

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

ROBERT MARQUES DE OLIVEIRA

**LODO DE ESGOTO TRATADO NO CULTIVO *IN VITRO*
DE SUCUPIRA-PRETA**

Alfenas/MG

2015

ROBERT MARQUES DE OLIVEIRA

**LODO DE ESGOTO TRATADO NO CULTIVO *IN VITRO* DE
SUCUPIRA-PRETA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Breno Régis Santos

Coorientador: Prof. Dr. Ronaldo Luiz Mincato

Alfenas/MG

2015

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Oliveira, Robert Marques.

Lodo de esgoto tratado no cultivo *in vitro* de sucupira-preta / Robert Marques Oliveira. -- Alfenas - MG, 2015.

66 f.

Orientador: Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, 2015.

Bibliografia.

1. Lodo de esgoto. 2. Lodo de esgoto - Nutrientes. 3. Cultura e meios de cultura (Biologia). 4. Plantas – Propagação *in vitro*. I. Santos, Breno Régis.
II. Título.

CDD-628.364



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
<http://www.unifal-mg.edu.br/ppgca/>



ROBERT MARQUES DE OLIVEIRA

“Lodo de esgoto tratado no cultivo *in vitro* de sucupira - preta”

A Banca julgadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Pesquisa: Meio Ambiente Sociedade e Diversidade Biológica.

Aprovada em: 15 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Prof. Dr. Adriano Bortolotti da Silva
Instituição: UNIFENAS

Assinatura:

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Instituição: UNIFAL - MG

Assinatura:

Dedico à Deus, e a minha
família, pelo constante apoio.

AGRADECIMENTOS

À minha esposa, minha filha, minha irmã e aos meus pais, pelo apoio incondicional em todos os momentos.

À Universidade Federal de Alfenas, pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Breno Régis Santos, orientador, pela acolhida, dedicação e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Luiz Mincato, coorientador, pela acolhida, dedicação e conhecimentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste estudo.

A todos vocês, serei eternamente grato.

“A ciência, meu rapaz, é feita de erros, mas de erros benéficos, já que conduzem pouco a pouco à verdade”.

Júlio Verne (1828-1905)

RESUMO

O tratamento de esgoto tem se evidenciado devido às necessidades ambientais, e no final do processo há geração de um resíduo denominado lodo de esgoto ou bio sólido, rico em matéria orgânica e elementos essenciais as plantas. Neste estudo, propôs-se a utilização do bio sólido da ETE de Paraguaçu- MG como fonte alternativa para nutrição *in vitro* de Sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.), espécie lenhosa nativa do cerrado brasileiro. As sementes de sucupira-preta foram desinfestadas em etanol 70 % e hipoclorito de sódio, e imersas em ácido sulfúrico concentrado (98 %) para superação da dormência tegumentar. Após 3 enxágues em água destilada autoclavada as sementes foram inoculadas, uma por tubo de ensaio contendo 30 mL de meio WPM e diferentes concentrações do bio sólido moído. Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira: controle com meio WPM; meio WPM acrescido de concentrações crescentes de bio sólido; concentrações crescentes de bio sólido apenas; e um segundo controle contendo apenas água destilada. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 7 com 14 tratamentos e 8 repetições por tratamento), com fator presença e ausência de meio WPM e fator concentração de bio sólido (ausência; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 g L⁻¹). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento até o 41º dia, quando foram avaliados: número de folhas; comprimento da parte aérea; área foliar; número de gemas; número de raízes secundárias; comprimento da raiz principal; espessura do caule e massa seca da planta inteira. O fator presença de bio sólido apenas, foi significativo influenciando de forma direta as variáveis área foliar, número de raízes secundárias e número de gemas. A presença do bio sólido influenciou de forma significativa nos tratamentos onde há interação deste com meio WPM apenas para variável comprimento da raiz principal. Quanto as demais variáveis: número de folhas, comprimento da parte área, espessura de caule e massa seca, não houve resultado significativo para os tratamentos com a presença do bio sólido apenas. Os resultados mostraram que a suplementação do meio com o bio sólido é possível. Conclui-se que devido à maioria dos parâmetros avaliados não diferirem estatisticamente, o bio sólido tem potencial para a substituição dos nutrientes do meio WPM, no que se refere ao estabelecimento *in vitro* de Sucupira-preta utilizando sementes como explante, resultando em economia para o processo, além de reutilizar o resíduo do tratamento de esgotos. Estudos complementares visando a padronização dos teores de cada componente do bio sólido auxiliarão na consolidação do uso deste na cultura de tecidos vegetais.

Palavras-chave: Bio sólido. Concentrações. Meio WPM. Propagação de plantas. *Bowdichia virgilioides* Kunth.

ABSTRACT

The high organic matter content of sewage sludge is one of the motivations for their disposal in the environment as a soil conditioner, and at the end of the process, there is a production of one residue denominated the biosolids, which is rich in organic matter and essential elements to the plants. This study aims to use the biosolids from ETE Paraguaçu (Minas Gerais) as an alternative source to *in vitro* nutrition of sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.), a native woody species from Brazilian Cerrado. Sucupira-preta seeds were sterilized in both 70 % ethanol and hypochlorite of sodium and immersed in 98 % concentrated sulphuric acid for breaking of seed coat dormancy. After 3 rinses in distilled autoclaved water the seeds were inoculated one by one in each test tube containing 30 ml of WPM medium and at different concentrations of grounded biosolids. The treatments were divided into four procedures: first control with WPM medium, one with WPM medium amended with increased concentrations of biosolids, other with only increased concentrations of biosolids and the last control medium with only distilled water. The experimental design was completely randomized in a factorial arrangement (2 x 7 with 14 treatments with eight replications), with the presence or absence factor of WPM medium and the biosolids concentration factor (absence; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 g L⁻¹). Test tubes were maintained in growing room until the 41th day and it was evaluated the number of leaves, aerial part length, leaf area measurements, the number of buds, the number of secondary roots, the length of the main root, the thickness of the stem and the mass of dry matter of the whole plant. The factor with only the biosolids presence was significantly influenced the leaf area, number of secondary roots and the number of buds directly. The biosolids presence significantly influences the treatments as the biosolids interacted with WPM medium affecting only the main root length variable. As for the other variables such as the number of leaves, aerial part length, the thickness of the stem and the drier mass, the results showed no significance to those treatments with only biosolids presence. Results demonstrated that the supplementation of medium with the biosolids is possible. Since the majority of estimated parameters did not have significant differences, it is possible to infer that biosolids has a potential to substitute the nutrients of WPM medium regarding the establishment *in vitro* of sucupira-preta using seeds as explants. Consequently, it is a safety way for the process besides of the reusing of sludge that result from processes of sewage treatment. Complementary studies searching for the standardization of each component of biosolids will contribute to evaluate the feasibility of this residue use as substrate in plants tissue cultivation.

Key-words: Biosolids. Concentrations. WPM medium. Plants propagules. *Bowdichia virgilioides* Kunth.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
2.1	Importância e caracterização da espécie	11
2.2	Elementos essenciais no desenvolvimento das plantas	13
2.3	Cultura de tecidos vegetais	15
2.3.1	Micropropagação.....	16
2.3.2	Meios de Cultura	18
2.3.3	Vantagens e importância do processo de propagação <i>in vitro</i>	21
2.4	Germinação	23
2.5	Meio ambiente, resíduos e saúde pública	25
2.6	Características do esgoto doméstico e do lodo de esgoto	27
2.7	Utilização do biossólido na agricultura	30
	REFERÊNCIAS	34
	ARTIGO: LODO DE ESGOTO TRATADO NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE <i>Bowdichia virgilioides</i> Kunth.	45
	INTRODUÇÃO	47
	MATERIAL E MÉTODOS	48
	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
	CONCLUSÕES	62
	REFERÊNCIAS	62
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	65
	ANEXO	66

1 INTTODUÇÃO

Um processo intenso de desenvolvimento industrial e crescimento demográfico mundial vem ocorrendo desde o século passado e tem gerado, além do desenvolvimento econômico, crescentes impactos ambientais, resultando em diferentes tipos de contaminação e poluição. Neste cenário, o tratamento dos efluentes industriais e sanitários, ou águas residuais, se tornaram uma exigência das políticas ambientais atuais, tanto para empresas privadas quanto para os diferentes segmentos do setor público, gerando no final do processo, um resíduo denominado lodo de esgoto (BARREIROS et al., 2007).

O lodo de esgoto é um resíduo decorrente das Estações de Tratamento de Esgoto (ETE) que depois de tratado e processado recebe o nome de biossólido, o qual possui características que permitem sua utilização agrícola como biofertilizante (FREITAS; MELO, 2013). O biossólido vem sendo cada vez mais utilizado como condicionador ou fertilizante de solo, já que é rico em matéria orgânica (MO) e em nutrientes indispensáveis, como N e P, para o desenvolvimento dos vegetais (TRIGUEIRO; GUERRINI, 2003; CAMARGO et al., 2013). Devido aos percentuais consideráveis de MO, e elementos essenciais às plantas, o biossólido pode substituir, ainda que parcialmente, os fertilizantes minerais (ARRUDA et al., 2013), reduzindo os custos de produção em diversas culturas (LEMAINSKI; SILVA, 2006).

Desse modo, usos alternativos do biossólido, como por exemplo, na agricultura, podem economizar recursos financeiros e viabilizar uma destinação sustentável para este resíduo (RIBEIRINHO et al., 2012).

De acordo com Trigueiro e Guerrini (2003), além dos bons resultados encontrados com o uso do biossólido na agricultura, o resíduo pode fornecer material orgânico de modo satisfatório na composição de substratos usados na formação de mudas florestais e frutíferas. Além disso, trabalhos relatam que várias espécies de interesse agrônômico e florestal, como por exemplo, eucalipto (MAGELA et al., 2012), café (MOBRICCI, 2006) e girassol (LOBO et al., 2013) apresentaram aumento na produção de matéria seca e de grãos quando cultivadas em solos tratados com biossólido.

Fontes alternativas de nutrientes têm sido testadas para a cultura de tecidos vegetais, técnica cada vez mais utilizada no cultivo de mudas de diversas espécies florestais, possibilitando a produção, em um curto espaço de tempo e a partir de um único explante, de

grandes quantidades de plantas, obtendo-se mudas de características genéticas desejáveis e com alto padrão de sanidade (XAVIER; OTONI; PANCHEL, 2007). Dentre estas fontes, pode-se citar substâncias complexas como água de coco, preparados vegetais como polpa de tomate, polpa de banana e suco de laranja, extratos de leveduras, além de hidrolisados de proteína (QUISEN; ANGELO, 2008).

Na cultura de tecidos, para a micropropagação de espécies lenhosas, o estabelecimento utilizando sementes é a técnica mais difundida, apresentando aplicações comprovadas. Existem pelo menos duas vantagens significativas quando se utiliza sementes como fonte de explantes para o estabelecimento de plantas *in vitro*: o controle da juvenilidade desses explantes, o que pode otimizar as respostas *in vitro*; e a variabilidade genética presente em um lote de sementes de espécies alógamas ou com sistemas mistos de cruzamento, que permite a ampliação da probabilidade de sucesso da metodologia ao usar uma ampla gama de genótipos (GOLLE et al., 2014).

Apesar dos benefícios à cultura de tecidos é um processo dispendioso que pode ter um custo laboral superior a 70 % em relação a produção tradicional de mudas em viveiros, representando um ônus para o processo. Diante do exposto, na busca de novas fontes de suplementação do meio de cultura e diminuição dos custos destes, o bio sólido pode ser uma opção viável.

Desse modo, de forma inovadora, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial nutricional do bio sólido no cultivo *in vitro* de *Bowdichia virgilioides* Kunth., visando a redução dos custos econômicos envolvidos no processo de produção das mudas via micropropagação seminal, além da destinação sustentável do resíduo utilizado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Importância e caracterização da espécie

A espécie *Bowdichia virgilioides* Kunth, popularmente conhecida como sucupira-preta, sucupira-açu, sucupira-do-campo, sucupira-do-cerrado, paricarana, é uma planta arbórea pertencente à família Fabaceae, amplamente comum, especialmente nas regiões de Cerrado do Brasil Central e na sua transição para floresta semidecídua, apresentando uma distribuição uniforme, porém com baixa densidade populacional (LORENZI, 2008; ALMEIDA et al., 1998).

De acordo com Lorenzi (2008), a sucupira-preta é uma espécie pioneira, mas pode também ser considerada secundária tardia, adaptada a terrenos secos e pobres, geralmente altos e de rápida drenagem. Sua madeira é de alta densidade e longa durabilidade natural, sendo por isso empregada na construção civil, na fabricação de móveis e molduras, arborização de ruas e projetos paisagísticos em geral (ROSA-MAGRI; MENECHIN, 2014). Além disso, é utilizada em programas de reflorestamento e na recuperação de áreas degradadas de preservação permanente (LORENZI, 2008), e na medicina popular para combater diabetes, reumatismos e inflamações em geral (ALMEIDA, 2008).

As árvores de sucupira-preta são altas e ramosas, podendo atingir até 20 m de altura quando adultas; possuem folhas compostas pinadas com folíolos pubescentes; é uma planta decídua, heliófita e xerófila; sua floração ocorre entre os meses de agosto e setembro, com a planta quase totalmente despida da folhagem; os frutos são legumes secos, indeiscentes, achatados, abrigando pequenas sementes com 3 a 5 mm de comprimento, e coloração avermelhada (Figura 1) (CRUZ et al., 2012; LORENZI, 2008; RIZZINI, 1990).

Na natureza, a produção de mudas ocorre geralmente via seminal, sendo que, para germinarem, as sementes devem apresentar boa viabilidade, baixa dormência e dependem de condições ambientais favoráveis (SMIDERLE; SCHWENGBER, 2011). As sementes da sucupira-preta possuem impermeabilidade tegumentar à água apresentando altas taxas de dormência (ALBUQUERQUE et al., 2007; PACHECO; MATOS, 2009). Desse modo, na natureza, a sucupira-preta possui uma baixa taxa de germinação ficando entre 0 e 2 %, ou

seja, bastante inferior as taxas de 45 a 88 % quando há a superação da dormência (CARVALHO, 2006).

Para reprodução controlada em viveiros sugere-se a quebra da dormência, que pode ser superada com: a) escarificação química, colocando-as em contato com ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) por cerca de cinco minutos (SMIRDELE; SOUZA, 2003); b) escarificação mecânica com lixa d'água; c) uso de solventes com álcool etílico; d) imersão em água a temperatura ambiente ($30^\circ C$); e) imersão em água quente (entre 80 e $100^\circ C$) (SMIDERLE; SCHWENGBER, 2011).



Figura 1 - *B. virgilioides* Kunth. e seus principais órgãos: flor, folha, fruto e semente.
Fonte: LORENZI (2008).

Devido às características econômicas, a espécie vem sofrendo uma exploração comercial desordenada, aliada aos crescentes processos de desmatamento do cerrado em consequência do avanço das fronteiras agrícolas e a baixa taxa de germinação característica da espécie. Além disso, o crescimento lento e anormal das plântulas limita a formação e desenvolvimento de mudas, tanto em ambiente natural quanto em viveiros (ROSA-MAGRI; MENEGHIN, 2014).

2.2 Elementos essenciais no desenvolvimento das plantas

As plantas são organismos autotróficos, capazes de sintetizar seus componentes orgânicos a partir de nutrientes inorgânicos, chamados de nutrientes minerais presentes no ambiente, que são absorvidos a partir de compostos do solo pelas raízes e incorporados em compostos de carbono orgânico, indispensáveis para o crescimento e desenvolvimento vegetal, pelo processo denominado assimilação de nutrientes (TAIZ; ZEIGER, 2004; MARENCO; LOPES, 2009).

Os nutrientes minerais são obtidos pelas plantas principalmente na forma de íons inorgânicos, absorvidos do solo pela grande área de superfície das raízes, capazes de capturar esses elementos mesmo quando estão em baixas concentrações no solo, fazendo das plantas um sistema extremamente eficaz na absorção mineral. Após a absorção os elementos são translocados para as diversas partes da planta para então serem utilizados nas mais variadas funções biológicas (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Dos cerca de 109 elementos químicos disponíveis na natureza, 89 são naturais, sendo que destes, mais de 60 já foram encontrados nos solos e nos vegetais (BRADY; WEIL, 2013). Apesar da variedade de elementos presentes nos vegetais, apenas 16 são considerados essenciais, assim classificados quando atendem aos dois critérios básicos da essencialidade: a) fazer parte de uma molécula que por si mesma já é essencial, como por exemplo o magnésio (Mg), que está envolvido diretamente no metabolismo fotossintético da planta, correspondendo ao átomo central da molécula de clorofila; e b) na ausência de algum destes elementos essenciais o vegetal não consegue finalizar seu ciclo de vida, que se completa com a formação de semente viável (KERBAUY, 2004).

