *A. cepa*. **A.** Interfase com broto nuclear; **B.** Prófase com broto nuclear; **C.** Metáfase aderência cromossômica; **D.** Metáfase com perda cromossômica; **E.** Anáfase com perda cromossômica; **F.** Telófase com ponte cromossômica. **G.** Telófase com perda cromossômica; **H.** Telófase com quebra cromossômica.

#### 4.4 Avaliação do potencial mutagênico das amostras

Para o parâmetro de mutagenicidade, foi avaliada a presença de micronúcleos em células meristemáticas e em células F1.

Os micronúcleos ocorrem em consequência de danos celulares não reparados, ou reparados de forma errada nas células parentais, observados como uma estrutura similar ao núcleo principal, porém em tamanho reduzido (BONOMO, 2014). Deste modo, o teste do micronúcleo é capaz demonstrar a ação do poluente analisado, pois seu tamanho indica se sua formação ocorreu em consequência de efeitos clastogênicos (micronúcleo de tamanho pequeno originado a partir de uma quebra cromossômica), ou aneugênicos (micronúcleo maior formado a partir de uma perda cromossômica) (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Além disso, micronúcleos podem ser também produtos da eliminação do DNA excedente do núcleo principal em casos de poliploidização, em uma tentativa de retomar as condições normais de ploidia da célula (FERNANDES; MAZZEO; MARIN-MORALES, 2007). Neste trabalho, devido às alterações cromossômicas mais frequentes observadas (quebras, pontes e perdas cromossômicas) (Figura 12) e aos tamanhos variados de micronúcleos encontrados (Figura 13), conclui-se que os contaminantes presentes no LE não apresentam um modo de ação específico sobre o material genético de *A. cepa*, acarretando em efeitos tanto de origem clastogênica, quanto de origem aneugênica.

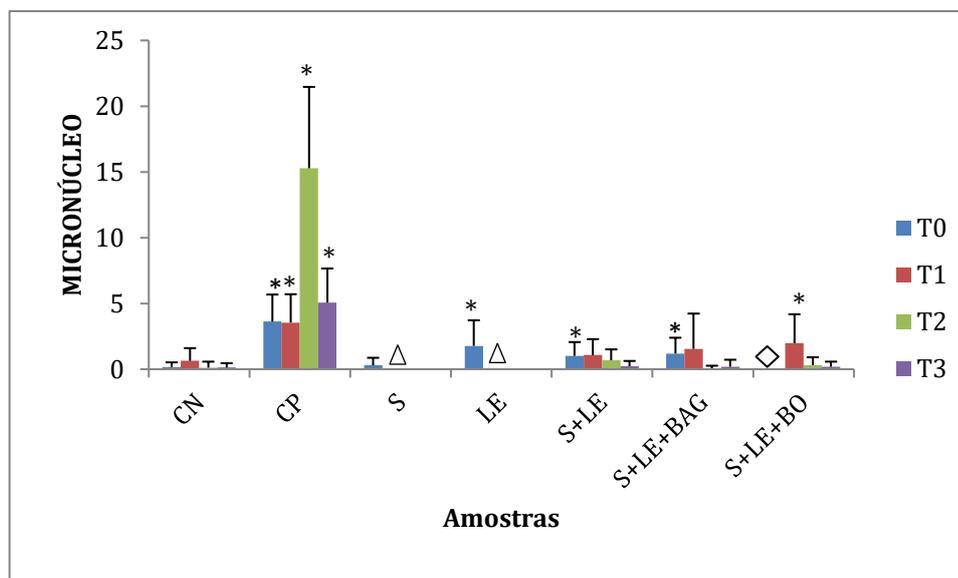


**Figura 13.** Micronúcleos encontrados em células meristemáticas e F1 de *A. cepa*. **A.** Células interfásicas do meristema radicular portando micronúcleos de tamanhos diferentes; **B.** Célula F1 com micronúcleo.

