

**Universidade de São Paulo  
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Potencial de biodegradação de resíduos por *Pleurotus* spp.**

**Joyce Ribeiro de Paula Santos**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2014**

Joyce Ribeiro de Paula Santos  
Bacharela em Ciências Biológicas

**Potencial de biodegradação de resíduos por *Pleurotus* spp.**

Orientador:  
Profa. Dra. **REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO**

Dissertação apresentada para obtenção do título de  
Mestra em Ciências. Área de concentração:  
Microbiologia Agrícola

**Piracicaba  
2014**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP**

Santos, Joyce Ribeiro de Paula  
Potencial de biodegradação de resíduos por *Pleurotus* spp. / Joyce Ribeiro de  
Paula Santos. - - Piracicaba, 2014.  
110 p : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", 2014.

1. Resíduos 2. Fungos 3. Biodegradação 4. Toxicidade 5. *Zea mays* 6. *Helianthus  
annuus* I. Título

CDD 589.222  
S237p

**"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte - O autor"**

## **DEDICO**

Aos meus pais, Donaldo e Maria Rita, pelo apoio, carinho, amor e afeto incondicional; exemplos de caráter para toda vida.

Aos meus irmãos, Alexandre e Donaldo, que mesmo distantes sempre me apoiaram nas minhas decisões.



## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, pela oportunidade, confiança, respeito e paciência durante o curso e elaboração deste trabalho.

À CAPES e ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado.

À Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz e ao Programa de Microbiologia Agrícola pela oportunidade de realizar este projeto.

Aos técnicos Luis Eduardo, Tatinha, Gustavo e Alexandra pelo auxílio e pelas análises realizadas.

Aos amigos de laboratório, Gilda, Gabriela, Gleison, Gislayne, Camila, Vinícius, João, Djanira, Natalya, Tâmara e ao técnico Luis Eduardo pelo respeito, boa convivência e muitos momentos de alegria durante esses dois anos.

Agradecimento em especial a Gilda e Gabriela, por me ajudar nos experimentos, na análise estatística, pelas conversas, risadas, enfim pela amizade.

À teacher Fabiana, pela amizade, conversar, risadas e por me apresentar uma das pessoas mais importantes em minha vida.

A Camila Rossetti, pelas conversas, churrascos, caronas para casa e pela amizade.

A Aline (Biju) pela amizade e companheirismo durante a graduação e mestrado.

Ao Rodrigo, pelo carinho, amizade, afeto, amor, ajuda e apoio nos momentos difíceis ao meu lado. Que continuemos com este sentimento por muitos e muitos anos.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio, incentivo e carinho.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, a Deus por todas as dádivas recebidas e por me conceder mais esta conquista.

## EPÍGRAFE

"Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível"

Charles Chaplin





## SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT .....	13
LISTA DE FIGURAS .....	15
LISTA DE TABELAS .....	17
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	19
1 INTRODUÇÃO .....	21
2 OBJETIVO.....	23
2.1 Objetivo geral .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	25
3.1 Lodo .....	25
3.2 Vinhaça e bagaço.....	29
3.3 Fungos e degradação .....	31
3.3.1 <i>Pleurotus</i> .....	33
3.4 Histórico de trabalhos desenvolvidos .....	34
3.5 Ecotoxicologia .....	35
3.6 Determinações dos efeitos dos poluentes no solo na flora .....	37
3.7 Análises de Elementos Químicos.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1 Coleta do Material .....	39
4.2 Fungos .....	39
4.3 Armazenamento e cultivo dos fungos .....	39
4.4 Desenvolvimento de <i>P. sajor-caju</i> CCB020 e <i>P. ostreatus</i> em lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar .....	40
4.5 Determinações dos efeitos dos poluentes no solo na flora .....	41
4.5.1 Cultivo de <i>Zea mays</i> e <i>Helianthus annuus</i> em lodo de ETA, vinhaça, bagaço em substrato comercial .....	41
4.6 Digestão das amostras e Análise dos Elementos .....	43
4.7 Testes toxicológicos .....	44
4.7.1 Teste de sensibilidade.....	44
4.7.2 <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	45

4.7.3 <i>Daphnia similis</i> .....	46
4.7.4 <i>Hydra attenuata</i> .....	47
4.7.5 Análises estatísticas .....	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	49
5.1 Análise do lodo .....	49
5.2 Análise da vinhaça.....	52
5.3 Desenvolvimento de <i>P. sajor-caju</i> CCB020 e <i>P. ostreatus</i> em lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar.....	54
5.4 Análise de <i>Zea mays</i> e <i>Helianthus annuus</i> em lodo de ETA, vinhaça, bagaço de cana-de-açúcar e substrato comercial.....	58
5.5 Concentração de elementos em <i>Zea mays</i> e <i>Helianthus annuus</i> .....	68
5.6 Testes Toxicológicos .....	80
6 CONCLUSÕES.....	87
REFERÊNCIAS .....	89
ANEXOS.....	103

## RESUMO

### Potencial de biodegradação de resíduos por *Pleurotus* spp.

O lodo gerado nas estações de tratamento de água (ETA) possui muitos elementos químicos provenientes dos sólidos em suspensão e dos produtos adicionados durante o processo de tratamento da água. A vinhaça é um resíduo originado da destilação do álcool etílico que apresenta alta BDO, BQO, turbidez, condutividade, alta concentração de sólidos, açúcares e compostos fenólicos. Fungos do gênero *Pleurotus* são organismos decompositores que por meio de vários mecanismos são capazes de crescer e degradar compostos de composição complexa, presentes nos poluentes ambientais. O presente estudo objetiva avaliar os efeitos proporcionados pelo tratamento por fungos do gênero *Pleurotus* em uma mistura de lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar e posteriormente aplicada como aditivo agrícola no plantio de milho e girassol. Foram realizadas análises físicas e químicas do lodo e da vinhaça assim como testes toxicológicos, com organismos padronizados, dos resíduos separadamente e da mistura antes e depois do tratamento fúngico. As plantas foram analisadas quanto às biomassas frescas e secas, o comprimento radicular e da parte aérea e quantificados os elementos químicos por ICP OES. Os resultados caracterizaram o lodo como argiloso, com alta concentração de Fe e Mn e a vinhaça com alta BDO, BQO, turbidez, condutividade, alta concentração de sólidos, açúcares, sulfato, fosfato, K, Ca e Mg. O desenvolvimento de *Pleurotus* na mistura de resíduos incorporada ao bagaço proporcionou um aumento nas variáveis: taxa germinativa dos cultivares, biomassa fresca e desenvolvimento radicular e aéreo significativo e maiores que o controle, em plântulas avaliadas aos de 30 dias de crescimento. Os elementos se concentraram nas raízes de ambas as culturas com 30 dias de desenvolvimento em misturas tratadas com *P. ostreatus*, sendo Al, Fe, Ca, K e  $\text{SO}_4^-$  os mais concentrados e na parte aérea foram K, Ca e  $\text{SO}_4^-$ . Os testes de toxicidade mostram que a toxicidade da vinhaça e do lodo foi maior do que a toxicidade da mistura. A toxicidade da mistura após o crescimento de *Pleurotus* foi menor do que a toxicidade da mistura sem o crescimento fúngico.

Palavras-chave: Resíduos; Fungos; Biodegradação; Toxicidade; *Z. mays*; *H. annuus*



## ABSTRACT

### Potential of wastes biodegradation by *Pleurotus* spp.

The sludge generated in the water treatment plant (WTP) has many chemicals from the suspended solids and from the products added during the water treatment process. The vinasse is a waste originated from the distillation of ethyl alcohol characterized by high values of BOD, COD, turbidity, conductivity, solids, sugars and phenolic compounds. Fungi of the genus *Pleurotus* are decomposers organisms that through various mechanisms are able to grow and degrade compounds of complex composition, present in environmental pollutants. This study aims to evaluate the effects given by the treatment by fungi of the genus *Pleurotus* to a mixture of water treatment plant sludge, vinasse and bagasse from sugar cane and later applied as an agriculture additive for corn and sunflower crops. Physical and chemical analysis of the sludge and vinasse as well as standard toxicological tests concerning the waste itself and of the mixed before and after fungal treatment were performed. Plants were analyzed for fresh and dry biomass, root and shoot and chemical elements were quantified by ICP OES. Results showed that the sludge is silty clayey with high concentrations of Fe and Mn; vinasse, on the other way, was found to present high levels of BOD, COD, turbidity, conductivity, solids, sugars, sulfate, phosphate, K, Ca and Mg. Evaluating seedling at 30 days of growth, the development of *Pleurotus* incorporated in the mixture of the crushed waste caused an increase on the following parameters: cultivars germination rate, fresh biomass and the mean root and shoot development larger than the control. On both cultures 30 days old and treated by *P. ostreatus*, elements were shown to be concentrated on the roots being Al, Fe, Ca, K and SO<sub>4</sub><sup>-</sup> the most concentrated. On the shoots, the most common elements were K, Ca and SO<sub>4</sub><sup>-</sup>. The toxicity tests showed that the toxicity of the vinasse and of the sludge, singly, was greater than the toxicity of the mixture. The toxicity of the mixture after the growth of *Pleurotus* was lower than the toxicity of the mixture without fungal growth.

Keywords: Wastes; Fungi; Biodegradation; Toxicity; *Z. mays*; *H. annuus*



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de um sistema de produção e distribuição de água.....	25
Figura 2 – Esquema das etapas de incorporação da mistura e plantio de milho e girassol.....	44
Figura 3 – Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de <i>H. attenuata</i> ....	48
Figura 4 – Crescimento de <i>P. sajor-caju</i> e <i>P. ostreatus</i> em lodo, bagaço e vinhaça após 15 dias de crescimento.....	55
Figura 5 - Porcentagem germinativa de <i>Z.mays</i> .....	58
Figura 6 – Porcentagem germinativa de <i>H. annuus</i> .....	59
Figura 7 – Dados médios do crescimento radicular e aéreo de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	60
Figura 8 – Dados médios do crescimento radicular e aéreo de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	61
Figura 9 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de <i>H. annuus</i> com 30.....	62
Figura 10 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	62
Figura 11 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	64
Figura 12 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	64
Figura 13 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de <i>H. annuus</i> com 30 dias.....	65
Figura 14 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	66
Figura 15 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	68
Figura 16 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	69
Figura 17 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	69
Figura 18 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	70



Figura 19 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	70
Figura 20 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>Z. mays</i> com 30 dias.....	71
Figura 21 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	71
Figura 22 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>Z. mays</i> com 60 dias.....	72
Figura 23 – Dados médios de concentração de elementos nas raízes de <i>H. annuus</i> com 30 dias.....	73
Figura 24 – Dados média de concentração de elementos nas raízes menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>H. annuus</i> com 30 dias.....	36
Figura 25 – Dados médios de concentração de elementos nas raízes de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	74
Figura 26 – Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	74
Figura 27 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de <i>H. annuus</i> com 30 dias.....	75
Figura 28 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>H. annuus</i> com 30 dias.....	75
Figura 29 – Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	79
Figura 30 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>H. annuus</i> com 60 dias.....	76
Figura 31 - Dados médios de concentração de elementos nas flores de <i>H. annuus</i> .....	77
Figura 32 - Dados médios de concentração de elementos nas flores menores que 10 mg kg <sup>-1</sup> de <i>H. annuus</i> .....	77

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração média dos elementos químicos, em mg kg <sup>-1</sup> , presentes em lodo do floculador.....	27
Tabela 2 – Programação utilizada para digestão de raízes e parte aérea de <i>Z. mays</i> e <i>H. annuus</i> .....	44
Tabela 3 – Meio de cultivo de <i>R. subcaptata</i> .....	45
Tabela 4 – Meio de cultivo de <i>D. similis</i> .....	47
Tabela 5 – Meio de cultivo de <i>H. attenuata</i> .....	47
Tabela 6 - Características do lodo do floculador da ETA Capim Fino .....	50
Tabela 7 – Elementos presente na vinhaça bruta.....	53
Tabela 8 - Valor de pH da vinhaça de acordo com a concentração.....	53
Tabela 9 - Dados médios de biomassa das flores de <i>H. annuus</i> .....	66
Tabela 10 - Concentração de inibição (CI <sub>50</sub> ) para <i>R. subcapitata</i> e concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuatta</i> expostas a NaCl em g L <sup>-1</sup> .....	81
Tabela 11 - Concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuata</i> expostas a vinhaça diluída a 50%.....	82
Tabela 12 - Concentração de inibição (CI <sub>50</sub> ) para <i>R. subcaptata</i> e concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuata</i> expostas ao ao elutriato do lodo v/v.....	82
Tabela 13 - Concentração de inibição (CI <sub>50</sub> ) para <i>R. subcaptata</i> e concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuata</i> expostas ao elutriato da mistura de resíduos.....	84
Tabela 14 - Concentração de inibição (CI <sub>50</sub> ) para <i>R. subcaptata</i> e concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuata</i> expostas ao elutriato da mistura tratada com <i>P. sajor-caju</i> .....	85
Tabela 15 - Concentração de inibição (CI <sub>50</sub> ) para <i>R. subcaptata</i> e concentração letal (CL <sub>50</sub> ) para <i>D. similis</i> e <i>H. attenuata</i> expostas ao elutriato da mistura tratada com <i>P. ostreatus</i> .....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AWWA – American Water Works Association

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

CL50 – concentração letal a 50% dos organismos testados

CI50 – concentração de inibição a 50% dos organismos testados

DBO – demanda bioquímica de oxigênio

DQO – demanda química de oxigênio

ETA – lodo de estação de tratamento de água

ISO – International Organization for Standardization

ICP OES – espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado

MEA – extrato de malte + ágar

MnP – manganês peroxidase

pH – potencial hidrogênico

CMRA – Capacidade máxima de retenção de água



## 1 INTRODUÇÃO

O lodo é um resíduo gerado durante o processo de tratamento da água. Esse processo envolve as etapas de floculação e decantação que são as principais responsáveis pela geração do lodo. Durante a etapa de floculação são adicionados vários coagulantes que tem o papel de aderir às partículas presentes em suspensão na água. De maneira geral, o lodo é formado por água, produtos químicos, sólidos, nutrientes, matéria orgânica, areia, argila, silte, organismos e micro-organismos. Entretanto, as características do lodo dependem das substâncias encontradas nos corpos d'água, dos coagulantes adicionados no processo de potabilidade da água, sendo que esses fatores refletem a saúde do manancial/ corpo d'água em questão. Atualmente a demanda por água potável está aumentando e por consequência há o aumento da geração de lodo, gerando a necessidade de tratamento e destinos adequados desse resíduo.

A ETA Capim Fino do município de Piracicaba trata a água do rio Corumbataí e usa os coagulantes cloreto férrico e hidróxi-cloreto de polialumínio (PAC). A geração de lodo nesta estação não é controlada, mas é estimado que ocorra a geração de 1,2 toneladas por dia. Este lodo é caracterizado por alta umidade, baixa relação C/N e a presença de muitos elementos como Al, Fe e Mn. O CONAMA 357 (2005) estabelece que o lodo pode ser descartado em corpos hídricos, desde que obedeça as condições e os parâmetros estabelecidos por essa resolução. Entretanto, o lodo contém muitas moléculas que não são analisadas ou detectadas e que causam efeitos a saúde ambiental e humana; sendo assim, o descarte deste resíduo nos rios causa um impacto ambiental. Alternativas viáveis e ambientalmente vantajosas devem ser propostas levando em consideração as características físicas, químicas, biológicas e ecotoxicológicas do lodo. O lodo pode ser utilizado como aditivo agrícola desde que a concentração de elementos não seja elevada, já que sua aplicação em solos pode aumentar a concentração de micronutrientes e estabilizar o pH. Entretanto, para elevar a concentração de macronutrientes o lodo deve estar associado a outros resíduos, como palha, bagaço, vinhaça e entre outros (TEIXEIRA; MELO; SILVA, 2005).

A vinhaça é um resíduo gerado durante a destilação do álcool, sendo que sua constituição básica é formada por água, matéria orgânica, K, Ca, Mn,  $\text{SO}_4^-$ ,

melanoidinas e compostos fenólicos. O poder poluente da vinhaça é cerca de 100 vezes maior do que o esgoto devido a alta quantidade de matéria orgânica, baixo pH e alta DBO e DQO. O despejo de vinhaça nos corpos hídricos provoca o aumento da atividade microbiana, diminuição da concentração de  $O_2$ , provoca a morte de animais aquáticos e plantas e a contaminação dos corpos hídricos. Entretanto, a adição de vinhaça nos solos proporciona o aumento da atividade microbiana, aumento das condições físicas do solo, estabilidade do pH e aumento da mobilidade de nutrientes. Porém, a aplicação não deve ser maior do que a capacidade de retenção de íons no solo (CHRISTOFOLETTI et al., 2013).

Assim como a vinhaça, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial, com produção anual de mais 170 milhões de toneladas no ano de 2013 (COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO - CONAB). O estado de São Paulo possui a maior geração de bagaço, uma vez que é o maior produtor de cana-de-açúcar do país. Este resíduo representa uma potencial matéria prima que pode ser inserida em diversos setores como a fermentação e também pode ser utilizado na incorporação de áreas degradadas juntamente com outros resíduos orgânicos. O bagaço é formado por moléculas de lignina, celulose e hemicelulose; sendo assim, micro-organismos que possuem enzimas capazes de quebrar essas moléculas podem degradar esse resíduo e liberar outros compostos que podem ser utilizados por outros organismos. Os fungos apresentam características interessantes que podem ser utilizadas na degradação de resíduos, uma vez que o modo de crescimento permite a colonização de grandes áreas. Os Basidiomicetos são tolerantes a substâncias e poluentes e a natureza não específica das enzimas do sistema ligninolítico permite que misturas complexas de poluentes sejam degradadas. A ação de enzimas como manganês peroxidase, peroxidase e lacase produzidas por fungos do gênero *Pleurotus* podem degradar alguns poluentes e resíduos, como a vinhaça e o bagaço.

Tendo por bases essas características, o presente trabalho tem o intuito de utilizar uma mistura de resíduos – como lodo de ETA e vinhaça acrescidos de bagaço de cana-de-açúcar – como substrato para o crescimento de fungos do gênero *Pleurotus* e posteriormente avaliar a adição desta mistura tratada no crescimento de culturas de milho e girassol.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar os efeitos proporcionados pelo crescimento de fungos do gênero *Pleurotus* na degradação e desintoxicação de uma mistura de resíduos, como lodo de ETA e vinhaça, acrescidos de bagaço de cana-de-açúcar.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a toxicidade da mistura de resíduos formada por lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar com e sem tratamento obtido pelo crescimento de *P. sajor- caju* e *P. ostreatus*;
- Avaliar o potencial de utilização da mistura de resíduos tratada, para o desenvolvimento de culturas, testando milho e girassol, aplicando a Norma Associação Brasileiro de Normas Técnicas; International Organization Standardization (ABNT NBR ISO 11269-2, 2009);
- Avaliar a presença dos elementos químicos nas diferentes partes das plantas, como raiz e parte aérea;





### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Lodo

O lodo de Estações de Tratamento de Água (ETA) é um resíduo proveniente do processo de potabilidade da água. Esse processo envolve várias etapas, mas as que estão envolvidas com a geração de lodo são coagulação/floculação e decantação (RICHTER, 2001) como mostra a Figura 1.

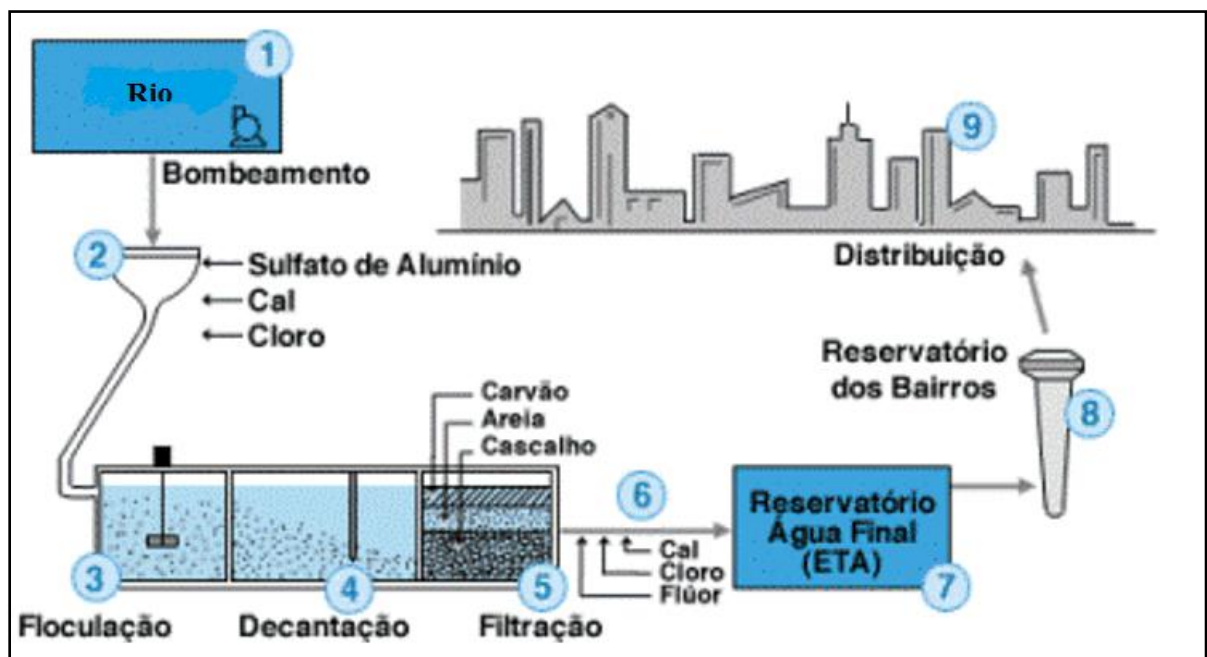


Figura 1 - Esquema de um sistema de produção e distribuição de água. Fluxo operacional (1) Manancial de abastecimento (2) Aplicação de produtos químicos (3) Sistema de flocculação (4) Sistema de decantação (5) Sistema de filtração (6) Aplicação de cloro, flúor e cal (7) Reservatório da ETA (8) Reservatório elevado (9) CETESB, 2009

Na etapa de coagulação/floculação são adicionados à água sais de alumínio e ferro na forma de sulfatos ou cloretos e polímeros catiônicos e aniônicos, que se juntam as partículas suspensas na água e são posteriormente decantadas e separadas da água (BAIRD, 2007). Os resíduos gerados pelas ETAs refletem a saúde do manancial utilizado, uma vez que contem os compostos tóxicos presentes nas amostras brutas e as moléculas de sulfato férrico e de alumínio, adicionadas como coagulantes (CORDEIRO, 1999; SARON; LEITE, 2001). No Brasil cerca de 80% das ETAs utilizam o processo convencional (com as etapas de coagulação/floculação/decantação/filtração) para tratamento da água. A demanda por água potável e a má qualidade da água está exigindo maiores concentrações de

produtos químicos nas ETAs, gerando maior quantidade de lodo (BOTERO et al., 2009).

De modo geral, o lodo é constituído por água, sólidos suspensos, sólidos orgânicos e inorgânicos (20 a 35%), matéria orgânica, micro e macro nutrientes, metais potencialmente tóxicos (BOTERO et al., 2009), organismos, micro-organismos, coloides, areia, argila, silte e produtos químicos provenientes dos corpos d'água ou que foram adicionados nas etapas do tratamento da água (KARVELAS; KATSOYIANNIS; SAMARA; 2003). Entretanto, as características do lodo gerado na ETA em cada estação estão relacionadas à qualidade da água bruta, ao tipo e a quantidade dos produtos químicos adicionados na estação e ao desempenho do processo de tratamento (SUNDEFELD-JUNIOR, 2007). O lodo de ETA de uma estação em Manaus/AM apresenta 68,90% de matéria orgânica devido à alta quantidade de matéria orgânica presente na água bruta captada proveniente do Rio Negro/AM (BOTERO et al., 2009).

A ETA Capim Fino localizada no município de Piracicaba trata aproximadamente 1.500 litros de água por segundo captada do rio Corumbataí. Esse volume de água representa 90% do total de água destinada ao abastecimento público da cidade de Piracicaba. O tratamento é do tipo convencional completo, envolvendo as etapas de oxidação, coagulação, floculação, decantação, filtração, fluoretação, desinfecção e correção do pH final. No tratamento da água, essa ETA utiliza cloreto férrico ou hidróxi-cloreto (PAC) como coagulantes e cloro, cal, carvão e flúor, os quais removem as impurezas e fazem a desinfecção da água (DI BERNARDO; DANTAS, 2005). A quantidade de lodo gerado por essa ETA não é controlada, mas é estimado que ocorra a produção de 1,2 toneladas por dia, se a quantidade de sólidos suspensos presente nas águas estiver entre 0,3 a 1,0% do volume de água tratada (MESSIAS, 2013).

Messias (2013) caracterizou o lodo de ETA retirado do floculador da estação Capim Fino como uma amostra com partículas finas, alta umidade, baixa relação C/N e a presença dos seguintes elementos mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração média dos elementos químicos, em  $\text{mg kg}^{-1}$ , presentes em lodo do floculador

<b>Elementos</b>	<b>Coleta 1</b>	<b>Coleta 2</b>
Al	-	76061
As	7,45	<LD
B	-	183
Ba	405	832
Be	1,35	1,65
Ca	6152	12341
Cd	0,23	<LD
Co	19,50	59,20
Cr	28,40	162
Cu	37,00	57,60
Fe	42020	106760
Hg	0,15	<LD
K	3486	4589
Li	-	30,30
Mg	4793	5650
Mn	4750	21218
Mo	1,10	466
Na	196	596
Ni	18,70	42,90
Pb	25,10	161
Se	0,39	3,04
Sr	-	114
Ti	0,41	-
V	93,20	205
Zn	144	2015
U	2,22	-

<LD – Concentração menor que o limite de detecção do método

Fonte: MESSIAS (2013)

Segundo a NBR 10.004/871 e a Lei Estadual 12.493/992 o lodo é classificado como resíduo sólido que deve ser minimizado, reutilizados e/ou reciclado. O lançamento dos lodos nos corpos hídricos é regulado pela resolução CONAMA 357 (2005), desde que os descartes obedeçam às condições, padrões e

exigências estabelecidas por essa resolução. Por isso, antes de realizar os descartes dos resíduos, os mesmos devem ser analisados física, química e biologicamente e descartados de acordo com suas características. Entretanto, muitas moléculas tóxicas presentes no ambiente aquático, não são analisadas como é o caso dos contaminantes emergentes (drogas ilícitas, fármacos, produtos de higiene pessoal, estrogênios, líquidos iônicos entre outros), os quais não constam nas normas ambientais, mas podem causar efeitos negativos na saúde ambiental e humana (RICHARDSON, 2009; RICHARDSON; TERNES, 2011). Há muito tempo o destino deste resíduo são os cursos d'água próximo às estações, agregando a estes elevadas cargas poluidoras. Sendo assim, é necessário buscar alternativas econômica e tecnicamente viáveis, além de ambientalmente vantajosas para a destinação final do lodo de ETA. Sua utilização benéfica pode ser considerada uma oportunidade para aumentar a receita das empresas de saneamento, mas também reduzir custos e impactos ambientais associados a este resíduo (HOPPEN et al., 2006). De acordo com Januário e Ferreira Filho (2007), os custos de transporte e disposição final de lodos tem se situado em torno de 100 a 150 reais por tonelada, o que tem justificado conduções de pesquisas e estudos experimentais que permitiram a redução dos custos de tratamento com produtos químicos, bem como a geração de lodo. Atualmente, também ocorrem à disposição do lodo em aterros sanitários, uso na formação de bio sólidos, emprego na construção civil e aplicações industriais diversas.