Desse modo, de acordo com Taiz e Zeiger (2004), os nutrientes foram classificados seguindo os seguintes critérios:

a) quanto a forma de obtenção, podendo ser orgânicos (obtidos a partir de MO em decomposição, caracterizando a fase sólida dos solos) ou minerais (resultando dos processos de intemperismo da rocha-mãe, sendo encontrados adsorvidos nas partículas do solo);

b) quanto a quantidade requerida pelo vegetal, podendo ser um micronutriente (requerido em pequenas quantidades) ou um macronutriente (necessário em maiores quantidades);

c) quanto a sua função bioquímica, classificação mais aceita do ponto de vista fisiológico, sendo que, de acordo com Mengel e Kirkby (1987) apud Taiz e Zeiger (2004), os elementos foram divididos em 4 grupos básicos onde:

a) grupo 1: formado pelos compostos orgânicos, nitrogênio (N) e enxofre (S), das plantas;

b) grupo 2: representado pelo fósforo (P), silício (Si) e boro (B) importantes para as reações de armazenamento de energia ou de manutenção da integridade da estrutura da planta;

c) grupo 3: formado pelos elementos potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cloro (Cl), manganês (Mn) e sódio (Na), presentes como íons livres ou ligados a substâncias como ácidos pécnicos, nas paredes celulares, realizando funções como cofatores enzimáticos e reguladores de potenciais osmóticos;

d) grupo 4: do qual fazem parte os elementos de ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu), níquel (Ni) e molibdênio (Mo), que desempenham funções importantes no processo de transporte de elétrons.

A produção de vegetais geralmente é medida por área de solo, sendo denominada produtividade. De acordo com Branco e Cavinatto (1999), na primeira metade do século XIX, o químico alemão Justus von Liebig (1803 – 1873) propôs a Lei do mínimo ou Lei de Liebig, que afirma que o elemento essencial que se encontra em menor disponibilidade no ambiente irá limitar o crescimento e a produção do vegetal. Os autores ainda ressaltam alguns aspectos importantes da Lei proposta por Liebig:

a) a limitação do crescimento do vegetal acontece devido à falta, e não pelo excesso, de um elemento componente do ambiente;

b) o fator mínimo é o elemento que se encontra em quantidades mínimas em relação às necessidades da planta;

c) os microelementos ou micronutrientes, os quais entram na composição das plantas em quantidades mínimas, também podem controlar seu crescimento;

d) atualmente, sabe-se que a lei de Liebig não está associada apenas às substâncias químicas dissolvidas no solo, mas também aos ciclos biogeoquímicos, aos componentes químicos do ar, e aos fatores físicos, como luz, temperatura e umidade.

De acordo com Marengo e Lopes (2009), os benefícios da aplicação de elementos minerais no solo visando potencializar a produtividade das culturas despertam curiosidades desde muito tempo, sendo que a nutrição mineral despontou como um campo novo da ciência graças aos estudos

de dois grandes cientistas do século XIX: o francês Jean Baptiste Boussingault (1802-1887), pioneiro nos estudos do efeito da aplicação de fertilizantes e corretivos na composição química das culturas, e da importância das leguminosas para fixação do N atmosférico; e o já citado alemão Justus von Liebig (1803-1873), que em estudos similares e realizados na mesma época, idealizou a “teoria dos fertilizantes minerais”, consequentemente derrubando por terra a antiga “teoria do húmus”, que apontava a MO como fonte de carbono para as plantas.

2.3 Cultura de tecidos vegetais

A cultura de tecidos representa um ramo da Biotecnologia, que juntamente com a fusão de protoplastos, a engenharia genética e o uso de marcadores moleculares, constituem técnicas geralmente interdependentes (EMBRAPA, 2003).

A técnica de cultura de tecidos vegetais consiste no isolamento, a partir de um organismo vegetal, de pequenos fragmentos de tecido vivo chamados explantes, que são desinfetados e cultivados sob condições assépticas e controladas em um meio de cultura apropriado e por períodos indefinidos (ANDRADE, 2002; BORÉM, 1999). Para Quisen e Angelo (2008), a cultura de tecidos vegetais é um conjunto de técnicas de cultivo *in vitro* de células e tecidos vegetais (explantes), destacando que essas técnicas dependem de um meio de cultura sintético de composição definida; condições adequadas de assepsia; nutrição e fatores ambientais, como luz, temperatura, oxigênio (O₂) e gás carbônico (CO₂) adequados. O processo é baseado no princípio da totipotencialidade das células, onde qualquer célula de organismo vegetal apresenta todas as informações genéticas necessárias à regeneração de uma planta completa (PASQUAL; HOFFMANN; RAMOS, 2001; GALLO; CROCOMO, 1995) podendo reproduzi-la integralmente, a partir de divisões sucessivas e diferenciação (BUENO; MENDES; CARVALHO, 2001). De acordo com Grattapaglia e Machado (1999), é recomendado utilizar explantes que contenham maior proporção de tecido meristemático ou que tenham maior capacidade de expressar a totipotência celular.

A cultura *in vitro* de plantas apresenta grande importância prática para os setores florestal e agrícola, bem como para a área científica básica, principalmente na área de biologia de plantas, aparecendo como uma alternativa de produção vegetal versátil e com

possibilidade de manipulação das plantas a nível molecular (QUISEN; ANGELO, 2008). De acordo com Pinhal et al. (2011), as principais aplicações da cultura de tecidos são:

a) limpeza de vírus: aplicação comum, especialmente em plantas de propagação vegetativa que enfrentam problemas sérios com viroses, como as fruteiras perenes, principalmente citros;

b) micropropagação ou reprodução em larga escala de um genótipo, por via assexuada: multiplicação que resulta em grande número de descendentes, sendo extremamente útil em plantas de difícil propagação pelos sistemas convencionais;

c) manutenção de bancos de germoplasma: sistema empregado especialmente em plantas de reprodução predominantemente assexuada, como a mandioca e a batata, possibilitando a conservação de germoplasma *in vitro*, evitando a transmissão de doenças, principalmente viroses e ocupando pouco espaço, o que resulta em maior praticidade e economia;

d) obtenção de material genético homozigoto, ou linhagens, em curto prazo: técnica desenvolvida principalmente nas famílias das solanáceas, gramíneas e crucíferas, com obtenção de plantas haploides por culturas de anteras, ou até mesmo a partir de oosfera não fertilizada, possibilitando a formação de diploides ou poliploides homozigotos, após a duplicação do número de cromossomos com colchicina, evitando o demorado processo de autofecundações sucessivas, sendo as linhagens resultantes possíveis de serem empregadas na produção de híbridos;

e) hibridação interespecífica: possibilidade de maior sucesso em cruzamentos interespecíficos, e até mesmo, intergenéticos, com a minimização das barreiras resultantes da diferença no número, na homologia e na morfologia dos cromossomos, além do grau de semelhança genética e anatomia do sistema reprodutivo. Apesar disso, mesmo com a possibilidade de fertilização nos cruzamentos, ocorrem com frequência, limitações resultantes do aborto ou desenvolvimento anormal do embrião.

2.3.1 Micropropagação

Com o desenvolvimento da biotecnologia, a técnica de micropropagação teve um forte impacto sobre a produção de plantas em larga escala, resultando em centenas de

protocolos visando a produção comercial de mudas, bem como a preservação de espécies vegetais ameaçadas de extinção (SOUZA; PEREIRA, 2007).

Dentre as técnicas de propagação vegetativa *in vitro*, a micropropagação é a mais difundida podendo ser utilizada para espécies cujas sementes apresentam dificuldades de germinação e armazenamento, permitindo a maximização da qualidade e uniformidade dos plantios quando utilizados genótipos selecionados, bem como para propagação de espécies de interesse econômico com intuito de preservar as florestas naturais (XAVIER; SANTOS; OLIVEIRA, 2003). A micropropagação possibilita a multiplicação rápida de organismos vegetais devido à possibilidade de obtenção de um elevado número de explantes a partir de uma planta matriz e ao controle, tanto do meio quanto das condições ambientais nas quais se realiza a multiplicação (QUISEN; ANGELO, 2008).

A micropropagação a partir de parte de segmentos de órgãos ou tecidos meristemáticos, com indução direta de gemas (organogênese direta) e/ou estímulo de gemas pré-existentes pela quebra da dominância apical é a mais indicada comercialmente, pelo fato de permitir menor ocorrência de variações genéticas em relação ao explante original (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002). Ainda de acordo com Wendling, Ferrari e Grossi (2002), quando há formação direta de uma ou mais gemas, o processo é chamado de organogênese direta, e quando ocorre formação de calo antes da formação de uma nova gema, o processo é dito organogênese indireta. Segundo Xavier, Otoni e Penchel (2007), no setor florestal, a técnica de micropropagação iniciada com uso de sementes é a mais difundida, apresentando aplicações comprovadas.

A micropropagação é dividida basicamente em cinco etapas: a) preparo de plantas matrizes; b) estabelecimento de culturas assépticas; c) multiplicação; d) indução, alongamento e enraizamento e; e) aclimatização em condições de casa de vegetação (DEBERGH; MAENE, 1981; WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

Após atingirem certo grau de desenvolvimento, o que varia de acordo com a espécie, as mudas são retiradas dos frascos de cultivo *in vitro* e vão para o processo de aclimatização. A aclimatização é o processo que envolve o transplante da planta cultivada *in vitro* para a casa de vegetação ou viveiro (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999). De acordo com Dutra; Wendling e Brondani (2009), é de extrema importância reduzir o estresse causado pela diferença entre os ambientes *in vitro* e *ex vitro*, sob o risco de grandes perdas de explantes, realizando esse processo em ambiente sombreado, deixando as plantas por um

período de 15 a 30 dias, para então levá-las para área de pleno sol, onde ocorre a rustificação e o crescimento.

Com o processo de aclimatização há uma mudança no ambiente habitual de crescimento das plantas, resultando diretamente no desenvolvimento da parte aérea, além de ficarem suscetíveis a grandes perdas de água por transpiração (FACHINELLO et al., 1995).

Para Bandeira et al. (2007), o modo correto de transferência das plantas estabelecidas *in vitro* para a fase de aclimatação e rustificação em condições *ex vitro*, constitui-se em uma importante etapa na formação de mudas de qualidade, principalmente porque essas mudas passam de uma condição heterotrófica para a autotrófica, sofrendo variados estresses fisiológicos.

Desse modo, a técnica mostra-se extremamente importante para a propagação comercial e como técnica auxiliar em programas de melhoramento para obtenção de mutantes, simplificando e barateando o processo, permitindo contornar certos casos de incompatibilidade genéticas em cruzamentos, resultando, além da economia, na antecipação de resultados, permitindo precisão na projeção de entrega de mudas prontas para o plantio, nas quantidades e época desejadas (FERRARI; GROSSI; WENDLING, 2004).

2.3.2 Meios de Cultura

Os meios de cultura devem apresentar uma série de substâncias capazes de realizar o crescimento, aproximando ao máximo possível às condições nutricionais *in vitro* daquelas que a célula encontra no organismo íntegro àquelas que a semente encontra no meio ambiente (EMBRAPA, 2003). Os meios utilizados para cultura de células, tecidos e órgãos de plantas fornecem as substâncias essenciais para o crescimento dos tecidos e controlam, em grande parte, o padrão de desenvolvimento *in vitro* (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009; CALDAS; HARIDASAN; FERREIRA, 1998).

Além dos nutrientes minerais necessários ao desenvolvimento normal de um vegetal, os meios de cultura podem ser acrescidos de: sacarose, que é fonte de energia e esqueleto carbônico para o crescimento das novas brotações; diferentes fontes de vitaminas, que permitem um adequado equilíbrio metabólico e fitorreguladores, principalmente auxinas e

citocininas, que irão direcionar os explantes a produzirem gemas, raízes ou embriões somáticos (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

De acordo com Quisen e Angelo (2008), os meios de cultura consistem em uma mistura balanceada de:

a) macronutrientes: fornecidos ao meio de cultura na forma de sais, contendo N, K, P, Ca, Se Mg requeridos em quantidades milimolares, e absorvidos pelas células vegetais como cátions (Ca^{+2} , Mg^{+2} e K^{+}); N na forma de amônio (NH_4^{+}) ou nitrato (NO_3^{-}); P como íons fosfato (HPO_4^{-2} e $\text{H}_2\text{PO}_4^{-}$) e S como íon sulfato (SO_4^{-2});

b) micronutrientes: Fe, Mn, Zn, B, Cu, Mo, requeridos em concentrações micromolares;

c) carboidratos: fonte externa de energia importantes nos casos onde células, tecidos ou plântulas não encontram condições adequadas de iluminação e concentração de CO_2 , comprometendo o processo de fotossíntese;

d) fontes orgânicas de N;

e) vitaminas: já que muitas vezes as células ou tecidos não conseguem sintetizar as vitaminas necessárias para o seu crescimento no ambiente *in vitro*, assim como fazem em ambiente natural, sendo que as principais vitaminas usadas são: tiamina (vitamina B₁); ácido nicotínico (vitamina B₃); piridoxina (vitamina B₆); pantotenato de cálcio (vitamina B₅); riboflavina (vitamina B₂); ácido ascórbico (vitamina C) e ácido fólico (vitamina B₉);

f) reguladores de crescimento: determinantes no crescimento e padrão de desenvolvimento;

g) adição de cobalto (Co) e iodo (I).

Segundo Quisen e Angelo (2008), na cultura *in vitro* também há a possibilidade de usarmos substâncias complexas com a finalidade de enriquecer os tradicionais meios de cultivo, sendo que essas preparações complexas são obtidas a partir de substâncias naturais, de composições indefinidas e conseqüentemente, de difícil determinação. Desse modo, ainda de acordo com os autores, o uso dessas substâncias é restrito a algumas culturas e a repetição experimental é bastante complicada. Apesar disso uma grande variedade de substratos já foi utilizada, estando a água de coco como o aditivo mais utilizado para um grande número de espécies *in vitro*, geralmente na proporção de 2 a 15 % (v/v), além dos hidrolisados de proteína, extratos de leveduras, e preparados vegetais, como polpa de banana e suco de laranja e de tomate.

Para Santos-Serejo et al. (2006), substâncias complexas como polpa de frutas, água de coco, suco de abacaxi e extrato de folha de fumo, juntamente com a água, macro e micronutrientes, aminoácidos, açúcares, vitaminas, agente gelificante, reguladores vegetais, além de eventuais suplementos como antibióticos e carvão ativado, podem fazer parte do meio nutritivo. Os autores ainda destacam que os aditivos orgânicos complexos são preparações obtidas a partir de produtos naturais de composição indefinida e tem a função de enriquecer o meio de cultura, melhorando a resposta no padrão de crescimento das plantas.

Alguns exemplos das substâncias complexas mais utilizadas estão o coco (endosperma, água, leite), a peptona de carne e a polpa de banana, que são empregados na germinação de sementes e no crescimento da planta, podendo promover diferentes efeitos durante o cultivo *in vitro*, dependendo da espécie e da quantidade de aditivo orgânico utilizada (SANTOS-SEREJO et al., 2006).

Para Trigueiro e Guerrini (2003), ao escolher um meio de crescimento para produção de mudas deve-se observar suas características físicas e químicas, além da espécie a ser usada, sem deixar de considerar os aspectos econômicos do processo de produção.

O meio WPM - Wood Plant Medium (LLOYD; McCOWN, 1981) é o mais usado para propagação de espécies lenhosas em laboratórios comerciais. Apesar de possuir as mesmas concentrações de NO_3^- e NH_4^+ do meio Anderson, possui mais K e um alto nível de íons sulfato. (PASQUAL, 2001).