Nas células meristemáticas, para o T0, todas as amostras analisadas apresentaram resultados significativos para mutagenicidade (Figura 14), assim como no parâmetro de genotoxicidade, o que novamente pode ser atribuído à constituição tóxica do LE, pois este apresentou os maiores resultados, comparados às amostras diluídas. Outros autores também constataram a potencialidade de LEs de origem sanitária em induzir um aumento significativo de micronúcleos (MAZIVIERO, 2011; MAZZEO et al., 2015; MARTINS; SOUZA; SOUZA, 2016; MAZZEO et al., 2016a; SOMMAGGIO, 2016). Contudo, em T1, houve redução significativa da mutagenicidade em LE+S e LE+S+BAG, com exceção dos resultados encontrados para LE+S+BO (Figura 14). Tais resultados indicam que, para este parâmetro, o

BAG mostrou-se um material mais eficiente, devendo as misturas com BO serem submetidas a um período maior de bioestimulação. Em T2, todos os tratamentos tiveram seus resultados reduzidos para este parâmetro (Figura 14), incluindo LE+S+BO, que neste período não apresentou resultados significativos, evidenciando que é necessário um período mínimo de 4 meses de bioestimulação para a detoxificação do LE utilizando a borra de café como agente bioestimulante.

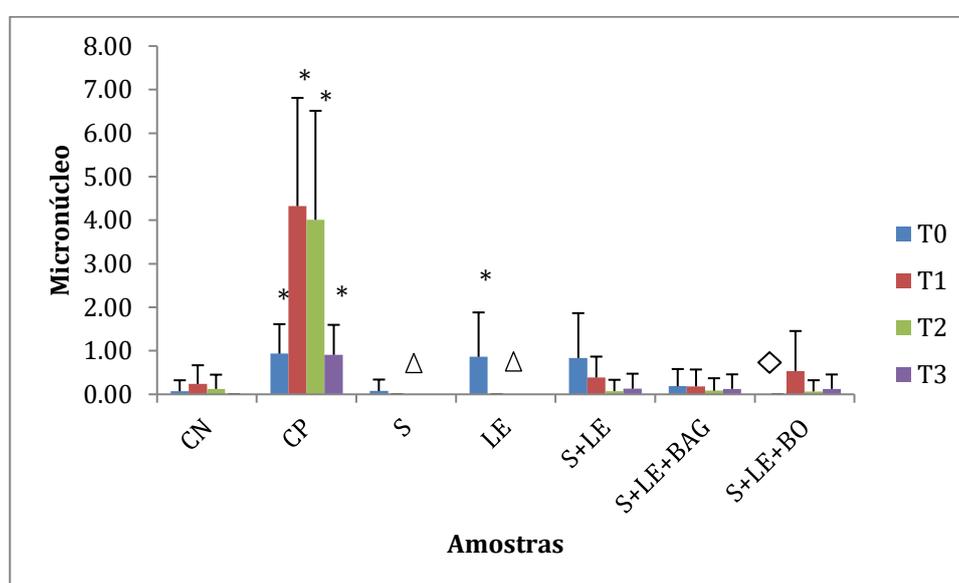
Os resultados obtidos após 6 meses de bioestimulação (T3), assim como no período anterior, apresentam uma ausência de mutagenicidade para o organismo teste empregado neste estudo, comprovando que o processo de bioestimulação utilizado foi capaz de remover os contaminantes tóxicos inicialmente presentes, sem levar à formação de metabólitos intermediários tóxicos. Resultados semelhantes foram descritos por Mazzeo et al. (2016a) para amostras de LE em diferentes diluições com solo submetidas, ao processo de atenuação natural monitorada. Os autores verificaram que o potencial mutagênico de todas as amostras apresentou redução significativa após 6 e 12 meses do processo de biorremediação empregado no estudo.



**Figura 14.** Presença de micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*, induzidos por diferentes misturas de LE, antes (T0), após 2 meses (T1), 4 meses (T2) e 6 meses (T3) de bioestimulação. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ );  $\Delta$  Parâmetro não avaliado para T1, T2 e T3;  $\diamond$  Parâmetro não avaliado para essa amostra no T0, devido à inibição da germinação.

Para a análise de mutagenicidade realizada com as células F1, foram observados resultados significativos apenas na amostra de LE puro (Figura 15), em T0, demonstrando que os danos causados pelo LE nas células meristemáticas não foram corrigidos na primeira geração, sendo transferidos para as células filhas, fixando-se no organismo. Resultados

semelhantes foram encontrados por Mazzeo et al. (2015), onde os autores verificaram que amostras de LE proveniente de uma ETE que tratava esgoto exclusivamente sanitário também foi capaz de induzir danos mutagênicos significativos em células F1 de *A. cepa*. Com isso pode-se aferir que, o LE puro foi mais tóxico do que quando diluído com outros compostos, como solo, bagaço de cana-de-açúcar e borra de café, pois nas outras amostras as células foram capazes de reparar os danos encontrados nas células meristemáticas, ao ponto de não serem significativos nas células F1. Nos outros períodos, T1, T2 e T3, os resultados permaneceram não sendo significativos para todas as amostras, indicando mais uma vez que quando diluído e bioestimulado, a toxicidade do LE puro é significativamente reduzida.