Na busca por métodos alternativos de descarte e/ou utilização dos lodos das ETAs, alguns parâmetros devem ser considerados como a quantidade e características físicas, químicas, biológicas e ecotoxicológicas, as vantagens e desvantagens dos métodos escolhidos e os impactos ambientais envolvidos (MESSIAS, 2013). Assim, para a reutilização do lodo de ETA é de fundamental importância o estudo das características do lodo a ser reciclado (BOTERO et al., 2009).

No Brasil, atualmente não existe leis que regulem a aplicação de lodo da ETA na recuperação de áreas degradadas ou em solos agrícolas. O CONAMA 375 (2006) faz referência apenas ao uso agrícola do lodo gerado pelas estações de tratamento de esgoto ETE. A aplicação do lodo da ETA na agricultura pode ser desinteressante devido às baixas concentrações de matéria orgânica, alto gasto com transporte do material, a necessidade de um efetivo acompanhamento do

resíduo, evitando impactos ambientais e a indisponibilidade do fósforo que pode ser observada devido à presença dos sais de alumínio (AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION; SABOGAL-PAZ, 2007; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Mas segundo Teixeira, Silva e Melo (2005), o lodo de ETA pode ser empregado como aditivo agrícola e ser disposto em áreas degradadas, já que tem a capacidade de elevar os teores dos micronutrientes e estabilizar o pH do solo; porém em altas concentrações pode ocasionar a salinidade do solo. Alguns elementos são nutrientes essenciais aos vegetais, e como são absorvidos na nutrição vegetal em pequenas quantidades são chamados de micronutrientes (Cu, Fe, Mn, Zn) (ALLOWAY; AYERS, 1997). Por isso, para fins de recuperação das áreas degradadas e a incorporação no solo, para o fornecimento de macronutrientes, sua aplicação deve estar associada a um resíduo orgânico, como serragens, palha de cana-de-açúcar, produtos de compostagens, esterco bovinos, entre outros compostos. Teixeira; Melo; Silva (2005) avaliaram a disposição de lodo de ETA em solos degradados, os quais indicaram aumento dos teores de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  após adição de lodo.

Algumas espécies metálicas como cobre, zinco, níquel, chumbo, cádmio, cromo, manganês, alumínio e ferro possuem ações tóxicas, podendo apresentar efeitos positivos ou negativos na reutilização desse resíduo (BOTERO et al., 2009). Porém, dependendo da concentração dos elementos, a aplicação de lodo pode melhorar a agregação do solo, aumentar o pH, a disponibilidade de nutrientes para a plantas, a capacidade de retenção e a aeração do solo (TEIXEIRA; MELO; SILVA, 2005). Dessa forma, o lodo ainda pode ser aplicado como condicionante de solo para germinação de sementes, grama comercial para campos de atividades esportivas e na recuperação de áreas erodidas. Para tanto estudos devem ser realizados, considerando o acúmulo de metais no solo e a absorção de nutrientes pelas plantas.

### **3.2 Vinhaça e bagaço**

A vinhaça é um resíduo proveniente da destilação do álcool etílico. Estima-se que ocorra a geração de 8 a 18 litros de vinhaça por litro de álcool produzido, sendo que a composição e características específicas dependem da cultura utilizada (cana-de-açúcar, milho, beterraba), equipamentos e dos processos

de produção do álcool. De modo geral, a vinhaça possui em torno de 94-97% de água, grande quantidade de matéria orgânica e elementos/moléculas K, Ca, Mg e  $\text{SO}_4^-$  (FERREIRA et al., 2011). A coloração escura é devido à presença de melanoidinas de elevado peso molecular formado por compostos fenólicos. Estes compostos são altamente recalcitrantes e permanecem no ambiente, mantendo propriedades antioxidantes (FERREIRA et al., 2010). O poder poluente é cerca de cem vezes maior que o esgoto doméstico, sendo que isto ocorre devido a riqueza em matéria orgânica, baixo pH, elevada corrosividade, elevada DQO e DBO (42.000 e 100.000 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente) (FREIRE; CORTEZ, 2000).

Devido a todas as características mencionadas, a vinhaça pode promover o aumento da população microbiana no solo. A matéria orgânica contida na vinhaça é metabolizada por fungos que neutralizam a acidez permitindo a proliferação bacteriana responsável pela mineralização e imobilização do nitrogênio, nitrificação, desnitrificação e fixação biológica. A neutralização da acidez do solo também proporciona o aumento de outros micro-organismos participantes de outros ciclos biogeoquímicos (SILVA; COELHO, 2006). A adição de vinhaça combinada com matéria orgânica pode melhorar as condições físicas do solo e a mobilização de nutriente (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Com isso, o uso da vinhaça na agricultura é viável, mas a quantidade aplicada no solo não pode ultrapassar a capacidade de retenção de íons, sendo a dosagem dependente das características do solo e da distancia de corpos d'água (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). Quando usadas em proporções desbalanceadas, acarretam na lixiviação de íons, como nitrato e potássio. Entretanto, quando usada em concentrações adequadas a vinhaça proporciona elevação do pH, aumento na disponibilidade de íons, aumento da CTC, retenção de água e estrutura física do solo, sendo usado como substituto parcial ou total de fertilizantes (SILVA; COELHO, 2006).

Apesar de ser usada na agricultura, a vinhaça ainda é despejada em rios e outros corpos d'água. As consequências do descarte em ambientes aquáticos são conhecidas há muito tempo. A carga orgânica da vinhaça provoca a proliferação de micro-organismos que deterioram o oxigênio dissolvido na água, provoca a morte de animais aquáticos e plantas e contamina os corpos d'água, dificultando o uso como fonte de água potável. Além disso, a descarga de vinhaça em corpos d'água libera odor desagradável e contribui para a disseminação de doenças como a malária, amebíase e esquistossomose (LAIME et al., 2011).

Assim como a vinhaça, o bagaço de cana-de-açúcar é um resíduo agroindustrial gerado em grandes quantidades no Brasil. O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com aproximadamente 350 refinarias (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). No ano de 2013 foram produzidos 595,13 milhões de toneladas de cana, sendo que a geração de bagaço foi de aproximadamente 30% do total de cana produzida (178,53 toneladas) (CONAB, 2013). No estado de São Paulo, em virtude da proibição legal das queimadas nos canaviais até o ano de 2031 há uma intensificação do uso da colheita de cana-crua mecanizada, que pode deixar camadas de até 10 cm de palha ou 20 t ha<sup>-1</sup> de resíduos na superfície do solo (RAMOS et al., 2009).

Este resíduo representa uma potencial matéria-prima que pode ser inserida em diversos setores em vez de descartá-los, como a fermentação (SCCOL; VANDENBERGHE, 2003) e incorporação em solos e áreas degradadas (TEIXEIRA; SILVA; MELO, 2005). Grande parte do bagaço é destinada a produção de energia pela sua queima (PATTRA et al., 2008), porém a sobra de bagaço é preocupante, pois toma espaço, polui e deve ser encontrada uma forma de utilizá-la. O bagaço de cana contém de 25 a 40% de celulose, 20 a 35% de hemicelulose e lignina (15 a 35%), com pequenas quantidades de outros compostos classificados como componentes estranhos (COWLING, 1961; KIRK; CROAN; TIEN, 1976). Entretanto, sua constituição química depende do tipo do solo, variedade da cana, técnicas de colheita e o manuseio empregado (RODRIGUES, 2008; CAMARGO et al., 2009). Devido a sua constituição formada por carboidratos, micro-organismos que possuem um sistema ligninolítico formado por enzimas capazes de desestabilizar a estrutura da lignina podem crescer e degradar o bagaço, liberando outros compostos/elementos que podem ser utilizados por outros organismos (BONONI, 1997; CLOETE; CELLIERS, 1999; CHAGAS; DURRANT, 2001).

### **3.3 Fungos e degradação**

Fungos são organismos que atuam diretamente no processo de decomposição, sendo os principais responsáveis pela reciclagem do carbono nos ecossistemas. Eles degradam os componentes da madeira, celulose, hemicelulose e lignina a partir dos quais obtêm energia para seu crescimento e reprodução. Fungos da podridão branca pertencentes ao filo *Basidiomycotina* e alguns organismos do filo



*Ascomycotina* são os únicos micro-organismos/organismos conhecidos com a capacidade de metabolizar completamente a molécula de lignina a gás carbônico e água, sendo os maiores responsáveis pela degradação dos tecidos vegetais (KIRK; FARREL, 1987). A degradação da lignina por estes fungos é mais rápida do que a causada por outros organismos (KIRK; FARELL, 1987; TUOMELA et al., 2000). Este grupo é popularmente conhecido como cogumelos, orelhas de pau, bolores, bufa de lobo, trufas, mofos, entre outros (MOREIRA NETO, 2006). No enfoque ecológico, os basidiomicetos possuem papel fundamental na ciclagem de nutrientes e manutenção dos ecossistemas, atuando na degradação da matéria orgânica. São saprófitos, parasitas e formam associações com plantas. A conservação *in situ* deste grupo de organismos está ligada a conservação de florestas preservando, assim os habitats onde eles ocorrem (HAWKSWORTH, 2001).

Os fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biodegradação. Eles são capazes de crescer sob condições de estresse ambiental, sendo que o modo de crescimento permite a colonização de grandes áreas. Assim, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente sua biodegradação (DUPONT et al., 1997).

Fungos basidiomicetos lignolíticos da podridão branca são versáteis e tem um enorme potencial em degradar e mineralizar vários poluentes devido à alta tolerância a substâncias tóxicas como: resíduos industriais, pesticidas, poli clorados, hidrocarbonetos aromáticos, corantes, conservantes de madeira e xenobióticos. A capacidade de degradação de diferentes compostos por basidiomicetos lignolíticos está associada à natureza não específica do sistema enzimático lignolítico desses organismos que permite que até mesmo misturas complexas de poluentes sejam degradadas (BARR; AUST, 1994; MONTEIRO, 2001). A degradação da lignina e de poluentes orgânicos por fungos basidiomicetos constitui um processo oxidativo extracelular relativamente inespecífico que consiste em um processo resultante da ação coordenada de uma série de enzimas. Os fungos são reconhecidos por sua habilidade em produzir uma ampla variedade de proteínas extracelulares, ácidos orgânicos e outros metabólitos, além de sua capacidade para se adaptar a vários contaminantes ambientais (COULIBALY; GERMAIN; SPIROS, 2003). Entretanto, essa capacidade é variável devido às diferenças fisiológicas, constituição genética e o padrão de expressão das enzimas (ASGHER et al., 2008). Mas sabe-se que o

crescimento desses fungos diminui em condições limitadas de nitrogênio e carbono, e a atividade de enzimas lignolíticas aparece como forma de metabolismo secundário (KIRK; FARELL, 1987; TUOMELA et al., 2000).

A maioria das pesquisas sobre o desempenho de fungos da podridão branca foi conduzida em solos autoclavados, sendo que nessas condições os resultados mostram boa taxa de crescimento e desenvolvimento de forma eficiente na degradação de poluentes tóxicos. Entretanto, os resultados não são significativos quando esses fungos são cultivados em ambiente natural com outros organismos no solo e outras variáveis como pH e temperatura. A aplicação de fungos da podridão branca no ambiente natural é um desafio, pois o crescimento de bactérias é mais rápido do que o crescimento fúngico e ambos competem por fontes de nutrientes (HEINFLING et al., 1998).

### **3.3.1 *Pleurotus***

Fungos do gênero *Pleurotus* são pertencentes à divisão Basidiomycota, a classe Homobasidiomycetes e a ordem Agaricales (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

Este gênero é cosmopolita, (MODA, 2003; FELINTO, 1999), possui alto valor nutricional, rico em proteínas, fibras, hidratos de carbono, vitaminas e minerais e ocupa a terceira posição na produção comercial de cogumelos no mundo (OBODAI; CLELAND-OKINE; VOWOTOR, 2003). Esses fungos também exibem propriedades terapêuticas como antiviral, antitumoral, indução de atividades imunológica, atividade antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa (NGAI; NG, 2004).

*Pleurotus*, assim como outros basidiomicetos da podridão branca, são caracterizados pela habilidade de degradar polímeros da lignina em tecidos vegetais. A lignina é um polímero aromático da parede celular vegetal que proporciona a célula rigidez, impermeabilidade, resistência microbiana e possuem uma biodegradabilidade restrita. Devido a essas características o ataque inicial do fungo precisa ser extracelular, não específico e oxidativo (KIRK; CROAN; TIEN, 1986; KLYOSOV, 1990). A biodegradação lignolítica envolve a ação de enzimas como lignina peroxidase, manganês-peroxidase, peroxidases e lacases (ERIKSSON, 1990; KIRK, CROAN; TIEN, 1986; HATAKKA, 1994; LEE, MOON, 2003; FERRAZ, 2004; JORGENSES et al., 2005), entretanto *Pleurotus* spp. apenas produzem

manganês peroxidases (MnP), peroxidases, lacases (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002). Eles são encontrados naturalmente em materiais lignocelulolíticos (OBODAI; CLELAND-OKINE; VOWOTOR, 2003), sendo que vários substratos que contêm lignina e celulose podem ser utilizados para o cultivo como madeira, palha de arroz, hastes de algodão e outros resíduos agrícolas que podem ser reciclados e usados como ração animal ou na preparação de outros produtos (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002).

Assim como os demais fungos basidiomicetos da podridão branca, *Pleurotus* spp. são biologicamente versáteis quando a biodegradação de materiais contaminantes. É relatado que o fungo *P. ostreatus* é capaz de degradar e mineralizar compostos xenobióticos, como PAHs, corantes industriais e outros poluentes do solo, como atrazina (MENEZES, 1997; DELLAMATRICE et al., 2005) e que esse processo deve-se a ação de enzimas lignolíticas. Da mesma forma, *Pleurotus* spp age na degradação de resíduos como o bagaço por meio da hidrólise enzimática das ligações glicosídicas das cadeias de celulose e um ataque ao polímero da lignina. Estas fibras de celulose geralmente fixam outros polímeros, como hemicelulose. Durante o processo de degradação, o bagaço é convertido em fibra e em muitos tipos de açúcares, que pode ser disponibilizados para as plantas e outros organismos (ESPOSITO; AZEVEDO, 2004).

*Pleurotus* spp. pode promover a degradação e a descoloração da vinhaça, diminuindo parâmetros como: turbidez, DQO, BDO, fenóis, sólidos suspensos e dissolvidos e condutividade (FERREIRA, 2009). Autores relatam que o mecanismo de descoloração envolve primeiramente a absorção de pigmentos pelo micélio durante o crescimento fúngico, e finalmente a acumulação intracelular no citoplasma. Conseqüentemente, as enzimas intracelulares atuam na degradação e/ou absorção em células como macromoléculas (FERREIRA et al., 2011). Outros estudos mostram que alguns fungos têm a capacidade de adsorção e fenóis e clorofenóis presentes em resíduos agroindustriais (DENIZLI et al., 2005).

### **3.4 Histórico de trabalhos desenvolvidos**

Diversos trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório de Ecologia Aplicada utilizando os fungos *Pleurotus* spp. Inicialmente, os estudos com esses fungos foram desenvolvidos utilizando a vinhaça bruta como meio de crescimento

para a produção de biomassa e exopolissacarídeos (WADT, 2008). Posteriormente, houve o desenvolvimento de outros trabalhos com *Pleurotus* spp. crescidos em vinhaça diluída e enriquecida com meio mineral e bagaço, com o foco na produção de enzimas lignolíticas (FERREIRA, 2009; SARTORI, 2011; SOUZA, 2012). Ferreira (2009) iniciou o estudo da descoloração da vinhaça por esses fungos e observou conjuntamente diminuição da DQO, DBO, turbidez e da cor. Já Souza (2012) estudou a descoloração do corante índigo utilizando as enzimas produzidas durante o cultivo dos fungos do mesmo gênero em vinhaça.

Em todos os estudos desenvolvidos, a linhagem *Pleurotus sajor-caju* CCB 020 foi a que mais apresentou resultados promissores, inclusive de diminuição da toxicidade da vinhaça para *Raphidocelis subcapitata* - antes denominada de *Pseudokirchneriella subcapitata* (KRIENITZ; BOCK, 2012) - *Daphnias* e *Hydra attenuata*. Os dados mostraram que *P. sajor-caju* CCB 020 pode ser aplicado em processos de remoção da cor e na degradação de compostos da vinhaça, ocorrendo desintoxicação e melhora na sua qualidade, podendo ser indicada como água de reuso e que a ação das enzimas do sistema lignolítico de *P. sajor-caju* CCB 020 demonstrou ser eficiente na descoloração do corante índigo.

### 3.5 Ecotoxicologia

Ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre os organismos vivos, populações, comunidades e o meio ambiente na sua totalidade (PLAA, 1982; ADAMS, 1995). O objetivo dessa ciência é compreender como os ecossistemas metabolizam, transformam, degradam, eliminam, acumulam e sofrem a ação da toxicidade das diversas substâncias químicas neles introduzidas. Está fundamentada no princípio de que a resposta dos organismos vivos depende da concentração do composto químico a que foram submetidos, do sinergismo e antagonismo das moléculas, do tempo de exposição, da idade e das condições de saúde dos organismos (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

No Brasil, o seu desenvolvimento começou após a participação da CETESB, em um programa internacional de padronização dos testes agudos desenvolvidos com peixes, pela ISO em 1975. A padronização e o conhecimento da capacidade de utilização dos organismos testes, principalmente os aquáticos, nos estudos dos efluentes líquidos complexos ou das interações entre os compostos

tóxicos presentes nos efluentes, acelerou o desenvolvimento dessa ciência (OGA; SIQUEIRA, 2003). Esses testes têm tido sucesso nas caracterizações dos agentes tóxicos, já que detectam a contaminação em diversos ambientes.

Os procedimentos químicos não fornecem informações suficientes sobre os potenciais efeitos nocivos dos poluentes no meio ambiente e são incapazes de prever o efeito sobre os organismos no ecossistema (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Por isso, é importante a realização de testes toxicológicos para determinar os efeitos dos efluentes aos organismos. Os testes podem ser realizados em um curto espaço de tempo, com custos acessíveis e uma estrutura relativamente simples para o desenvolvimento dos mesmos. Esses testes têm tido sucesso nas caracterizações dos agentes tóxicos, já que detectam a contaminação em diversos ambientes. Os resultados dos testes desenvolvidos com indicadores biológicos de qualidade da água e do solo que são padronizados mundialmente (MOREIRA-SANTOS; SOARES; RIBEIRO, 2004), possibilitam a comparação mundial da sensibilidade dos organismos e a toxicidade das amostras nos diferentes níveis tróficos, ao longo da cadeia alimentar (DIAZ-BAEZ et al., 2002; DAVOREN; FOGARTY, 2004; OBERHOLTER; BOTHA; CLOETE, 2008).

Os critérios de avaliação do teste de toxicidade aguda e crônica são a mortalidade, imobilidade, alterações morfológicas e fisiológicas, crescimento e capacidade reprodutiva dos organismos-teste, em relação a uma curva de dose/resposta que conduz ao cálculo da  $CL_{50}$  (concentração letal),  $CE_{50}$  (concentração efetiva) e  $CI_{50}$  (concentração da inibição do crescimento). Esses valores representam a concentração da substância tóxica necessária para afetar 50% dos organismos testados. Essa concentração é estimada pela exposição dos organismos a uma série de concentrações das soluções. Para os testes serem considerados aceitáveis e válidos, a sobrevivência no controle deve ser de no mínimo 90% (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT, 2004a).

Alguns organismos utilizados em testes ecotoxicológicos são: *Raphidocelis subcapitata*, *Daphnia magna*, *Daphnia similis*, *Hydra attenuata*, *Chironomus xanthus*, *Danio rerio*, *Folsomia candida* e *Zea mays*. Todas essas espécies são utilizadas para avaliar as amostras ambientais, resíduos indústrias, produtos químicos, fertilizantes, fármacos, entre outras substâncias (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; PADILHA, 2007; JARDIM; ARMAS; MONTEIRO, 2008).

### **3.6 Determinações dos efeitos dos poluentes no solo na flora**

Dentre as metodologias de avaliação de qualidade de um solo contaminado, há a possibilidade de avaliar os efeitos de poluentes na flora terrestre. A Norma ABNT NBR ISO 11269-2 (2009), apresenta uma metodologia baseada na ISO 11269-2 (2005) elaborada pelo Comitê Técnico de Qualidade do Solo (ISO/TEC 190) e Subcomitê de Métodos Biológicos.

Esta norma descreve como deve ser feitos os testes para avaliação dos efeitos de emergência e crescimento das plantas exposta a um produto/composto químico conhecido ou desconhecido que foi incorporado ao solo.

Espécies monocotilédones e dicotiledôneas são muito comuns em testes germinativos e de crescimento e desenvolvimento de biomassa radicular e aérea. O milho é uma monocotiledônea, pertence à família Poaceae, que apresenta caule delgado, raízes fasciculadas, germinação e crescimento relativamente rápido cultivado ao longo do ano. Essa espécie tem sido muito utilizada para avaliar o índice germinativo, o melhoramento genético, absorção de nutrientes, adubação e crescimento vegetativo (PADILHA, 2007; MARTINES, 2009; PEDRINHO, 2009; ZAVASCHI, 2010; MATA et al., 2011). O girassol é uma dicotiledônea que possui ampla adaptabilidade, alta tolerância a seca e um sistema radicular pivotante com um conjunto de raízes secundárias, além de ser pouco sensível ao fotoperiodismo. Devido a essas características, o girassol vem sendo testado em estudos com acumulação de substâncias (RODACK et al., 2011), como óleo lubrificante que contem altas taxas de Al em sua composição (SOUZA, 2009).

### **3.7 Análises de Elementos Químicos**

Uma das técnicas de detecção de elementos químicos em material vegetal consiste primeiramente em uma etapa de digestão das amostras e posteriormente a detecção por espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES). Os fornos micro-ondas são capazes de realizar a decomposição/digestão de amostras orgânicas e inorgânicas. Quando a radiação micro-ondas interage com a solução ácido/ácidos, fenômenos como migração iônica (movimento eletroforético dos íons dissolvidos em solução) e rotação de dipolos (efeito que o campo elétrico oscilante das micro-ondas causa as moléculas da

amostra que possuem momento dipolar induzido ou permanente) podem surgir e potencializar a decomposição da amostra de interesse (NOGUEIRA et al., 2008). Já o princípio da técnica de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) consiste em um gás ionizado em que a amostra é queimada a uma temperatura suficiente alta para fazer com que os átomos emitam elétrons. A emissão de cada íon de interesse ocorre em faixas específicas do espectro, que é medida em sistema óptico (RAINONE, 2011).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta do Material

Amostras de lodo do flocculador foram coletadas na ETA – Capim Fino, localizada no bairro Guamium, saída 27 da rodovia Fausto Santo Mauro – SP 127, no município de Piracicaba/SP. A coleta foi realizada com um coletor de sedimento e sólidos, de aço-inox, no compartimento do flocculador, quando este foi esvaziado para lavagem e limpeza, pela empresa. O lodo foi colocado em sacos plásticos de poliestireno e armazenado em câmara fria a 4°C.

A vinhaça foi coletada na usina Iracema, localizada na Zona Rural s/n°, no município de Iracemápolis. A coleta foi feita na saída da dorna de fermentação sendo considerada livre de contaminantes. A amostra foi armazenada em galões de 20 litros de polietileno em câmara fria a 4°C.

As amostras de bagaço moído e seco de cana-de-açúcar foram cedidas pelo Laboratório de Radiobiologia e Ambiente do CENA/USP, sendo armazenado em latão de aço hermeticamente fechado.

### 4.2 Fungos

Foram selecionados os fungos *Pleurotus sajor-caju* CCB020 e *Pleurotus ostreatus* para a degradação de uma mistura constituída de lodo, bagaço e vinhaça. A seleção dos fungos foi feita com base em trabalhos publicados na literatura e pelos resultados de trabalhos realizados no Laboratório de Ecologia Aplicada por Aguiar Filho (2008), Ferreira (2009) e Souza (2012). Os fungos selecionados fazem parte do estoque de culturas do Laboratório de Ecologia Aplicada do CENA/USP, Piracicaba – SP.

### 4.3 Armazenamento e cultivo dos fungos

De acordo com a metodologia de Rosolen (2004), os fungos foram armazenados em grãos de trigo previamente hidratados por 24 horas, na proporção de 2:1 (água/trigo). Depois os grãos foram lavados e cozidos por 30 minutos. Em seguida, os grãos foram tamponados com 0,2% de carbonato de cálcio e 0,8% de sulfato de cálcio na proporção do peso do grão. Logo após, os grãos foram colocados em saquinhos de poliestireno (10 x 15 cm) com aproximadamente 60 g de



grão de trigo. Os saquinhos foram vedados com tampão de algodão, amarrados com barbante e autoclavados a 121°C e 1 atm por 20 minutos. Após a esterilização, os saquinhos foram mantidos a temperatura ambiente. Para estoque das culturas, os grãos de trigo foram inoculados com os fungos, crescidos em MEA (extrato de malte e ágar) por sete dias e mantidos a 28°C em estufa B.O.D. por 20 dias. Após o crescimento dos fungos, os saquinhos foram armazenados em refrigerador a 4°C e renovados a cada seis meses.

As espécies armazenadas em grãos de trigo foram utilizadas para inoculação em placas de Petri contendo meio sólido de extrato de malte (MEA), previamente esterilizados em autoclave a 121°C e 1atm por 15 minutos. Feito o inóculo, as placas foram então incubadas em estufa B.O.D. a 28°C, para o crescimento dos fungos. A cada sete dias foram realizados repicagens destes fungos para novas placas contendo meio MEA para utilização nos experimentos.

#### **4.4 Desenvolvimento de *P. sajor-caju* CCB020 e *P. ostreatus* em lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**

Os experimentos foram realizados em sacos de poliestireno (40 X 60 cm) com capacidade para 20 kg. Foi colocada aos sacos uma mistura de:

7,5 L de lodo + 7,5 L de vinhaça diluída a 50% + 3 kg de bagaço

Os sacos foram vedados com tampão de algodão e amarrados com barbante. Em seguida, os sacos foram esterilizados em autoclave a 121°C e 1 atm por 30 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, a mistura foi inoculada com discos de micélios com os fungos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, separadamente, na proporção de 5% do peso dos sacos e mantidos por 15 dias a 29°C ± 2°C. O controle consistiu na mistura dos resíduos sem a inoculação dos fungos. Depois de 15 dias, a mistura foi incorporada em um substrato comercial (Basaplant), constituído de turfa vegetal, vermiculita expandida e fibra de coco.

Todo o experimento foi feito com os resíduos autoclavados levando em consideração que fungos da podridão branca, como *Pleurotus*, não se desenvolvem de modo eficaz quando outros organismos estão presentes nos resíduos

(HEINFLING et al., 1998). Assim, para observar a ação e modo como agem esses fungos, optou-se por autoclavar os resíduos antes da inoculação dos fungos.