Além das fontes de nutrientes, na micropropagação comercial é necessário um substrato para seu suporte, a fim de que o explante não fique imerso diretamente na solução nutritiva, o que pode ocasionar falta de oxigênio para atividades metabólicas, resultando na morte do explante (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002). Desse modo, ainda de acordo com os autores, é necessário misturar ao meio de cultura uma fonte de agente geleificante, sendo que os mais comuns são o ágar, extraído de algas marinhas, e o fitagel, sintetizado a partir de metabólitos bacterianos.

O ágar é o agente mais utilizado na solidificação dos meios de cultura (GEORGE, 1993; SINGHA, 1984). O produto está disponível em várias marcas comerciais e é considerado o componente de custo mais elevado na preparação de um meio de cultura, sendo por isso, importante buscar a otimização desse componente no preparo do meio (PEIXOTO; PASQUAL, 1995; GEORGE, 1993; SINGHA, 1984). Por outro lado, o fitagel, por ser um produto importado, geralmente tem custo maior que o ágar, questão que pode ser

revertida pelo fato da quantidade de fitagel necessária para geleificação ser bem menor, cerca de 2 g L⁻¹ contra 6 a 8 g L⁻¹ de ágar, além de resultar em uma melhor transparência do meio de cultura (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

Apesar da eficiência do ágar e do fitagel como agentes de solidificação dos meios de cultura, Grattapaglia e Machado (1999) ressaltam que há uma tendência mundial pela busca de sistemas utilizando meio líquido como alternativa ao uso do ágar no processo de produção *in vitro*, possibilitando redução dos custos e maior agilidade na preparação dos meios de cultura. Existem outras alternativas de menor custo que o ágar que podem servir como suporte, destacando por exemplo, substratos inertes, como a vermiculita, a perlita ou espumas de poliuretano, embebidas em meio líquido (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1999), vermiculita e polpa de papel (AFREEN-ZOBAYEDE et al., 2000), bagaço-de-cana (MOHAN et al., 2004).

2.3.3 Vantagens e importância do processo de propagação *in vitro*

Como vantagens do processo de propagação de espécies vegetais *in vitro* em relação aos métodos convencionais podemos destacar a multiplicação de clones em qualquer época do ano, produção de espécies que apresentam dificuldades de propagação por métodos convencionais, rápida multiplicação clonal de espécies raras, além da supressão de vírus (GALLO; CROCOMO, 1995). Pois, as atividades de cultivo *in vitro* são realizadas em ambiente asséptico e com temperatura e iluminação controladas, visando a otimização das respostas aos estímulos de temperatura e luminosidade aplicados ao material propagado, entre outros fatores (TEIXEIRA; TORRES, 1998).

O cultivo *in vitro* é considerado importante para a propagação de várias espécies lenhosas florestais e vem sendo utilizado com sucesso (LANDA et al., 2000; MOURA, 2012). Na área florestal, a micropropagação faz parte de grandes programas de pesquisa, permitindo a preservação de germoplasma, produção de plantas livres de doenças, multiplicação rápida de plantas em períodos de tempo e espaço físico reduzidos, rejuvenescimento clonal e produção de mudas de clones selecionados (XAVIER; WENDLING; SILVA, 2009).

Quando comparada com outras técnicas a micropropagação, a técnica de propagação vegetativa foi a que mais difundiu, com resultados positivos comprovados para muitas espécies. Porém na literatura, as informações sobre a micropropagação de sucupira-preta são escassas, sendo importante o desenvolvimento de procedimentos básicos capazes de melhorar o aproveitamento genético dessa espécie (MOURA, 2012).

Ainda de acordo com Moura (2012), a propagação de espécies nativas, como por exemplo, a sucupira-preta, é realizada principalmente a partir de sementes, reforçando o fato de existir pouco conhecimento sobre a propagação vegetativa dessa espécie, destacando ainda que a produção de mudas via seminal geralmente é limitada devido à ocorrência de dormência tegumentar, reduzindo a taxa de germinação das sementes, que ocorre de forma lenta e em baixa porcentagem.

A produção industrial de plantas *in vitro* é uma prática comum em agroindústrias de flores como nos Estados Unidos e países da Europa, onde se tornaram um método biotecnológico consagrado, capaz de produzir plantas (mudas) mais saudáveis e uniformes e em menor espaço de tempo quando comparado com os métodos convencionais. É importante destacar que a produção industrial de plantas *in vitro*, também chamada biofabricação de plantas, já não se limita a flores e plantas ornamentais apenas (BRAGA, 2012), alcançando também outras plantas de grande valor econômico, como café, batata, banana, abacaxi, eucalipto, pinus, cana-de-açúcar, que já são produzidas em biofábricas no mundo inteiro (RIBEIRO et al., 2010).

O termo biofábrica é utilizado para designar um método de produção vegetal em massa, geralmente de importância econômica, que utiliza a micropropagação para produzir plantas de forma rápida e homogênea, com a possibilidade de conservação e aprimoramento de características genéticas apresentadas pela planta de origem (QUISEN; ANGELO, 2008).

Desse modo, a propagação *in vitro* vem sendo utilizada de maneira comercial para várias culturas, sendo de grande importância a busca por técnicas que reduzam os custos de produção que ainda são muito elevados, resultado de alguns fatores como perdas causadas pela contaminação *in vitro*; desordens fisiológicas e morfológicas nas plantas; baixa porcentagem de sobrevivência das plantas no estágio de aclimatização; necessidade de mão-de-obra especializada para a manipulação intensa dos materiais e das plantas (KOZAI; KUBOTA, 2001).

As respostas das plantas às técnicas de micropropagação variam em função da espécie, variedade e/ou cultivar, época de coleta, tipo de explante utilizado e condições de

cultivo, sendo importante determinar qual a época mais adequada para coleta dos explantes e as condições que devem ser oferecidas para que venham a expressar o potencial máximo de regeneração de novas plantas (WENDLING; FERRARI; GROSSI, 2002).

2.4 Germinação

As sementes possuem a função de perpetuação e multiplicação das espécies. Caracterizam-se por possuírem reservas, que podem funcionar como fonte de energia para processos metabólicos e/ou fonte de matéria para a construção de tecidos vegetais que constituirão a plântula. Essas reservas possuem o papel de manutenção e desenvolvimento do embrião até a formação de uma plântula, capaz de se manter de forma autotrófica (BUCKERIDGE et al., 2004). Ainda de acordo com Buckeridge et al. (2004), existe uma grande variação na composição das sementes, sendo que em geral, estão presentes carboidratos e lipídeos, que atuam como fonte de energia e carbono para germinação e desenvolvimento das plântulas; e as proteínas, que armazenam principalmente N e S, essenciais para a síntese proteica, de ácidos nucléicos e de compostos secundários nas plântulas em crescimento. Além dos carboidratos, lipídeos e proteínas, estão presentes micro e macronutrientes usados desde o início do desenvolvimento.

A germinação pode ser definida como uma sequência de fatores fisiológicos amplamente influenciados por fatores externos e internos às sementes, podendo agir isoladamente ou interagindo uns com os outros (CARVALHO; NAKAGAWA, 2000). Para Laboriau (1983), a germinação é um fenômeno biológico, botanicamente caracterizado como a retomada do crescimento do embrião com o conseqüente rompimento do tegumento pela radícula.

De forma básica, a germinação é composta por três fases: (a) embebição, em que ocorre a reativação do metabolismo com um conjunto de processos físicos que variam de acordo com a permeabilidade do tegumento, composição química da semente, área de contato entre a semente e a água, pressão hidrostática e o estado fisiológico da própria semente; (b) indução de crescimento e (c) protusão da radícula (BEWLEY; BLACK, 1994). Já para Popinigis (1985), sob um ponto de vista fisiológico, a germinação engloba quatro

fases: embebição de água; alongamento das células; divisão celular; e diferenciação das células em tecidos.

É de grande importância conhecer as condições ideais para a germinação das sementes de uma determinada espécie, já que diferentes espécies, geralmente apresentam respostas diferenciadas, resultantes da ação de diversos fatores, como viabilidade; dormência; condições de ambiente, envolvendo água, luz, temperatura e oxigênio; ausência de agentes patogênicos e tipo de substrato para sua germinação (MAPA, 2009; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000).

Segundo Cardoso (2004), a maioria das sementes tendem a apresentar algum mecanismo de dormência, principalmente física ou mecânica, bastante comum em espécies tropicais. Apesar de ser considerada benéfica no tocante ao processo de sobrevivência das espécies vegetais, para as técnicas de reprodução via seminal realizadas pelo homem, a dormência é um processo prejudicial à formação de mudas e necessita ser superada, a fim de se obter emergência uniforme (ANDRADE et al., 2010).

Como já mencionado, diversos fatores ambientais também afetam o processo de germinação, dentre estes, os mais importantes são as condições de umidade, temperatura, oxigênio (TOLEDO; MARCOS FILHO, 1977; CARVALHO; NAKAGAWA, 2000) e luminosidade (KOLLER, 1972).

É importante distinguir os aspectos que afetam a germinação das sementes, destacando os seguintes fatores: de origem genética (variação entre espécies e cultivares); pré e pós-colheita (injúrias mecânicas durante a colheita, problemas fitossanitários, variações climáticas, secagem, armazenamento); morfológicos e fisiológicos (dormência, maturidade, vigor), dentre outros fatores (PÁDUA et al., 2011).

As condições ambientais apropriadas para o processo de germinação podem também ser fornecidas em laboratórios no processo de multiplicação *in vitro* (GOMES, 1999). Pois, nesse tipo de cultivo, as variáveis podem ser controladas e as soluções de sais e açúcares que compõem os meios de cultura não exercem efeito puramente nutritivo, podendo também influenciar na germinação, crescimento celular e a morfogênese por meio de propriedades osmóticas (GEORGE, 1996). Além disso, a germinação de sementes *in vitro* geralmente permite maior germinabilidade das mesmas do que quando realizada em viveiros, fato que se deve as condições mais adequadas do ambiente *in vitro*, propiciando, além de uma melhor taxa de germinação, um melhor desenvolvimento inicial da plântula (NOLETO; SILVEIRA, 2004).

A presença de reguladores de crescimento, como por exemplo, as giberelinas no meio de cultura influenciam na regulação da germinação, atuando tanto na quebra da dormência, quanto no controle da hidrólise de reservas, da qual depende o embrião em crescimento (SOARES et al., 2009). Ainda de acordo com esses autores, enquanto para diversas espécies, as giberelinas aceleram a germinação e a emergência, para outras elas apresentam resposta mínima ou nenhum efeito.

Desse modo, são de grande importância estudos relacionados aos fatores que interferem na viabilidade e vigor das sementes, definindo procedimentos a serem adotados nos testes para a avaliação do potencial fisiológico desse órgão vegetal, e também, para definição da estratégia mais adequada para o armazenamento, principalmente para espécies não cultivadas, em que a heterogeneidade genética e fisiológica das amostras é acentuada (PÁDUA et al., 2011).

2.5 Meio ambiente, resíduos e saúde pública

Segundo o Instituto Carbono Brasil de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (2013), o Brasil possui 12 % das reservas de água doce do planeta, as quais são cada vez mais ameaçadas pela exploração exagerada, descaso com os mananciais, má distribuição nos centros urbanos, poluição, desmatamento, desperdício, crescimento desordenado das cidades e ocupação de áreas de preservação, fazendo com que a água potável se torne um bem cada vez mais escasso.

Durante muito tempo se acreditou que a água era um recurso autossustentável com capacidade de autodepuração, o que gerou, durante séculos, a ideia de que era um bem público de quantidade infinita e a serviço do homem, que se aglomerou em cidades cada vez maiores, seguidas de quantidades crescentes de esgoto, lançados de forma indiscriminada em rios, lagos, represas e córregos, resultando em grande carga poluidora nesses reservatórios (PHILIPPI JÚNIOR; MARTINS, 2005). Ainda de acordo com os autores a escassez e poluição dos recursos hídricos atingem dimensões sociais, econômicas e ambientais, visto que, comprometem o equilíbrio dos ecossistemas; provocam doenças em virtude da má qualidade da água e da falta dela em quantidades suficientes para as necessidades mínimas; impedem o desenvolvimento socioeconômico prejudicando atividades de recreação, pesca,

turismo e de propostas paisagísticas; prejudicam o desenvolvimento industrial, comprometendo a geração de energia elétrica, refrigeração de máquinas, produção de alimentos e navegação; e interferem no desenvolvimento da agricultura, dificultando a produção de cereais, frutas e hortaliças.

De acordo com a Portaria 1.469/00 do Ministério da Saúde, antes do consumo humano a água deve passar por um processo de adequação de suas características visando atingir certo padrão de potabilidade, visto que ela não é encontrada de forma pura na natureza, incorporando impurezas da atmosfera quando cai em forma de chuva e do solo quando escoar, dissolvendo algumas substâncias e apresentando outras em suspensão (PHILIPPI JÚNIOR; MARTINS, 2005). Ainda de acordo com os autores, as etapas do processo de tratamento e as dosagens dos produtos químicos devem ser ajustadas a partir de análises da água bruta que chega às ETA (Estações de Tratamento de Água) em períodos de estiagem e de chuvas, sendo que essas análises levam em conta cinco parâmetros: DBO₅, Coliformes, pH, Cloretos e Fluoretos.

Apesar disso, os sistemas convencionais de tratamento de águas para o consumo humano usados no Brasil (coagulação/floculação, sedimentação, filtração e desinfecção com cloro), não são eficientes na remoção de algumas substâncias e compostos tradicionais encontrados nos efluentes, principalmente os industriais, que podem causar problemas sérios de saúde pública aos usuários desses sistemas de abastecimento de água (HESPANHOL, 2008).

Nas ETA também há geração de lodo, rico em alumínio (Al), proveniente da lavagem dos filtros, decantadores e dos tanques de produtos químicos, sendo que esse lodo também é considerado resíduo sólido, de composição variada de acordo com as propriedades da água bruta e dos produtos químicos usados no seu tratamento, e representa um desafio para as empresas de água, visto que pode atuar como um fator importante de degradação ambiental quando é descartado no solo ou mananciais de forma inadequada (PHILIPPI JÚNIOR; MARTINS, 2005).

Ainda de acordo com os autores, como alternativas para disposição final aparecem: os aterros sanitários, quando o teor de umidade do lodo deve ser reduzido de 95 % para cerca de 25 % possibilitando o transporte e reduzindo o volume; a co-disposição ou mistura com biossólidos, indo juntamente com o lodo de esgoto para o solo ou servindo para o preparo de fertilizantes, proporcionando vantagens operacionais e comerciais; disposição controlada no solo, o que exige grande cuidado devido às altas concentrações de Al que pode reagir

com o P, inviabilizando sua eficiência como condicionantes do solo para fins agrícolas; aplicação em processos industriais, onde pode ser usado na fabricação de tijolos para construção civil e base para pavimentos; e por fim disposição em ETE, onde até aumenta a eficiência dos decantadores primários com consequente aumento de produção de lodo, porém pode inibir o processo biológico pela presença de produtos químicos como Al e hidróxido de ferro ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) usados na etapa de coagulação nas ETA.

Quando os efluentes sanitários são tratados nas ETE, além de evitar seu descarte inadequado no ambiente, há geração de uma grande quantidade de lodo, que se descartado de forma incorreta também pode gerar um grave problema ambiental e comprometer o meio ambiente e as futuras gerações. Por isso, a disposição final desse lodo é uma questão polêmica que pode representar até 60 % dos custos operacionais em uma unidade de tratamento de efluentes de uma indústria ou município (MAZZER; CAVALCANTI, 2004), visto que, é obrigação dos geradores, bem como do poder público, cuidar do gerenciamento, transporte, tratamento e destinação final de seus resíduos, sendo uma responsabilidade permanente (KRAEMER, 2005).

O desenvolvimento adequado da infraestrutura de abastecimento de água e esgotamento sanitário é indispensável para o desenvolvimento urbano e a qualidade de vida (TUCCI, 2005). A proteção dos recursos hídricos e da saúde da população depende do controle inicial do processo de poluição das águas, principalmente do tratamento da fase líquida da grande quantidade de esgoto *in natura* gerado nas cidades (BARBOSA; TAVARES FILHO; FONSECA, 2002).

2.6 Características do esgoto doméstico e do lodo de esgoto

Da água que entra no sistema urbano para o abastecimento da população, uma boa parte se transforma em esgoto após ser utilizada (NATAL; MENEZES; MUCCI, 2005).