**Figura 15.** Presença de micronúcleo em células F1 de *A. cepa*, induzidos por diferentes misturas de LE, antes (T0), após 2 meses (T1), após 4 meses (T2) e após 6 meses (T3) de bioestimulação. \*Estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ );  $\Delta$  Parâmetro não avaliado para T1, T2 e T3;  $\diamond$  Parâmetro não avaliado para essa amostra no T0, devido à inibição da germinação.

#### 4.5 Discussões Gerais

Frente aos resultados expostos anteriormente, é possível afirmar que o LE bruto é um composto altamente tóxico, não sendo viável sua aplicação na agricultura sem que este seja previamente submetido a algum processo de detoxificação. Resultados semelhantes foram descritos na literatura por Roig et al. (2012), os quais, após estudarem diferentes tipos de LE, observaram que a realização de tratamento prévio deste resíduo, tem influência direta em algumas de suas propriedades, como por exemplo, sua toxicidade. Em sua pesquisa, os LEs que não foram pré-tratados apresentaram os maiores índices de toxicidade para ensaios com vegetais e bactérias, enquanto que o LE submetido à compostagem, foi considerado 2 a 3

vezes menos tóxico. Ramírez et al. (2008) também concluíram que a realização de processos de detoxificação como a compostagem reduziu a fitotoxicidade do LE para os vegetais *Brassica rapa*, *Lolium perenne* e *Trifolium pratense*. Assim como, Mena et al. (2003), verificaram que o processo de compostagem de LE, juntamente com restos de madeira, resultou em um índice adequado de germinação de sementes de *Hordeum vulgare* e *Lepidium sativa*.

Pelo fato do LE ser considerado uma matriz complexa (OLESZCZUK, 2008), constituída por diversos contaminantes, seu processo de detoxificação representa um desafio bastante complexo. Contudo, o processo de bioestimulação proposto neste trabalho demonstrou-se bastante eficaz na atenuação da toxicidade do LE, principalmente quando se leva em conta seu baixo custo e seu tempo relativamente curto.

Os resultados obtidos demonstraram, nas análises com *L. sativa*, que os dois agentes bioestimulantes propostos foram eficientes para atenuar os efeitos fitotóxicos do LE utilizado. Além disso, a amostra bioestimulada com BO levou a um maior crescimento das raízes, apresentando um comprimento significativamente maior que o controle negativo. Estes resultados podem ser explicados pelo alto índice de compostos orgânicos que compõem a borra de café (CAMPOS-VEGA et al., 2015), os quais favoreceram o crescimento das raízes de *L. sativa*. No entanto, em análises mais refinadas, feitas por meio de bioensaio com *A. cepa*, os resultados obtidos com a borra de café como agente bioestimulante não foram satisfatórios, já que foi observado um efeito citotóxico significativo mesmo após 6 meses do processo de bioestimulação. Sendo assim, para o período de biorremediação aplicado no estudo, a borra de café não apresentou resultados efetivos na detoxificação do LE estudado. Mazzeo et al. (2015) realizaram a atenuação natural do LE bruto e solubilizado em várias proporções, observando que o decaimento da toxicidade do LE ocorreu após 6 meses, sendo mais efetivo após 12 meses de processo. Desse modo, pode ser que para este agente seja necessário um período maior do processo para promover a detoxificação completa do LE. Portanto, a bioestimulação do LE com bagaço de cana e solo foi mais adequada para a atenuação da toxicidade do LE, sendo eficaz após um período de seis meses. Esta afirmação se justifica no fato de que tanto os resultados obtidos pelo ensaio com *L. sativa* como pelo bioensaio com *A. cepa* indicaram ausência de efeito tóxico para as amostras bioestimuladas contendo o bagaço. Os bons resultados para bagaço de cana-de-açúcar devem-se, possivelmente, à sua capacidade de melhorar a porosidade do solo e constituir uma ótima fonte de carbono, devido ao seu alto teor de carboidratos (PANDEY et al. 2000). Segundo Zhang e Sun (2016), o bagaço de cana-de-açúcar possui capacidade de manter o nitrogênio no