A escolha da proporção de resíduos foi feita com base em um experimento anterior, onde foram testadas proporções diferentes de resíduos. Este experimento foi realizado em saquinhos de poliestireno (10 X15 cm) em três réplicas, com as seguintes proporções v/v de resíduos:

- 100%: 50 mL de lodo + bagaço;
- 75%: 37,5 mL de lodo e 12,5 mL de vinhaça diluída a 50% + 10 g de bagaço;
- 50%: 25 mL de lodo e 25 mL de vinhaça diluída a 50% + 10 g de bagaço;

A forma de esterilização dos saquinhos contendo os resíduos foi a mesma do experimento descrito anteriormente. Depois de esterilizados, os saquinhos foram inoculados com *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*, separadamente e mantidos em estufa B.O.D. a 28°C. Depois de 15 dias, foi observado que o melhor crescimento do fungo ocorreu na proporção de 50% v/v.

A escolha desses resíduos foi feita com o intuito de utilizar essa mistura na agricultura após o crescimento fúngico. Para isso, foi necessário a utilização de resíduos orgânico – como o bagaço e a vinhaça – visto que o lodo possui baixa relação C/N, sendo que a vinha possui macro e micronutrientes e o bagaço auxilia na aeração do solo e como fonte de carbono.

#### **4.5 Determinações dos efeitos dos poluentes no solo na flora**

##### **4.5.1 Cultivo de *Zea mays* e *Helianthus annuus* em lodo de ETA, vinhaça, bagaço em substrato comercial**

Sementes de milho e girassol foram doadas pelo Departamento de Sementes da ESALQ, sendo as sementes da variedade híbrida 20A78 e BRS 329, respectivamente. As sementes doadas são livres de produtos químicos e procedimentos físicos. A escolha do milho foi baseada no trabalho de Messias (2013), onde foi descrito o desenvolvimento de milho em uma mistura de substrato comercial e lodo de ETA. Já, a escolha do girassol foi baseada no trabalho de Souza (2009) em que descreve que esta cultura é tolerante a elementos inorgânicos e alguns metais (por exemplo, o alumínio) presentes em resíduos, como óleo lubrificante.

Depois de 15 dias de crescimento dos fungos na mistura de lodo, vinhaça e bagaço descrita no item 4.4, a mesma foi incorporada a um substrato comercial (Basaplant), constituído de turfa vegetal, vermiculita expandida e fibra de coco. A mistura foi distribuída em vasos plástico de polietileno com capacidade de dois kg e depois de 15 dias houve o plantio das sementes de milho e girassol, como mostra a Figura 2.

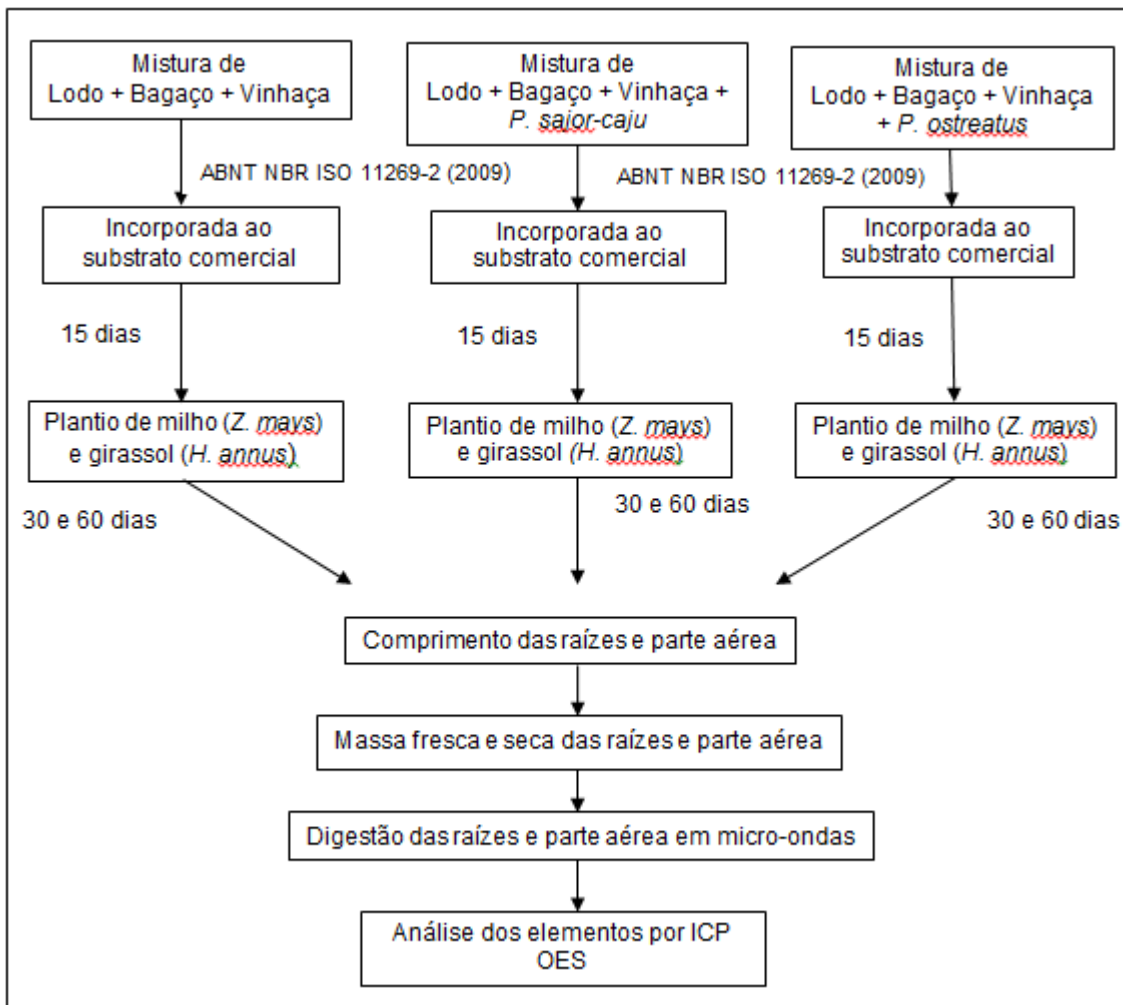


Figura 2 - Esquema das etapas de incorporação da mistura e plantio de milho e girassol

A incorporação da mistura ao substrato foi feita com base na capacidade máxima de retenção de água (CMRA) para 100 g desse substrato de referencia ABNT NBR ISO 11269-2 (2009), conforme o cálculo:

$$\text{CMRA (em \% de massa seca)} = (S-T-D/D) \cdot 100$$

Onde: S = peso do solo escorrido + peso do frasco + peso do papel de filtro;

T = tara (peso do frasco + peso do papel de filtro);

D = massa seca do substrato

Após 15 dias, foram plantadas sementes de milho e girassol nos vasos com a mistura. O experimento foi feito com três réplicas, sendo que os vasos foram mantidos em casa de vegetação com fotoperíodo de 12 horas (claro: escuro) a temperatura de  $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Foram plantadas seis sementes de milho e cinco sementes de girassol por vaso. A irrigação foi feita com água deionizada sempre que necessário. Após a germinação de 50% das sementes, foram deixadas em cada vaso apenas duas plântulas de milho e uma plântula de girassol. Depois de 30 e 60 dias de crescimento após a germinação, foi determinado o comprimento e massa seca e fresca das raízes e parte aérea do milho e do girassol. A massa fresca e medidas de comprimento foram determinadas depois que as plantas foram lavadas. Para a massa seca foram levadas em estufa a  $65^{\circ}\text{C}$ , com ventilação forçada, até atingir massa constante. Posteriormente, as amostras foram moídas em moinho criogênico e realizada a digestão das mesmas em micro-ondas no Laboratório de Química Analítica do CENA/USP.

#### **4.6 Digestão das amostras e Análise dos Elementos**

A digestão das amostras foi feita em frascos de micro-ondas, onde foram pesadas 250 mg da amostra e adicionado seis mL de  $\text{HNO}_3$  (Merck purificado 1x a 20%) e dois mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O sistema de micro-ondas foi programado conforme mostrado na Tabela 2. O experimento foi feito com micro-ondas Ethos 1600, Milestone, sendo que a abertura dos frascos, transferências das amostras para tubos falcon e aferição do volume para 25 mL com água Milli-Q foram realizados em capela.

Após a digestão das amostras, foi realizada a análise de ICP OES a fim de determinar a concentração dos elementos nos vegetais. Esta análise foi feita no Laboratório de Química Ambiental e Geoprocessamento do CENA/USP, em aparelho Ultima 2.

Tabela 2 - Programação utilizada para digestão de raízes e parte aérea de *Z. mays* e *H. annuus*

T (min)	P (W)	T <sub>1</sub> °C	T <sub>2</sub> °C
3	1000	160	106
2	1000	160	106
5	1000	210	140
15	1000	210	140

#### 4.7 Testes toxicológicos

Os testes foram realizados com o elutriato da mistura antes e depois do crescimento dos fungos e antes da incorporação da mistura ao substrato, obedecendo à proporção de 1:4 (mistura: água destilada) (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998; MESSIAS, 2013). Para isso, a mistura foi agitada manualmente por 10 minutos e em seguida foi levada à mesa agitadora por 30 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada por 8 minutos em centrífuga FANEM com 8.000 G, sendo o sobrenadante coletado (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1998; MESSIAS, 2013).

A escolha de organismos aquáticos para a realização dos testes foi feita levando em consideração que estes resíduos podem atingir os corpos d'água por lixiviação, enxurradas ou serem descartados em ambientes aquáticos, com exceção do bagaço que foi usado apenas como um condicionante do lodo. Sendo assim, foi determinada a concentração/porcentagem de inibição de 50% dos organismos (CI<sub>50</sub>) em *Raphidocelis subcapitata*, concentração/porcentagem de mortalidade de 50% dos organismos (CL<sub>50</sub>) em *Daphnia simillis* e *Hydra attenuata* quando expostas a estes resíduos.

##### 4.7.1 Teste de sensibilidade

Antes da realização dos testes com as amostras, testes de sensibilidade foram feitos com todos os organismos. Os testes foram feitos com controles negativo e positivo com NaCl como substância referência, conforme Santos, Vicensotti e Monteiro (2007).

Teste de sensibilidade com determinada substância de referência permitem maior precisão e confiabilidade nos resultados obtidos, pois eles

estabelecem a faixa de aceitação dos resultados da sensibilidade dos organismos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

#### 4.7.2 *Raphidocelis subcapitata*

Os testes foram realizados com base na metodologia descrita por Blaise, Forget e Trottier (2000). O meio de cultivo foi preparado com macro e micro nutrientes essenciais ao crescimento deste organismo. As soluções destes nutrientes estão na forma de soluções-estoque, como mostra a Tabela 3. O meio de cultura foi distribuído em frascos Erlenmeyers de 250 mL com 50 mL de meio de cultura, sendo o pH ajustado para  $7,00 \pm 0,001$ . Em seguida, o meio foi autoclavado por 20 minutos a  $121^{\circ}\text{C}$  e 1 atm. Para que a cultura mantivesse um crescimento exponencial ideal para os testes, as culturas foram repicadas semanalmente em câmara de fluxo laminar e encubadas em iluminação contínua de  $4.000 \pm 10\%$  luz e temperatura de  $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  e agitadas em mesa agitadora e manualmente três vezes ao dia.

Tabela 3 - Meio de cultivo para *R. subcapitata*

<b>Sol-estoque</b>	<b>Compostos</b>	<b>mg L<sup>-1</sup></b>	<b>Sol-estoque mL L<sup>-1</sup>/meio</b>
	MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	12160	
	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	4400	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	185,6	
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	416	
1	ZnCl <sub>2</sub>	3,28	18
	FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	159,8	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	1,43	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,26	
	CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,012	
<b>Sol-estoque</b>	<b>Reagentes</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>	<b>Sol-estoque mL L<sup>-1</sup>/meio</b>
2	NaNO <sub>3</sub>	25,5	18
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	14,7	18
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,04	18
5	NaHCO <sub>3</sub>	15	18

Em frascos de cintilação transparentes, populações de  $10^4$  células  $\text{mL}^{-1}$  de *R. subcapitata* foram expostas em amostras puras e diluídas do elutriato, contendo as diluições em três réplicas de 100, 75, 50, 25, 12,5% e um controle (meio de cultivo). Os frascos foram vedados com filme plástico transparente, permaneceram incubados sob luz contínua ( $4.000 \pm$  luz), a  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  em placa agitadora por 72 h, sendo realizada agitação em mesa agitadora e manual três vezes ao dia. Após esse período, as células foram preservadas em solução de lugol com concentração de  $1,25 \text{ g L}^{-1}$  de iodo,  $2,5 \text{ g L}^{-1}$  de iodeto de potássio e 0,25% de ácido acético. Esta preservação foi feita para que as células pudessem ser contadas dias depois após o fim da exposição desses organismos.

As células foram contadas na câmara de Neubauer, com o auxílio de um microscópio óptico. Posteriormente, foi calculada a porcentagem de inibição do crescimento em relação à média dos controles, utilizando a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - [(amostra / x \text{ controle}) * 100]$$

#### 4.7.3 *Daphnia similis*

A metodologia usada para o cultivo de *D. similis* foi a ABNT NBR 12.713 (2004a). Os organismos foram mantidos em cristalizadores de vidro com capacidade de um litro, contendo aproximadamente 30 fêmeas em 700 mL de meio de cultivo (ou água reconstituída) preparado conforme a fórmula abaixo e as soluções da Tabela 4:

$$\text{Volume a preparar} \times (\text{DJ} - \text{DAD}) \times 0,5 = \text{solução em mL}$$

Onde: DAD = dureza da água destilada = 0

Constante = 0,5

DJ = dureza desejada = 44

Volume de meio a preparar (em litros) = 20

Tabela 4 - Meio de cultivo de *D. similis*

<b>Sol-estoque</b>	<b>Reagentes</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
Solução 1	CaSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,5
Solução 2	KCl	0,2
	NaHCO <sub>3</sub>	4,8
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	6,1

O pH do meio de cultivo foi ajustado com soluções de HCl e NaOH após aeração de 48 h, permanecendo entre 7,0 e 7,5. Este meio foi trocado três vezes por semana, sendo que a cada troca eram retirados os filhotes e restos de alimentação. A alimentação foi feita também três vezes por semana com uma suspensão de alga *R. subcapitata* de  $5 \times 10^6$  células por organismo e mais uma solução de fermento biológico ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ) e ração para trutas ( $5 \text{ g L}^{-1}$ ), dissolvidos em água destilada, aerados por sete dias e filtrados em peneira de  $45 \mu\text{m}$ .

Para a realização dos testes, grupos de cinco neonatos com até 24 h de idade foram colocados em copos de polietileno, contendo 28 mL da amostra pura (100%) e diluídas com água reconstituída a 100, 75, 50 e 25% por um período de 48h. O teste foi feito em triplicata, sendo realizado também um controle (meio de cultivo). Após 48 h, foi observado e anotado o número de organismos mortos e vivos em cada diluição.

#### 4.7.4 *Hydra attenuata*

A metodologia usada para o cultivo destes organismos foi segundo Trottier et al., (1997). Foram usados cristalizadores de vidro com capacidade de um litro, contendo aproximadamente 700 mL do meio de cultivo preparado com água destilada, conforme a Tabela 5.

Tabela 5 - Meio de cultivo de *H. attenuata*

<b>Reagentes</b>	<b>g L<sup>-1</sup></b>
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,147
N-tris (hidroximetil) metil 1-2 aminoetanosulfônico (Tampão TES)	0,11

As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. a temperatura de  $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ , com fotoperíodo de 12 h e alimentadas três vezes por semana com *Artemia*



*salina* eclodidas em solução salina de 14 g L<sup>-1</sup> de NaCl sob aeração e iluminação contínua por 24 h. Depois o período de 2 h após o fornecimento de alimento, o meio de cultivo foi trocado para a retirada do excesso de alimento e dos exoesqueletos regurgitados.

Para o teste, o elutriato foi preparado com CaCl<sub>2</sub>.H<sub>2</sub>O, tampão TES, pH ajustado para 7,00 ± 0,1 e, diluídas com meio de cultivo a 100, 75, 50, 25, 12,5%. Foram inseridos três organismos saudáveis e sem brotos em placas de poliestireno contendo quatro mL da amostra. Cada diluição com três réplicas, com a inserção nove organismos expostos por amostra/diluição, por período de 96 h, com observações a cada 24 h.

Os efeitos observados foram: mortalidade e o surgimento de danos morfológicos (efeitos subletais), os quais em estágios progressivos foram: formação dos bulbos na extremidade dos tentáculos dos organismos, encurtamento dos tentáculos, degeneração dos tentáculos e finalmente a morte do organismo, como mostra a Figura 3. As estimativas de CL<sub>50</sub> foram calculadas baseadas no número de indivíduos mortos e no estágio tulipa.



Figura 3 - Estágios progressivos de intoxicação e degeneração de *H. attenuata* (Fonte: Trottier et al. (1997) modificada pelo autor)

#### 4.7.5 Análises estatísticas

Os dados de germinação, crescimento, massa fresca e seca das raízes e parte aérea do milho e do girassol foram analisados com o auxílio do programa Statistica versão sete, onde foi feito o teste de Dunnett. Já os dados dos testes toxicológicos foram analisados com o programa PriProbit, onde foi calculado a CL<sub>50</sub> e a CI<sub>50</sub> dos organismos usados no teste.

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Análise do lodo**

As análises física, química e granulométrica do lodo do floculador foram realizadas no Departamento de Solos da ESALQ/USP. A análise granulométrica do lodo da ETA Capim Fino, Piracicaba SP, resultou na caracterização da amostra como: argilosa, tendo  $410 \text{ g kg}^{-1}$  de argila disponível e  $233 \text{ g kg}^{-1}$  de silte. A umidade total da amostra foi de 54,11%, sendo que as concentrações de alguns elementos são apresentadas na Tabela 6. Outras características do lodo também se encontram na Tabela 6.

Tabela 6 - Características do lodo do floculador da ETA Capim Fino

<b>Determinações</b>	<b>Lodo do Floculador</b>
pH CaCl <sub>2</sub>	7,0
Densidade (g cm <sup>-3</sup> )	1,23
MO total – combustão (%)	1,49
MO compostável (%)	1,24
MO resistente a compostagem (%)	0,25
Carbono total (%)	0,83
Carbono total orgânico (%)	0,69
Resíduo mineral total (%)	44,40
Resíduo mineral insolúvel (%)	37,16
Resíduo mineral solúvel (%)	7,24
Nitrogênio total (%)	0,16
Fósforo (P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ) total (%)	0,09
Potássio (K <sub>2</sub> O) total (%)	0,07
Cálcio (Ca) total (%)	0,45
Magnésio (Mg) total (%)	0,13
Enxofre (S) total (%)	0,02
Relação C/N total (%)	5/1
Relação C/N orgânico (%)	4/1
Cobre (mg kg <sup>-1</sup> )	12,0
Manganês (mg kg <sup>-1</sup> )	246,0
Zinco (mg kg <sup>-1</sup> )	35,0
Ferro (mg kg <sup>-1</sup> )	10424,0
Boro (mg kg <sup>-1</sup> )	1,0
Sódio (mg kg <sup>-1</sup> )	161,0

MO = matéria orgânica

Os lodos provenientes das ETAs são caracterizados por serem argilosos e por terem grande quantidade de umidade, apesar de serem classificados como um resíduo sólido (ABNT NBR 10.004, 2004b). As características podem oscilar dependendo da época de amostragem, pois fatores climatológicos, características específicas dos copos d'água e mudanças físicas e químicas dos mesmos as quais as estações recebem podem ocorrer, afetando o resultado de algumas análises.

Dois anos antes do presente estudo, o lodo do floculador coletado na mesma estação continha 63% de argila, 54 g dm<sup>-3</sup> de matéria orgânica e 80,4% de umidade total (MESSIAS, 2013). Botero et al. (2009) caracterizou três ETAs as quais a matéria orgânica variou de 20,5 a 68,9% e umidade de 82 a 91%. Já Tartari et al. (2011) obtiveram umidade de 74% e 73% de areia no lodo de ETA estudado.

A relação C/N encontrada nesta amostra de lodo foi baixa se comparada com amostras de Botero et al. (2009) em que a relação oscilou de 8,40 a 26,60. Entretanto, esta relação para amostras de lodo coletadas dois anos antes desse estudo também foi baixa com razão de 10/1 (MESSIAS, 2013). A baixa razão C/N (<30) indica que o uso deste resíduo não é recomendado na agricultura, uma vez que há baixa disponibilidade de carbono que serve de fonte de energia para os micro-organismos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2009). Entretanto, nos Estados Unidos (Atlanta e Nova Jersey) e Portugal, este lodo já é aplicado em solos agrícolas. Em solos deficientes em ferro, o lodo promove o aumento da concentração desse elemento, como tem sido observado nos Estados Unidos, no cultivo da laranja e do limão, os quais consideram eficientes na aplicação de lodos (AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS; AMERICAN WATER WORKS ASSOCIATION, 1996; SABOGAL-PAZ, 2007; DI BERNARDO; DANTAS, 2005). Porém, dados sobre a aplicação deste resíduo no Brasil ainda são escassos, sendo necessárias mais pesquisas sobre as vantagens e os riscos desta prática (TEIXEIRA; MELO; SILVA, 2005).

Além da baixa razão C/N, o lodo de ETAs apresenta algumas espécies metálicas como Cu, Zn, Ni, Pb, Cd, Cr, Mn, Al e Fe - provenientes dos rios e da adição de coagulantes adicionados no tratamento da água - que podem ser tóxicos e apresentar efeitos positivos ou negativos na disposição final e na reutilização desses resíduos (BOTERO et al., 2009). Na amostra de lodo em questão, há uma grande quantidade de Mn e Fe. Messias (2013) observou a presença de mais de 20 elementos químicos em amostra de lodo do floculador da ETA em estudo. Desses 20 elementos, Al, Fe, Ca, K, Mg e Mn estavam em maior concentração (acima de 1000 mg kg<sup>-1</sup>). As concentrações elevadas desses elementos devem-se em grande parte aos coagulantes adicionados na estação que são à base de hidróxidos de alumínio e ferro, (alguns apresentam Mn na composição) que durante o processo de coagulação e decantação permanecem no lodo. A concentração de K e Mg provavelmente está associada aos fertilizantes presentes na bacia do rio Corumbataí

que podem ter sido lixiviados. Já a presença de Ca está ligada ao fator de correção do pH da água.

O lodo é um resíduo de granulometria fina e possui maior capacidade de retenção e absorção de elementos químicos. Desse modo, para que os lodos de ETAs sejam utilizados na agricultura é necessária a retirada de espécies metálicas e compostos/poluentes potencialmente tóxicas. É necessário também realizar o enriquecimento do lodo com micro e macronutrientes que podem ser disponibilizados para as plantas (BOTERO et al., 2009). Por ser um resíduo de granulometria fina, quando está parcialmente desidratado, apresenta aspecto pastoso que dificulta a difusão de ar. Por essa razão, o lodo deverá ser misturado a outro resíduo capaz de atuar como agente estruturante na mistura, permitindo assim a criação de espaços vazios necessários à difusão do ar (FERNANDES, 2000), como o bagaço de cana-de-açúcar.

## **5.2 Análise da vinhaça**

A Tabela 7 mostra os valores dos parâmetros e alguns elementos encontrados na vinhaça utilizada.

Tabela 7 - Elementos presente na vinhaça bruta

<b>Parâmetros</b>	<b>Vinhaça Bruta</b>
pH (a 20°C)	3,95
DQO (mg L <sup>-1</sup> )	422000
DBO (mg L <sup>-1</sup> )	11310
Sólidos Suspensos totais (mg L <sup>-1</sup> )	5969
Condutividade (µS/cm)	8630
Sólidos Totais Dissolvidos (ppm)	152126
Açúcares Redutores (mg L <sup>-1</sup> )	962
Nitrogênio Tital Kjeldahl (mg L <sup>-1</sup> )	70
Potássio (mg L <sup>-1</sup> )	2272
Fosfatos (mg L <sup>-1</sup> )	200
Magnésio (mg L <sup>-1</sup> )	290
Sódio (mg L <sup>-1</sup> )	<50
Cálcio (mg L <sup>-1</sup> )	460
Sulfatos (mg L <sup>-1</sup> )	1320
Índice de fenóis (mg L <sup>-1</sup> )	1,1

A Tabela 8 mostra o valor do pH de acordo com a concentração utilizada para a realização dos testes e experimentos com a vinhaça.

Tabela 8 - Valor de pH da vinhaça de acordo com a concentração

<b>Concentração</b>	<b>pH (a 25°C)</b>
100%	5,96
75%	5,00
50%	5,05

De modo geral, a DQO e a DBO da vinhaça são altos com média entre 10-210 g L<sup>-1</sup> e 42-100 g L<sup>-1</sup>, respectivamente (FREIRE; CORTEZ). Esses parâmetros também são altos na vinhaça amostrada, entretanto estão acima da média encontrada na literatura (CHRISTOFOLETTI et al., 2013). O pH da vinhaça é ácido e a condutividade é elevada quando comparados a outros resíduos, como o esgoto, devido a grande concentração de matéria orgânica e elementos minerais (FREIRE; CORTEZ, 2000). Além disso, a vinhaça pode conter melanoidinas e compostos

fenólicos, celulose e hemicelulose (FITZGIBBON et al., 1995; BENKE; MERMUT; CHATSON, 1998).

A composição química da vinhaça depende do tipo de planta usada para a produção do etanol e o processo de destilação (ESPAÑA-GAMBOA et al., 2011). Por exemplo, a concentração de íons sódio na vinhaça de cana-de-açúcar é menor do que a vinhaça de beterraba (GEMTOS; CHOULIARAS; MARAKIS, 1999). Mas de maneira geral, a vinhaça consiste basicamente em 93% de água e 7% de sólidos orgânicos e minerais, sendo que os altos índices de matéria orgânica podem estar na forma de ácidos e cátions K, Ca e Mg, mas baixa concentração de N e P (LAIME et al., 2011; GIANCHINI; FERRAZ, 2009).

A vinhaça pode ser uma fonte de nutrientes para micro-organismos na degradação de resíduos (CRIVELARO et al., 2010; PRATA et al., 2001) e utilizada no enriquecimento do lodo, já que ela contém micro e macronutrientes que podem ser disponibilizados para as plantas. A matéria orgânica a partir da vinhaça é uma fonte importante de carbono solúvel prontamente disponível para os micro-organismos (PRATA et al., 2001). Prata et al. (2001) observou que a adição de vinhaça em solos contendo o herbicida ametrina proporcionou um aumento significativo da taxa de desprendimento de CO<sub>2</sub>, contribuindo para a maior mineralização do herbicida. Lourencetti, Marchi e Ribeiro (2008) também mostrou que a adição de vinhaça em solos argilosos aumentou a degradação dos herbicidas diurom e tebutiurom, reduzindo a meia vida de 80 para 7 dias e 128 para 73 dias, respectivamente. A degradação pode ocorrer pelo aumento da atividade microbiana proporcionado pela adição da vinhaça, que fornece energia na forma de carbono aos micro-organismos. A maior parte do carbono da vinhaça pode estar também na forma de glicerol, provenientes de rotas alternativas durante a fermentação do álcool (RODELLA; ZAMBELLO JUNIOR; ORLANDO FILLHO, 1983). Na célula microbiana, o glicerol pode passar a diidroxicetona, que pode ser incorporada a via glicolítica do metabolismo microbiano (LEHNINGER, 1986).