Esgoto doméstico é aquele gerado nas residências ou nas instalações hidráulico-sanitárias como cozinha, chuveiro, pias, lavatório, vaso sanitário, ducha sanitária, banheira, bebedouro e mictório; há também o esgoto não doméstico, chamado de esgoto industrial, que possui características diferentes dos esgotos gerados nas residências (COPASA, 2013a). Ainda, de acordo com a COPASA (2013a), o perfeito funcionamento dos sistemas de

esgotamento e tratamento sanitário depende da participação e colaboração do empreendedor e/ou da população.

O esgoto possui características: físicas, correspondentes à matéria sólida, temperatura, odor, cor e turbidez; químicas, as quais podem ser classificadas em MO e inorgânica, representadas pelo pH, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), N e P biológicas, representadas pelas bactérias, fungos, protozoários, (responsáveis pela degradação da MO existente no esgoto) vírus, algas e grupos de plantas e de animais, sendo que essas características estão relacionadas diretamente com o controle da poluição e tratamento do efluente, visto que a composição do esgoto gerado por uma localidade dependerá da função que a água desempenha na comunidade, do clima, dos hábitos e da situação social e econômica da população (COPASA, 2013b).

O esgoto doméstico é constituído de 99,9 % de água e 0,01 % de sólidos, os quais possuem cerca de 70 % de substâncias orgânicas, como as proteínas, carboidratos e gorduras e 30 % de substâncias inorgânicas, constituídas principalmente por diversos sais e areia, estando a fração de 0,01 % de sólidos responsável pelos problemas de poluição das águas (BERTON; NOGUEIRA, 2010; COPASA, 2013b). Para Paganini (1997), o esgoto doméstico é composto essencialmente por matérias orgânicas e inorgânicas que aparecem nas formas dissolvidas, coloidal e em suspensão, estando em diferentes proporções resultantes de múltiplas situações; e o esgoto industrial possui composição variada, dependendo das características próprias de cada indústria e de seus processamentos.

De acordo com Philippi Júnior e Martins (2005), cerca de 80% da água de abastecimento que chega às moradias retorna como esgotos gerados nas instalações sanitárias de banheiros, cozinhas e lavanderias em geral, colhidos por redes coletoras a afastados das áreas urbanas por grandes tubulações, para então serem tratados nas ETE, que transformam esses esgotos em:

a) efluentes líquidos: podem então ser reutilizados em diversas aplicações, sendo que a disposição final desse tipo de efluente nos cursos de água ou no solo representa a última etapa desse ciclo de tratamento, onde o manancial recebe de volta a água outrora dele retirada, em condições diferentes;

b) efluentes sólidos: denominados biossólidos, passíveis de serem aproveitados como fertilizantes ou condicionadores de solo na agricultura;

c) efluentes gasosos: denominados biogases, que podem ser utilizados na geração de energia; e

d) produtos reciclados: plásticos, metais e vidros que chegam misturados ao esgoto bruto e que podem ser reutilizados como insumos na indústria.

O lodo de esgoto é um subproduto procedente das ETE, com composição variável, mas rico em MO e nutrientes, e após passar pelo processo de estabilização, geralmente a compostagem, passa a ser denominado biossólido, um produto de características desejáveis para o setor agrícola e florestal (GOMES et al., 2013).

Para reduzir o volume e o teor de MO, o tratamento do lodo de esgoto consiste basicamente de três etapas (Figura 2):

a) adensamento: torna o lodo mais concentrado, separando uma parte da água presente;

b) estabilização: microrganismos anaeróbicos degradam a MO presente no lodo formando gás metano e água, promovendo sua estabilização;

c) desidratação ou desaguamento: pode ocorrer naturalmente ou com a ajuda de algum equipamento, quando o lodo passa a ter cerca de 40% de sólidos, formando tortas que geralmente vão para os aterros sanitários (SABESP, 2013b; COPASA, 2013c).

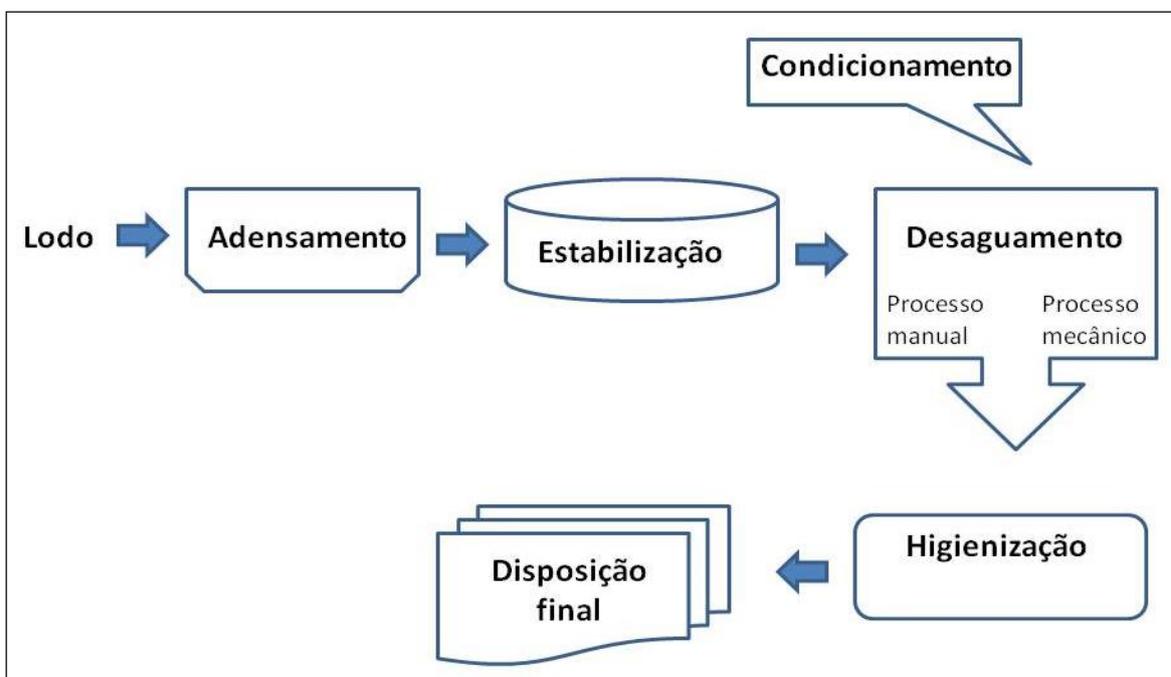


Figura 2 - Etapas de tratamento do lodo de esgoto.

Fonte: Adaptado de LIMA (2010).

Para Lambais e Carmo (2008), os lodos são caracterizados como resíduos orgânicos compostos basicamente de biomassa microbiana sedimentável, de composição química variável de acordo com a origem, que pode ser desde MO e nutrientes essenciais abundantes para as plantas e microrganismos até quantidades elevadas de metais pesados como Zn, Cu, Cd e Pb e/ou compostos resistentes à decomposição ou xenobiontes, além de microrganismos patogênicos a animais e humanos.

De acordo com Brady e Weil (2013), os microrganismos do solo decompõem a MO e liberam nutrientes na forma disponível às plantas, além de degradarem algumas substâncias tóxicas, embora os metais pesados não sejam degradados. A vida útil dos metais pesados no solo varia, sendo cerca de 70 a 510 anos para o Zn; 13 a 1.100 anos para o Cd; 300 a 1.500 anos para o Cu e 740 a 5.900 anos para o Pb, sendo a completa remoção dos contaminantes metálicos dos solos praticamente impossível (MALAVOLTA, 1994).

Entre 2010 e 2011 no Brasil, ocorreu um crescimento de 1,3 milhão de ramais na rede de esgoto, embora menos da metade da população, cerca de 48,6% tem acesso ao saneamento básico. De todo esgoto gerado no país, somente 39 % recebem algum tipo de tratamento. Apesar dos baixos índices, esse crescimento é relevante, frente à ampliação de sistemas complexos de coleta e tratamento de esgoto nas cidades brasileiras (BRASIL, 2014).

Em 2010, cerca de 2,5 bilhões de pessoas (37 %) no mundo viviam sem saneamento adequado, sendo 40 milhões brasileiros. Assim, apesar de 1,8 bilhão de pessoas terem tido acesso ao saneamento adequado desde 1990, estamos longe de atingir a meta da Organização Mundial de Saúde (OMS), de reduzir pela metade, até 2015, a proporção da população sem acesso sustentável à água potável segura e ao saneamento básico. Pois, de acordo com as projeções atuais, em 2015 ainda teremos 33 % da população mundial sem saneamento adequado (WHO, 2013).

2.7 Utilização do biossólido na agricultura

A prática da agricultura surgiu a cerca de 10 mil anos, possibilitando ao homem se fixar à terra, não havendo mais a necessidade vital de busca periódica de novas áreas para

satisfazer sua demanda alimentar; e então a terra começou a ser lavrada, dando início ao processo de modificação do ambiente local, e consequente poluição do espaço (PHILIPPI JÚNIOR; MALHEIROS, 2005).

A sociedade está cada vez mais preocupada com a qualidade ambiental. Isso tem feito com que os produtores de diversos tipos de resíduos busquem alternativas não poluentes de descarte, sendo que muitos desses materiais têm se mostrado fontes de nutrientes e de MO capazes de aumentar a produtividade nas práticas de agricultura, silvicultura, paisagismo, além de promover a recuperação de áreas degradadas (BRADY; WEIL, 2013; JUNIO et al., 2013).

De acordo com Pinto; Kohler e Lacerda (2001), áreas de discrepância entre o uso efetivo da terra e sua capacidade agrícola, podem concorrer, em alguns casos, tanto para o decréscimo da produtividade agrária, quanto para a degradação dos solos. Esse fato se agrava quando é considerado que a demanda mundial por alimentos aumenta progressivamente, em taxas muito altas (TUNDISI, 2008).

Ao mesmo tempo, é crescente o interesse pela produção de compostos orgânicos e de reaproveitamento de lodos de esgotos ou biossólido (CAMARGO et al., 2013) bem como resíduos industriais, visando à redução do volume desse passivo ambiental e simultaneamente obter um produto útil para solos agrícolas (ARAÚJO; MONTEIRO; CARDOSO, 2005) e que podem ainda mitigar efeitos negativos para a fertilidade, como erosão e a lixiviação de nutrientes.

Quanto ao setor de produção, as indústrias devem sempre buscar minimizar a geração de resíduos. Quando se deseja reaproveitá-los é recomendável inicialmente aplicar os procedimentos da NBR 10.004:2004 que os classificam em “perigosos” e “não perigosos” (BASTIAN; ROCCO, 2009).

Há diversas alternativas de disposição dos resíduos sólidos. As mais comuns são a disposição em aterros sanitários, com a necessidade de contínuo monitoramento, além de não ser sustentável em longo prazo devido à saturação da capacidade desses aterros e a necessidade de aquisição de novas áreas; a incineração, que além da emissão de gases e material particulado, produz uma pequena quantidade de cinzas, que pode ser considerada relativamente inerte; aplicação em áreas florestais; reuso industrial e na construção civil (produção de agregado leve, fabricação de tijolos e cerâmicas e produção de cimentos) e a aplicação em áreas degradadas, com o objetivo de recuperar solos que sofreram profundas

alterações nas propriedades físicas e/ou químicas e, conseqüentemente, apresentam condições impróprias ao desenvolvimento da vegetação (ZEITOUNI, 2005).

Segundo Pogorzelski; Rosa e Castilhos (2012), recentemente vem sendo usados resíduos orgânicos oriundos de efluentes urbanos e industriais na agricultura, prática que se intensifica como apelo à sustentabilidade na cadeia produtiva da indústria. Ainda, de acordo com os autores, apesar do uso crescente, são pouco conhecidas as alterações que essa prática provoca nos solos, devido aos diferentes componentes de cada tipo de resíduo e as interações que podem ocorrer com o meio.

A CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental) do Estado de São Paulo foi, no ano de 1999, pioneira na regulamentação da aplicação de lodo de esgoto em solos agrícolas, editando o manual técnico P.4.230/99 - Aplicação de lodos de sistema de tratamento biológico em áreas agrícolas. Esse manual foi fundamentado na legislação americana USEPA (United States Environmental Protection Agency), seguindo também recomendações alemãs, e foi de grande importância para elaboração de projetos, estabelecendo procedimentos, critérios e requisitos para ações de implantação e operação de sistemas de aplicação de lodos provenientes das estações de tratamento biológico e despejos líquidos sanitários ou industriais, em áreas agrícolas. A norma exigiu a obediência dos critérios de proteção ambiental e defendeu a aplicação do lodo de esgoto em áreas agrícolas somente nos casos em que fosse comprovado os benefícios para a cultura pretendida.

De acordo com a SABESP (2013a), o bio sólido é um produto resultante do processo de tratamento de esgotos, transformado em adubo rico em MO e nutrientes como N e P, que melhora as condições do solo e beneficia o crescimento das plantas. Apesar disso, a SABESP não recomenda seu uso para adubar culturas que sejam consumidas cruas ou em contato direto com o solo, como batata, cenoura e hortaliças. Ainda, de acordo com a SABESP (2013a), atualmente o bio sólido produzido na ETE de Franca, São Paulo, é utilizado no plantio de café, banana e reflorestamento, auxiliando na reciclagem de nutrientes, repondo a MO da terra e mantendo o solo equilibrado.

Segundo Giordano (1999), os processos de tratamentos dos efluentes líquidos, bem como o tratamento e a possível reutilização dos lodos estão relacionados às características de sua composição, levando-se em conta o grau de tratamento desejado. Para o mesmo autor, também se deve levar em conta aspectos como a legislação ambiental regional, a cultura local, o clima, custos de investimento e operacionais, a quantidade e a qualidade do lodo gerado na ETE, a segurança operacional, a geração de odores e a interação com a vizinhança.

Alguns fatores como variações na composição química dos lodos, diferenças edafoclimáticas, diferentes formas de agricultura e diferenças culturais e históricas, determinam diferenças marcantes entre as legislações americanas e europeias para reutilização de lodos de esgoto e de indústrias em diferentes países (ROSA, 2004).

Ainda de acordo com Rosa (2004), no Brasil é proibido por lei o uso de lodos industriais em solos agrícolas, sendo que ainda existe, uma série de leis e normas, como as Normas Brasileiras Registradas (NBR 10.004, 10.005, 10.006, 10.007) da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), que devem ser analisadas e respeitadas quando se deseja utilizar qualquer tipo de lodo em alguma atividade, inclusive o biossólido.

As Resoluções nº 375 e nº 380, de 29 de agosto de 2006 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto apenas, gerados em ETE e seus produtos derivados, e dá outras providências (CONAMA, 2006). Essa resolução determina as concentrações limites de metais, as cargas cumulativas máximas permitidas para a aplicação em solos agrícolas, presença de patógenos e as espécies para as quais o seu uso é recomendado (GOMES et al., 2013). Com isso a partir do dia 29 de agosto de 2006, todos os projetos e aplicações de lodo de esgoto devem estar de acordo com os requisitos dessa legislação, sob pena de crime ambiental e sanções administrativas.

Desse modo, o uso de lodo de esgoto como fertilizante vegetal em solos agrícolas no Brasil ainda é uma prática pouco expressiva, mas que vêm crescendo. Existe grande carência de pesquisas, definições e elaboração de normas técnicas que regulamentem a aplicação do biossólidos em solos agrícolas de diferentes regiões, bem como em outros ambientes de produção vegetal, como por exemplo, nos viveiros de produção de mudas nativas, prática que pode contribuir para a atual e crescente filosofia da reciclagem.

REFERÊNCIAS

- AFREEN-ZOBAYEDE, F. et al. A combination of vermiculite and paper pulp supporting material for the photoautotrophic micropropagation of sweet potato. **Plant Science**, Limerick, v. 157, p. 225-231, 2000.
- ALBUQUERQUE, K. S. et al. Métodos para a superação da dormência em sementes de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, vol. 31, n. 6, 2007.
- ALMEIDA, A. V. **Flora do nordeste do Brasil segundo Piso e Marcgrave**. Recife: EDUFRPE, 2008. 312 p.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464 p.
- ANDRADE, L. A. et al. Aspectos biométricos de frutos e sementes, grau de umidade e superação de dormência de jatobá. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 2, p. 293-299, 2010.
- ANDRADE, S. R. M. **Princípio da cultura de tecidos vegetais**. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2002. 16 p.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; CARDOSO, P. F. Composto de lodo têxtil em plântula de soja e trigo, **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 549-554, 2005.
- ARRUDA, O. G. et al. Atributos físicos de um latossolo degradado tratado com biossólido há cinco anos. **Científica**, Jaboticabal, v. 41, n. 1, p. 73-81, 2013.
- BANDEIRA, F. S. et al. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. **Árvore**, Viçosa, v. 3, n. 5, p. 773-781, 2007.
- BARBOSA, G. M. C.; TAVARES FILHO, J.; FONSECA, I. C. B. Propriedades químicas de um latossolo vermelho eutroférico após aplicação por dois anos consecutivos de lodo de esgoto. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1501-1505, 2002.