solo, que é fundamental para que os microrganismos degradem compostos orgânicos. Sommaggio et al. (2018) afirmaram ainda que a adição desse material ao LE contribuiu para o aumento bacteriano, o que pode estar relacionado com a efetividade do processo de biorremediação do presente estudo, embora, aqui, a taxa de microrganismos não tenha sido avaliada. Anacleto; Roberto; Marin-Morales (2017) também destacaram o bagaço de cana-de-açúcar como sendo um agente bioestimulante eficiente para ser empregado em ensaios de detoxificação de resíduos sólidos. Adicionalmente, Hussain e Qazi (2016) obtiveram bons resultados utilizando bagaço de cana-de-açúcar como substrato de crescimento e fonte de suplementação de carbono no tratamento de águas contaminadas.

Outro ponto relevante a ser destacado é que, sempre que possível, a efetividade do processo de detoxificação de LE deve ser baseado nos resultados obtidos para mais de um bioensaio e, preferencialmente, com um número maior de endpoints. Como apresentado neste estudo, espécies diferentes podem responder de modo distinto a uma mesma amostra, assim como evidencia uma variação da sensibilidade de cada um dos endpoints avaliados. Outros autores também atestam que a associação de mais de um organismo teste para analisar efeitos tóxicos do LE fornece respostas mais conclusivas e precisas para esta avaliação (MAZZEO et al., 2016a; 2016b).

## ***5 CONCLUSÕES***

De acordo com os resultados obtidos, pode-se concluir que o LE aeróbio puro, proveniente da ETE Praia Azul, da cidade de Americana/SP, apresentou alta toxicidade em análise por meio dos bioensaios com *L. sativa* e *A. cepa*. Ambos organismos teste, mostraram-se bastante sensível para detectar os efeitos fitotóxicos do LE, antes e após processo de bioestimulação, sendo muito efetivos para esse propósito.

A toxicidade do LE estudado foi completamente eliminada ao realizar sua diluição com solo e bioestimulação com bagaço de cana-de-açúcar. A tecnologia proposta para a detoxificação deste LE mostrou-se eficiente quando o bagaço de cana-de-açúcar foi utilizado como agente bioestimulante, pois para este material foi necessário um tempo de seis meses de bioestimulação até que os efeitos fitotóxicos e ecotoxicogenéticos fossem atenuados. Assim, pelo baixo custo do processo na detoxificação do LE, essa tecnologia caracteriza-se como promissora para ser aplicada em larga escala pelas ETES.

O outro material bioestimulante utilizado no trabalho, a borra de café, não obteve resultados efetivos para o período estudado, pois após seis meses de bioestimulação as amostras continuaram apresentando efeitos citotóxicos ao organismo *A. cepa*.

Desse modo, o LE aqui estudado apresenta um elevado potencial de se transformar em um aditivo de solos agrícolas, desde que este passe por um processo de detoxificação como o desenvolvido neste estudo.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10006:**

**Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos.** Rio de Janeiro, 2004.

ADAMCOVÁ, D.; VAVERKOVÁ, M.D.; BŘOUŠKOVÁ, E. The toxicity of two types of sewage sludge from wastewater treatment plant for plants. **Journal of Ecological Engineering**, v. 17, n.2, 2016.

ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONCALVES, A.P.; FERNANDES, R.M.; CUNHA-QUEDA, A.C.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environment International**, v.33, p.505–513, 2007.

ANDREOLI, C.V. **Uso e manejo do lodo de esgoto na agricultura e sua influência em características ambientais no agrossistema.** 1999. Tese (Doutorado) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1999. 278p.

ANACLETO, L.R.; ROBERTO, M.M.; MARIN-MORALES, M.A. Toxicological effects of the waste of the sugarcane industry, used as agricultural fertilizer, on the test system *Allium cepa*. **Chemosphere**, v.173, p.31-42, 2017.

ARAÚJO, S.S.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A.; BRASILEIRO-VIDAL, A.C.; BENKO-ISEPPON, A.M. In. DUARTE, M.C. T; RAI, M. (ed). **Therapeutic Medicinal Plants: From Lab to the Market.** CRC Press, 2015.130 -153p.

BAMFORTH, S.M; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** v.80, p.723-736, 2005.

BETTIOL, W.; CAMARGO, O. A. **Impacto ambiental do uso agrícola do lodo de esgoto.** Jaguariúna, SP: EMBRAPA, 2000. 312p.