### **5.3 Desenvolvimento de *P. sajor-caju* CCB020 e *P. ostreatus* em lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**

A Figura 4 mostra o crescimento de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* nos sacos contendo a mistura de lodo, vinhaça e bagaço após 15 dias de crescimento, a 29°C ± 2°C.



Figura 4 - Crescimento de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* em lodo, bagaço e vinhaça após 15 dias de crescimento

O lodo de ETA apresenta diversos elementos em sua composição. Messias (2013) verificou que o lodo do floculador ETA obtido na estação Capim Fino continha mais de 20 elementos, quando analisada por ICP OES. Entre esses, os que estavam em maior concentração em  $\text{mg kg}^{-1}$  eram: Al, Ca, Fe, Ba, Cu, K, Mg, Mn, Na, Pb e Zn.

O crescimento fúngico em resíduos está relacionado com a homeostase, que envolve a absorção de elementos essenciais suficientes para o funcionamento ideal dos processos metabólicos enquanto promove proteção contra o excesso de outros elementos e metais presentes nos resíduos (THOMSETT, 1993). Alguns elementos são essenciais para o metabolismo dos fungos devido a sua localização em sítios ativos ou porque atuam como moduladores de enzimas; em concentrações toleráveis podem agir como modulador de enzimas ligninolíticas em fungos da podridão branca (STAJIC et al., 2013). Entretanto, em altas concentrações, esses elementos podem ser tóxicos. Cu e Mn participam dos processos de degradação da lignina; Mn integra os ciclo de reações da manganês peroxidase (MnP) e o Cu atua como cofator no centro catalítico da lacase (BALDRIAN; GABRIEL 2002a; BALDRIAN, 2003). Entretanto, em altas concentrações, esses elementos podem ser tóxicos.



Segundo Stajic et al. (2013), a presença de sais de Fe e Zn e apenas Zn em meio de cultivo proporcionou um aumento de 0,7% e de três vezes da atividade da lacase em *P. ostreatus* em relação ao controle, respectivamente. A presença de  $\text{Na}_2\text{SeO}_4$  em meio de cultura como fonte de selênio também proporcionou aumento de cinco vezes da lacase em *P. ostreatus*. Já para MnP ocorreu um aumento de 25% da atividade quando  $\text{SeO}_2$  foi adicionado em meio de cultura. Devido a esta capacidade de crescer e produzir enzimas em meios que contem vários elementos, os resíduos se apresentam como potenciais substratos para o crescimento fúngico (BALDRIAN; GABRIEL 2002b; BALDRIAN 2003).

A proteção contra o excesso de elementos e metais presentes em resíduos é feito por meio dos processos chamados de “avoidance” e “sequestration” que envolvem restrição na entrada de metais na célula e formação de outros compostos (THOMSETT, 1993). É com base nesses mecanismos que *Pleurotus sajor-caju* é mais tolerante a monômeros fenólicos relacionados com lignina e tanino (CAI; BUSWELL; CHANG, 1993). Sanglimsuwan et al. (1993) mostraram que o gênero *Pleurotus* apresentou resistência a metais pesados quando crescidos em meio aquoso de solução de metais a 28°C por uma semana. A quantidade média para a inibição do crescimento do gênero *Pleurotus* foi de 5,88 mM para os metais analisados, como cobre, cádmio, zinco, níquel, cobalto e mercúrio. Já a espécie *P. ostreatus* mostrou uma concentração de inibição de 8,41 mM, sendo a espécie que exibiu a mais alta resistência a todos os metais.

É descrito na literatura que compostos fenólicos e não fenólicos podem despolimerizar  $\text{Cu}^{2+}$  na presença de alguns metabolitos fúngicos em meio aquoso. Entretanto, não se sabe em quais condições esta despolimerização pode ocorrer (WATABABE; KOLLER; MESSENER, 1998). Este processo permite uma nova estratégia na despolimerização de metais presentes no lodo de ETA, como o Cu e na decomposição de compostos fenólicos e não fenólicos encontrados na vinhaça e no bagaço, já que fungos da podridão branca também são capazes de metabolizar alguns compostos derivados do fenol e reduzir íons  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^+$  (AGUIAR; FERRAZ, 2007).

O crescimento de ambos os fungos na mistura de resíduos também se deve a presença de materiais lignolíticos, como o bagaço e a vinhaça. A presença de materiais lignocelulósicos pode induzir a produção de enzimas lignocelulolíticas produzidas por fungos, como lacase, MnP e peroxidase que agem em sinergismo

na degradação de efluentes industriais (FERREIRA et al., 2011). Essa degradação ocorre, pois algumas enzimas são capazes de quebrar estruturas fenólicas de compostos presentes nestes resíduos. A MnP é capaz de oxidar compostos fenólicos da estrutura da lignina (NOVIKOVA et al., 2002; SZKLARZ, 1989; TIEN; KIRK, 1984) e a lacase atua principalmente na quebra de compostos fenólicos, aminofenóis, difenóis e polifenóis (SALIS et al., 2009). Desse modo, a lacase e a MP atuam na quebra da molécula de lignina, uma vez que em sua estrutura há estruturas fenólicas.

Aguiar Filho et al. (2008) verificou o crescimento e o desenvolvimento de fungos do gênero *Pleurotus* em bagaço de cana-de-açúcar suplementado com meio mineral e vinhaça em diferentes temperaturas. Neste estudo, foi observado que os fungos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* tiveram maior massa de micélio seco em meio suplementado com vinhaça a 30°C, sendo que a massa de *P. sajor-caju* foi 4,71% maior do que a de *P. ostreatus*. Quanto a produção de enzimas, foi observado que a maior produção ocorreu em *P. sajor-caju* crescido em bagaço quimicamente tratado e vinhaça em 15 dias a 30°C. Já *P. ostreatus* não apresentou produção de lacase, sendo que a produção de MnP e peroxidases foram 27,11 e 30,05% menores, respectivamente para o mesmo tratamento. Souza (2012) obteve atividade enzimática de lacase e peroxidase produzidas por *P. sajor-caju* maior do que *P. ostreatus* em 15 dias a 28°C; cerca de 90 e 45,75%, respectivamente. Já a produção de MnP por *P. ostreatus* não foi significativa. Esses dados mostram que os fungos do gênero *Pleurotus* podem crescer em resíduos da indústria alcooleira e que seu crescimento proporciona a degradação de certos compostos pela produção de enzimas como lacase, peroxidase e MnP.

É notado também na literatura que a vinhaça pode provocar uma maior produção de micélio de *Pleurotus*. Wadt (2008) observou que *P. sajor-caju* crescido em meio mineral e vinhaça obteve biomassa de 27,5 g L<sup>-1</sup>, já a massa do micélio em *P. ostreatus* foi de 7,7 g L<sup>-1</sup>. Neste estudo, os fungos crescidos somente em vinhaça proporcionaram melhor produção de biomassa com teor alto de proteínas. A vinhaça bruta foi a que melhor proporcionou melhor produção proteica com valores de 13,64 a 20,28%, sendo a produção de *P. sajor-caju* foi de 18,56%. Entretanto, *P. ostreatus* mostrou melhor produção proteica em vinhaça enriquecida com meio mineral com produção 21% maior.

Os principais resíduos agroindustriais contêm fibras e baixa disponibilidade de proteínas e vitaminas. A colonização por fungos nestes resíduos aumenta a disponibilidade de nutrientes e o valor nutricional dos resíduos (LUZ et al., 2013). Nesse sentido, a degradação desses resíduos por fungos da podridão branca tem um papel importante no ciclo do carbono, pois há liberação de CO<sub>2</sub>, água, biomassa e ácidos orgânicos que são incorporados ao material húmico e disponibilizados para outros organismos. Neste contexto, fungos do gênero *Pleurotus* poderiam degradar resíduos como lodo de ETA, bagaço e vinhaça, sendo que os elementos destes resíduos poderiam favorecer o crescimento de algumas culturas.

#### 5.4 Análise de *Zea mays* e *Helianthus annuus* em lodo de ETA, vinhaça, bagaço de cana-de-açúcar e substrato comercial

Os dados médios de germinação de *Z. mays* e *H. annuus* são mostrados nas Figuras 5 e 6.

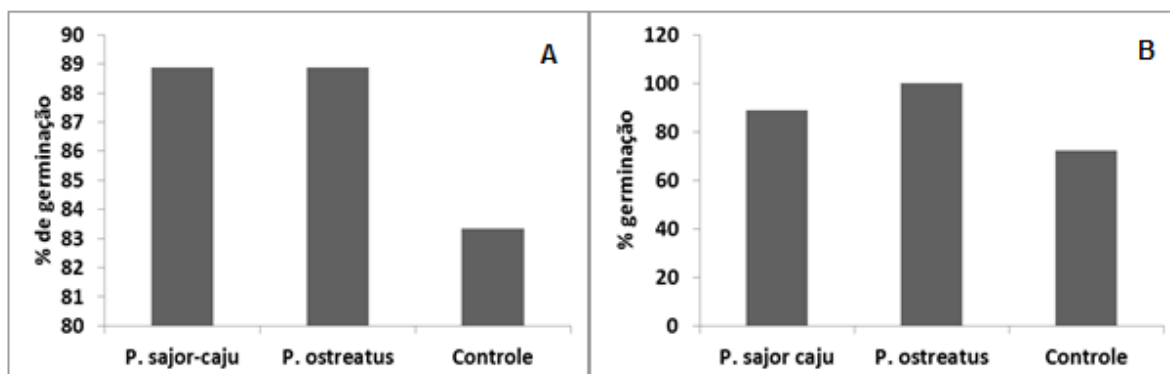


Figura 5 – Porcentagem germinativa de *Z. mays*

A. Porcentagem germinativa de *Z. mays* colhidos com 30 dias de plantio

B. Porcentagem germinativa de *Z. mays* colhidos com 60 dias de plantio

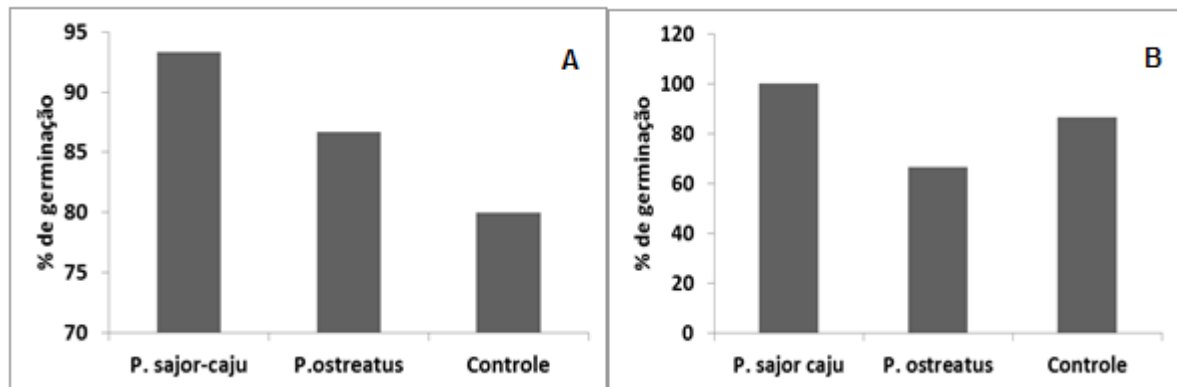


Figura 6 – Porcentagem germinativa de *H. annuus*

A. Porcentagem germinativa de *H. annuus* colhidos com 30 dias de plantio

B. Porcentagem germinativa de *H. annuus* colhidos com 60 dias de plantio

A germinação de pelo menos 50% das sementes de milho ocorreu no 5º dia após o plantio, já a germinação de 50% das sementes de girassol ocorreu no 7º dia. A porcentagem germinativa das sementes de milho e girassol - submetidas ao plantio com misturas com o crescimento de *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* - foram maiores que o controle para o cultivo de 30 e 60 dias. Entretanto, as maiores porcentagens foram obtidas com sementes de girassóis em misturas de *P. sajor-caju* (93,33 e 100%). A porcentagem germinativa foi maior do que outros trabalhos em que as sementes foram submetidas ao plantio com compostos tóxicos. Mata et al. (2011) observaram a ocorrência de 100% da germinação do milho, quando as sementes foram cultivadas em solos que receberam adubação com esterco bovino. Mas quando as sementes foram expostas a agroquímicos e resíduos que contem altas concentrações de elementos químicos, a porcentagem de germinação foi menor. Finoto et al. (2011) analisaram a porcentagem de *Z. mays* quando foram expostas a agroquímicos formulados. Estes autores observaram a inibição de 38% do índice germinativo das sementes quando foram expostas ao imazipac, na dose de 140 g ha<sup>-1</sup>. Machado et al. (2012) encontraram resultados semelhantes, quando expuseram as sementes de *Z. mays* ao imazamoxi e glifosato e observaram que esses produtos causaram inibição de 33,3% e 13,3% da germinação das sementes expostas, respectivamente. Souza (2009) estudou a germinação de girassóis em solos com contaminação de óleo lubrificante e observou que em contaminações acima de 4% a germinação foi menor que 26%. Já Vaz (2010) fez a análise de lama de uma estação de tratamento de água residual de uma indústria de revestimento de Àgueda, Portugal, a qual continha Cr, Cu, Ni e Zn em sua composição. Essa lama

quando incorporada ao solo inibiu até 100% a germinação das plântulas de *Brassica rapa* e *Avena sativa*, nas aplicações de 1250 g kg<sup>-1</sup> de solo. No presente estudo, a germinação de ambas as culturas foi maior nos tratamentos submetidos a misturas de resíduos crescidos com *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*. Esta taxa germinativa pode ter ocorrido devido a degradação/transformação dos elementos presentes nos resíduos em outras formas que não afetaram a germinação, já que os metais pesados podem interferir negativamente e significativamente na germinação de sementes de monocotiledôneas e dicotiledôneas, dependendo de suas concentrações (VAZ, 2010).

As Figuras 7 e 8 mostram os dados médios de crescimento radicular e aéreo de *Z. mays* com 30 e 60 dias de crescimento.

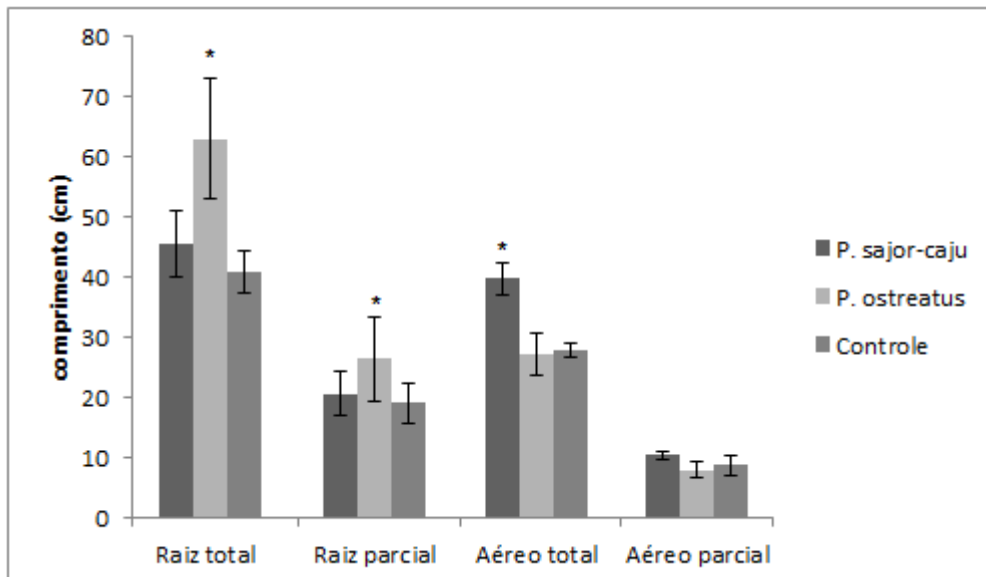


Figura 7 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de *Z. mays* com 30 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

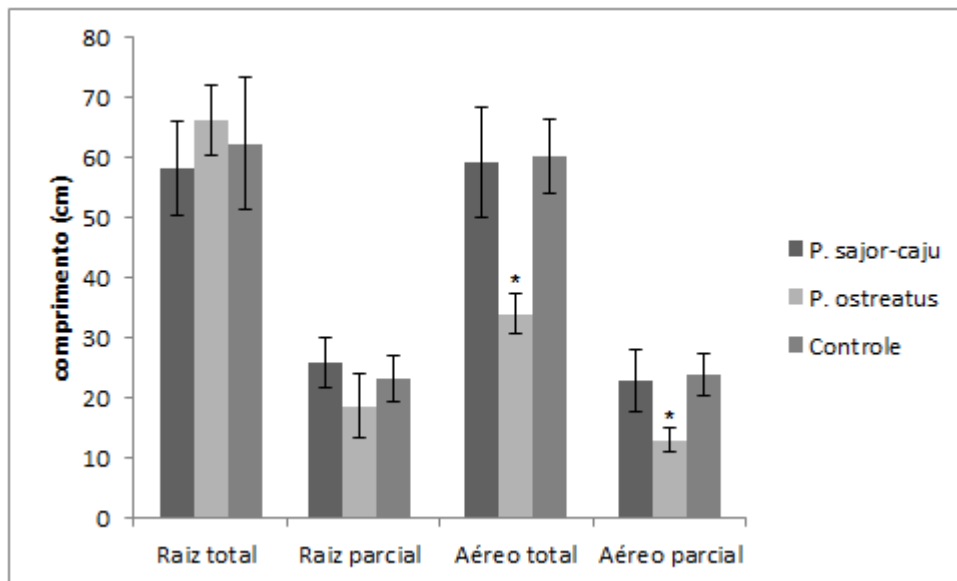


Figura 8 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

Com 30 dias de crescimento, o milho apresentou maior crescimento radicular total e parcial (comprimento médio das raízes) em misturas com o crescimento de *P. ostreatus*. Esse crescimento foi significativo e diferente do controle pelo teste de Dunnett ( $p < 0,05$ ). Entretanto, o crescimento aéreo total e parcial (crescimento do caule) foi maior em misturas crescidas com *P. sajor-caju*, sendo que a parte aérea total foi significativamente diferente do controle (Dunnett  $< 0,05$ ). Com 60 dias de crescimento, o comprimento radicular total foi maior em misturas crescidas com *P. ostreatus*, já a raiz parcial foi maior em *P. sajor-caju*. Em ambos os cultivos, as raízes crescidas em misturas com *P. ostreatus* foram mais grossas que o controle, o que pode indicar fitotoxicidade. O crescimento aéreo total e parcial do controle e de *P. sajor-caju* foram próximos e maiores que o de *P. ostreatus*, sendo que o crescimento deste foi significativamente diferente (Dunnett  $< 0,05$ ).

As Figuras 9 e 10 mostram os dados médios de crescimento radicular e aéreo de *Z. mays* com 30 e 60 dias de crescimento.

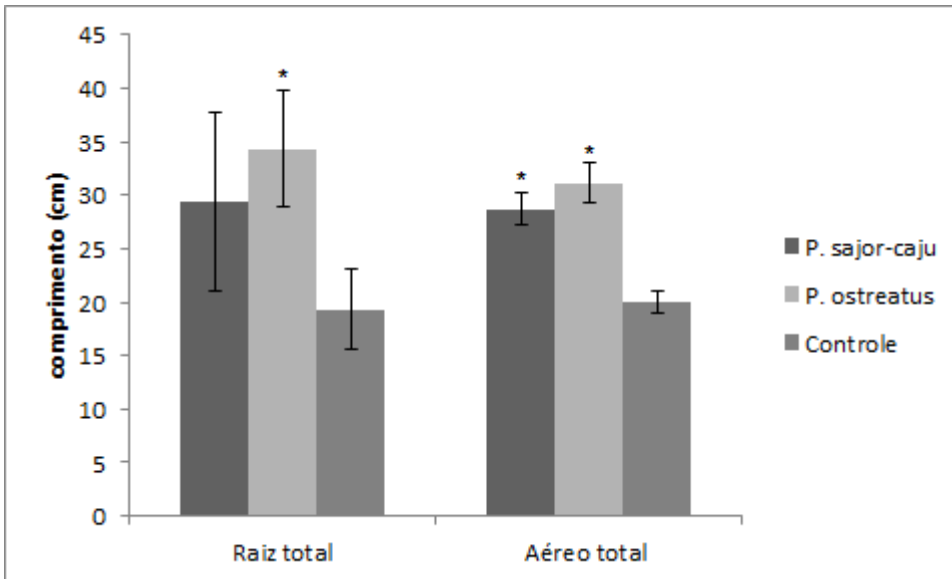


Figura 9 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

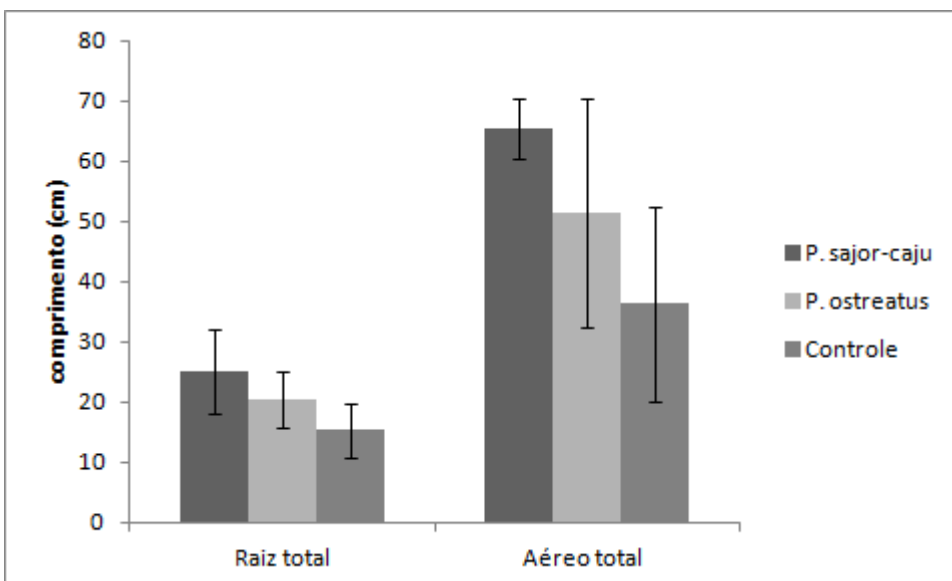


Figura 10 - Dados médios do crescimento radicular e aéreo de *H. annuus* com 60 dias

O comprimento aéreo e das raízes de girassóis com 30 dias de crescimento foi maior em misturas de *P. ostreatus*, sendo em ambos diferentes do controle. Com 60 dias de crescimento, a raiz e a parte aérea foram maiores com misturas de *P. sajor-caju*.

Messias (2013) verificou que a mistura de lodo de ETA e substrato comercial na concentração de 50% estimulou o desenvolvimento parcial e total das raízes de milho. Finoto et al. (2011) observaram redução de 81,35% da parte aérea

do milho em solo com a aplicação recente de imazapic. Já Machado et al. (2012) obteve redução de 75,8%; 70,9%; e 80% da altura da planta, comprimento do caule e comprimento da raiz quando aplicado imazamoxi 100 mg kg<sup>-1</sup> no solo. Em solo com aplicação de glifosato 100 mg kg<sup>-1</sup> houve redução de 92,53%; 73,39% e 96,92% da altura da planta, comprimento do caule e comprimento da raiz. Os efeitos dos compostos tóxicos afetam, na maioria dos casos, primeiramente a germinação e o desenvolvimento das raízes. A função das raízes é realizar a absorção de água e nutrientes presentes na mistura/solução. Consequentemente, poluentes, elementos químicos e agrotóxicos em excesso presentes nessas amostras, os quais dependendo de suas concentrações podem interferir positiva ou negativamente no desenvolvimento das plântulas (MATA et al., 2011), sendo que a toxicidade destes compostos pode estar relacionada aos tratamentos e a maneira de disposição do resíduo.

O desenvolvimento das culturas com misturas de resíduos com o crescimento de *P. sajor-caju* foi melhor do que *P. ostreatus*. A parte aérea das culturas foi maior apesar do crescimento radicular ser menor. Entretanto, as raízes foram mais grossas em *P. ostreatus*, principalmente no desenvolvimento do milho. Zhou et al. (2009) observaram que o diâmetro das raízes de milho aumentou quando submetidas ao imazethapyr, indicando um efeito fitotóxico a este herbicida. Esses dados podem indicar que *P. sajor-caju* foi mais eficiente na degradação/transformação de elementos, já que o crescimento das culturas foi melhor do que o crescimento em mistura de resíduos com *P. ostreatus*.

As Figuras 11 e 12 mostram os dados médios de massa fresca e seca com 30 e 60 dias de crescimento de milho, respectivamente.



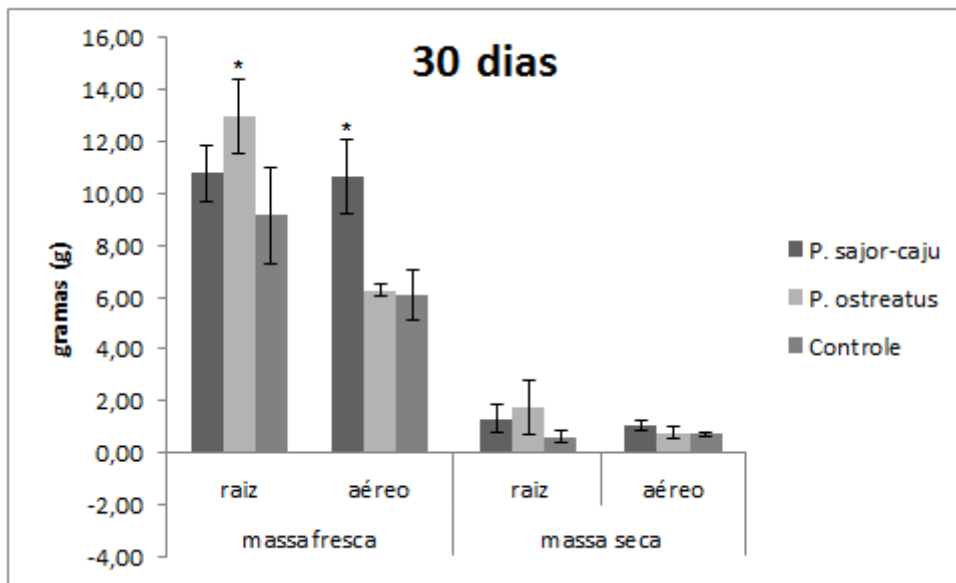


Figura 11 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de *Z. mays* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

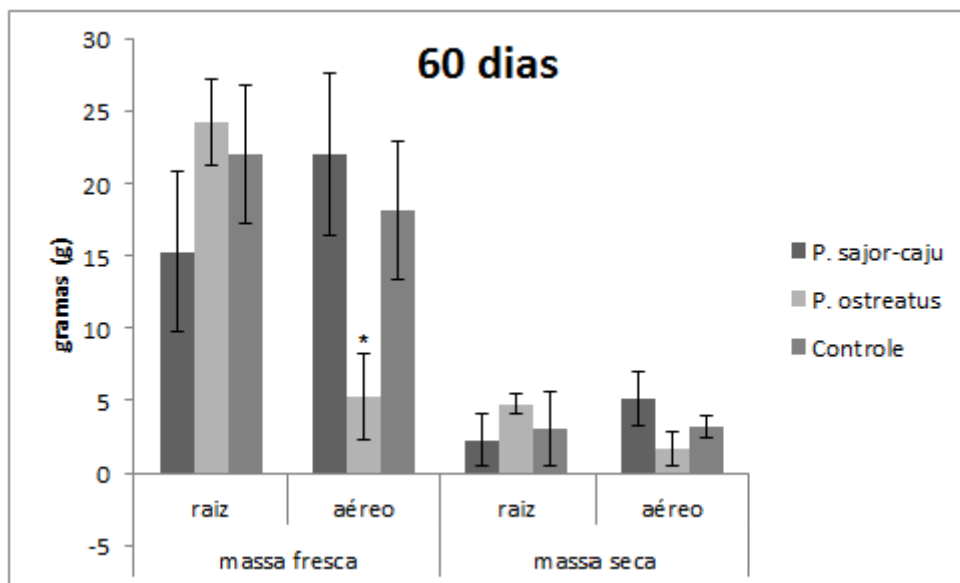


Figura 12 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

De maneira geral, a biomassa do milho foi maior nos tratamentos do que no controle com 30 e 60 dias de crescimento. Entretanto, estatisticamente, apenas a massa fresca foi diferente do controle pelo teste de Dunnett. A massa fresca e seca das raízes do milho cultivada em mistura de *P. ostreatus* foi 41,85% e quase três vezes maior do que o controle, respectivamente. Já a massa fresca e seca da parte aérea do milho cultivada em mistura de *P. sajor-caju* foi 75,41 e 48,46% maior do que o controle com 30 dias de crescimento, respectivamente.