BARREIROS, R. M. et al. Modificações na produtividade e nas características físicas e químicas da madeira de *Eucalyptus grandis* causadas pela adubação com lodo de esgoto tratado. **Árvore**, Viçosa, v. 31, n. 1, p. 103-111, 2007.

BASTIAN, E. Y. O.; ROCCO, J. L. S. **Guia técnico ambiental da indústria têxtil**. São Paulo: CETESB - SINDITÊXTIL, 2009. 85 p.

BERTON, R. S.; NOGUEIRA, T. A. R. Uso de lodo de esgoto na agricultura. In: COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M. **Uso agrícola de lodo de esgoto: avaliação após a resolução nº 375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010. cap. 2, p. 31-50.

BEWLEY, J. D.; BLACK, M. **Seeds: physiology, development and germination**. 2. ed. New York: Plenum Press, 1994. 445 p.

BORÉM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: UFV, 1999. 817 p.

BRADY, N. C.; WEIL, R. R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. 3.ed. Porto Alegre: Bookmam, 2013. 686 p.

BRAGA, A. G. S. **Calogênese em *Annona glabra* L. Annonaceae**. 2012. 46f. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento Regional e Meio Ambiente) – Área de Concentração em Ambiente, Saúde e Sustentabilidade, UFRO, Porto Velho, 2012.

BRANCO, S. M.; CAVINATTO, V. M. **Solos: a base da vida terrestre**. São Paulo: Editora Moderna, 1999. 79 p.

BRASIL. Ministério das Cidades. Secretaria Nacional de Saneamento Ambiental-SNSA. **Sistema Nacional de Informações sobre Saneamento: diagnóstico dos serviços de água e esgotos- 2012**. Brasília: SNSA/MCIDADES, 2014. 164 p.

BUCKERIDGE, M. S. et al. Acúmulo de reservas. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação: do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 2, p. 31-50.

BUENO, L. C. S.; MENDES, N. A. G.; CARVALHO, S. P. **Melhoramento genético de plantas: princípios e procedimentos**. Lavras: UFLA, 2001. 282 p.

CALDAS, L. S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M. E. Meios nutritivos. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, v. 1, 1998. p. 87-132.

CAMARGO, R. et al. Diagnose foliar em mudas de pinhão-mansão (*Jatropha curcas* L.) produzidas com biossólido. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 3, p. 283-290, 2013.

CARDOSO, V. J. M. Dormência: estabelecimento do processo. In: FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação do básico ao aplicado**. Porto Alegre: Artmed, 2004. cap. 5, p. 96-108.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 4. ed. Jaboticabal: Funep, 2000. 588 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 2. ed. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2006. 627 p.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375 e nº 380, de 29 de agosto de 2006. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2006>>. Acesso em: 13 ago. 2015.

COPASA. Companhia de Saneamento de Minas Gerais. **Ligação de esgoto**. 2013a. Disponível em: <http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?infol=657&sid=259>. Acesso em: 2 de out. 2013.

_____. **O Sistema de Esgotos**. 2013b. Disponível em: <http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=10>. Acesso em: 2 de out. 2013.

_____. **Processos de Tratamento**. 2013c. Disponível em: <http://www.copasa.com.br/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=34>. Acesso em: 2 de out. 2013.

CRUZ, A. F. et al. Methods for analysis of seeds of *Bowdichia virgilioides* Kunth. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 40, n. 93, p. 77-84, 2012.

DEBERGH, P. C.; MAENE, L. J. A scheme for comercial propagation of ornamental plants by tissue culture. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 14, p. 335-345, 1981.

DUTRA, L. F.; WENDLING, I.; BRONDANI, G. E. A micropropagação de eucalipto. **Pesquisa Florestal Brasileira**, Colombo, n. 58, p. 49-59, 2009.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro Nacional de Pesquisa de Algodão. **Noções de cultivo de tecidos vegetais por Julita Maria Frota Chagas Carvalho e Márcia Soares Vidal**. Campina Grande: EMBRAPA Algodão, 2003. 39 p.

FACHINELLO, J. C. et al. **Propagação de plantas frutíferas de clima temperado**. 2. ed. Pelotas: UFPel, 1995. 179 p.

FERRARI, M. P.; GROSSI, F.; WENDLING, I. **Propagação vegetativa de espécies vegetais**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2004. 22 p.

FREITAS, R. X.; MELO, G. A. Avaliação do uso de biocomposto de lodo de esgoto como substrato para a produção de mudas. **Revista Monografias Ambientais**, Santa Maria, v. 12, n. 12, p. 2665-2673, 2013.

GALLO, L. A.; CROCOMO, O. J. A. Cultura de tecidos em fitopatologia. In: BERGAMIM FILHO, A.; KIMATI, H.; AMORIM, L. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. São Paulo: Agronômica Ceres, 1995. v. 1, cap. 25, p. 494-506.

GEORGE, E. F. The components of culture media. In: _____. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Great Britain: Exegetice Limited, 1993. cap. 9, p. 273-343.

_____. **Plant propagation by tissue culture**. 2. ed. Edington: Exegetics, 1996. 1361 p.

GIORDANO, G. **Avaliação ambiental de um balneário e estudo de alternativa para controle da poluição utilizando o processo eletrolítico para o tratamento de esgotos**. 1999. 137f. Dissertação (Mestrado em Ciência Ambiental) - UFF, Rio de Janeiro, 1999.

GOLLE, D. P. et al. Seleção de lotes de sementes de *Pinus taeda* L. para a cultura de tecidos. **Cerne**, Lavras, v. 20, n. 2, p. 259-266, 2014.

GOMES, D. R. et al. Lodo de esgoto como substrato para produção de mudas de *Tectona grandis* L. **Cerne**, Lavras, v. 19, n. 1, p. 123-131, 2013.

GOMES, G. A. C. **Propagação *in vitro* de amoreira (*Maclura tinctoria*)**. 1999. 92f. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Fisiologia Vegetal) - Departamento de Agricultura, UFLA, Lavras, 1999.

GRATTAPAGLIA, D.; MACHADO, M. A. Micropropagação. In: TORRES, A. C.; CALDAS, L. S.; BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1999. v. 1, p. 183-260.

HESPANHOL, I. Um novo paradigma para a gestão de recursos hídricos. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 63, 2008.

INSTITUTO CARBONO BRASIL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO. **Água**. 2013. Disponível em: <<http://www.institutocarbonobrasil.org.br/ecossistemas/agua>>. Acesso em: 20 set. 2013.

JUNIO, G. R. Z. et al. Produtividade de milho adubado com composto de lodo de esgoto e fosfato natural de Gafsa. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 7, p. 706-712, 2013.

KERBAUY, G. B. **Fisiologia vegetal**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 452 p.

KOLLER, O. **Environmental control of seed germination**. London: Academic, 1972.

KOZAI, T.; KUBOTA, C. Developing a photoautotrophic micropropagation system for woody plants. **Journal of Plant Research**, Netherlands, v. 114, n. 4, p. 525-537, 2001.

KRAEMER, M. E. P. A questão ambiental e os resíduos industriais. In: ENCONTRO NACIONAL DE ENGENHARIA DE PRODUÇÃO (ENEGEP), 25, 2005, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: Associação Brasileira de Engenharia de Produção, 2005.

LABORIAU, L. G. **A germinação das sementes**. Washington: OEA, 1983. 174 p.

LAMBAIS, M. R.; CARMO, J. B. Impactos da aplicação de biossólidos na microbiota de solos tropicais. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v. 32, n. 3, p. 1129-1138, 2008.

LANDA, F. S. L. et al. Indução *in vitro* de calos em explantes foliares de pequizeiros (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24 (Edição especial), p. 56-63, 2000.

LEMAINSKI, J.; SILVA, J. E. Utilização do bio-sólido da CAESB na produção de milho no Distrito Federal. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 741-750, 2006.

LIMA, M. R. P. **Uso de estufa agrícola para secagem e higienização de lodo de esgoto**. 2010. 284f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica) - Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially- feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. **International Plant Propagation Society Proceedings**, Bellefonte, v. 30, p. 421-427, 1981.

LOBO, T. F. et al. Efeito do lodo de esgoto e do nitrogênio nos fatores produtivos do girassol. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 17, n. 5, p. 504-509, 2013.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas no Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008, 384 p.

MAGELA, M. L. M. et al. Bio-sólido na produção de mudas de eucalipto (*Eucalyptus citriodora* Hook). **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 8, n. 14, p. 166-178, 2012.

MALAVOLTA, E. **Fertilizantes e seu impacto ambiental: micronutrientes e metais pesados, mitos, mistificações e fatos**. São Paulo: ProduQuímica, 1994. 153 p.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Brasília: Mapa/ACS, 2009. 399 p.

MARENCO, R. A.; LOPES, N. F. **Fisiologia vegetal**: fotossíntese, respiração, relações hídricas e nutrição mineral. 3. ed. Viçosa: UFV, 2009. 486 p.

MAZZER, C.; CAVALCANTI, O. A. Introdução à gestão ambiental de resíduos. **Infarma**, Brasília, v. 16, n. 11-12, p. 67-77, 2004.

MOBRICCI, C. A. N. **Adubação mineral, esterco de curral e lodo de esgoto no desenvolvimento inicial do cafeeiro.** 2006. 64f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP, Botucatu, 2006.

MOHAN, R. et al. Use of sugarcane bagasse as an alternative low-cost support material during the rooting stage of apple micropropagation. ***In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant***, Largo, v. 40, p. 408-411, 2004.

MOURA, L. C. **Micropropagação de sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth.).** 2012. 51f. Dissertação (Mestrado em Ciência Florestal) - Faculdade de Ciências Agrárias, UFVJM, Diamantina, 2012.

NATAL, D.; MENEZES, R. M. T.; MUCCI, J. L. N. Fundamentos de ecologia humana. In: PHILIPPI JÚNIOR, A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável.** Barueri: Manole, 2005. cap. 3, p. 57-86.

NOLETO, L. G.; SILVEIRA, C. E. S. Micropropagação de copaíba: propagação *in vitro* de *Copaifera langsdorffii*. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 33, n. 2, p. 109-120, 2004.

PACHECO, M. V.; MATOS, V. P. Método para superação de dormência tegumentar em sementes de *Apeiba tibourbu* Aubl.. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 4, n. 1, p. 62-66, 2009.

PÁDUA, J. G. et al. Germinação de sementes de *Passiflora setacea* e dormência induzida pelo armazenamento. **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, vol. 33, n. 1, p. 80-85, 2011.

PAGANINI, W. S. **Disposição de esgotos no solo: escoamento à superfície.** São Paulo: Fundo Editorial da AESABESP, 1997. 232 p.

PASQUAL, M.; HOFFMANN, A.; RAMOS, J. D. **Cultura de tecidos - tecnologia e aplicações. Introdução: situação e perspectivas.** Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 72 p.

PASQUAL, M. **Textos acadêmicos: meios de cultura.** Lavras: FAEPE/UFLA, 2001. 127 p.

PEIXOTO P. H. P.; PASQUAL M. Micropropagação da videira: efeitos do pH e do ágar. **Ceres**, Viçosa, v. 42, n. 242, p. 431-443, 1995.

PHILIPPI JÚNIOR, A.; MALHEIROS, T. F. Saneamento e saúde pública: integrando homem e ambiente. In: PHILIPPI JÚNIOR, A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri: Manole, 2005. cap. 1, p. 3-32.

PHILIPPI JÚNIOR, A.; MARTINS, G. Águas de abastecimento. In: PHILIPPI JÚNIOR, A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri: Manole, 2005. cap. 5, p. 117-180.

PINHAL, H. F. et al. Aplicações da cultura de tecidos vegetais em fruteiras do cerrado. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 7, p. 1136-1142, 2011.

PINTO, S. A. F.; KOHLER, H. C.; LACERDA, C. A. **Modelo preditivo, sensoriamento remoto e geoprocessamento aplicados à caracterização de indicadores da erosão do solo: análise de cenários em uma bacia hidrográfica**. Belo Horizonte: PUCMinas (Relatório técnico Fapemig, processo CRA81.006/97). 2001.

POGORZELSKI, D. Q.; ROSA, D. S. B.; CASTILHOS, D. D. Atributos microbiológicos e teores de carbono orgânico em um planossolo adubado com lodo têxtil. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E 4ª MOSTRA CIENTÍFICA, 21, 2012, Pelotas. **Anais...** Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2012.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: AGIPLAN, 1985. 289 p.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. **Manual de procedimentos do laboratório de cultura de tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental**. Manaus: EMBRAPA Amazônia Ocidental, 2008. 44 p.

RIBEIRINHO, V. S. et al. Fertilidade do solo, estado nutricional e produtividade de girassol, em função da aplicação de lodo de esgoto. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 166-173, 2012.

RIBEIRO, J. M. et al. **Micropropagação e aclimatização de goiabeira 'Paluma'**, Petrolina: EMBRAPA Semiárido, 2010. 26 p.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil**. 2. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 1990. 296 p.

ROSA, E. V. C. **Reaproveitamento de lodo têxtil em solo florestal: estudos dos aspectos físico-químicos, agrônômicos e ecotoxicológicos**. 2004. 139f. Tese (Doutorado em Química) - UFSC, Florianópolis, 2004.

ROSA-MAGRI, M. M.; MENEGHIN, S. P. Avaliação das características germinativas da espécie arbórea sucupira-preta (*Bowdichia virgilioides* Kunth - Fabaceae). **Bioikos**, Campinas, v. 28, n. 1, p. 3-10, 2014.

SABESP. Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo. **Biossólido**. 2013a. Disponível em: <<http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=60>>. Acesso em: 8 de out. 2013.

_____. **Tratamento de esgotos**. 2013b. Disponível em: <http://site.sabesp.com.br/uploads/file/asabespdoctos/Tratamento_Esgoto_Solido_impresso.pdf>. Acesso em: 8 de out. 2013.

SANTOS-SEREJO, J. et al. Meios Nutritivos para micropropagação de plantas. In: SOUZA, A. S.; JUNGHANS, T. G. **Introdução à micropropagação de plantas**. Cruz da Almas: Embrapa Mandioca e Fruticultura Tropical, 2006, cap. 4, p. 80-98.

SINGHA, S. Influence of two commercial agar on *in vitro* proliferation of ‘Almey’ crabapple and ‘Seckel’ pear. **Hort Science**, Alexandria, n. 19, p. 227-228, 1984.

SMIDERLE, O. J.; SCHWENGBER, L. A. M. Superação da dormência em sementes de Paricarana (*Bowdichia virgilioides* Kunt.). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 33, n. 3, p. 407-414, 2011.

SMIRDELE, O. J.; SOUZA, R. C. P. Dormência em sementes de paricana (*Bowdichia virgilioides* Kunth – Fabaceae - Papilionoideae). **Revista Brasileira de Sementes**, Londrina, v. 25, n. 2, p. 48-52, 2003.

SOARES, F. P. et al. Efeito de meios de cultura, concentrações de GA₃ e pH sobre a germinação *in vitro* de mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, (Edição Especial), p. 1847-1852, 2009.

SOUZA, A. V.; PEREIRA, A. M. S. Enraizamento de plantas cultivadas *in vitro*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 9, n. 4, p. 103-117, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

TEIXEIRA, S. L.; TORRES, A. C. Organização do laboratório de cultura de tecidos de plantas. In: TORRES, A. C., CALDAS, L. S., BUSO, J. A. **Cultura de tecidos e transformação genética de plantas**. Brasília: EMBRAPA-SPI/ EMBRAPA-CNPq, 1998. v. 1, p. 71-86.

TOLEDO, F. F.; MARCOS FILHO, J. **Manual das Sementes: Tecnologia da Produção**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1977. 224 p.