BONOMO, M.M.; **Efeitos citogenéticos, bioquímicos, morfológicos e anatômicos da aplicação de lodo de esgoto higienizado em caricapapaya I.** 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Vegetal, Biologia Vegetal, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 375, de 29 de agosto de 2006.** Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. Brasília, 2006.

CAMPOS-VEGA, R.; LOARCA-PINA, G.; VERGARA-CASTAÑEDA, H.A.; OOMAH, B.D. Spent coffee grounds: A review on current research and future prospects. **Trends in Food Science & Technology**, v.45, n.1, pp.24-36, 2015.

CARITÁ, Renata. **Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico de amostras de águas de recursos hídricos que recebem efluentes urbanos e industriais do pólo ceramista da cidade de Santa Gertrudes – SP.** 2010. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2010.

CESAR, R.G.; EGLER, S.G.; POLIVANOV, H.; CASTILHOS, Z.C.; RODRIGUES, A.P.C.; ARAÚJO, P.A. Biodisponibilidade de mercúrio, zinco e cobre em distintas frações granulométricas de solo contaminado utilizando oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. **Anuário do Instituto de Geociências**, v.31, n.2, p.33-41, 2008.

CETESB (São Paulo). **Qualidade das águas interiores no estado de São Paulo 2016**. São Paulo : CETESB, p. 19, 2017

CHENON, P.; GAUTHIER, L.; LOUBIERES, P.; SEVERAC, A.; DELPOUX, M. Evaluation of the genotoxic and teratogenic potential of a municipal sludge and sludge-amended soil using the amphibian *Xenopus laevis* and the tobacco: *Nicotiana tabacum* L. var. *xanthi* Dulieu. **The Science of the Total Environment**, v.301, p.139-150, 2003.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; PEDRO-ESCHER, J.; FONTANETTI, C.S. Assessment of the genotoxicity of two agricultural residues after processing by diplopods using the *Allium cepa* assay. **Water, Air, & Soil Pollution**, v.224, n. 4, 2013.

ÇIFCI, D.İ.; KINACI, C.; ARIKAN, O.A. Occurrence of phthalates in sewage sludge from three wastewater treatment plants in Istanbul, Turkey. **Clean – Soil, Air, Water**, v.41, p.851-855, 2013.

CLARKE, B.O.; SMITH, S.R. Review of ‘emerging’ organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. **Environ Int**, v.37, p.226-247, 2011.

CORDI, L.; ASSALIN, M.R.; DIEZ, M.C.; DURAN, N. Montagem, partida e operação de um sistema de lodos ativados para o tratamento de efluentes: parâmetros físico-químicos e biológicos. **Engenharia Ambiental, Espírito Santo do Pinhal**, v.5, n.1, p.97-115, 2008.

CORRÊA, R.S.; FONSECA, Y.M.F.; CORRÊA, A.S. Produção de biossólido agrícola por meio da compostagem e vermicompostagem de lodo de esgoto. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.11, p.420–426, 2007.

CRUZ, R.; MORAIS, S.; MENDES, E.; PEREIRA, J.A.; BAPTISTA, P.; CASAL, S. Improvement of vegetables elemental quality by espresso coffee residues. **Food Chem**, v.148, p.294- 299, 2014.

ENGWALL, M.; HJELM, K. Uptake of dioxin-like compounds from sewage sludge into various plant species – assessment of levels using a sensitive bioassay. **Chemosphere**, v.40, p.1189-1195, 2000

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

FUENTES, A.; LLORENS, M.; SAEZ, J.; AGUILAR, M.I.; PÉREZ-MARÍN, A.B.; ORTUÑO, J.F.; MESEGUER, V.F. 2006. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. **Environmental pollution**, v. 143, n. 2, p.355-360, 2006

GIANICO, A.; BRAGUGLIA, C.M.; MASCOLO, G.; MININNI, G. Partitioning of nutrients and micropollutants along the sludge treatment line: a case study. **Environ Sci Pollut Res**,

v.20, p.6256-6265, 2013.

GIUDICE, B.D.; YOUNG, T.M. Mobilization of endocrine-disrupting chemicals and estrogenic activity in simulate drainfall run off from land-applied biosolids. **Environ Toxicol Chem**, v.30, p.2220-2228, 2011.

GRANT, W.F. Chromosome aberration assays in *Allium*: A report of the U.S. environmental protection agency gene-tox program. **Mutation Research**, v.99, p.273-291, 1982.