Assim como a biomassa fresca e seca do milho, os dados de biomassa com 60 dias também apresentaram massa fresca e seca das raízes maiores do que o controle em *P. ostreatus* (9,75 e 56,40%) e massa fresca e seca da parte aérea maiores que o controle em *P. sajor-caju* (21,23 e 62,02%) Esses dados já eram esperados, pois o maior comprimento das raízes e parte aérea foi obtido com o milho crescido em misturas crescidas em *P. ostreatus* e *P. sajor-caju*, respectivamente.

As Figuras 13 e 14 mostram os dados médios de massa fresca e seca com 30 e 60 dias de crescimento de girassol, respectivamente.

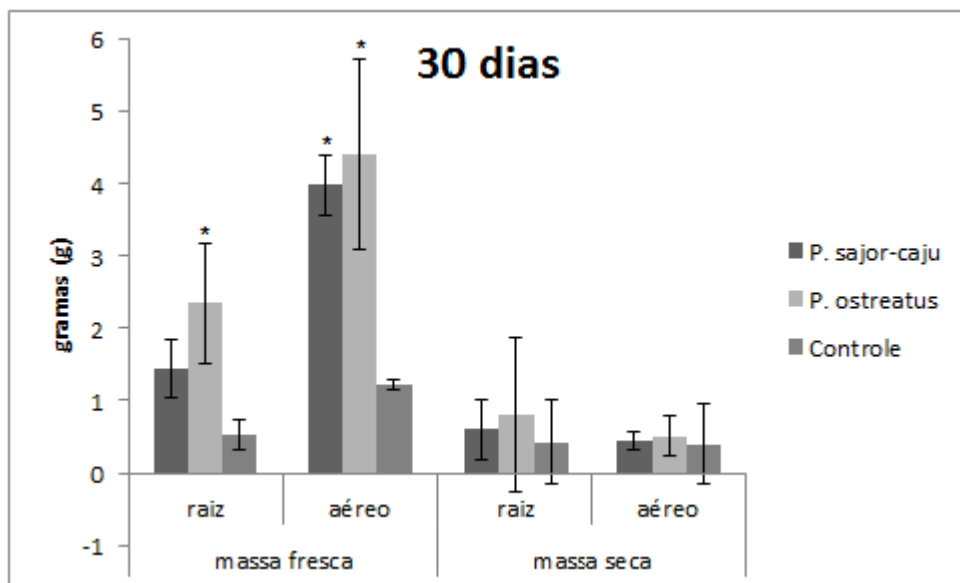


Figura 13 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

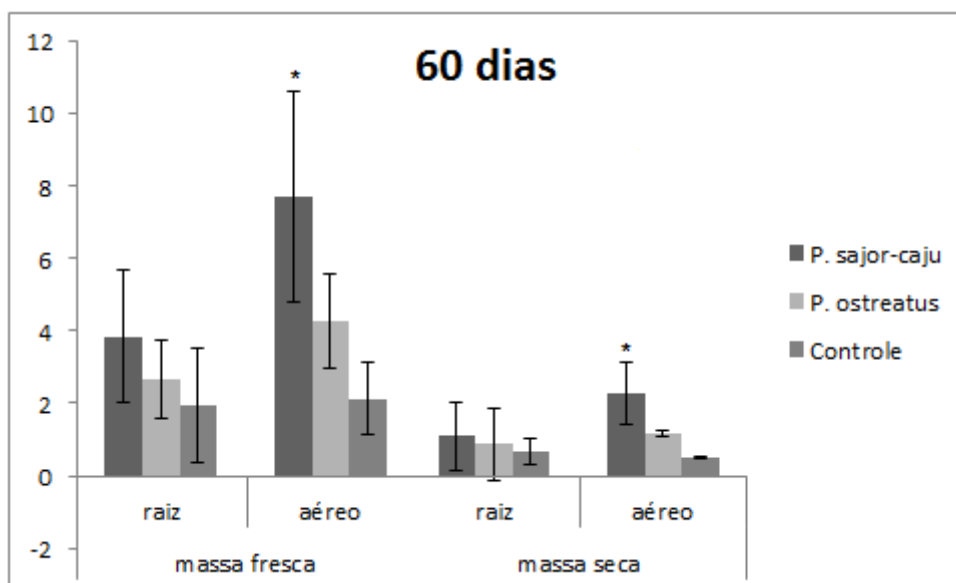


Figura 14 - Dados médios de biomassa radicular e aérea de *H. annuus* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

Tabela 9 - Dados médios de biomassa das flores de *H. annuus*

	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
<i>P. sajor-caju</i>	4,90	0,80
<i>P. ostreatus</i>	2,70	0,36
Controle	3,52	0,44

Assim como a biomassa do milho, a biomassa do girassol cultivado com a mistura tratada com os fungos também foi maior do que o controle. Estatisticamente os dados de massa fresca e seca da parte aérea com 60 dias e massa fresca das raízes e parte aérea foram diferentes do controle pelo teste de Dunnnett. A massa fresca e seca das raízes foi maior quatro vezes e 88,37%, respectivamente, maior do que o controle com o girassol cultivado em mistura de *P. ostreatus* com 30 dias de crescimento. A massa fresca e seca da parte aérea também foi quase quatro vezes e 27,98% maior do que o controle com o girassol cultivado em mistura de *P. ostreatus*. Com 60 dias de crescimento, o girassol teve 71,96 e 66,82% de massa fresca e seca das raízes maior do que o controle quando cultivados em mistura de *P. sajor-caju*. Entretanto, a massa fresca e seca da parte aérea foi maior que o controle em cultivo com misturas de *P. sajor-caju* (quase quatro e cinco vezes maior). Nas flores dos girassóis, o tratamento com *P. sajor-caju* apresentou biomassa (massa fresca e seca) maiores que o controle; porém a biomassa do tratamento com *P. ostreatus* foi menor que o controle. Entretanto,

ambos os tratamentos não diferiram estatisticamente do controle. As flores não tiveram um bom desenvolvimento, permaneceram pequenas até o envelhecimento da planta, provavelmente pela insuficiência de luz proporcionada na casa de vegetação.

Segundo Messias (2013), a massa seca das raízes de milho teve efeito negativo de 8,2%, sendo que o efeito positivo chegou a 42%, comparadas com o controle a 50% de lodo de ETA em substrato comercial. Já a biomassa fresca e seca da parte aérea foi 15% maior que o controle. Machado et al. (2012) obteve redução de 90,87% da biomassa fresca de milho (parte aérea e raiz) em solo com aplicação de 100 mg kg<sup>-1</sup> de glifosato. Os dados obtidos foram um pouco mais relevantes do que os dados de Ramos et al. (2008). Estes autores verificaram que o crescimento da parte aérea de *H. annuus* foi 10,52% menor do que o controle em solo que recebeu 5 t ha<sup>-1</sup> de palha de cana-de-açúcar. Quanto a biomassa, somente a média da massa fresca das raízes foi maior do que o controle (1,33%). A biomassa seca da parte aérea foi 22,33% menor do que o controle. Ramos et al. (2008) verificou biomassa seca da parte aérea 41,17% e 52,94% menores em solo com aplicação de 5 t ha<sup>-1</sup> de palha da cana e 150 m<sup>3</sup> de vinhaça aplicados separadamente, respectivamente.

Ullah et al. (2011) estudaram a biomassa de girassóis cultivados em seis concentrações de Pb, Cr e Cd. Os efeitos mais evidentes foram com 50 e 100 mg kg<sup>-1</sup> de Pb, em que a massa da parte aérea foi de 10,97 g e 9,27 g. O peso seco foi mais notado em solos com 150 mg kg<sup>-1</sup> de Cr e 20 mg kg<sup>-1</sup> de Cd com 1,0g e 0,98, respectivamente. Já na massa fresca das raízes, o efeitos foram de 1,16 g para solo com Cr 50 mg kg<sup>-1</sup> e 0,85 g para Cd 10 mg kg<sup>-1</sup>. A massa seca também ocorreu em Cr (0,19 g), mas com 100 mg kg<sup>-1</sup> e 10 e 40 mg kg<sup>-1</sup> de Cd (0,12 e 0,18 g, respectivamente).

A biomassa fresca e seca das flores foi maior na mistura tratada com *P. sajor-caju*, sendo estas 2,2 e 1,8 vezes maior e 1,4 e 1,8 vezes maior que o controle e *P. ostreatus*, respectivamente (Tabela 9). Observando visualmente na casa de vegetação a diferença entre as flores dos diferentes tratamentos era bastante perceptível.

### 5.5 Concentração de elementos em *Zea mays* e *Helianthus annuus*

As quantificações dos elementos químicos presentes nas raízes e parte aérea de milho e girassol foram realizadas para determinar em qual parte das culturas (raiz ou parte aérea) poderá ocorrer o acúmulo dos elementos químicos. As Figuras 15 a 22 mostram os resultados das análises realizadas no milho.

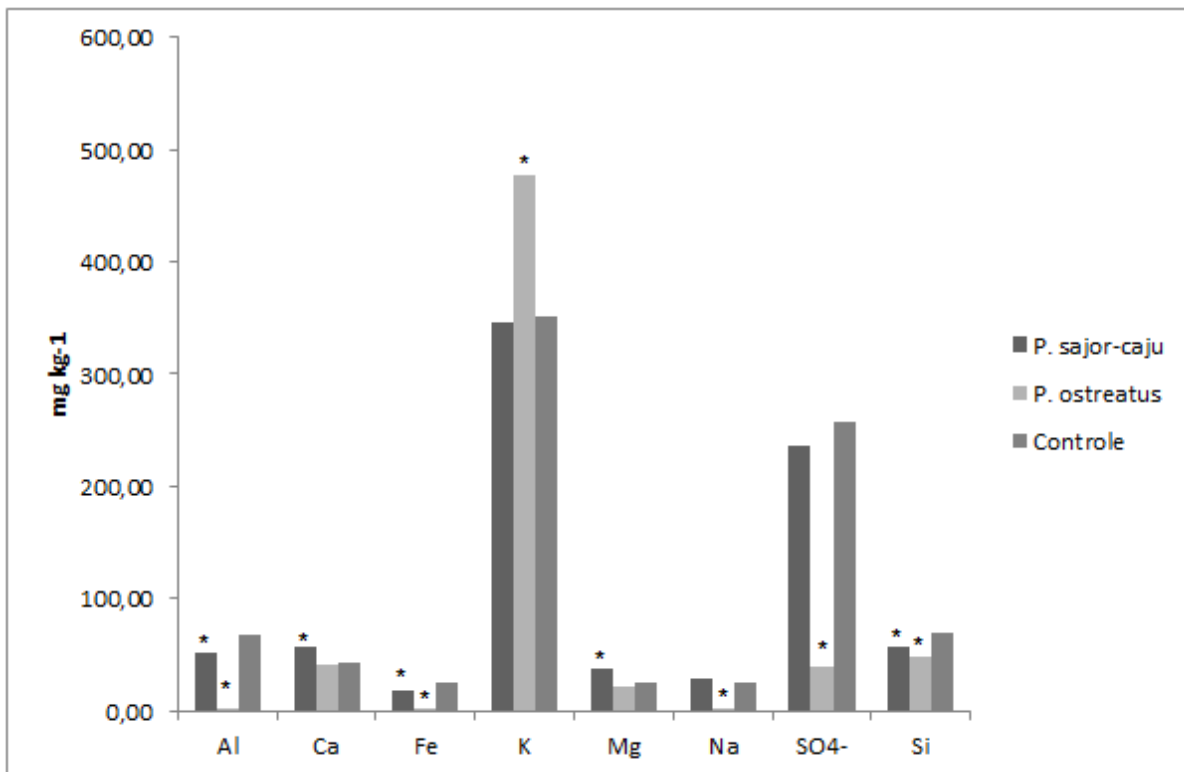


Figura 15 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de *Z. mays* com 30 dias

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

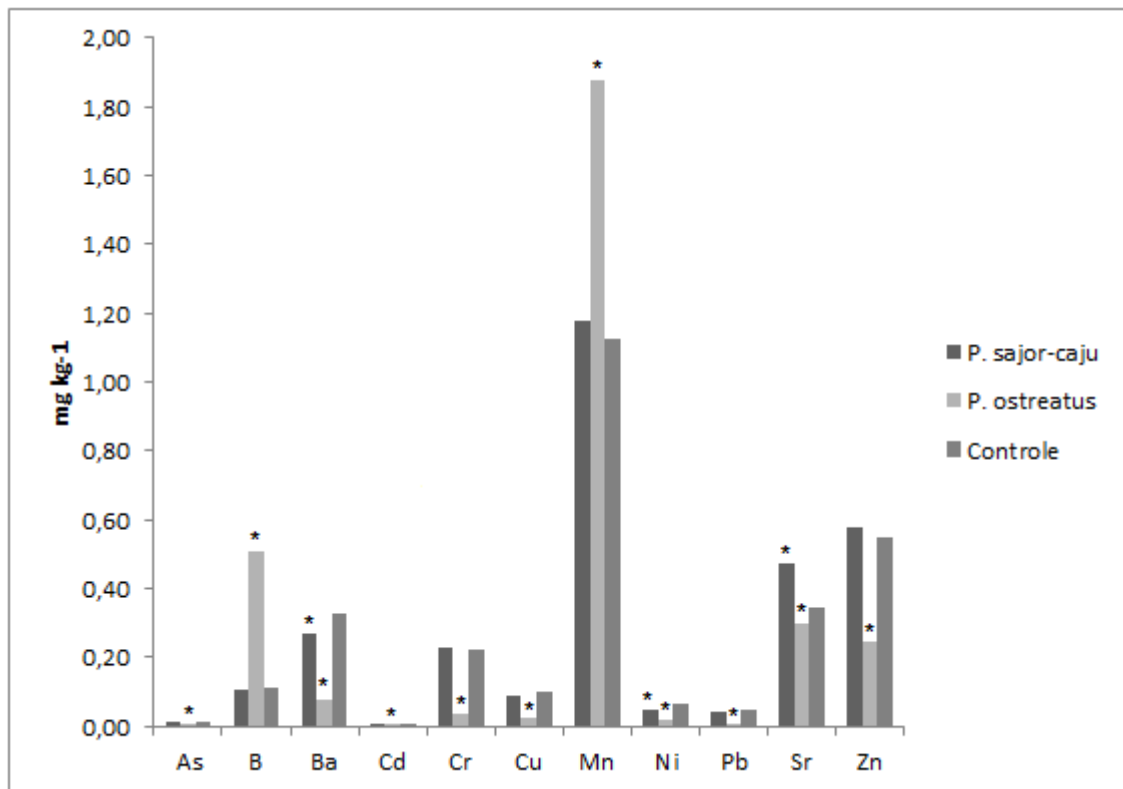


Figura 16 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *Z. mays* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

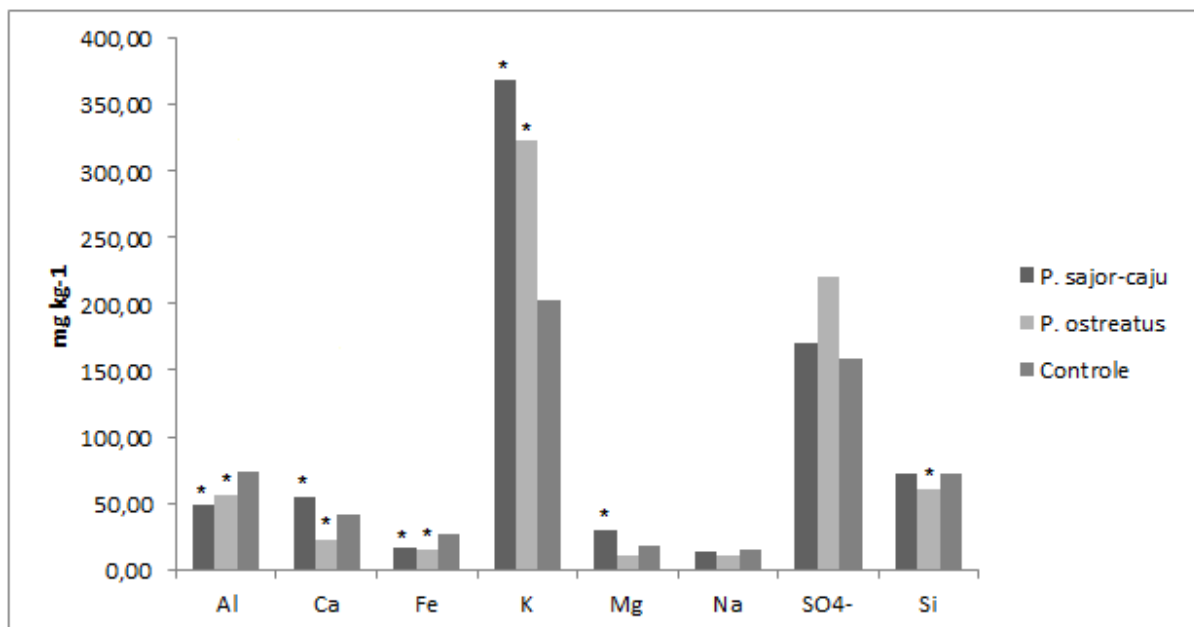


Figura 17 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

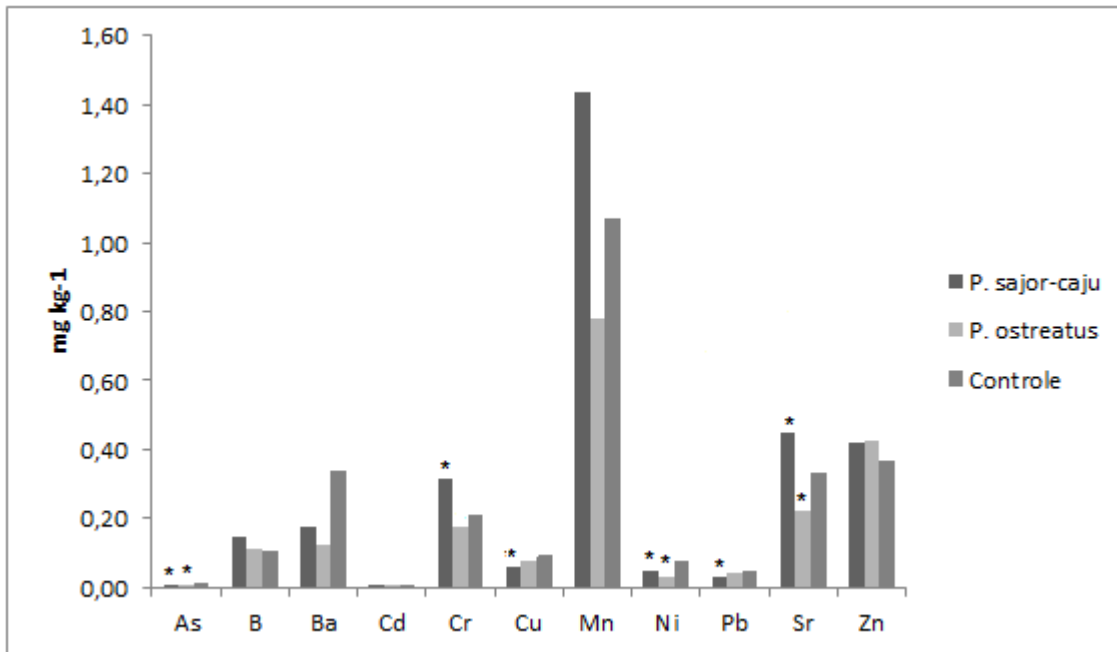


Figura 18 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

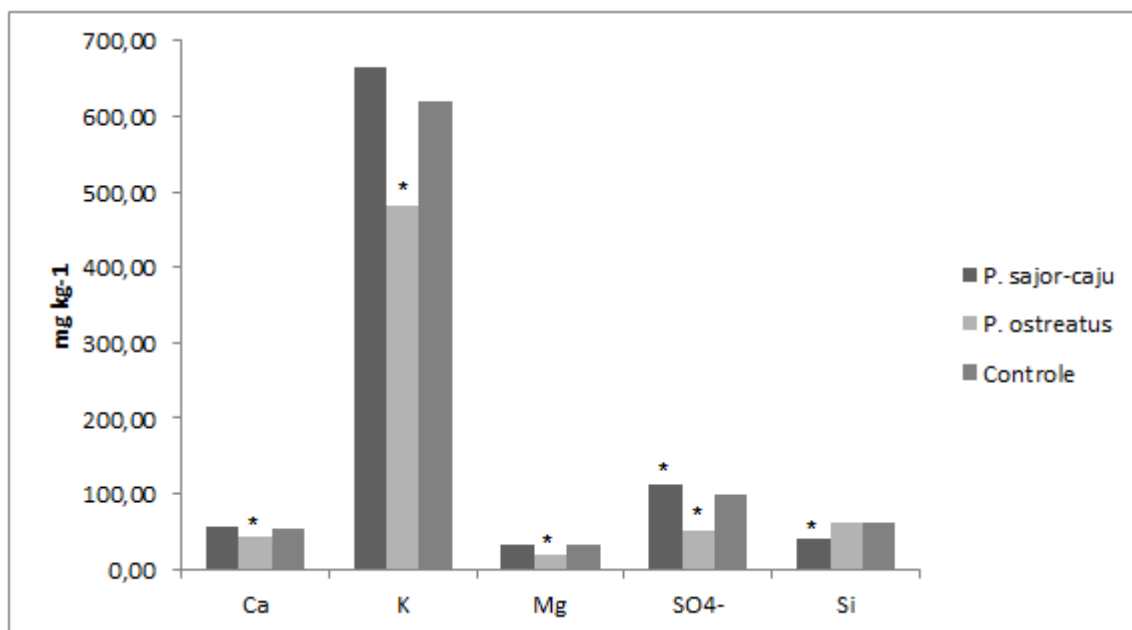


Figura 19 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de *Z. mays* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

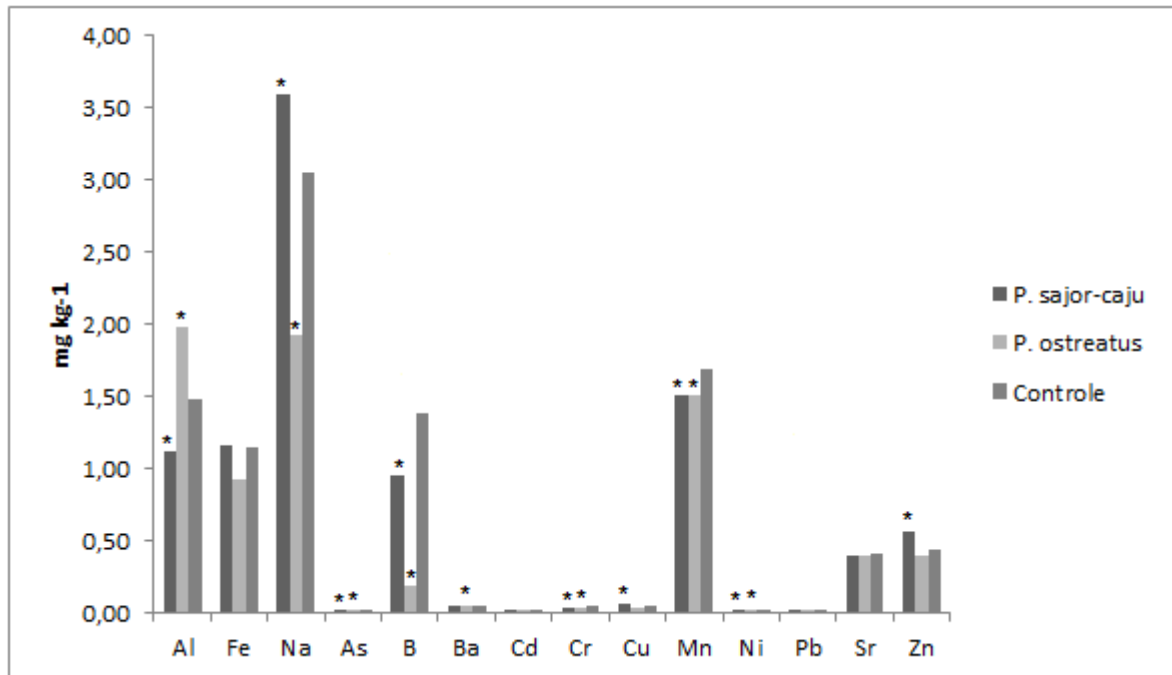


Figura 20 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *Z. mays* com 30 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

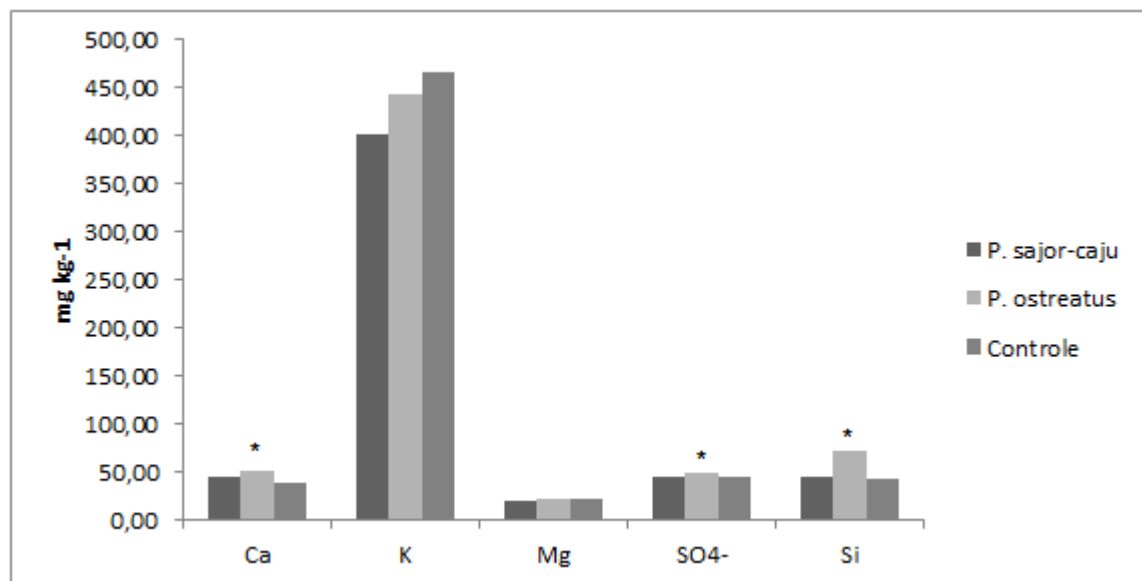


Figura 21 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )



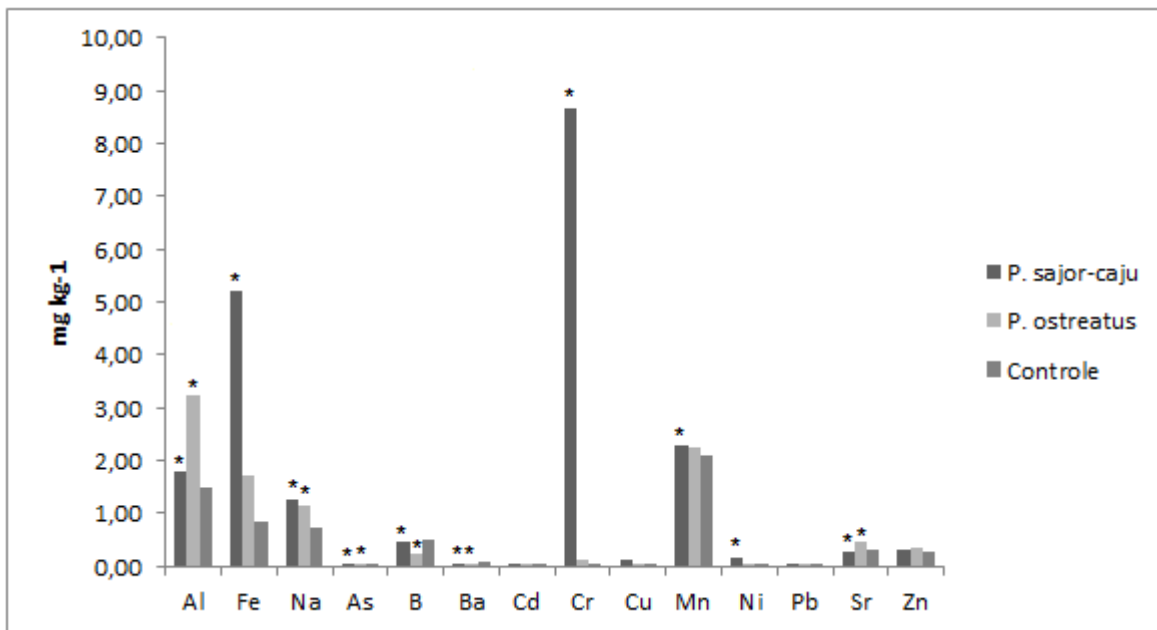


Figura 22 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *Z. mays* com 60 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

Nos cultivos de 30 e 60 dias, as raízes submetidas ao tratamento com *P. ostreatus* apresentaram maiores concentrações significativamente diferentes do controle. Entretanto, no cultivo com 60 dias, a parte aérea do tratamento com *P. sajor-caju* apresentaram maiores concentrações significativamente diferentes do controle seguidos do cultivo de 30 dias.