TRIGUEIRO, R. M.; GUERRINI, I. A. Uso de bio-sólido como substrato para produção de mudas de eucalipto. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, n. 64, p. 150-162, 2003.

TUCCI, C. E. M. Águas urbanas: interfaces no gerenciamento. In: PHILIPPI JÚNIOR, A. **Saneamento, saúde e ambiente: fundamentos para um desenvolvimento sustentável**. Barueri: Manole, 2005. cap. 10, p. 375-411.

TUNDISI, J. G. Recursos hídricos no futuro: problemas e soluções. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 22, n. 63, p. 7-16, 2008.

WENDLING, I.; FERRARI, M. P.; GROSSI, F. **Curso intensivo de viveiros e produção de mudas**. Colombo: EMBRAPA Florestas, 2002. 48 p.

WHO. World Health Organization. **Progress on sanitation and drinking water - 2013 update**. 2013. Disponível em: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/81245/1/9789241505390_eng.pdf. Acesso em: 2 de out. 2013.

XAVIER, A.; OTONI, W. C.; PENCHEL, R. M. Micropropagação e enxertia *in vitro* de espécies florestais. In: BORÉM, A. **Biotecnologia florestal**. Viçosa: UFV, 2007. cap. 3, p. 55-74.

XAVIER, A.; SANTOS, G. A.; OLIVEIRA, M. L. Enraizamento de miniestaca caulinar e foliar na propagação vegetativa de cedro-rosa (*Cedrela fissilis* Vell.). **Árvore**, Viçosa, v. 27, n. 3, p. 351-356, 2003.

XAVIER, A.; WENDLING, I.; SILVA, R. L. **Silvicultura Clonal: princípios e técnicas**. Viçosa: UFV, 2009. 272 p.

ZEITOUNI, R. F. Análise Crítica da Norma CETESB P 4.230 – “Aplicação de Lodos de Sistemas de tratamento Biológico em Áreas Agrícolas – Critérios Para Projeto e Operação”. 2005. 267f. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical – Gestão dos Recursos Agroambientais). IAC, Campinas, 2005.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO: LODO DE ESGOTO TRATADO NO CULTIVO *IN VITRO* DE *Bowdichia virgilioides* Kunth.

Autores: Robert Marques de Oliveira, Lucas Batista de Souza, Renan Terassi Pinto,
Ronaldo Luiz Mincato, Breno Régis Santos

Artigo redigido conforme normas da Revista Pesquisa Agropecuária Tropical

Lodo de esgoto tratado no cultivo *in vitro* de *Bowdichia virgilioides* Kunth.

Resumo: A sucupira-preta propaga-se principalmente por meio de sementes, as quais possuem grande dureza tegumentar dificultando a disseminação da espécie. O objetivo desse trabalho foi adequar uma metodologia ao estabelecimento *in vitro* da sucupira-preta, utilizando lodo de esgoto tratado ou biossólido. Sementes foram inoculadas em tubos de ensaio com WPM mais biossólido e com biossólido apenas, em diferentes concentrações. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 7 com 14 tratamentos e 8 repetições por tratamento), com fator presença e ausência de meio WPM e fator concentração de biossólido (ausência; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 g L⁻¹). Os tubos foram mantidos em sala de crescimento até o 41º dia, quando foram avaliados: número de folhas; comprimento da parte aérea; área da maior folha; número de gemas; número de raízes secundárias; comprimento da raiz principal; espessura do caule e massa seca da planta inteira. A presença do biossólido apenas, foi significativa influenciando de forma direta as variáveis área foliar, número de raízes secundárias e número de gemas. Houve influência do biossólido de forma significativa nos tratamentos onde há interação deste com meio WPM apenas para variável comprimento da raiz principal. Quanto as demais variáveis, número de folhas, comprimento da parte aérea, espessura de caule e massa seca, não houve resultado significativo para os tratamentos com a presença do biossólido apenas. Os resultados mostraram que a suplementação do meio com o biossólido é possível, contribuindo para uma produção *in vitro* mais econômica e de qualidade da sucupira-preta.

Palavras-chave: sucupira-preta; biossólido; concentrações; meio WPM; micropropagação.

Treated sewage sludge to *in vitro* culture of *Bowdichia virgilioides* Kunth.

Abstract: Sucupira-preta propagation is mainly by seeds, which has a hard thickness affecting his own dissemination. This study aim to adjust one methodology to *in vitro* establishment of sucupira-preta using treated sewage sludge or the biosolids. Seeds were inoculated in two tube tests, one with WPM plus biosolids medium and another with only biosolids with different concentrations. The experimental design was entirely randomized and the treatments were arranged in a factorial scheme (2 x 7 with 14 treatments and 8 repetitions by each treatment), with presence and absence factor of WPM medium and the biosolids concentration factor (absence, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10 g L⁻¹). Test tubes were maintained in growing room until the 41th day and it was evaluated the number of leaves, aerial part length, leaf area measurements, the number of buds, the number of secondary roots, the length of the main root, the thickness of the stem and the mass of dry matter of the whole plant. The biosolids presence has only significantly influence directly to leaf area, number of secondary roots and number of buds variables. The biosolids more WPM medium has only significantly influence to the length of the main root. As for the other variables such as the number of leaves, aerial part length, the thickness of the stem and the drier mass, the

results showed no significance to those treatments with only biosolids presence. Results showed that supplementation of medium with the biosolids is possible, contributing to a safe quality *in vitro* production of sucupira-preta.

Key-words: Sucupira-preta, biosolids, concentration, WPM medium, micropropagation.

INTRODUÇÃO

A espécie *Bowdichia virgilioides* Kunth., conhecida popularmente como sucupira-preta é uma planta arbórea, pertencente à família Fabaceae e se caracteriza por apresentar madeira densa, resistente e de alta durabilidade. É uma planta pioneira, decídua e heliófila, não tolerando baixas temperaturas e pode atingir até 15 m de altura e 60 cm de DAP (Diâmetro a altura do peito), além de se adaptar bem a solos secos e pouco férteis (Dalanhol et al. 2014). Ela é amplamente usada na confecção de móveis de luxo, acabamentos internos, construções variadas, além de possuir uso medicinal, paisagístico e na recomposição de áreas degradadas (Lorenzi 2008).

Apesar de possuir vasta ocorrência no cerrado brasileiro, sua propagação é realizada principalmente por meio de sementes, as quais possuem dormência tegumentar, dificultando a germinação, que apresenta taxas entre 0 e 2% sem a superação da dormência, e entre 45 e 88 % com a superação (Carvalho 2014).

A micropropagação é uma técnica de produção de mudas recomendada para espécies que têm dificuldade de germinação e armazenamento, além de permitir maximização da qualidade e melhor uniformidade dos plantios, já que possibilita a utilização de genótipos selecionados (Moura et al. 2012). Essa é a técnica da cultura de tecidos mais difundida no setor florestal, pois poupa tempo e espaço (Xavier & Otoni 2009).

As técnicas de micropropagação utilizam meios de cultura, que são soluções pré-fabricadas contendo as quantidades ideais dos nutrientes que as mudas necessitam,

oferecendo às plantas as possibilidades de germinação, crescimento e manutenção da condição *in vitro* até chegarem ao ponto da aclimatização e posterior comercialização.

Não obstante as inúmeras vantagens, os meios de cultura utilizados na propagação de mudas *in vitro* representam grande parte dos custos finais de produção, muitas vezes inviabilizando a atividade de produção de mudas em larga escala.

Devido aos percentuais consideráveis de matéria orgânica (MO), e de elementos essenciais às plantas, o lodo de esgoto tratado ou bio sólido, pode substituir, ainda que parcialmente, os fertilizantes minerais usados em plantações agrícolas (Arruda et al. 2013) reduzindo os custos de produção em diversas culturas (Lemainski & Silva 2006), além de viabilizar uma destinação sustentável para este resíduo (Ribeirinho et al. 2012).

Dessa forma, o bio sólido, assim chamado após o processo de estabilização, pode ser utilizado, de maneira inovadora, em substituição total ou parcial aos meios de cultura tradicionais usados na produção de mudas vegetais *in vitro* com objetivos comerciais e de redução de custos.

Considerando a escassez de pesquisas que utilizam o bio sólido como fonte de nutrientes na produção *in vitro* de mudas, o objetivo deste trabalho foi adequar uma metodologia ao estabelecimento *in vitro* da sucupira-preta, utilizando diferentes concentrações deste resíduo.

MATERIAL E MÉTODOS

As sementes de sucupira-preta foram coletadas em uma população próxima a cidade de Campos Gerais - MG, com localização central a 21° 14' de latitude sul e 45° 44' de longitude a oeste de Greenwich e altitude de 884 m. Após serem selecionadas com o mesmo padrão de tamanho e normalidade, as sementes foram armazenadas por seis meses em recipientes de vidro e mantidas a temperatura ambiente controlada de 22° C e umidade relativa média de 30%.

O biossólido utilizado foi produzido na ETE da cidade de Paraguaçu – MG, administrada pela companhia municipal COSÁGUA (Concessionária de Saneamento Básico). A ETE de Paraguaçu realiza o tratamento biológico anaeróbico distribuindo o esgoto em 3 reatores UASB, de onde o lodo é retirado periodicamente, através de válvulas de controle, e disposto em leitos de secagem para a desidratação natural.

A amostragem do biossólido ocorreu no dia 18 de dezembro de 2013 e foram coletadas alternadamente 9 amostras representativas dos 3 tanques de secagem dos lodos da ETE. As amostras foram preparadas para os ensaios físicos e químicos, quando foram secas em estufa à temperatura média de 60° C por 4 dias. Em seguida, as amostras foram moídas, quarteadas e armazenadas em recipientes plásticos e encaminhadas para o laboratório para realização dos ensaios físicos e químicos.

Para avaliar se o lodo utilizado atendia à legislação brasileira foram analisados os metais pesados Cd, Pb, Ni, Cr, Cu e Zn, devido ao potencial tóxico desses elementos. A solubilização das amostras foi feita pela digestão com água-régia (Melo & Silva 2008) e os metais quantificados por Espectroscopia de Emissão com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES). Os teores obtidos foram comparados com os limites legais estabelecidos pelas Resoluções CONAMA n° 375 e n° 380 (CONAMA 2006).

A preparação das sementes de sucupira-preta e o processo de inoculação foram feitos em câmara de fluxo laminar. Primeiramente, procedeu-se com a desinfestação, colocando-as por 60 segundos em contato com etanol 70% seguidos por 5 minutos de imersão em hipoclorito de sódio e imersão em ácido sulfúrico concentrado (98 %) por 10 minutos para superar a dormência tegumentar, e finalmente, 3 enxágues com água destilada autoclavada.

As sementes foram inoculadas em tubos de ensaio (25 x 150 mm), vedados com algodão e uma camada de plástico filme transparente, contendo 30 mL de meio de cultura básico WPM (Lloyd & Mccown 1981). As concentrações do biossólido moído foram

adicionadas aos tratamentos que receberam o resíduo. As misturas foram solidificadas com 7 g L⁻¹ de ágar Himedia[®], tiveram seu pH ajustado para 5,8 ± 0,1 e foram autoclavadas por 15 minutos a 121° C e pressão de 1 atm. Foi inoculada uma semente por tubo. Após, os tubos foram mantidos em sala de crescimento com foto período de 16 horas, intensidade luminosa de 36 μmol.m⁻².s⁻¹ e temperatura de 25 ± 2° C, até o 41º dia, quando foram feitas as avaliações.

Os tratamentos foram divididos da seguinte maneira: T1 (primeiro controle) com meio WPM apenas; T2 ao T7 com meio WPM mais concentrações crescentes de bio sólido; T8 ao T13 contendo apenas bio sólido em concentrações crescentes; e T14 (segundo controle) contendo apenas água, conforme Tabela 1.

Tabela 1. Descrição dos 14 tratamentos realizados, com presença e ausência de WPM e concentrações do bio sólido.

Tratamentos	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14
Meio WPM ⁽¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Bio sólido ⁽²⁾	0	1	2	4	6	8	10	1	2	4	6	8	10	0

(1) + indica presença e - indica ausência do meio de cultura.

(2) Unidade do bio sólido considerada em g L⁻¹.

Depois de 41 dias da inoculação, foram avaliados: número de folhas; comprimento da parte aérea; área foliar (maior folha); número de gemas; número de raízes secundárias; comprimento da raiz principal; espessura do caule e massa seca. Os dados foram submetidos à análise de variância no software SAS[®], pelo procedimento GLM usando LSMEAN, e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey-Kramer considerando o nível de 5% de significância. O delineamento foi inteiramente casualizado em esquema fatorial (2 x 7, com 14 tratamentos e 8 repetições por tratamento), com fator presença e ausência de meio WPM e fator concentração de bio sólido (ausência; 1,0; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10 g L⁻¹). Para as variáveis número de gemas e número de raízes secundárias foi feita a transformação

logarítmica para correção de normalidade. A área foliar foi medida pelo software Image Tool[®] UTHSCSA IT (University of Texas, San Antônio, TX, USA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Caracterização do bio sólido

A caracterização química do bio sólido revelou a presença de importantes nutrientes para o desenvolvimento vegetal. Foram identificados os micronutrientes: ferro (Fe), manganês (Mn), zinco (Zn), boro (B), cobre (Cu) e molibdênio (Mo); e os macronutrientes: nitrogênio (N), potássio (K), fósforo (P), cálcio (Ca), enxofre (S) e magnésio (Mg).

A quantidade de K encontrada foi menor por quilograma de bio sólido, de 410 mg Kg⁻¹, quando comparada com a quantidade desse nutriente presente em 1 litro do meio WPM (Tabela 2). Para Lobo et al. (2012), normalmente, a concentração de K em bio sólidos é baixa para suprir as necessidades das culturas agrícolas. Apesar disso, os autores destacam que o resíduo geralmente contém teores elevados de nitrogênio N e bons teores de P e micronutrientes essenciais, como Fe e Zn, todos encontrados no bio sólido usado neste estudo (Tabela 2).

Os valores típicos de N, P, e K presentes em bio sólidos provenientes dos esgotos domésticos, são sempre menores quando comparados com fertilizantes para uso agrícola, sendo que, apesar disso, o bio sólido não deixa ter um papel importante no desenvolvimento vegetal bem como no condicionamento dos solos (Jordão & Pessoa 2005). Quando o bio sólido é aplicado no solo como única fonte de N para as plantas, as quantidades de micronutrientes presentes neste insumo são, na maioria das vezes, suficientes para atender às demandas nutricionais da cultura (Andreoli et al. 2001).

Além do K, a média de sódio (Na) foi significativamente menor por quilograma do bio sólido usado em relação à quantidade do elemento presente em 1 litro do meio WPM. Já

os teores de N, P, Ca, Mg, S, Zn, Cu, Mn, Fe, B e Mo, estão presentes em 1 quilograma do resíduo em concentrações superiores as encontradas em 1 litro do meio WPM (Tabela 2).

Além dos macros e micronutrientes a caracterização química do resíduo revelou a presença de alguns elementos-traço como cádmio (Cd), cromo (Cr), cobre (Cu), molibdênio (Mo), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn). Embora estejam presentes, as concentrações desses elementos por quilograma do biossólido estão abaixo das permitidas pelas Resoluções nº 375 e nº 380 de 2006, do CONAMA (Tabela 2).

Para Egiarte et al. (2006), apesar dos benefícios apontados para as plantas, os biossólidos geralmente possuem uma parcela significativa de elementos considerados poluidores, como por exemplo, os metais pesados, além da possibilidade de carregar microrganismos patogênicos (Cesar et al. 2010). Nogueira et al. (2013) e Bramryd (2013) têm observado aumentos constantes nos teores de metais pesados em solos e em plantas que recebem o resíduo, alertando para o fato do uso crescente do biossólido como fonte nutricional associado ao pouco conhecimento. Ainda para os autores, essa prática pode provocar alterações nos solos, devido a gama de componentes possíveis no resíduo, além de interações desconhecidas que podem ocorrer com o meio ambiente.

Segundo Andrade et al. (2014), alguns elementos-traço, como por exemplo, Cu, Mo, Ni e Zn, presentes no biossólido estudado (Tabela 2), são essenciais às plantas. A saúde humana também depende de certos elementos como Se, Cr, Cu e Zn. Porém, alguns elementos, em determinadas concentrações, são considerados tóxicos aos seres vivos, como por exemplo, As, Ba, Cd, Hg e Pb. Ainda de acordo com os autores, a presença e a quantidade desses elementos no biossólido é um dos fatores que pode limitar o uso deste resíduo em solos agrícolas e na nutrição vegetal.