GRAY, N.F. Sludge treatment and disposal. In: GRAY, N.F. **Water Technology**. Na Introduction for Environmental Scientists and Engineers (Third Edition). Elsevier, 2010. p.645-685.

HARRISON, E.Z.; OAKES, S.R.; HYSELL, M.; HAY, A. Organic chemicals in sewage sludges. **Sci Total Environ**, v.367, p.481-497, 2006.

HOLMSTRUP, M.; KROGH, P.H.; LOKKE, H.; WOLF, W. de; MARSHALL, S.; FOX, K.; WOLF, W. Effect and risk assessment of linear alkylbenzenesulfonates in agricultural soil. 4. The influence of salt speciation, soil type, and sewage sludge on toxicity using the collembolan *Folsomia fimetaria* and the earthworm *Aporrectodea caliginosa* as test organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.20, p.1680-1689, 2001.

HUSSAIN, A.; QAZI, J.I. Application of sugarcane bagasse for passive anaerobic biotreatment of sulphate rich wastewaters. **Applied Water Science**, v.6, n.2, p.205-211, 2016.

ITÄVAARA, M.; VIKMAN, M.; LIISA, M.; VUORINEN, A. Maturity Tests for Composts — Verification Of a Test Scheme for Assessing Maturity. **Compost Science & Utilization**, v.18, n. 3, p.174 – 183, 2010.

JAIN, P.; SHARMA, R.C.; BHATTACHARYYA. P.; BANIK; P. Effect of new organic supplement (Panchgavya) on seed germination and soil quality. **Environmental monitoring and assessment**, v. 186, n. 4, p. 1999 – 2011, 2014.

KAPANEN, M.; COLLAN, J. BEULE, A.; SEPPÄLÄ, K.; TENHUNEN, M. Commissioning of MRI-only based treatment planning procedure for external beam radiotherapy of prostate. **Magnetic resonance in medicine**, v. 70, n.1, p.127-135, 2013.

KASONGO, R.K.; VERDOODT, A.; KANYANKAGOTE, P.; BAERT, G.; VAN RANST, E. Coffee waste as an alternative fertilizer with soil improving properties for sandy soils in humid tropical environments. **Soil Use Manage**, v. 27, p.94-102, 2011.

KAPANEN, A.; ITÄVAARA, M. Ecotoxicity tests for compost applications. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 49, p. 1-16, 2001.

KURÁS, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWINSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; GULEWICZ, K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* Test induced by barck water extract of *Uncariatomentosa* (Willd.) DC. **Chemosphere**, v.107, p.211-221, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.682, p.71-81, 2009.

LOPES, J.C.; RIBEIRO, L.G.; ARAÚJO, M.G.; BERALDO, M.R.B.S. Produção de alface com doses de lodo de esgoto. **Horticultura Brasileira**, v.23, p.143-147, 2005.

MA, T.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants. **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, v.334, n.2, p.185-195, 1995.

MARCANO, L.; CARRUYO, A.; DEL-CAMPO, A.; MONTIEL, X. Cytotoxicity and mode of action of maleic hydrazide in root tips of *Allium cepa* L. **Environ Res**, v.94, n.2, p.221–226, 2004.

MARTINS, M.N.C.; SOUZA, V.V.; SOUZA, T.S.; Cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of sewage sludge on *Allium cepa*. **Chemosphere**, v.148, p.481-486, 2016.

MATSUMOTO, S.T.; MANTOVANI, M.S.; MALAGUTTI, M.I. A.; DIAS, A.L.; FONSECA, I.C.; MARIN-MORALES, M.A. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n.1, p.148-158, 2006.

MAZZEO, D.E.C. **Avaliação da viabilidade do lodo de esgoto como condicionante de solos agrícolas, após processo de atenuação natural, por meio de diferentes bioensaios**. 2013. 221 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular), IB, UNESP, 2013.

MAZZEO, D.E.C.; CASADO, M.; PIÑA, B.; MARIN-MORALES, M.A. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. **Science of the Total Environment**, 2016b.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; LEVY, C.E.; FONTANETTI, C.S.; MARIN-MORALES, M.A. Monitoring the natural attenuation of a sewage sludge toxicity using the *Allium cepa* test. **Ecol Indic**, v.56, p.60–69, 2015.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M. A. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v.85, p.13-18, 2011.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, n.20, p.4334-4340, 2010.