As Figuras 23 a 32 mostram as análises realizadas no girassol.

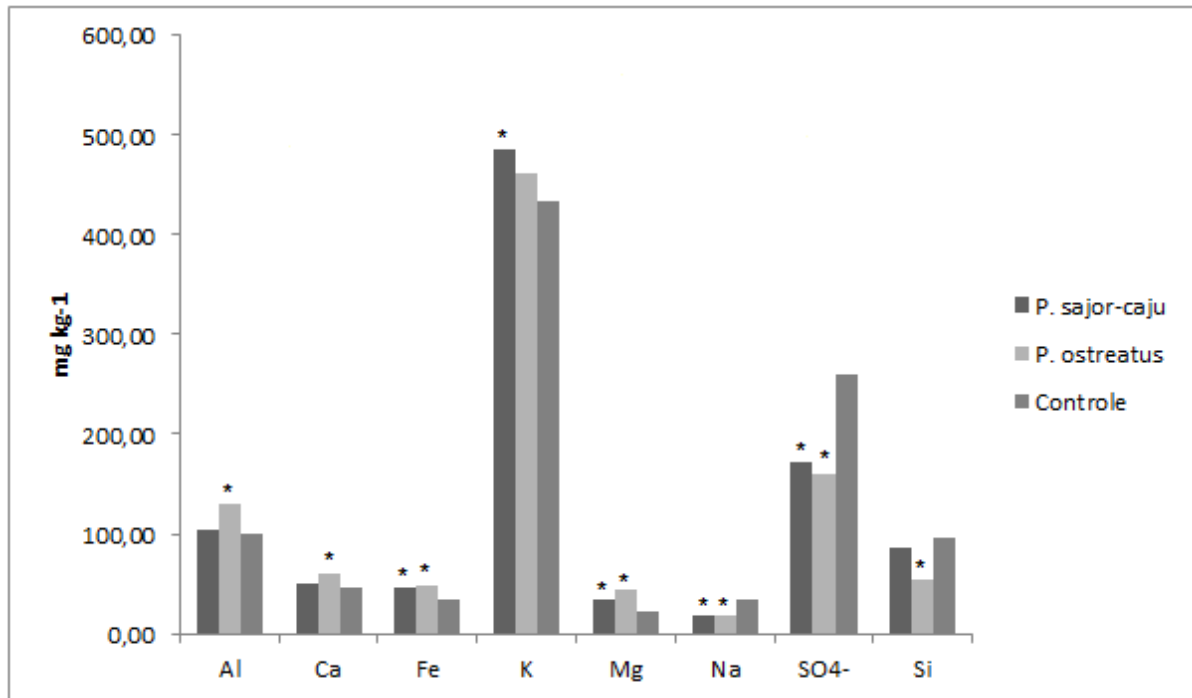


Figura 23 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

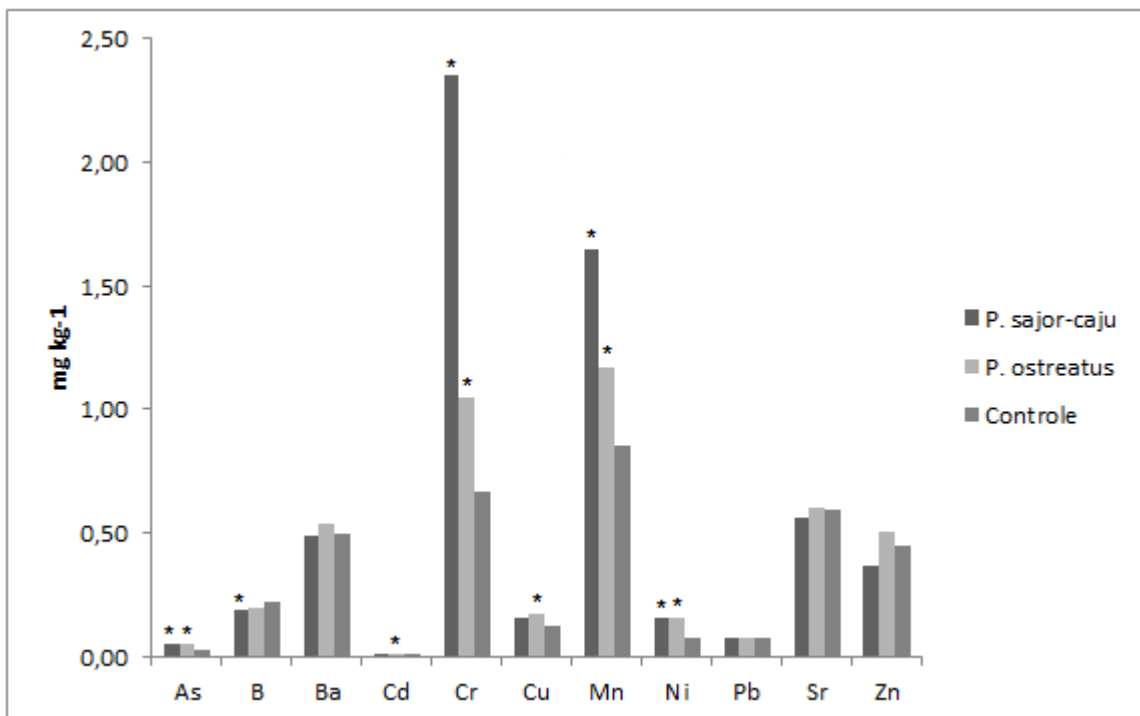


Figura 24 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

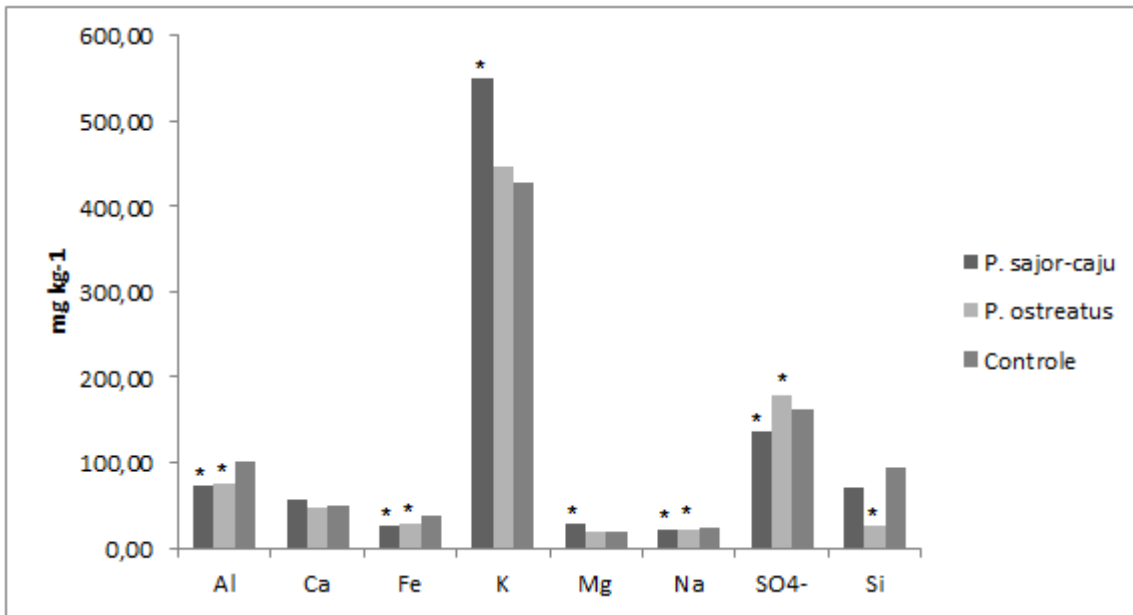


Figura 25 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes de *H. annuus* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

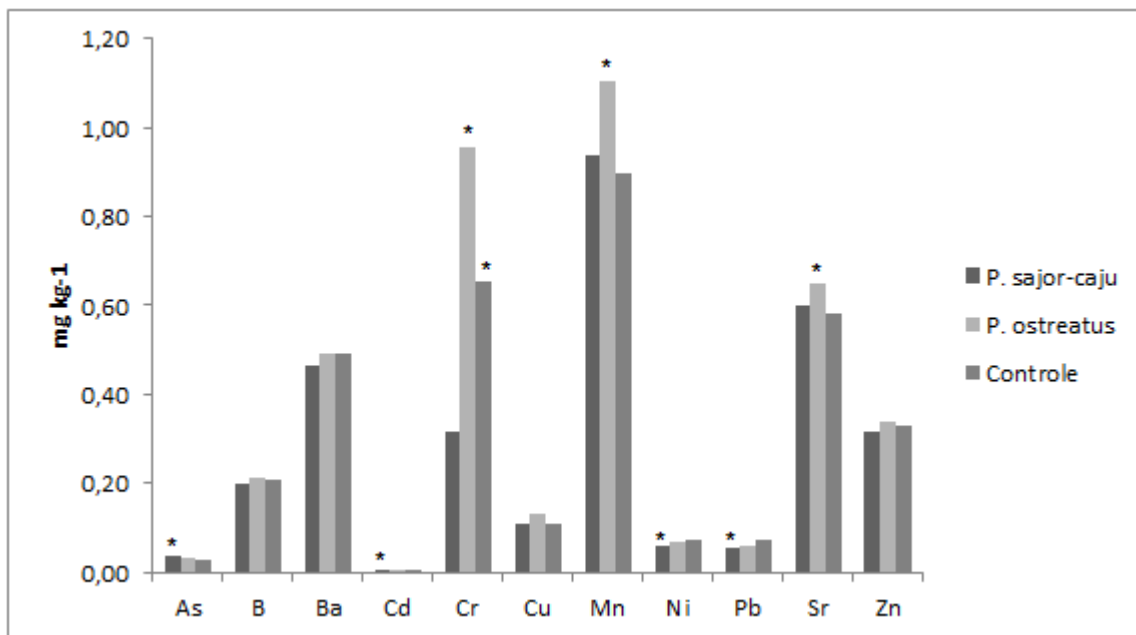


Figura 26 - Dados médios de concentração de elementos nas raízes menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *H. annuus* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

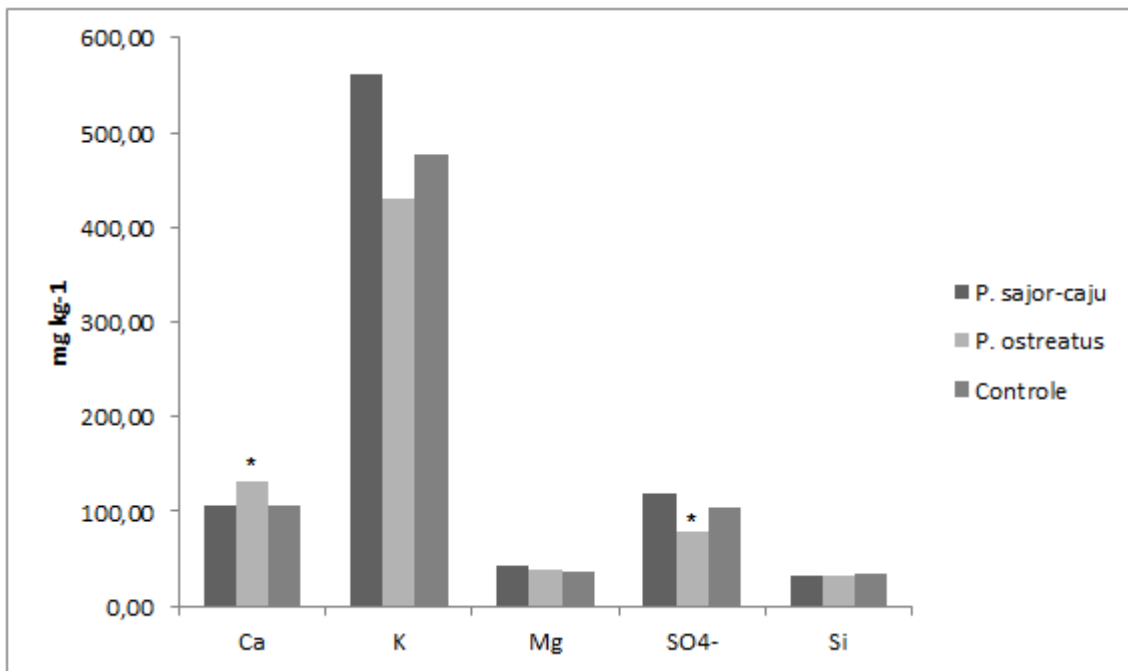


Figura 27 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

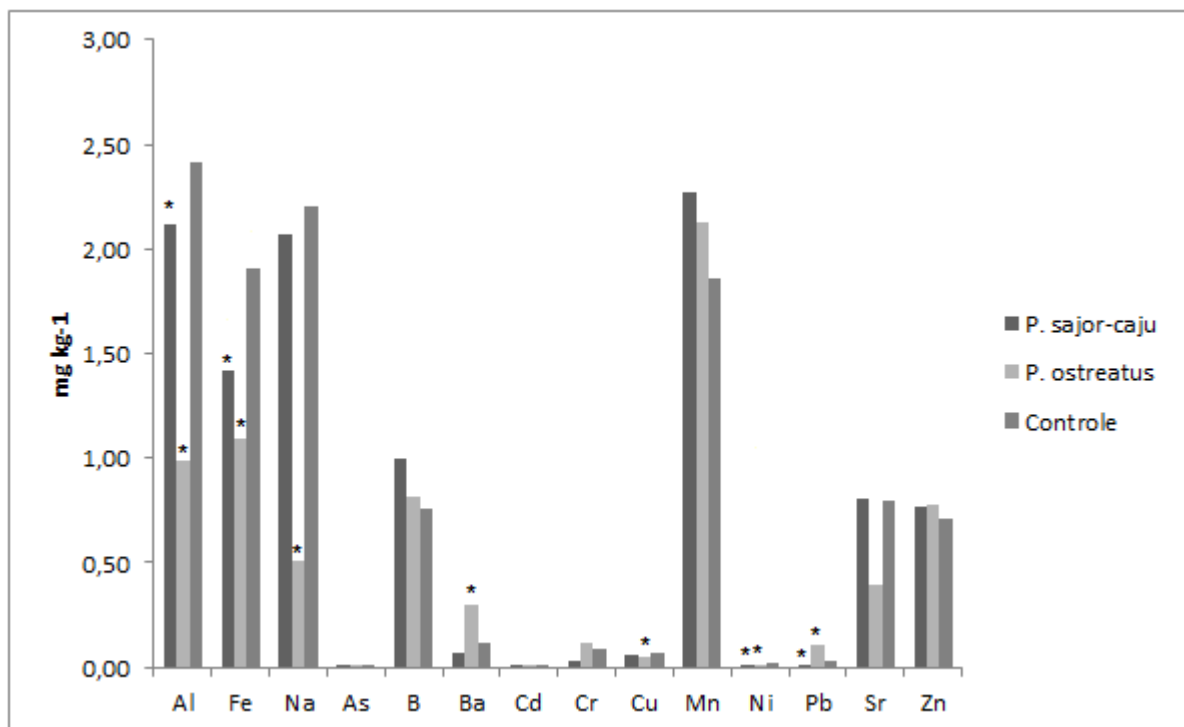


Figura 28 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *H. annuus* com 30 dias  
\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

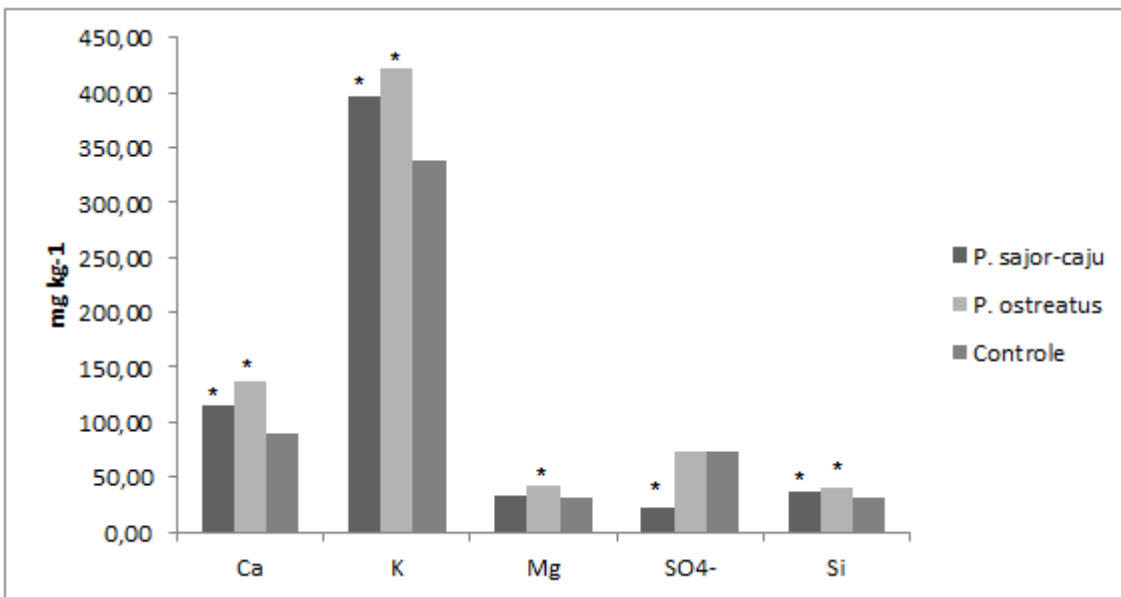


Figura 29 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea de *H. annuus* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

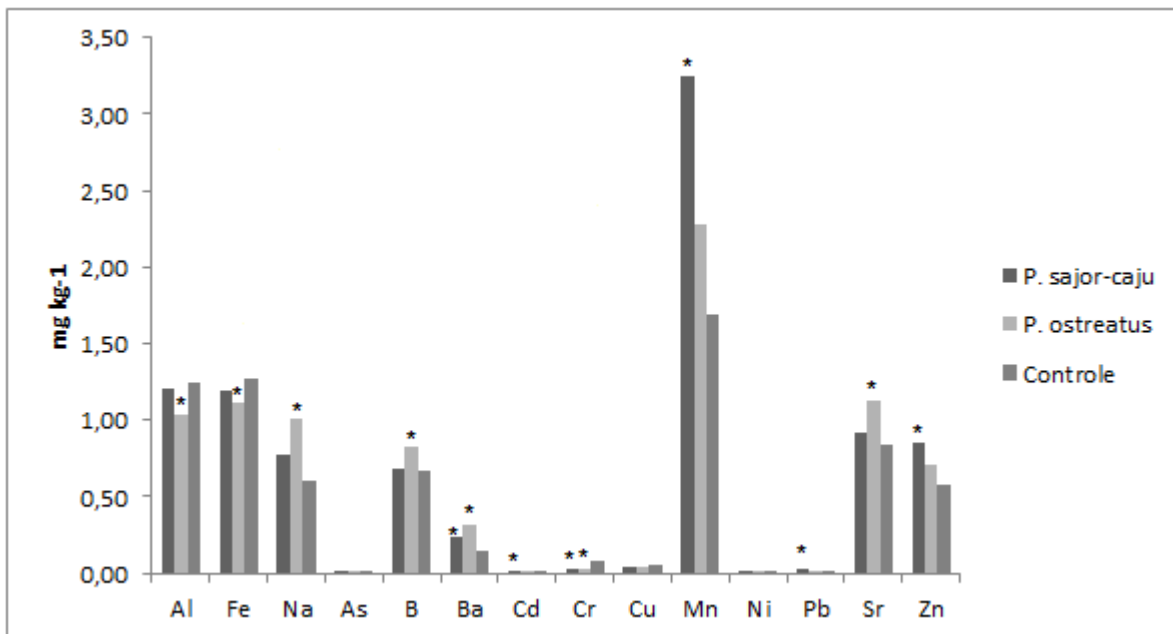


Figura 30 - Dados médios de concentração de elementos na parte aérea menores que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$  de *H. annuus* com 60 dias  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

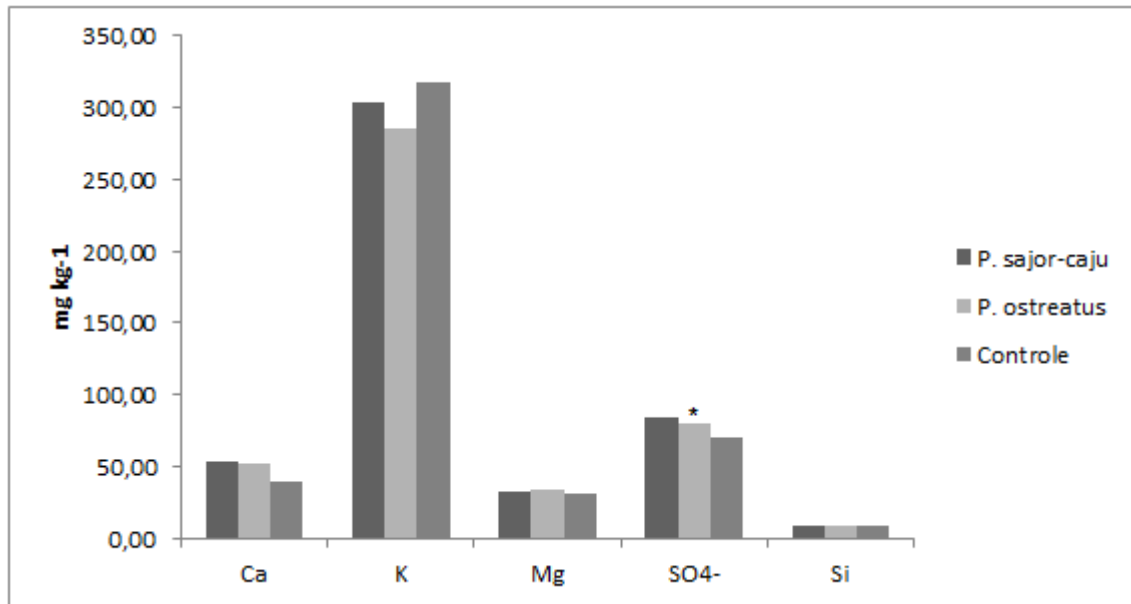


Figura 31 - Dados médios de concentração de elementos nas flores de *H. annuus*  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

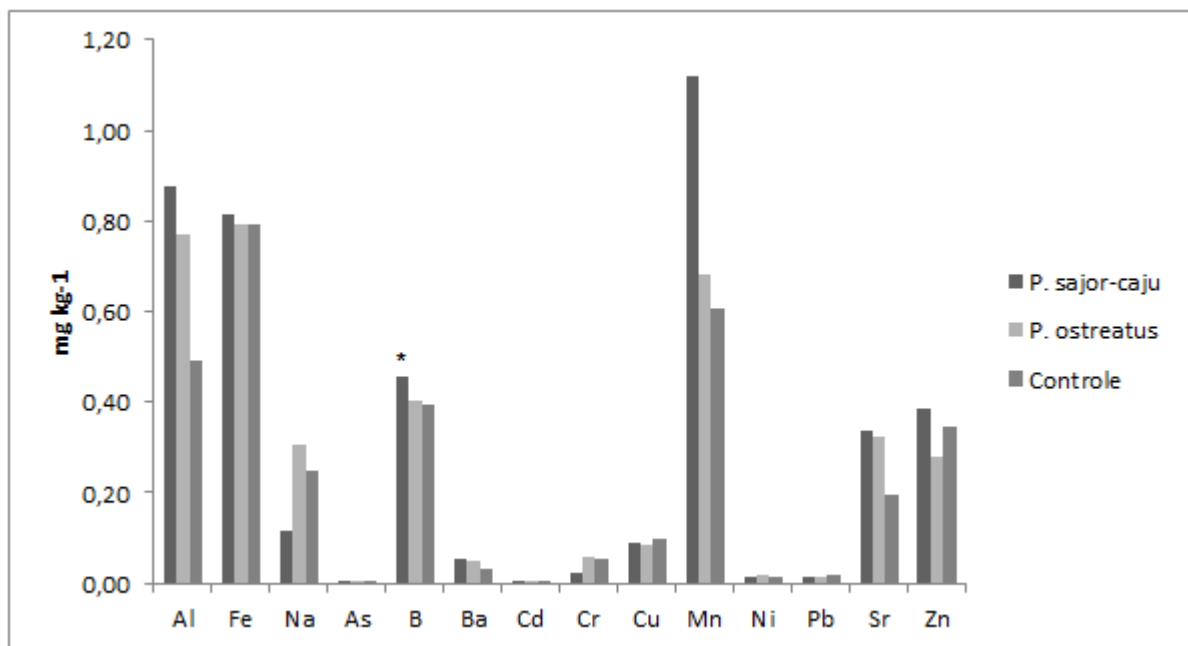


Figura 32 - Dados médios de concentração de elementos nas flores menores que 10 mg kg<sup>-1</sup> de *H. annuus*  
\*Dunnnett ( $p < 0,05$ )

Assim como no milho, as raízes de girassóis as raízes submetidas ao tratamento com *P. ostreatus* apresentaram maiores concentrações significativamente diferentes do controle. No cultivo de 60 dias, a parte aérea apresentou maiores

concentrações significativamente diferente do controle para o mesmo tratamento, seguido do cultivo de 30 dias.