Tabela 2. Comparação dos elementos químicos presentes do meio WPM com os encontrados no biossólido utilizado; teores médios dos elementos traço encontrados no biossólido; e valores máximos permitidos pelas Resoluções nº 375 e nº 380 do CONAMA (CONAMA, 2006).

Elemento	Meio WPM	Biossólido ⁽¹⁾	CONAMA
	mg L ⁻¹	mg Kg ⁻¹	
Nitrogênio	172,95	30280 ± 1,41	-
Fósforo	37,50	6540 ± 0,75	-
Potássio	541,50	410 ± 0,32	-
Cálcio	169,00	40500 ± 12,48	-
Magnésio	74,00	4320 ± 1,96	-
Enxofre	238,74	11010 ± 2,18	-
Zinco	3,47	861,14 ± 160,58	2800
Cobre	0,09	134,66 ± 14,03	1500
Manganês	7,97	243,45 ± 17,02	-
Ferro	10,24	24880,30 ± 2188,63	-
Boro	1,10	119,89 ± 12,31	-
Níquel	-	16,54 ± 1,22	420
Chumbo	-	46,16 ± 4,98	300
Cádmio	-	0,49 ± 0,10	39
Molibdênio	0,09	1,51 ± 0,43	50
Sódio	5,09	0,04 ± 0,00	-
Alumínio	-	24346,90 ± 1590,76	-
Cromo	-	83,46 ± 11,66	1000
Arsênio	-	-	41
Bário	-	-	1300
Mercúrio	-	-	17
Selênio	-	-	100

(1) Médias e erro padrão de 9 amostras retiradas dos leitos de secagem.

Portanto, em que pese o uso de quantidades adequadas, o biossólido como fonte de nutrientes pode ser feito de maneira segura em ambientes controlados, tais como a produção de mudas *in vitro*, em relação ao seu uso em áreas agrícolas ou florestais, onde estão em contato irrestrito com o meio ambiente.

É importante salientar que ao adicionar o biossólido ao meio de cultura WPM, a

mistura apresentou características visuais de cor cada vez mais escura à medida em que se aumentou a concentração desse resíduo nos tratamentos (Anexo A).

Crescimento das plantas

Os resultados obtidos apontam que para o número de folhas, apenas o fator meio WPM foi significativo ($p < 0,0001$), sendo que o fator concentração de biossólido não influenciou nessa variável ($p = 0,2296$), independentemente das concentrações aplicadas. Para os tratamentos onde o meio WPM estava presente a média foi de 6,36 unidades de folhas, enquanto que na ausência foi de 3,95.

Uma possível explicação é o fato do biossólido utilizado conter metais na sua composição, ainda que abaixo dos níveis permitidos pelo CONAMA (Tabela 2), influenciado o desenvolvimento das plantas, já que em outro estudo semelhante, o número de folhas também foi menor quando o substrato padrão para cultivo de *Phaseolus mungo* L. (Fabaceae) *in vivo* foi adicionado de biossólido, e esse efeito foi atribuído à entrada de metais no protoplasma, resultando em perdas de metabólitos intermediários essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta (Chandra et al. 2008).

Em relação ao meio de cultura utilizado, Disarz & Martins-Corder (2009), comparando o número de folhas de *Acacia mearnsii* (Fabaceae) em resposta aos meios de cultura WPM e MS, que apresentou 25% de redução da concentração dos principais sais, obtiveram melhores médias com o meio MS, com 5,30 contra 4,52 folhas por explante. Os autores atribuíram esse resultado à redução na concentração dos principais sais do meio MS, que se caracteriza por conter o dobro de sais do meio WPM. Para Quisen & Ângelo (2008) o meio MS se caracteriza por conter maior concentração de minerais. Ao analisarmos a composição do biossólido utilizado (Tabela 2) podemos perceber uma grande concentração de minerais em relação ao meio WPM. Desse modo, a composição mineral do resíduo provavelmente influenciou em um menor número de folhas em relação aos tratamentos com

meio WPM.

O comprimento da parte aérea diferiu-se significativamente apenas quanto a ausência ou presença de WPM ($p < 0,0001$). Quanto a concentração de biossólido não houve diferença entre os tratamentos ($p = 0,5463$). Os maiores comprimentos foram encontrados nos tratamentos que receberam o meio WPM, com média de 46,18 cm. Já os menores comprimentos ocorreram nos tratamentos sob influência única do biossólido, com média de 34,46 cm.

Sugere-se que esses resultados sejam explicados pela composição equilibrada de sais e minerais presentes no meio WPM, oferecendo melhores condições para o crescimento, influenciando por exemplo, na passagem de água durante a fase de embebição das sementes. De acordo com George (1993), as soluções de sais e açúcares que compõem os diferentes meios de cultura usados no cultivo *in vitro*, não exercem efeito apenas nutritivo, mas influenciam no crescimento celular e na morfogênese por meio de propriedades osmóticas. Desse modo, a combinação de alguns nutrientes e sais em maior quantidade no biossólido pode ter influenciado na etapa inicial de germinação das sementes, resultando em um crescimento menor das mudas quando o suprimento nutricional do vegetal foi proveniente apenas do resíduo.

A área foliar foi significativamente diferente entre os tratamentos com duas concentrações de biossólido ($p = 0,0228$), sendo que a concentração de 2 g L^{-1} foi a que induziu a maior área ($1,43 \text{ cm}^2$), enquanto a de 6 g L^{-1} a menor ($0,90 \text{ cm}^2$), conforme a Figura 1. O fator meio de cultura não diferiu estatisticamente entre os tratamentos ($p = 0,2063$), ou seja, a resposta é similar com ou sem a adição de biossólido ao meio de cultura.

De modo semelhante, Singh & Agrawal (2007) observaram melhores resultados para área foliar de *Beta vulgaris* (Amaranthaceae) à medida que aumentaram as concentrações de biossólido aplicadas no solo até determinada faixa, sendo que o aumento da concentração de

metais pesados presentes no biossólido resultou no acúmulo desses elementos tanto na raiz quanto na parte aérea, prejudicando o desenvolvimento dessas estruturas. O mesmo efeito pode ter ocorrido neste estudo, onde a presença do biossólido em relação a do WPM resultou em menores médias para parte aérea e para o número de folhas, porém, em contrapartida, levou à uma maior área foliar.

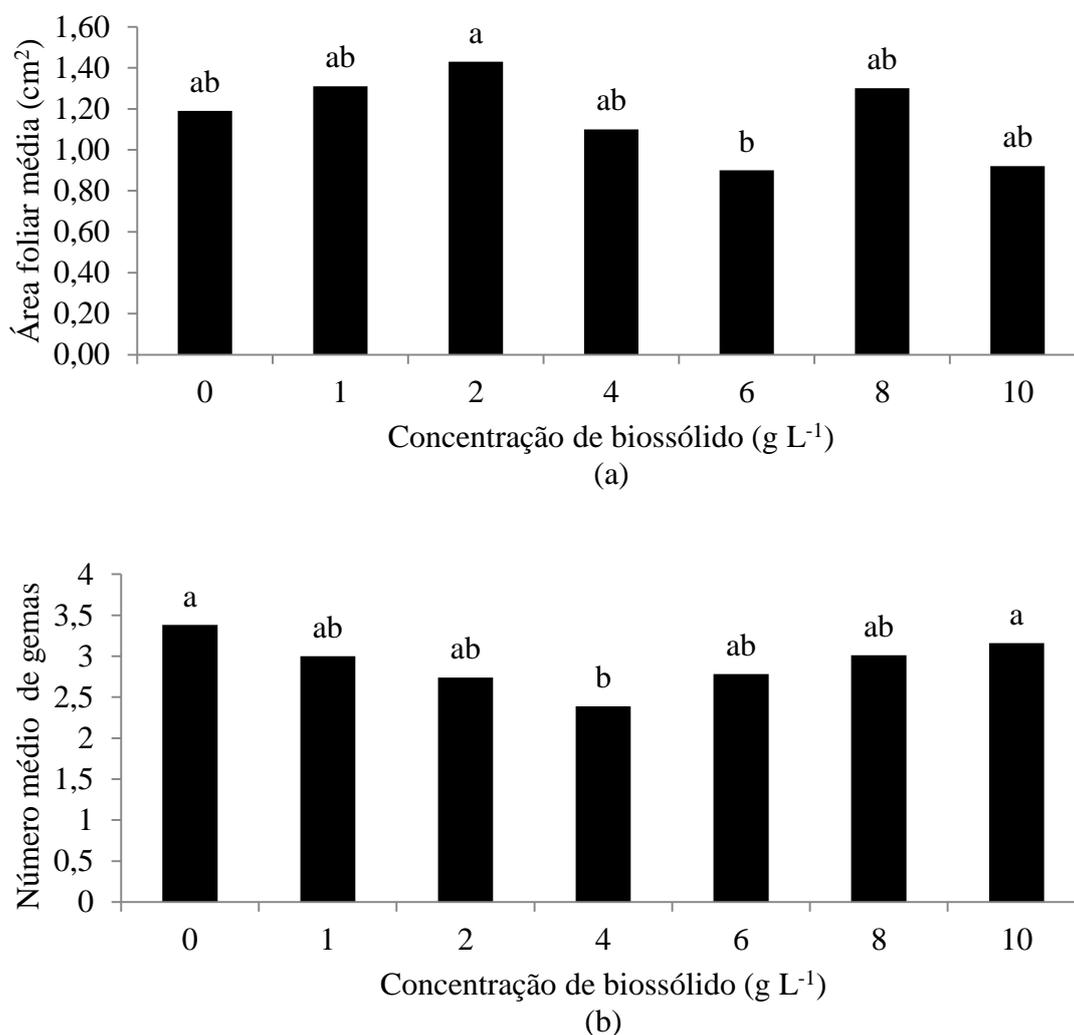


Figura 1. Médias dos tratamentos e efeitos das concentrações de biossólido sobre área foliar média (a) e número médio de gemas (b). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Segundo Favarin et al. (2002) a superfície foliar de uma planta é a base do rendimento potencial de determinada cultura, sendo, portanto, um importante parâmetro indicativo de

adaptação e produtividade por meio do processo fotossintético. Durante o tempo em que as plantas estão *in vitro* a fotossíntese exerce pouca influência no seu desenvolvimento. Porém, uma maior área foliar obtida com o uso do biossólido, auxiliaria as mudas a partir do momento que saíssem do ambiente *in vitro* para a etapa de aclimatização e rustificação, momento em que de acordo com Bandeira et al. (2007) as plantas passam de uma condição heterotrófica para a autotrófica, sofrendo variados estresses fisiológicos que podem comprometer a qualidade das mudas.

Quanto ao número de gemas, o fator meio de cultura foi significativo ($p < 0,0001$), sendo que na sua ausência houve média menor na produção de gemas, de 2,42 contra 3,51. Ainda para o número de gemas, o fator concentração de biossólido também foi significativo ($p = 0,0014$).

O número de gemas só foi significativamente diferente entre os controles, juntamente com os tratamentos com 10 e 4 g L⁻¹ de biossólido. Portanto, foi observado uma tendência de redução no número médio de gemas até a concentração de 4 g L⁻¹ e em seguida, um aumento até a concentração de 10 g L⁻¹, retomando as condições normais de desenvolvimento (Figura 1).

Embora a resposta do número de gemas seja reduzida em relação aos controles, ao aumentar inicialmente a concentração de biossólido até um ponto médio crítico de 4 g L⁻¹, a presença deste começa a compensar o papel do meio WPM onde ele está ausente, elevando novamente o valor da variável resposta, ou seja, há uma concentração mínima na qual o biossólido é requerido para que tenha efeito similar ao do meio de cultura WPM.

Em relação ao fator meio WPM, em um estudo realizado com espécie *Acacia mearnsii* (Fabaceae) foram testados o desempenho de 4 tipos de meios de cultura (MS, B₅, WPM e SP), sendo que todos promoveram a formação de gemas axilares, embora o meio MS tenha obtido as melhores médias de gemas por explante (3,66) seguido do meio WPM

(3,06), evidenciando a superioridade do meio MS na multiplicação de gemas axilares dessa espécie de lenhosa, devido ao fato desse meio nutritivo possuir o dobro da concentração de minerais e maior força iônica (Disarz & Martins-Corder 2009). Portanto, no presente estudo, quando comparamos o efeito do meio WPM e do bio-sólido, podemos sugerir que o resíduo resultou em maiores médias devido a maior carga mineral característica.

É importante ressaltar que as concentrações de bio-sólido testadas foram significativas, de forma não linear para área foliar e número de gemas, e não foi possível o ajuste de um modelo de regressão. Esses resultados sugerem uma inter-relação concentração-órgão, ou seja, a porção de nutrientes e recursos disponíveis em determinada concentração pode ser crítica para o desenvolvimento vegetal, mas se manifesta, significativamente, em órgãos específicos devido as suas respectivas mobilidades.

Quanto ao número de raízes secundárias, tanto o fator meio de cultura ($p = 0,0112$) quanto o fator concentração de bio-sólido ($p < 0,0001$) foram significativos. A ausência do meio induziu à formação de um maior número médio de raízes secundárias, em qualquer concentração de bio-sólido, respectivamente de 5,51 para 3,54 (Figura 2). Os controles e os tratamentos com até 2 g L^{-1} de bio-sólido apresentaram as maiores médias, ou seja, maior formação de raízes secundárias. Já nos tratamentos com concentrações a partir de 4 g L^{-1} do bio-sólido, o número de raízes secundárias é reduzido para menos de um terço do valor encontrado para os tratamentos com ausência deste (Figura 2).

A disponibilidade nutritiva mais equilibrada na presença do meio WPM provavelmente induziu um desenvolvimento de raízes secundárias em uma quantidade menor em relação aos tratamentos com as concentrações do bio-sólido, ao passo que na ausência do meio WPM a nutrição das plântulas foi influenciada, sobretudo, pela alta concentração de nutrientes do bio-sólido. A maior disponibilidade de nutrientes resultante das concentrações superiores a 4 g L^{-1} de bio-sólido, pode ter inibido parcialmente a

formação de novas raízes secundárias, uma vez que isso implica na redução mais acentuada do potencial hídrico do meio, resultando em uma consequente inibição da iniciação de raízes secundárias, bem como a limitação do alongamento dessas estruturas (Liang et al. 1996).