MAZZEO, D.E.C.; FERNANDES, T.C.C.; MARIN-MORALES, M.A. Attesting the efficiency of monitored natural attenuation in the detoxification of sewage sludge by means of genotoxic and mutagenic bioassays. **Chemosphere**, v.163, p. 508–515, 2016a.

MAZZEO, D. E. C.; VENTURA-CAMARGO, B. C.; SOMMAGGIO, L. R. D.; MARIN-MORALES, M. A. Endpoints and bioassays to assess bioremediation efficiency of contaminated soils. In: Jesús B. Velázquez-Fernández (Ed.), **Bioremediation: Processes, Challenges and Future Prospects**. New York: Nova Science Publishers, p.243- 268, 2014.

MAZIVIERO, GT. **Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de lodo de esgoto por meio dos sistemas–teste *allium cepa* e *tradescantia pallida***. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). IB, UNESP, 2011.

MCGEEHAN, S.L. Impact of waste materials and organic amendments on soil properties and vegetative performance. **Appl Environ Soil Sci**, p.1-11, 2012.

MELO, W.J.; MARQUES, M.O.; MELO, V.P. O uso agrícola do biossólido e as propriedades do solo. In: TSUTIJA, M.T.; COMPARINI, J.B.; SOBRINHO, P.A. et al., (Eds.). **Biossólidos na agricultura**, p. 289–363, Sao Paulo, Brazil, 2001.

MENA, E.; GARRIDO, A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Bioremediation of sewage sludge by composting. **Communications in soil science and plant analysi**, v. 34, n.7-8, p.957-971, 2003.

MIRANDA, R.C.M.; GOMES, E.B.; PEREIRA JR, N.; MARIN-MORALES, M.A.;MACHADO, K.M.G.; GUSMAO, N.B. Biotreatment of textile effluent in static bioreactor by *Curvularia lunata* URM 6179 and *Phanerochaete chrysosporium* URM 6181. **Bioresource Technology**, v.142, p.361–367, 2013.

MURTHY, P.S.; NAIDU, M.M. Sustainable management of coffee industry by-products and value addition – A review. **Resour Conserv Recy**, v.66, p.45-58, 2012.

OLESZCZUK, P. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PHAs and heavy metals. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.69, p.496-505, 2008.

PALMIERI, M.J.; LUBER, J.; ANDRADE-VIEIRA, L.F.; DAVIDE, L.C. Cytotoxic and phytotoxic effects of the main chemical components of spent pot-liner: A comparative approach. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 763, p.30-35, 2014.

PARAIBA, L.C; SAITO, M.L. Distribuição ambiental de poluentes encontrados em lodos de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, n.9, p.853-860, 2005.

PATHAK, A.; DASTIDAR, M.G.; SREEKRISHNAN, T.R. Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: A review. **Journal of Environmental Management**, v.90, p.2343-2353, 2009.

PANDEY, A.; SOCOOL, C.A.; NIGAM, P.; SOCOOL, V.T. Biotechnological potential of agro- industrial residues.I: sugarcane bagasse. **Bioresour Technol**, v.74, p.69-80, 2000.

PASCUAL, J.A.; AYUSO, M.; GARCIA, C.; HERNÁNDEZ, T. Characterization of urban wastes according to fertility and phytotoxicity parameters.**Waste Manage**, res. 15, p. 103–112, 1997.

PEDROZA, M.M.; VIEIRA, G. E. G.; SOUSA, J. F.; PICKLER, A. C.; LEAL, E. R. M.; MILHOMEN, C.C. Produção e tratamento de lodo de esgoto – uma revisão. **Revista Liberato**, v.17, p.89-188, 2010.

RAMÍREZ W.A.; DOMENE X.; ORTIZ O.; ALCAÑIZ J.M. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. **Bioresource Technology**,

v.99, p.7168–7175, 2008.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Genotoxicity testing of wastewater sludge using the *Allium cepa* anaphase-telophase chromosome aberration assay. **Mutat Res**, v.418, p.113-119, 1998.

RATHOD, P.H.; PATEL, J.C.; SHAH, M.R.; JHALA, A.J. Evaluation of gamma irradiation for biosolid waste management. **Int. J. Environ. Waste. Manage.**, v.2, p.37-48, 2008.

ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; MARTÍ, E.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUMACHER, M.; DOMINGO, J.L. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v.425, p.99-109, 2012.