De modo geral, os elementos que se apresentaram em maior concentração e que foram significativamente diferentes do controle (Dunnett < 0,05) nas culturas de milho e girassol foram K, S (na forma de  $\text{SO}_4^-$ ). Outros elementos em quantidades significativas foram Si, Al, Ca, Mg, Na e Fe. Os demais elementos apresentaram uma concentração menor do que  $10 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Os dados ainda mostram que a concentração de elementos foi maior nas raízes do que na parte aérea em ambas as culturas com cultivo de 30 dias. Nas raízes, a maior concentração foram de K, S, Si, Al, Ca, Mg, Na e Fe, já na parte aérea os elementos em maior quantidade são K, S, Si, Ca e Mg. Nas flores de girassóis, os elementos em maior concentração foram de Ca, K, Mg e  $\text{SO}_4^-$ . Entretanto, as análises estatísticas mostram que não houve relação entre concentração de elementos com o tempo de cultivo e com os tratamentos. Sendo assim, as culturas com 60 dias não diferiram estatisticamente quanto à concentração de elementos das culturas com 30 dias.

Em ambas as culturas, houve acúmulo de Al, Fe e  $\text{SO}_4^-$  nas raízes, o que pode justificar o desenvolvimento de algumas raízes grossas, já que este sintoma pode ocorrer devido ao acúmulo desses elementos/moléculas (ANDRADA; TAVARES; MAHLER, 2007). Apesar do desenvolvimento de raízes grossas, na parte aérea das culturas não foi observado efeitos de clorose ou outros sintomas de fitotoxicidade ou falta de nutriente; exceto nos controles, onde ocorreu o desenvolvimento de folhas amareladas. Alguns autores sugerem que os efeitos que ocorrem durante o desenvolvimento vegetal, como sinergismo e antagonismo, dependem da concentração e do número de contaminantes (RIVELLI et al., 2012). O lodo de ETA contém grandes quantidades de Al e Fe provenientes da adição de sulfato de ferro e de alumínio que são adicionados durante o processo de potabilidade da água, sendo que na presente amostra foi quantificada grandes quantidades de Fe. Assim, as altas concentrações desses elementos/moléculas nas culturas já eram esperadas. Os elementos Mg e Ca geralmente se apresentam em grandes quantidades, pois são constituintes da molécula de clorofila e do esqueleto celulósico das plantas, respectivamente (ANDRADA; TAVARES; MAHLER, 2007).

Messias (2013) observou altas concentrações de elementos nas raízes, tais como Al, B, Ca, Fe, K, Mg, Mn e Na e Ca, K, Na e Mg na parte aérea de milho

crescido em lodo de ETA em quantidades maiores do que as concentrações observadas neste estudo. As concentrações nas raízes foram maiores que 45 vezes de Al e 25 vezes de Fe e três vezes maiores de K na parte aérea. Assim como Messias (2013), neste estudo também houve maior concentração de K na parte aérea no cultivo de milho, entretanto no cultivo de girassol as concentrações foram homogêneas nas raízes e parte aérea. O acúmulo de potássio pode ser devido a altas concentrações de K presente na vinhaça. Baran et al. (2001) notaram o acúmulo de K nas raízes e parte aérea de *Hypostases phyllostagya* cultivada em bagaço de uva e turfa, quanto maior a concentração de bagaço maior o K acumulado.

A literatura mostra que, assim como os dados obtidos, há maior concentração de elementos provenientes de diversos contaminantes/fonte poluidoras nas raízes do que caule e folhas. Singh et al. (2004) encontraram um efetivo acúmulo de metais principalmente nas raízes seguido por parte aérea e folhas em girassóis crescidos em várias concentrações de lodo de curtume, durante 60 dias. Houve maior absorção de Fe ( $476,18 \mu\text{g g}^{-1}$ ) no tratamento com 100% de lodo, em comparação ao Cr ( $426,33 \mu\text{g g}^{-1}$ ), Zn ( $103,74 \mu\text{g g}^{-1}$ ) e Mn ( $242,46 \mu\text{g g}^{-1}$ ). Esse acúmulo de metais nas raízes pode ser devido a absorção de metais pelas raízes na presença de soluções que contenham metais (na forma de íons) e a presença de metais complexados, resultando em menos translocação de metais para outras partes da planta (SINGH et al., 2004; CARBONELL et al., 2011).

Em solos que foram incorporados resíduos urbanos com concentração de Cu e Pb de 16,14 e 35,61  $\text{mg kg}^{-1}$ , houve absorção de 20 e 7  $\text{mg kg}^{-1}$  pelas raízes de milho, respectivamente; já a concentração de Cd e Zn nas folhas foi de 0,6 e 119  $\text{mg kg}^{-1}$ , sendo que a concentração nos resíduos eram de 0,21 e 66,43  $\text{mg kg}^{-1}$  (CARBONELL et al., 2011). Outro estudo mostra que a concentração de Ni na parte aérea de milhos cultivados próximo a área mineradora foi de 2,73 a 8,14  $\text{mg kg}^{-1}$  em solos contaminados com Ni a taxas de 2,4 a 42  $\text{mg kg}^{-1}$ . Todos esses dados indicam que a absorção de elementos pelas plantas nem sempre reflete a concentração dos elementos no solo (MARWA; MEHARGA; RICE, 2012), mostrando que há uma complexidade nos mecanismos de absorção e fatores ambientais (SINGH et al., 2004; RIVELLI et al., 2011).

Marchiol et al. (2007) estudaram a acumulação de alguns metais em girassóis crescidos em solo com 1527; 233 e 980  $\text{mg kg}^{-1}$  de Cu, Pb e Zn,



respectivamente. Depois de 112 dias de crescimento, foi observado uma concentração média de 45,13% da taxa inicial desses elementos na raiz, sendo que na parte aérea a média foi de 31,32%. Assim como em girassóis, Dresler et al. (2014) mostraram que Cu e Cd se acumularam na raiz de milho crescidos em solução iônica durante oito dias (4800 e 3700  $\mu\text{g g}^{-1}$  raízes e 105 e 300  $\mu\text{g g}^{-1}$  na parte aérea). Já em milhos crescidos em áreas que recebem águas residuárias urbanas, foi observado um aumento de Mg, K e Mn de 25,7, 12,5, 22,4% em relação ao controle, respectivamente (TAMOUTSIDIS et al., 2009). Outros dados mostram que o Zn foi o elemento que concentrou mais nas raízes (250  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e folhas (79,8  $\text{mg kg}^{-1}$ ) de girassóis crescidos em solos com adição de Zn (300  $\text{mg kg}^{-1}$ ), Cd (5  $\text{mg kg}^{-1}$ ) e Cu (400  $\text{mg kg}^{-1}$ ) (RIVELLI et al., 2012).

Todos os dados de estudos citados mostram que não há uma relação direta entre a absorção e a concentração de elementos nos vegetais compatíveis com os elementos encontrados nos solo ou em contaminante/fonte poluidora. A ausência de uma relação pode ser devido ao mecanismo de bioacumulação de elementos, que é governado por fatores ambientais como a presença de substâncias húmicas, cloradas, metais, salinidade e entre outros. Por consequência desses fatores, a diferença de concentração de elementos observada em diferentes partes vegetais sugere diferentes mecanismos celulares de bioacumulação e translocação de elementos (SINGH et al., 2004). Outros dados mostram que para alguns elementos, as raízes agem como uma barreira, assim o acúmulo nas plantas é baixa e ocorre menos translocação para a parte aérea (CARBONELL et al., 2011).

## 5.6 Testes Toxicológicos

Os resultados dos controles positivos e negativos dos testes de sensibilidade com os organismos *Hydra attenuata*, *Daphnia similis* e *Raphidocelis subcapitata* foram satisfatório, pois estiveram dentro da faixa de sensibilidade observada por Santos, Vicensotti e Monteiro (2007), os quais também foram realizados no laboratório de Ecologia Aplicada (Tabela 10).

Tabela 10 - Concentração de inibição ( $CI_{50}$ ) para *R. subcapitata* e concentração letal ( $CL_{50}$ ) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas a NaCl em  $g L^{-1}$

<b>Organismos</b>	<b><math>CI_{50}</math> e <math>CL_{50}</math></b>
<i>R. subcapitata</i>	1,22
<i>D. similis</i>	3,72
<i>H. attenuata</i>	2,11

Os testes de sensibilidade com substâncias de referência, aliados aos dados das condições de cultivo dos organismos, são capazes de fornecer informações prévias quanto à saúde dos organismos utilizados. O NaCl foi escolhido como substância referência, pois é um contaminante para organismos de água doce, apresenta pureza consistente e é solúvel em água. Dessa maneira, o controle de sensibilidade dos organismos é um procedimento que permite maior precisão e confiabilidade dos resultados obtidos ao longo do tempo por um mesmo laboratório ou entre laboratórios diferentes (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Em testes toxicológicos, é importante o uso de mais uma espécie, pois é fundamentado que nenhuma espécie é sensível a todas as substâncias e que a sensibilidade varia com o agente tóxico e as condições ambientais (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006; MESSIAS, 2008). Também é importante o uso de espécies de níveis tróficos diferentes para mostrar a ação dos poluentes (TIGINI et al., 2011). Além disso, o uso de uma espécie não leva em conta as interações com outros organismos que ocorrem no ambiente (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Nesse sentido, bioensaios com *H. attenuata*, *R. subcapitata* e *D. similis* constituem uma ferramenta efetiva na avaliação de poluentes ambientais (MESSIAS, 2008), pois eles são sensíveis a amplos agentes químicos com resultados precisos (FERREIRA et al., 2011).

As Tabelas abaixo mostram os resultados da porcentagem de sensibilidade ( $CI_{50}$ ,  $CI_{20}$ ,  $CL_{50}$  e  $CL_{50}$ ) dos organismos expostos aos resíduos, separadamente – utilizados na mistura para o crescimento fúngico – e na mistura de resíduos antes e depois do crescimento dos fungos. Os testes foram feitos dessa maneira, pois a exposição à biota a mistura de contaminantes pode levar a interações toxicológicas resultantes da exposição de dois contaminantes, acarretando em uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente da esperada pela ação dos contaminantes sozinhos (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). Os testes realizados com a mistura de resíduos com o cultivo fúngico foram feitos

para saber se o metabolismo dos fungos proporcionaria um acréscimo ou decréscimo na toxicidade da mistura.

A toxicidade da vinhaça aos organismos *D. similis* e *H. attenuata* é alta, sendo que a concentração da vinhaça diluída a 50% que elimina 50% dos organismos foi ao redor de 2 e de 4,4% para *D. similis* e *H. attenuata*, respectivamente (Tabela 11). Já a exposição ao elutriado do lodo, mostrou toxicidade alta para *H. attenuata*, média para *R. subcapitata* e baixa para *D. similis* (Tabela 12).

Tabela 11 - Concentração letal (CL<sub>50</sub>) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas a vinhaça diluída a 50%

<b>Organismos</b>	<b>Porcentagem de sensibilidade</b>	
<i>D. similis</i>	<b>1,99</b> (CL <sub>50</sub> – 48 h)	<b>1,22</b> (CL <sub>20</sub> – 96 h)
<i>H. attenuata</i>	<b>4,41</b> (CL <sub>50</sub> – 96 h)	<b>4,20</b> (CL <sub>20</sub> – 96 h)

Tabela 12 - Concentração de inibição (CI<sub>50</sub>) para *R. subcapitata* e concentração letal (CL<sub>50</sub>) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas ao elutriado do lodo, 1:4 v/v

<b>Organismos</b>	<b>Porcentagem de sensibilidade</b>	
<i>R. subcapitata</i>	49,46 (CI <sub>50</sub> – 72 h)	13,42 (CI <sub>20</sub> – 72 h)
<i>D. similis</i>	75,48 (CL <sub>50</sub> – 48 h)	56,11 (CL <sub>20</sub> – 48 h)
<i>H. attenuata</i>	<b>8,12</b> (CL <sub>50</sub> – 96 h)	<b>5,61</b> (CL <sub>20</sub> – 96 h)

Na interpretação dos resultados dos testes de toxicidade, deve-se lembrar de que quanto menor forem os valores obtidos, maior será a toxicidade da amostra, uma vez que os resultados encontrados se referem à concentração da amostra necessária para afetar 50% dos organismos utilizados nos testes (MESSIAS, 2008).

Comparando os resultados da vinhaça e do lodo, é possível notar que a vinhaça apresentou maior toxicidade do que o lodo, e que *D. similis* foi organismo mais sensível. A CL<sub>50</sub> de *D. similis* e *H. attenuata* expostas a vinhaça foi cerca de 37 vezes e 1,84 vezes menor do que a CL<sub>50</sub> do lodo para esses organismos, respectivamente. Ferreira et al. (2011) também observaram que *D. similis* foi o organismo mais sensível quando foi exposta a vinhaça bruta (CL<sub>50</sub> de 2,2%) e que sua sensibilidade foi maior quando comparado a *D. magna*. Já, em estudos com a concentração letal de *D. similis* com lodo de esgoto e chorume Mannarino et al. (2010) detectaram CL<sub>50</sub> de 5 e 12% em amostras de esgoto e esgoto mais chorume,

respectivamente. A  $CL_{50}$  de *H. attenuata* foi menor do que a toxicidade de *D. similis*, assim como os dados de Ferreira et al. (2011) para este organismos. Geralmente *H. attenuata* é muito usado em testes com efluentes e sua sensibilidade/resposta é mais notada em amostras que contenha metais pesados (QUINN; GAGNÉ; BLAISE, 2009). Dessa forma, a toxicidade deste cnidário não foi tão alta quanto a de *D. similis*, pois a vinhaça é caracterizada pela elevada DBO e DQO e não por metais pesados.

Neste estudo, não foi possível calcular a  $CI_{50}$  de *R. subcapitata* expostas à vinhaça, pois não houve crescimento suficiente que permitisse o cálculo da concentração de inibição. O baixo crescimento deste organismo pode estar relacionado à turbidez da vinhaça, uma vez que partículas suspensas na água podem interferir no processo de fotossíntese que é essencial ao crescimento das algas (DEBENEST et al., 2012). Outros fatores como a presença de compostos com alto peso molecular e melanoidinas podem ter contribuído para o baixo crescimento, uma vez que esses compostos constituem cerca de 70-80% de todos os compostos da vinhaça e que frequentemente são tóxicos para os organismos. Entretanto, Ferreira et al. (2011) obtiveram  $CI_{50}$  de 1,6% para *R. subcapitata* expostas a vinhaça bruta. As algas respondem diretamente a presença de herbicidas e elementos químicos presentes nas amostras de água, sedimento e resíduos industriais (MESSIAS, 2008), como a vinhaça pode conter resíduos de herbicidas que são aplicados à cana-de-açúcar, pode também justificar a alta toxicidade e sensibilidade destes organismos.

Para a amostra de lodo, o organismo que apresentou maior sensibilidade toxicidade. Messias (2013) obteve porcentagem de sensibilidade de 7,6% deste organismo quando exposto a concentração de água filtrada do lodo do floculador da mesma estação de água estudada. Esses dados se correlacionam com a sensibilidade/resposta das hidras, pois segundo Quinn, Gagné e Blaise (2009) elas respondem mais a amostras que contenha elementos químicos e metais pesados normalmente estão presentes no lodo de ETA.

A  $CI_{50}$  e a  $CL_{50}$  de *R. subcapitata* e *D. similis* mostram média baixa de toxicidade. Barbosa (2000) e Bretano (2006) também não observaram toxicidade aguda do lodo para *D. similis*, no período de 48 h. Entretanto, em teste que avaliaram os efeitos crônicos dessas amostras a *D. similis*, esses autores constataram a mortalidade de até 60% dos organismos expostos, no período de 21

dias do teste. Em efluentes de estação de tratamento de esgoto, durante 21 dias de teste não foram observada a mortalidade dos indivíduos, mostrando que os indivíduos não foram sensíveis à presença da alta carga orgânica encontrada nos efluentes das estações de tratamento de esgoto. Messias (2013) encontrou  $CL_{50}$  de 54,20% quando *D. similis* foram expostas a água filtrada de lodo do floculador, entretanto não encontrou tal concentração para o elutriado do mesmo lodo, porque obteve número insuficiente de efeitos nos organismos. As *Daphnias* tem sua sensibilidade relacionada à mistura de agroquímicos ou agroquímicos puros e a produtos químicos puros e não apresentam toxicidade aos resíduos ricos em nutrientes, como lodo de ETA (BARATA et al., 2008). Porém, *R. subcapitata* quando expostas as amostras ambientais tendem a apresentar alta variação dos resultados, os quais dependem das amostras coletadas e dos períodos de coleta (MESSIAS, 2008), o que pode justificar estes resultados, uma vez que este organismo é sensível a elementos químicos presentes na amostra de lodo. Chelinho et al. (2010) avaliaram a taxa de crescimento diário de *R. subcapitata*, expostas a solos contaminados com atrazina, em diferentes amostras de elutriado e lixiviados do solo, sendo que a taxa de crescimento diário variou de 0,10 a 1,40 para as amostras de elutriado e de 0,13 a 1,60 para amostras de lixiviados. Tigini et al. (2011) encontraram  $CI_{50}$  desta mesma alga de 2,20 a 18,80% quando expostas a lodo de indústrias têxteis provenientes de três estações de tratamento de efluentes.

O elutriado das misturas de resíduos sem tratamento (Tabela 13) mostrou maior toxicidade do que as misturas tratadas com os fungos. A mistura tratada com *P. sajor-caju* mostrou ser a menos tóxicas para os três organismos testados (Tabela 14), e *P. ostreatus*, mostrou que ocorreu desintoxicação em comparação com o controle (Tabela15).

Tabela 13 - Concentração de inibição ( $CI_{50}$ ) para *R. subcaptata* e concentração letal ( $CL_{50}$ ) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas ao elutriado da mistura de resíduos

<b>Organismos</b>	<b>Porcentagem de sensibilidade</b>	
<i>R. subcapitata</i>	74,61 ( $CI_{50}$ – 72 h)	<b>7,78</b> ( $CL_{20}$ – 72 h)
<i>D. similis</i>	34,08 ( $CL_{50}$ – 48 h)	23,85 ( $CL_{20}$ – 48 h)
<i>H. attenuata</i>	<b>18,79</b> ( $CL_{50}$ – 96 h)	<b>12,68</b> ( $CL_{20}$ – 96 h)

Tabela 14 - Concentração de inibição (CI<sub>50</sub>) para *R. subcapitata* e concentração letal (CL<sub>50</sub>) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas ao elutriado da mistura tratada com *P. sajur-caju*

Organismos	Porcentagem de sensibilidade	
<i>R. subcapitata</i>	95,70 (CI <sub>50</sub> – 72 h)	27,40 (CI <sub>20</sub> – 72 h)
<i>D. similis</i>	53,85 (CL <sub>50</sub> – 48 h)	34,35 (CL <sub>20</sub> – 48 h)
<i>H. attenuata</i>	40,92 (CL <sub>50</sub> – 96 h)	28,27 (CL <sub>20</sub> – 96 h)

Tabela 15 - Concentração de inibição (CI<sub>50</sub>) para *R. subcapitata* e concentração letal (CL<sub>50</sub>) para *D. similis* e *H. attenuata* expostas ao elutriado da mistura tratada com *P. ostreatus*

Organismos	Porcentagem de sensibilidade	
<i>P. subcapitata</i>	83,07 (CI <sub>50</sub> – 72 h)	31,14 (CI <sub>20</sub> – 72 h)
<i>D. similis</i>	51,76 (CL <sub>50</sub> – 48 h)	26,70 (CL <sub>20</sub> – 48 h)
<i>H. attenuata</i>	30,53 (CL <sub>50</sub> – 96 h)	18,55 (CL <sub>20</sub> – 96 h)

Estudos com misturas de mais de um resíduo e poluente junto proveniente do setor agrícola e efluente são escassos na literatura. Os poucos trabalhos que estão disponíveis são com estudos de fármacos ou drogas usadas na medicina. Entretanto, alguns autores sugerem que é necessário avaliar a toxicidade de misturas de resíduos, a fim de investigar qual o efeito no ambiente. O efeito de um composto no ambiente pode ser pequeno, mas quando agem e interagem com outros compostos, podem representar perigo a uma ou várias espécies de um ecossistema (KOLPIN et al., 2002). Apesar disso, dada a complexidade das questões envolvidas, não se dispõem ainda de explicações claras sobre os efeitos causados por tais interações (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006).

Comparando a toxicidade dos resíduos e da mistura deles pode se observar que a mistura apresentou menor toxicidade, embora as concentrações sejam diferentes e foram incorporadas ao bagaço de cana-de-açúcar. Esses dados reforçam as afirmações de Zagatto e Bertolotti (2006) que diz que a exposição à biota a mistura de contaminantes pode levar a interações toxicológicas resultantes da exposição de dois contaminantes, acarretando em uma resposta biológica quanti e qualitativamente diferente da esperada pela ação dos contaminantes sozinhos. Quinn, Gagné e Blaise (2009) estudaram os efeitos toxicológicos de 11 fármacos encontrados em efluentes municipais em *H. attenuata*. Os resultados mostram que a CL<sub>50</sub> foi acima de 20%, mas quando misturas de fármacos foram testadas a CE<sub>50</sub> da

mistura foi de duas a três vezes menor do que os fármacos individuais, sendo portanto muito mais tóxicos. Os resultados indicam ainda que os fármacos atuam de forma aditiva quando presentes em misturas, possuindo efeitos em concentrações ambientalmente relevantes e que a sua concentração combinada poderia ser significantes para hidra e outros organismos aquáticos. Kim et al. (2009) estudaram o efeito de três antibióticos – tetraciclina, lincomicina e sulfametazina - em *R. subcapitata*, sendo que a  $CI_{50}$  foi de 0,167; 0,439 e 1,246% respectivamente. Entretanto, poucas mudanças na taxa de inibição foram notadas quando os três antibióticos estavam juntos. Porém, esta alga foi mais sensível quando exposta a fármacos aplicados no tratamento de câncer, com  $CI_{50}$  de 13,  $mg L^{-1}$  (BREZOVSEK; ELERSEK; FILIPIC, 2014).

As porcentagens de sensibilidade ( $CL_{50}$  e  $CI_{50}$ ) da mistura após o crescimento dos fungos *P. sajor-caju* e *P. ostreatus* foram acima de 30% para todos os organismos. A toxicidade da mistura inicial ficou entre 18 e 74%, enquanto que a porcentagem da mistura crescida com *P. sajor-caju* permaneceu entre 40 e 95% e *P. ostreatus* entre 30 e 83%.

A maior toxicidade da mistura de *P. ostreatus* em relação a *P. sajor-caju* pode ter levado ao menor crescimento do milho e do girassol. Alguns elementos ou compostos presentes na mistura levaram a um crescimento menor a estas culturas e alguns efeitos toxicológicos, como raízes grossas e vice-versa.

Dellamatrice et al. (2005) verificou a descoloração e a toxicidade de lodo têxtil tratados com *P. sajor-caju* e *P. ostreatus*. A descoloração foi maior para o lodo tratado com *P. sajor-caju* e a toxicidade de *H. attenuata* foi menor para o lodo tratado com o mesmo fungo.

## 6 CONCLUSÕES

A amostra de lodo do floculador da ETA foi argilosa com baixa relação C/N e elevada concentração de Fe e Mn. A vinhaça foi caracterizada por alta BDO, DQO, condutividade, turbidez, grandes quantidades de sólidos, açúcares, K, Mg, Ca, fosfato, sulfato e pela presença de fenóis.

*Pleurotus sajor-caju* e *Pleurotus ostreatus* cresceram em uma mistura de lodo de ETA, vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar, proporcionando o tratamento dos resíduos.

A porcentagem germinativa de milho e girassol foi maior em misturas tratadas pelos fungos *Pleurotus*. Plântulas de milho e girassol cultivadas por 30 dias na mistura tratadas com *P. ostreatus* apresentam crescimento radicular significativo, acima de 50 e 30% para raiz total e parcial de milho e de 75% da raiz de girassol e 55% da parte aérea, em relação ao controle. O crescimento aéreo total foi significativo quando as plântulas foram desenvolvidas por 30 dias na mistura com *P. sajor-caju* (acima de 40% em relação ao controle).

A massa fresca das raízes do milho e girassol com 30 dias foram maiores significativamente na mistura tratada com *P. ostreatus*. A massa fresca da parte aérea de ambas as culturas foi maior com o tratamento de *P. sajor-caju* com 30 e 60 dias, sendo que a massa seca da parte aérea do girassol com 60 dias também foram significativos.

A concentração de elementos foi maior e significativa nas raízes de ambas as plântulas desenvolvidas em misturas crescidas com *P. ostreatus* com 30 dias. Nas raízes ocorreu o acúmulo de Al, Fe, K,  $\text{SO}_4^-$  e Ca, enquanto na parte aérea houve maior concentração somente de K, Ca e  $\text{SO}_4^-$  para as duas culturas estudadas.

A vinhaça apresentou alta toxicidade para os organismos. *D. similis*, *H. attenuata* e o lodo apresentou toxicidade média. A mistura tratada por *P. sajor-caju* apresentou a menor toxicidade para todos organismos, mostrando que em 15 dias foi capaz de degradar os compostos que apresentavam toxicidade.

A toxicidade da vinhaça foi maior do que a do lodo de ETA para os organismos expostos a esses poluentes, entretanto a toxicidade da mistura de poluentes foi menor do que os poluentes individuais. Depois de 15 dias de



tratamento com o fungo *Pleurotus*, a mistura de resíduos apresentou diminuição da toxicidade em relação à mistura sem o tratamento fúngico para todos os organismos expostos, sendo o que mostrou menor toxicidade foi à mistura com o crescimento de *P. sajor-caju*. Estes dados indicam que em 15 dias, *Pleurotus* foi capaz de crescer e degradar/transformar compostos/elementos que antes faziam com que a toxicidade da mistura fosse maior.

Com base neste trabalho, é recomendável a realização de outros trabalhos para avaliar mais efeitos na utilização de resíduos/poluentes usados como substrato para o tratamento com *Pleurotus* para posterior uso na agricultura.