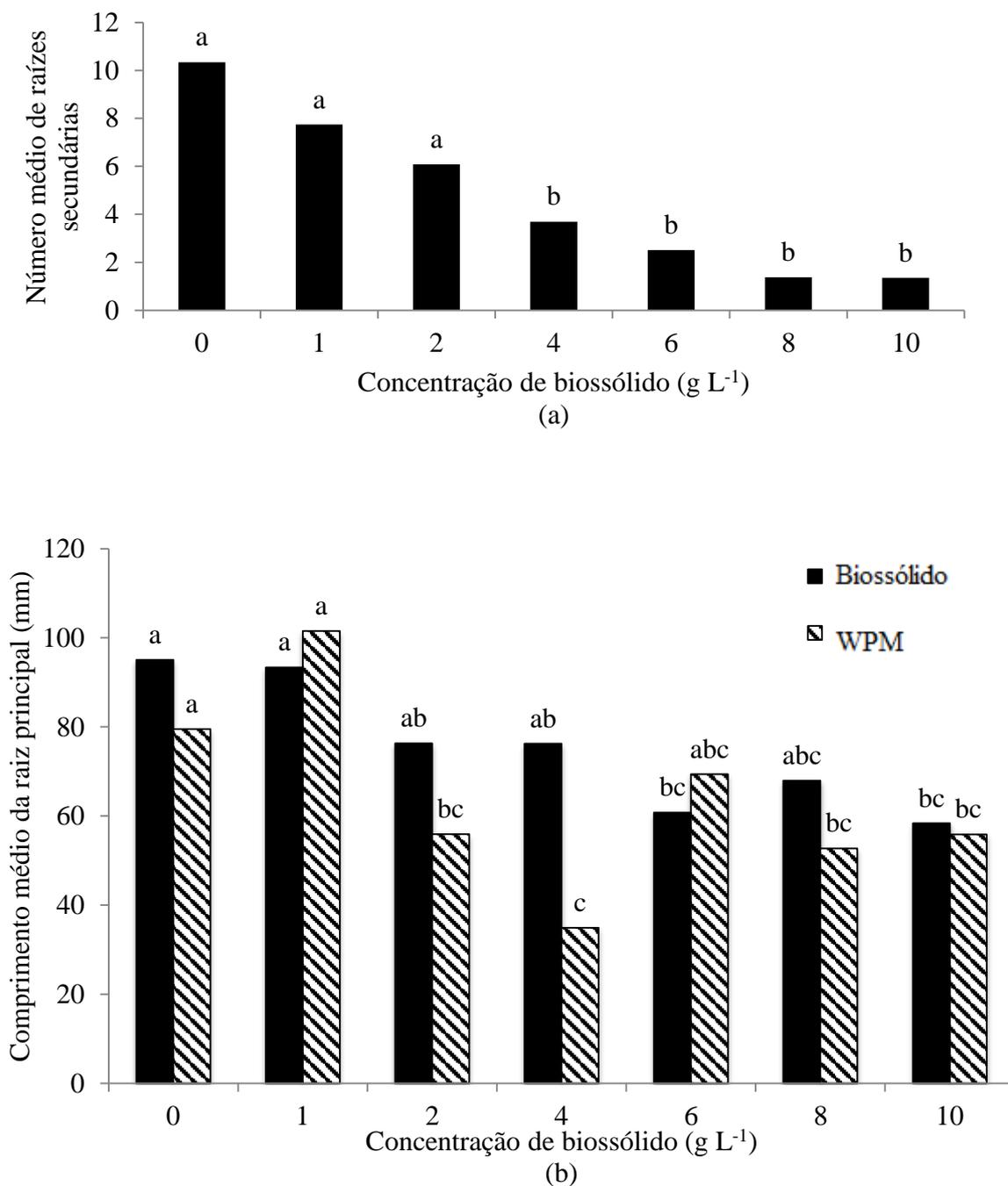


Figura 2. Médias dos tratamentos e efeitos das concentrações de biossólido sobre o número de raízes secundárias (a) e sobre a interação do meio WPM com biossólido para o comprimento médio da raiz principal (b). Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Em relação ao meio de cultura, Reis et al. (2012) testando quatro tipos de meio de cultura (WPM, SH, MS e SBH) em duas concentrações de sacarose (1,5 e 3 %) no cultivo *in vitro* de embriões de pessegueiro, obteve as menores médias para o número de raízes secundárias com o meio WPM. De acordo com os autores, o desenvolvimento desses embriões melhora quando realizados em meios com maiores concentrações salinas e de sacarose. Da mesma forma, no presente estudo, quando comparamos o efeito do meio WPM e do bio sólido, podemos inferir que o resíduo resultou em maiores médias para essa variável, devido à maior carga mineral e salina característica. Outro fator importante a ser considerado é a possibilidade de algum componente do bio sólido apresentar certa toxicidade, inibindo a formação de raízes secundárias. Sabe-se que o alumínio trivalente (Al^{3+}) leva a uma rápida inibição do alongamento de raízes por elevar subitamente os níveis de etileno e desregular o transporte de basípeto de auxina (Sun et al. 2010). Portanto, a alta concentração de Al no bio sólido (Tabela 2) pode ter influenciado essa resposta.

Para a variável comprimento da raiz principal a interação entre o meio WPM e bio sólido foi significativa ($p=0,0166$). Concentrações de até 4 g L^{-1} de bio sólido sem o meio WPM não induziram respostas diferentes entre si, do mesmo modo quando se usou o meio sem o bio sólido, referindo-se ao controle, ou até 1 g L^{-1} do bio sólido combinado com o meio WPM. A partir de 4 g L^{-1} do bio sólido o crescimento foi menor (Figura 2).

Contudo, devido à interação apresentada, a concentração de 4 g L^{-1} resultou em diferença significativa quanto à presença do meio WPM ($p=0,0002$), sendo o comprimento da raiz principal menor na combinação de ambos (Figura 2). Portanto, assim como a concentração de 4 g L^{-1} já foi um marco de diferença para o número de raízes secundárias, ela também se mostrou relevante quanto ao comprimento da raiz principal. Tendo em vista que o tratamento com 4 g L^{-1} de bio sólido sem meio WPM seguiu a média dos demais tratamentos ($p\geq 0,4624$), sugere-se que seja devido ao estresse causado pela adição do

biossólido não ser suplantada pela concentração do mesmo, ou seja, a sensibilização provocada para a captação dos nutrientes não equivale ao seu potencial em fomentar o desenvolvimento da raiz.

Em um estudo com sucupira-preta, Albuquerque et al. (2013) testaram o desenvolvimento da espécie em diferentes substratos, sendo que o solo de cerrado resultou em menor comprimento para a raiz principal. Os autores atribuíram esse efeito a alta quantidade de argila presente nesse substrato, o que prejudicou a aeração das raízes das mudas. O mesmo efeito pode ter ocorrido no presente estudo, em decorrência da grande concentração de material orgânico, que deixou o meio bastante denso, atrapalhando a respiração das raízes.

Quanto a espessura do caule, não houve diferença entre os tratamentos sendo que as concentrações de biossólido não induziram resposta significativa ($p=0,3102$). O mesmo foi observado quanto ao uso do meio ($p=0,6028$) e a interação entre meio e concentração do biossólido ($p=0,1638$). A saber, a espessura dos caules variou de 0,54 a 0,62 mm. É importante destacar que o diâmetro de plântulas é, de modo geral, a variável mais avaliada para inferir sobre a capacidade de sobrevivência de mudas no campo, aponta Nóbrega et al. (2007), sendo altamente indicada quando da definição da concentração de biossólido a ser utilizada nos tratamentos. Portanto, uma vez que as concentrações dos tratamentos não diferiram dos controles, espera-se uma boa sobrevivência das mudas estabelecidas com suplementação do biossólido, em uma posterior fase de aclimatização.

A massa seca também não diferiu entre os tratamentos quanto ao fator WPM ($p=0,9696$), à concentração de biossólido ($p=0,2205$) e à interação entre ambos ($p=0,4605$). Estes resultados salientam que o biossólido utilizado não afetou a capacidade intrínseca de fixação de carbono durante o desenvolvimento das plântulas nos 41 dias em que estiveram sob a sua influência.

CONCLUSÕES

1. O biossólido coletado na ETE de Paraguaçu – MG se adéqua a legislação brasileira com relação ao conteúdo dos metais pesados quantificados, sendo possível seu uso como fonte nutricional na produção *in vitro* de plantas.
2. Para a variável número de raízes secundárias, os melhores resultados foram obtidos até a concentração de 2 g L⁻¹ de biossólido; para a área foliar e comprimento da raiz principal até 4 g L⁻¹; e para o número de gemas as menores médias foram obtidas até a concentração de 4 g L⁻¹, tendo a partir daí aumento progressivo até 10 g L⁻¹.
3. A formação de mudas de sucupira-preta *in vitro* usando biossólido como fonte alternativa de nutrientes é possível.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, A. N. et al. Crescimento de mudas de sucupira-preta em diferentes substratos. *Revista Trópica- Ciências Agrárias e Biológicas*, Chapadinha, v. 7, n. 3, p. 208-2017, 2013.
- ANDRADE, M. G. et al. Trace elements in two oxisols after annual application of sewage sludge for thirteen years. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 35, n. 1, p. 135-148, 2014.
- ANDREOLI, C. V.; PEGORINI, E. S.; FERNANDES, F. Disposição de lodo no solo. In: ANDREOLI, C. V.; SPERLING, M. von; FERNANDES, F. *Lodos de esgotos: Tratamento e disposição final*. Belo Horizonte: UFMG, Companhia de Saneamento do Paraná (SANEPAR), 2001. p.319-395.
- ARRUDA, O. G. et al. Atributos físicos de um latossolo degradado tratado com biossólido há cinco anos. *Científica*, Jaboticabal, v. 41, n. 1, p. 73–81, 2013.
- BANDEIRA, F. S. et al. Aclimação *ex vitro* de plantas propagadas pela enxertia *in vitro* de *Eucalyptus urophylla* x *E. grandis*. *Árvore*, Viçosa, v. 3, n. 5, p. 773 - 781, 2007.
- BRAMRYD, T. Long-term effects of sewage sludge application on the heavy metal concentrations in acid pine (*Pinus sylvestris* L.) forests in a climatic gradient in Sweden. *Forest Ecology and Management*, Amsterdam, v. 289, p. 434-444, 2013.
- CARVALHO, P. E. R. *Espécies arbóreas brasileiras*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2014.

- CESAR, R. et al. Biodisponibilidade de contaminantes em solos brasileiros tratados com lodo de esgoto: uma abordagem ecotoxicológica utilizando bioensaios com organismos aquáticos e edáficos. *Geochimica Brasiliensis*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 41-49, 2010.
- CHANDRA, R.; YADAV, S.; MOHAN, D. Effect of distillery sludge on seed germination and growth parameters of green gram (*Phaseolus mungo L.*). *Journal of Hazardous Materials*, Amsterdam, v. 152, n. 1, p. 431-439, 2008.
- CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 375 e nº 380, de 29 de agosto de 2006. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiano1.cfm?codlegitipo=3&ano=2006>. Acesso em: 13 ago. 2015.
- DALANHOL, S. J. et al. Teste de condutividade elétrica em sementes de *Bowdichia virgilioides* Kunth. *Floresta e Ambiente*, v. 21, n. 1, p. 69-77, 2014.
- DISARZ, R.; MARTINS CORDER, M. P. Multiplicação de gemas axilares de *Acacia mearnsii* DE WILD. sob diferentes meios de cultura. *Árvore*, Viçosa, v. 33, n. 4, p. 599-606, 2009.
- EGIARTE, G. et al. Study of the chemistry of and acid soil column and of the corresponding leachates after the addition of an anaerobic municipal sludge. *Chemosphere*, Oxford, v. 65, n. 11, p. 2456-2467, 2006.
- FAVARIN, J. L. et al. Equações para a estimativa do índice de área foliar do cafeeiro. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 37, n. 6, p. 769-773, 2002.
- GEORGE, E. F. *Plant propagation by tissue culture*. Edington: Exegetics. 1993.
- JORDÃO, E. P.; PESSÔA, C. A. *Tratamento de esgotos domésticos*. Rio de Janeiro: ABES, 2005.
- LEMAINSKI, J.; SILVA, J. E. Utilização do biossólido da CAESB na produção de milho no Distrito Federal. *Revista Brasileira de Ciência de Solo*, Viçosa, v. 30, n. 4, p. 741-750, 2006.
- LIANG, J.; ZHANG, J.; WONG, M. H. Effects of air-filled soil porosity and aeration on the initiation and growth of secondary roots of maize (*Zea mays*). *Plant and Soil*, Springer, v. 186, n. 2, p. 245-254, 1996.
- LLOYD, G.; MCCOWN, B. Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *International Plant Propagation Society Proceedings*, Council of Fremont, v. 30, p. 421-427, 1981.
- LOBO, T. F.; GRASSI FILHO, H.; COELHO, H. A. Efeito da adubação nitrogenada na produtividade do girassol. *Científica*, Jaboticabal, v. 40, n. 1, p.59-68, 2012.
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras – manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MELO, L. C. A.; SILVA, C. A. Influência de métodos de digestão e massa de amostra na recuperação de nutrientes em resíduos orgânicos. *Química Nova*, São Paulo, v. 31, p. 556-561, 2008.

MOURA, L. C. et al. Micropropagação de sucupira-preta por meio de gemas axilares. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 47, n. 12, p. 1691-1698, 2012.

NOGUEIRA, T. A. et al. Short-term usage of sewage sludge as organic fertilizer to sugarcane in a tropical soil bears little threat of heavy metal contamination. *Journal of Environmental Management*, London, v. 114, p. 168-177, 2013.

NÓBREGA, R. S. A. et al. Utilização de biossólido no crescimento inicial de mudas de aroeira (*Schinus terebynthifolius* Raddi). *Árvore*, Viçosa, v. 31, n.2, p. 239-246, 2007.

QUISEN, R. C.; ANGELO, P. C. S. *Manual de procedimentos do Laboratório de Cultura de Tecidos da Embrapa Amazônia Ocidental*. Manaus: EMBRAPA. 2008.

REIS, L. et al. Estratificação *in vitro* de embriões zigóticos de pessegueiro em diferentes meios de cultura e concentrações de sacarose. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 653-660, 2012.

RIBEIRINHO, V. S. et al. Fertilidade do solo, estado nutricional e produtividade de girassol, em função da aplicação de lodo de esgoto. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, v. 42, n. 2, p. 166-173, 2012.

SINGH, R. P.; AGRAWAL, M. Effects of sewage sludge amendment on heavy metal accumulation and consequent responses of *Beta vulgaris* plants. *Chemosphere*, Oxford, v. 67, n. 11, p. 2229-2240, 2007.

SUN, P. et al. Aluminium-induced inhibition of root elongation in *Arabidopsis* is mediated by ethylene and auxin. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 61, n. 2, p. 347-356, 2010.

XAVIER, A.; OTONI, W. C. Aplicações da micropropagação na clonagem de *eucalyptus* no Brasil. *Agronomía Costarricense*, San José, v. 33, n. 2, p. 303-307, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os parâmetros que não diferiram em relação a presença ou não do meio de cultura são indícios diretos de que a suplementação do meio com o biossólido utilizado para a cultura *in vitro* é possível. Por outro lado, os parâmetros onde o fator meio teve distinção merecem ponderação em relação a concentração de biossólido a ser utilizada.

Estudos complementares visando à padronização dos teores de cada componente do biossólido podem auxiliar na melhoria da resposta do crescimento e desenvolvimento das plantas. Além disso, estudos futuros podem abordar métodos que possibilite ainda mais, a redução dos custos de produção de mudas *in vitro*, associando, por exemplo, o biossólido com outros meios de cultura e com agentes de solidificação alternativos, citados neste estudo.

ANEXO A – Etapas do procedimento experimental

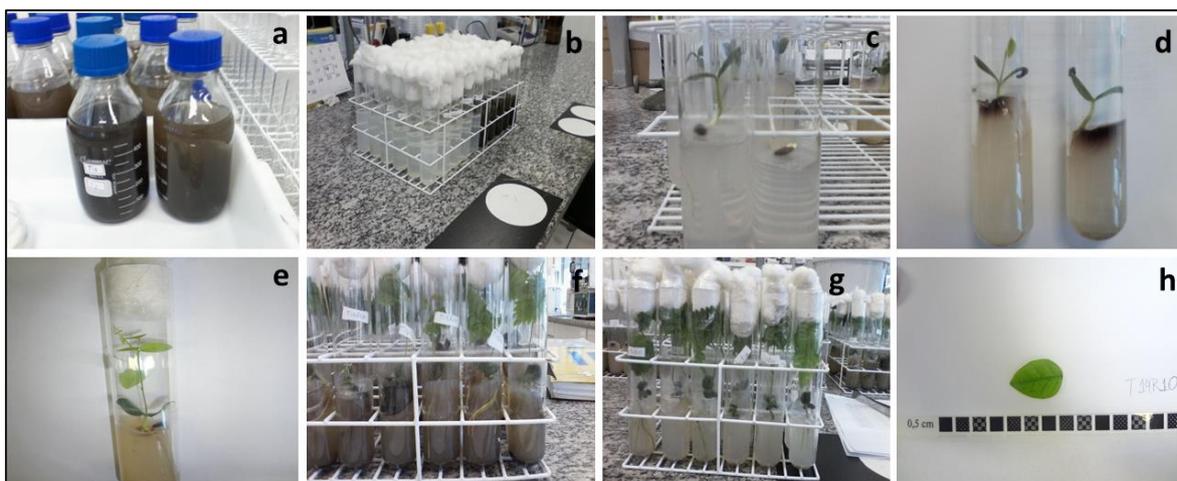


Figura 3 - Resumo das etapas do procedimento experimental. Meios de cultura preparados com o bio-sólido (a); meios de cultura nos tubos de ensaio prontos para serem autoclavados (b); germinação e desenvolvimento inicial das sementes (c); mudas nos primeiros estágios de desenvolvimento (d) (e); mudas com 41 dias, prontas para serem avaliadas (f) (g); folha preparada para medição da área foliar (h).

Fotos: Arquivo pessoal.