SÃO PAULO (São Paulo). Secretaria de Energia, Recursos Hídricos e Saneamento. SABESP. **Esgoto - Tratamento de Esgotos**. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=49>>. Acesso em maio de 2017.

SELLAMI, F.; JARBOUI, R.; HACHICHA, S.; MEDHIOUB, K.; AMMAR, E. Co-composting of oil exhausted olive-cake, poultry manure and industrial residues of agro-food activity for soil amendment. **Bioresour Technol**, v.99, p.1177-1188, 2008.

SERRANO-GARCIA, L., MONTEIRO-MONTOYA, R. Micronuclei and heterochromatid buds are the results of related genotoxic events. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.38, p.38-45, 2001.

SHAHBAZI, F.; GHASEMI, S.; SODAIEZADEH, H.; AYASEH, K.; ZAMANI-AHMADMAHMOODI, R.; The effect of sewage sludge on heavy metal concentrations in wheat plant (*Triticum aestivum* L.). **Environmental Science and Pollution Research**, p.1-11, 2017.

SHAMINA, N. V.; SILKOVA, O. G.; SERIUKOVA, E. G. Monopolar spindles in meiosis of intergeneric cereal hybrids. **Cell Biol Int**, v.27, n.8, p. 657–664, 2003.

SNIS, Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento Brasil. **Diagnóstico dos Serviços de Água e Esgotos – 2015**. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental – SNSA. Brasília: SNSA/MCIDADES, p. 26, 2017

SINGH, R.P.; AGRAWAL, M. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. **Waste Manage**, v.28, p.347-358, 2008.

SOBRERO, M.C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. **IDRC/IMTA. Canadá**, cap. 4, p.71-79, 2004.

SOMMAGGIO, L.R.D. **Avaliação da atenuação da toxicidade de lodo de esgoto por associação com resíduo vegetal da indústria sucro-alcooleira**. 2013. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas) – IB, UNESP, Rio Claro, 2013.

SOMMAGGIO, L.R.D. **Avaliação da possibilidade de detoxificação e utilização agrícola de lodo de esgoto, após bioestimulação, por meio de diferentes bioensaios**. 2016. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas – Biologia Celular e Molecular) – IB, UNESP, Rio Claro,

2016.

SOMMAGGIO, L.R.D.; MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; MARIN-MORALES, M. A. Ecotoxicological and microbiological assessment of sewage sludge associated with sugarcane bagasse. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 147, p. 550-557, 2018.

SOUZA, T.S.; HENCKLEIN, F.A.; ANGELIS, D.F.; FONTANETTI, C.S. Clastogenicity of land farming soil treated with sugarcane vinasse. **Environ. Monit. Assess.**, v.185, p.1627-1636, 2013.

TEIXEIRA, F.A.; PIRES, A.V.; NASCIMENTO, P.V.N. Bagaço de cana-de-acúcar na alimentação de bovinos. **Revista eletrônica de veterinária**, Itapetinga, v.8, n.6. 2007.

TELHADO, M. C. S. C. L. **Avaliação da biodisponibilidade de contaminante orgânico em solo contaminado**. 2009. 134f. Tese (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2009.

TRAVERSA, A.; LOFFREDO, E.; GATTULHO, C. E.; PALAZZO, A. J.; BASHORE, T. L.; SENESI, N. Comparative evaluation of compost humic acids and their effects on the germination of switchgrass (*Panicum virgatum* L.). **Journal of soils and sediments**, v. 14, n.2, p. 432-440, 2014.

VAZOLLÈR, R. F. GARCIA, A. D.; CONCEIÇÃO NETO, J. Microbiologia de Lodos ativados – Série Manuais. **CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental**. São Paulo; CETESB, 1991.p.23.

WALTER, I.; MARTÍNEZ, F.; CALA, V. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. **Environ Pollut**, v.139, p.507-514, 2006.

WATANABE, K. Microorganisms relevant to bioremediation. **Current Opinion in Biotechnology**, v.12, p.237-241, 2001

WHITE, P.A.; CLAXTON, L.D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutat Res**, v.567, p.227-345, 2004.

ZHANG, L.; SUN, X. Improving green waste composting by addition of sugarcane bagasse and exhausted grape marc. **Bioresource Technology**, v.218, p.335-343, 2016.

---

Mileni Norberto de Souza  
Aluna

---

Dra. Dânia Elisa Christofolletti Mazzeo Morales  
Orientadora

---

Profa. Dra. Maria Aparecida Marin-Morales  
Co-orientadora