## REFERÊNCIAS

ADAMS, W.J. Aquatic toxicology testing methods. In: HOFFMAN, D.J.; RATTNER, B.A.; BURTON JUNIOR, G.A.; CAIRNS, J.R. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton: Lewis Publ., 1995. chap. 2, p. 25-46.

AGUIAR, A.; FERRAZ, A. Fe<sup>3+</sup> and Cu<sup>2+</sup> - reduction by phenol derivatives associated with Azure B degradation in Fenton-like reactions. **Chemosphere**, New York, v. 66, p. 947-954, 2007.

AGUIAR FILHO, J.M.M. **Análise enzimática de fungos lignocelulolíticos cultivados em vinhaça e bagaço de cana-de-açúcar**. 2008. 79 p. (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

AGUIAR FILHO, J.M.M.; FERREIRA, L.F.R.; MONTEIRO, R.T.R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 1245-1254, 2010.

ALLOWAY, B.J.; AYERS, D.C. **Chemical principles of environmental pollution**. 2<sup>nd</sup> ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. 395 p.

AMERICAN SOCIETY OF CIVIL ENGINEERS. **Technology transfer handbook: management of water treatment plant residual**. Reston: ASCE; AWWA, 1996. 294 p.

ANDRADE, J.C.M.; TAVARES, S.R.L.; MAHLER, C.F. **Fitorremediação: uso de plantas na melhoria da qualidade ambiental**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007. 176 p.

ASGHER, A.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R.L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 19, p. 771-783, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR ISO 11269-2: qualidade do solo – determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre. Rio de Janeiro, 2009. 17 p.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713**: ecotoxicologia aquática - toxicidade aguda - método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro, 2004a. 16 p.

\_\_\_\_\_. **NBR 10.004**: resíduos sólidos – classificação. Rio de Janeiro, 2004b. 71 p.

AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A.M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. São Carlos: RiMa, 2003. 340 p.

BAIRD, C. **Química ambiental**. Tradução de M.A.L. Recio e L.C.M. Marques. 3. ed. Porto Alegre: Brokman, 2007. 622 p.

BALAN, D.S.L.; MONTEIRO, R.T.R. Decolorization of textile indigo dye by ligninolytic fungi. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 89, p.141-145, 2001.

BALDRIAN, P. Interactions of heavy metals with white-rot fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 32, n. 1, p. 78-91, 2003.

BALDRIAN, P.; GABRIEL, J. Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 206, p. 69-74, 2002a.

\_\_\_\_\_. Variability of laccase activity in the white-rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. **Folia Microbiologica**, New York, v. 47, n. 4, p. 385-390, 2002b.

BARAN, A.; ÇAYCI, G.; KÜTÜK, HARTMANN, R. Composted grape marc as growing medium for hypostases (*Hypostases phyllostagya*). **Bioresource Technology**, Barking, v. 78, n. 1, p. 103-106, 2001.

BARATA, C.; ALANON, P.; GUTIERREZ-ALONSO, S.; RIVA, M.; FERNANDEZ, C.; TARAZONA, J.A. *Daphnia magna* feeding bioassay as a cost effective and ecological relevant sub lethal toxicity test for environmental risk assessment of toxic effluents. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 405, p. 78-86, 2008.

BARBOSA, R. **Avaliação do impacto de efluentes (lodos) de estações de tratamento de água à biota aquática através de testes de toxicidade**. 2000. 199 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

BARR, D.P.; AUST, S.D. Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 28, n. 2, p. 78-87, 1994.

BENKE, M.B.; MERMUT, A.R.; CHATSON, B. Carbon-13 CP/MAS NMR and DR-FTIR spectroscopic studies of sugarcane distillery waste. **Canadian Journal of Soil Science**, Ottawa, v. 78, p. 227-236, 1998.

BLAISE, C.; FORGET, G.; TROTTIER, S. Toxicity screening of aqueous samples using a cost-effective 72-h exposure *Selenastrum capricornutum* assay. **Journal of Environmental Toxicology**, New York, v. 15, p. 352-359, 2000.

BONONI, V.L.R. Biodegradação de organoclorados no solo por basidiomicetos lignocelulósicos. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: Embrapa CNPMA, 1997. cap. 5, p. 243-268.

BOTERO, W.G.; SANTOS, A.; OLIVEIRA, L.C.; ROCHA, J.C. Caracterização de lodo gerado em estações de tratamento de água: perspectivas de aplicação agrícola. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 8, p. 2018-2022, 2009.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução Nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como

estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 17 mar. 2005. p. 58-63.

\_\_\_\_\_. Resolução Nº 375, de 29 de agosto de 2006. Define critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 29 ago. 2006. p. 1-32.

BRENTANO, D.M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna***: avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário. 2006. 130 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2006.

BREZOVSEK, P.; ELERSEK, T.; FILIPIC, M. Toxicities of four anti-neoplastic drugs and their binary mixtures tested on the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata* and the cyanobacterium *Synechococcus leopoliensis*. **Water Research**, Oxford, v. 52, p. 168-177, 2014.

CAI, Y.J.; BUSWELL, J.A.; CHANG, S.T. Effect of lignin-derived phenolic monomers on the growth of the edible mushrooms *Lentinus edodes*, *Pleurotus sajor-caju* and *Volvariella volvacea*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 9, n. 5, p. 503-507, 1993.

CAMARGO, J.A., PEREIRA, N., CABELLO, P.R., TERAN, F.J.C. Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para a análise da atividade microbiana de solos sob a aplicação de vinhaça. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 6, p. 264–271, 2009.

CARBONELL, G.; IMPERIAL, R.M.; TORRIJOS, M.; DELGADO, M.; RODRIGUEZ, J.A. Effects of municipal solid waste compost and mineral fertilizer amendments on soil properties and heavy metals distribution in maize plants (*Zea mays* L.). **Chemosphere**, Oxford, v. 85, p. 1614-1623, 2011.

CHAGAS, E.P.; DURRANT, L.R. Descolorization of azo dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Pleurotus sajor-caju*. **Enzyme and Microbial Technology**, New York, v. 29, p. 473-477, 2001.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A.M.; VIEGAS, C.A.; SOUSA, J.P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. **Journal of Soils and Sediments**, Heidelberg, v. 10, p. 568-578, 2010.

CHRISTOFOLETTI, C.A.; ESCHER, J.P.; CORREIA, J.E.; MARINHO, J.F.U.; FONTANETTI. Sugarcane vinasse: environmental implications of its use. **Waste Management**, New York, v. 33, p. 2752-2761, 2013.

CLOETE, T.E.; CELLIERS, L. Removal of Aroclor 1254 by the white rot fungus *Coriolus versicolor* in the presence of different concentrations of Mn (IV) oxide. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 44, p. 243-253, 1999.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wooddegrading mushrooms of the genus *Pleurotus*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 58, p. 582-594, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/>>. Acesso em: 02 jun. 2014.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br/>>. Acesso em: 04 dez. 2012.

CORDEIRO, J.S. Importância do tratamento e disposição final adequada dos lodos de ETAs. In: REALI, M.A.P. **Noções gerais de tratamento e disposição final do lodo de ETA**. Rio de Janeiro: ABES; PROSAB, 1999. cap. 1, p. 1-19.

COULIBALY, L.; GERMAIN, G.; SPIROS, A. Utilization of fungi for biotreatment of raw wastewaters. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 2, n. 12, p. 620-630, 2003.

COWLING, E.B. **Comparative biochemistry of the decay of sweetgum sapwood by white-rot and brow-rot fungi**. Washington: USDA, 1961. 79 p. (Technical Bulletin, 1258).

CRIVELARO, S.H.R.; MARIANO, A.P.; FURLAN, L.T.; GONÇALVES, R.A.; SEABRA, P.N.; ANGELIS, D.F. Evaluation of the use of vinasse as a biostimulation agent for the biodegradation of oily sludge in soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 5, p. 1217-1224, 2010.

DAVOREN, M.; FOGARTY, A.M. A test battery for the ecotoxicological evaluation of the agri-chemical environ. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 59, p. 116-122, 2004.

DEBENEST, T.; TURCOTTE, P.; GAGNÉ, F.; GAGNON, C.; BLAISE, C. Ecotoxicological impacts of effluents generated by oil sands bitumen extraction and oil sands lixiviation on *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 112/113, p. 83-91, 2012.

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.; KAMIDA, H.M.; NOGUEIRA, N.L.; ROSSI, M.L.; BLAISE, C. Decolourization of municipal effluent and sludge by *Pleurotus sajor-caju* and *Pleurotus ostreatus*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 21, p. 1363-1369, 2005.

DENIZLI, A.; CIHANGIR, N.; TUZMEN, N.; ALSANCAK, G. Removal of chlorophenols from aquatic systems using the dried and dead fungus *Pleurotus sajor-caju*. **Bioresource Technology**, New York, v. 96, p. 59-62, 2005.

DI BERNARDO, L.; DANTAS, A.D.B. **Métodos e técnicas de tratamento de água**. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2005. v. 2, 980 p.

DIAZ-BAEZ, M.C.; SÁNCHEZ, W.A.; DUTKA, B.J.; RONCO, A.; CASTILLO, G.; PICA-GRANADOS, Y.; CASTILLO, L.E.; RIDAL, J.; ARKHIPCHUK, V.;

SRIVASTAVA, R.C. Overview of results from the WaterTox intercalibration and environmental testing phase II program: Part 2. Ecotoxicological evaluation of drinking water supplies. **Environmental Toxicology**, New York, v. 17, p. 241-249, 2002.

DRESLER, S.; HANAKA, A.; BEDNAREK, W.; MAKSYMIEC, W. Accumulation of low-molecular-weight organic acids in roots and leaf segments of *Zea mays* plants treated with cadmium and copper. **Acta Physiologiae Plantarum**, Warszawa, v. 36, p. 1565-1575, 2014.

DUPONT, R.R.; BRUELL, C.J.; MARLEY, M.C.; DOWNEY, D.C.; NORRIS, R.D.; HULLING, S.G.; PIVETS, B. **Bioremediation**. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers; USEPA, 1997. 596 p.

ERIKSSON, K.E.L. Biotechnology in the pulp and paper industry. **Wood Science and Technology**, New York, v. 24, p. 79-101, 1990.

ESPAÑA-GAMBOA, E.; MIJANGOS-CORTES, J.; BARAHONA-PEREZ, L.; DOMINGUEZ-MALDONADO, J.; HERNÁNDEZ-ZARATE, G.; ALZATE-GAVIRIA, L. Vinasse: characterization and treatments. **Waste Management**, London, v. 29, p. 1235-1250, 2011.

ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Introdução. In: \_\_\_\_\_. (Org.). **Fungos uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia**, Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 1, p. 9-11.

FELINTO, A.S. **Cultivo de cogumelos comestíveis do gênero *Pleurotus* spp. em resíduos agroindustriais**. 1999. 123 p. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1999.

FERNANDES, A.C. **Cálculos na agroindústria da cana-de-açúcar**. Piracicaba: STAB, 2000. 193 p.

FERRAZ, A.L. Fungos decompositores de materiais lignocelulolíticos. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. **Fungos uma introdução à bioquímica e biotecnologia**. Caxias do Sul: EDUCS, 2004. cap. 5, p. 220-231.

FERREIRA, L.F.R. **Biodegradação de vinhaça proveniente do processo industrial de cana-de-açúcar por fungos**. 2009. 134 p. Tese (Doutorado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, M.; POMPEU, G. B.; MESSIAS, T.G.; MONTEIRO, R.T.R. Selection of vinasse degrading microorganisms. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, Oxford, v. 26, n. 9, p. 1613-1621, 2010.

FERREIRA, L.F.R.; AGUIAR, J.M.M.; MESSIAS, T.G.; POMPEU, G.B.; QUEIJEIRO LOPEZ, A.M.; SILVA, D.P.; MONTEIRO, R.T.R. Evaluation of sugar-cane vinasse treated with *Pleurotus sajor-caju* utilizing aquatic organisms as toxicological

indicators. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 132-137, 2011.

FINOTO, E.L.; SOARES, M.B.B.; MICHELOTTO, M.D.; MARTINS, A.L.M. Efeito residual do herbicida imazapic sobre a germinação e o desenvolvimento inicial da cultura do milho. **Pesquisa & Tecnologia**, Campinas, v. 8, n. 2, p. 1-7, jul./dez. 2011.

FITZGIBBON, F.J.; NIGAM, P.; SINGH, D.; MARCHANT, R. Biological treatment of distillery waste for pollution-remediation. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 35, p. 293-301, 1995.

FREIRE, W.J.; CORTEZ, L.A.B. **Vinhaça de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Livraria e Editora Agropecuária, 2000. cap. 2, p. 25-27. (Série Engenharia Agrícola, 1).

GEMTOS, T.A.; CHOULIARAS, N.; MARAKIS, S. Vinasse rate, time of application and compaction effect on soil properties and durum wheat crop. **Journal of Agricultural Engineering Research**, New York, v. 73, p. 283-296, 1999.

GIANCHINI, C.F.; FERRAZ, M.V. Benefícios da utilização de vinhaça em terras de plantio de cana-de-açúcar: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 15, p. 1-15, 2009.

HATAKKA, A. Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 13, p. 125-135, 1994.

HAWKSWORTH, D.L. Why to study tropical fungi? In: WATLING, R.; FRANKLAND, J.C.; AINSWORTH, A.M.; ISAAC, S.; ROBINSON, C.H. **Tropical mycology: Micromycetes**. Wallingford: CAB International, 2001. chap. 1, p. 1-12.

HEINFLING, A.; MARTÍNEZ, M.J.; MARTÍNEZ, A.T.; BERGAUER, M.; SZEWYK, U. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese independent reaction. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 2788-2793, 1998.

HOPPEN, C.; PORTELLA, K.; JOUKOSKI, A.; TRINDADE, E.; ANDREOLI, C. The use of centrifuged sludge from a water treatment plant (WTP) in Portland cement concrete matrices for reducing the environmental impact. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 79-84, 2006.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11269-2**: soil quality - determination of the effects of pollutants on soil flora. Part 2: Effects of chemicals on the emergence and growth of higher plants. Geneva, 2005. p. 1-13.

JANUÁRIO, G.F.; FERREIRA FILHO, S.S. Planejamento e aspectos ambientais envolvidos na disposição final de lodos das estações de tratamento de água da região metropolitana de São Paulo. **Engenharia Sanitária Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 12, p. 117-126, 2007.

JARDIM, G.; ARMAS, E.; MONTEIRO, R. Ecotoxicological assessment of water and sediment of the Corumbatai River, SP, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 68, p. 51-59, 2008.

JORGENSEN, H.; MORKEBERG, A.; KROGH, K.; OLSSON, L. Production of cellulases and hemicellulases by three *Penicillium* species: effect of substrate and evaluation of cellulose adsorption by capillary electrophoresis. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 36, p. 42-48, 2005.

KARVELAS, M.; KATSOYIANNIS, A.; SAMARA, C. Occurrence and fate of heavy metals in the wastewater treatment process. **Chemosphere**, Oxford, v. 53, p. 1201-1210, 2003.

KIM, H.Y.; YU, S.H.; LEE, M.J.; KIM, T.H.; KIM, S.D. Radiolysis of selected antibiotics and their toxic effects on various aquatic organisms. **Radiation Physics and Chemistry**, Oxford, v. 78, p. 267-272, 2009.

KIRK, T.K.; FARELL, R.L. Enzymatic "combustion": the microbial degradation of lignin. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 41, p. 465-505, 1987.

KIRK, T.K.; CROAN, S.; TIEN, M. Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. **Enzyme and Microbial Technology**, Surrey, v. 8, p. 27-32, 1986.

KLYOSOV, A.A. Trends in biochemistry and enzymology of cellulose degradation. **Biochemistry**, Washington, v. 29, p.10577-10585, 1990.

KOLPIN, D.W.; FURLONG, E.T.; MEYER, M.T.; THURMAN, E.M. BARBER, L.B.; BUXTON, H.T. Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. Streams, 199-200: a national reconnaissance. **Environmental Science Technology**, Washington, v. 36, p. 1202-1211, 2002.

KRIENITZ, L.; BOCK, C. Present state systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. **Hydrobiologia**, São Paulo, v. 698, p. 295-326, 2012.

LAIME, E.M.O.; FERNANDES, P.D.; OLIVEIRA, D.C.S.; FREIRA, E.A. Possibilidades tecnológicas para a destinação da vinhaça: uma revisão. **Revista Trópica: Ciências Agrárias e Biológicas**, Chapadinha, v. 5, p. 16-29, 2011.

LEE, K.; MOON, S.H. Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 102, p. 261-268, 2003.

LEHNINGER, A.L. **Princípios de bioquímica**. Tradução de W.R. Lodi e A.A. Simões. São Paulo: Sarvier, 1986. cap. 2, p. 185-190.

LOURENCETTI, C.; MARCHI, M.R.R.; RIBEIRO, M.L. Determination of sugar cane herbicides in soil and soil treated with sugar cane vinasse by solid-phase extraction and HPLC-UV. **Talanta**, Amsterdam, v. 77, p. 701-709, 2008.



LUZ, J.M.R.; PAES, S.A.; TORRES, D.P.; NUNES, M.D.; SILVA, J.S.; MANTOVANI, H.C.; KASUYA, M.C.M. Production of edible mushroom and degradation of antinutritional factors in jatropha biodiesel residues. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, p. 575-580, 2013.

MACHADO, M.S.; NOGUEIRA, C.H.P.; PEREIRA, A.A.; MAIA, L.; CINTRA, E.B.; OLIVEIRA, J.V.S.; NOCITI, L.A.S.; CRUZ, C. Efeitos de herbicidas sobre a germinação e crescimento de milho (*Zea mays*) utilizado como planta teste. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS NA ERA DA BIOTECNOLOGIA, 28., 2012, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: ABES, 2012. 1 CR-ROM.

MARCHIOL, L.; FELLET, G.; PEROSA, D.; ZERBI, G. Removal of trace metals by *Sorghum bicolor* and *Helianthus annuus* in a site polluted by industrial waste: A field experience. **Plant Physiology and Biochemistry**, Amsterdam, v. 45, n. 5, p. 379-387, 2007.

MATA, J.F.; PEREIRA, J.C.S.; CHAGAS, J.F.R.; VIEIRA, L.M. Germinação e emergência de milho híbrido sob doses de esterco bovino. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, Belém, v. 6, n. 12, p. 31-40, jan./jun. 2011.

MARTINES, A.M. **Avaliação ambiental e agronômica do uso de lodo de curtume no solo**. 2009. 84 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MARWA, E.M.M.; MEHARG, A.A.; RICE, C.M. Risk assessment of potentially toxic elements in agricultural soils and maize tissues from selected districts in Tanzania. **Science of the total Environment**, Amsterdam, v. 416, p. 180-186, 2012.

MENEZES, T.J.B. Os fungos na indústria. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 2, p. 116-120, 1997.

MESSIAS, T.G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na bacia do Corumbataí**. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

\_\_\_\_\_. **Avaliação ecotoxicológica de lodo gerado por estação de tratamento de água**. 2013. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2013.

MODA, E.M. **Produção de *Pleurotus sajor-caju* em bagaço de cana-de-açúcar lavado e o uso de aditivos visando sua conservação *in natura***. 2003. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Transformações bioquímicas e ciclos dos elementos no solo. In: \_\_\_\_\_. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora Universidade Federal de Lavras, 2009. cap. 5, p. 313-403.

MOREIRA-NETO, S.L.; MUSSATTO, S.I.; MACHADO, K.M.; MILAGRES, A.M. Decolorization of salt-alkaline effluent with industrial reactive dyes by laccase-producing Basidiomycetes strains. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 56, p. 283-290, 2013.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A.; RIBEIRO, R. An *in situ* bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 59, p. 164-173, 2004.

NGAI, P.H.K.; NG, T.B. A ribonuclease with antimicrobial, antimitogenic and antiproliferative activities from the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. **Peptides**, New York, v. 5, p.11-17, 2004.

NOGUEIRA, A.R.D.A.; MORAES, D.P.; FLORES, E.M.M.; KRUG, F.J.; KNAPP, G.; NÓBREGA, J.A.; BARLIN, J.S.; MESKO, M.F. Decomposição assistidas por radiação micro-ondas. In: KRUG, F.J. **Métodos de preparo de amostras: fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar**. Piracicaba: USP, CENA, 2008. cap. 8, p. 276-284.

NOVIKOVA, L.N.; MEDVEDEVA, S.A.; VOLCHATOVA, I.V.; BOGATYREVA, S.A. Changes in macromolecular characteristics and biological activity of hydrolytic lignin in the course of composting. **Applied Biochemistry and Microbiology**, New York, v. 38, p. 181-185, 2002.

OBERHOLSTER, P.J.; BOTHA, A.M.; CLOETE, T.E. Biological and chemical evaluation of sewage water pollution in the Rietvlei nature reserve wetland area, South Africa. **Environmental Pollution**, London, v. 156, p. 184-192, 2008.

OBODAI, M.; CLELAND-OKINE, J.; VOWOTOR, K.A. Comparative study on the growth and yield of *Pleurotus ostreatus* mushroom on different lignocellulosic by-products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. Heidelberg, v. 30, p. 146-149, 2003.

OGA, S.; SIQUEIRA, M.E.P.B. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 420 p.

PADILHA, J.C. **Aplicação de lodos de tratamento de água e esgoto em latossolos cultivados com milho e soja**. 2007. 345 p. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

PATTRA, S.; SANGYOKA, S.; BOONMEE, M.; REUNGSANG, A. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. **International Journal of Hydrogen Energy**, Oxford, v. 33, n. 19, p. 5256-5265, 2008.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

PEDRINHO, E.A.N. **Isolamento e caracterização de bactérias promotoras de crescimento em milho (*Zea mays* L.)**. 2009. 74 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 2009.

PLAA, G.L. Present status: toxic substances in the environment. **Canadian Journal of physiology and Pharmacology**, Ottawa, v. 60, p. 1010-1016, 1982.

QUINN, B.; GAGNE, F.; BLAISE, C. Evaluation of the acute, chronic and teratogenic effects of a mixture of eleven pharmaceuticals on the cnidarian, *Hydra attenuata*. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 407, p. 1072-1079, 2009.

RAINONE, R. **Avaliação de métodos analíticos para determinação de Na, K, Ca, Mg, P e S em biodiesel por ICP OES**. 2011. 95 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RAMOS, N.P.; NOVO, M.C.S.S.; LAGO, A.A.; LAGO, A.A.; UNGARO, M.R.G. Girassol: emergência e crescimento inicial de plantas sob resíduos de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 45-51, 2009.

RICHARDSON, S. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 81, p. 8654-8654, 2009.

RICHARDSON, S.; TERNES, T. Water analysis: emerging contaminants and current issues. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 83, p. 4614-4648, 2011.

RICHTER, C.A. **Tratamento de lodo de estação de tratamento de água**. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. 102 p.

RIVELLI, A.R.; MARIA, D.; PUSCHENREITER, M.; GHERBIN, P. Accumulation of cadmium, zinc, and copper by *Helianthus annuus* L.: impact on plant growth and uptake of nutritional elements. **International Journal of Phytoremediation**, Boca Raton, v. 14, p. 320-332, 2012.

RODAK, B.W.; CASTRO, C.; MORAES, L.A.C. JÚNIOR, A.O.; OLIVEIRA, F.A. Tolerância de girassol (*Helianthus annuus* L.) ao alumínio. In: REUNIÃO NACIONAL DE PESQUISA DE GIRASSOL, 7º; SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE A CULTURA DO GIRASSOL, 7., 2011 Aracaju. **Anais...** Aracaju: SNA, 2011. p. 71-74.

RODELLA, A.A.; ZAMBELLO JÚNIOR, E.; ORLANDO FILHO, E. Effects of vinasse added to soil on pH and exchangeable aluminum content. In: CONGRESS OF INTERNATIONAL SOCIETY OF SUGAR CANE TECHNOLOGISTS, 18, 1983, Havana. **Proceedings...** Havana: ISSCT, 1983. p. 237-245.

RODRIGUES, A.H. **Três patamares tecnológicos na produção de etanol: a usina do Proálcool, a usina atual e a usina do futuro**. 2008. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências Sociais) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

ROSOLEN, L.A. **Biodegradação de efluentes têxtil e corantes utilizando fungos basideomicetos**. 2004. 53 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

SABOGAL-PAZ, L.P. **Modelo conceitual de seleção de tecnologias de tratamento de água para abastecimento de comunidades de pequeno porte**. 2007. 364 p. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SALIS, A.; PISANO, M.; MONDUZZI, M.; MONDUZZI, M.; SOLINAS, V.; SANJUST, E. Laccase from *Pleurotus sajor-caju* on functionalised SBA-15 mesoporous silica: Immobilisation and use for the oxidation of phenolic compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, Amsterdam, v. 58, p. 175-180, 2009.

SANGLIMUWAN, S.; YOSHIDA, N.; MORINAGA, T.; MUROOKA, Y. Resistance to and uptake of heavy-metals in mushrooms. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Osaka, v. 75, n. 2, p. 112-114, 1993.

SANIN, L.B.B. A indústria têxtil e o meio ambiente. In: CONGRESSO LATINO AMERICANO DE QUÍMICA TÊXTIL, 14., 1997, Caracas. **Anais...** Caracas: SNA, 1997. p. 13-34.

SANTOS, M.A.P.F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R.T.R. Sensitivity of four test organisms (*Chironomus xanthus*, *Daphnia magna*, *Hydra attenuata* and *Pseudokirchneriella subcapitata*) to NaCl: an alternative reference toxicant. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Rio Grande, v. 2, p. 229-236, 2007.

SARON, A.; LEITE, V.M.B. Quantificação de lodo em estação de tratamento de água. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 21, 2001, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: ABES, 2001. 1 CR-ROM.

SARTORI, S. **Atividade enzimática e valores nutricionais de *Pleurotus* spp. cultivados em vinhaça**. 2011. 108 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2011.

SCCOL, C.R.; VANDENBERGHE, L.P.S. Overview of applied solid-state fermentation in Brazil. **Biochemical Engineering Journal**, Amsterdam, v. 13, p. 205-218, 2003.

SILVA, E.T.; MELO, W.J.; TEIXEIRA, S.T. Chemical attributes of a degraded soil after application of water treatment sludges. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 62, n. 6, p. 559-563, Nov./Dec. 2005.

SILVA, R.R.; COELHO, G.D. **Fungos: principais grupos e aplicações biotecnológicas**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. 20 p.

SINGH, S.; SAXENA, R.; PANDEY, K.; BHATT, K.; SARITA, S. Response of antioxidants in sunflower (*Helianthus annuus*. L.) grown on different amendments of tannery sludge: its metal accumulation potential. **Chemosphere**, Oxford, v. 57, p. 1663-1673, 2004.

SOUZA, A.M. **Fitorremediação de solos contaminados com óleos lubrificantes usados**. 2009. 143 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

SOUZA, G. **Produção, extração e estabilidade de enzimas lignocelulolíticas para uso em degradação de compostos poluentes**. 2012. 111 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

STAJIC, M.; VUKOIEVIC, J.; KNEZEVIC, A.; MILOVANOVIC, I. Influence of trace elements on ligninolytic enzyme activity of *Pleurotus ostreatus* and *P. pulmonarius*. **BioResources**, Raleigh, v. 8, n. 2, p. 3027-3037, 2013.

SUNDEFELD-JUNIOR, G.C. **Efeitos do recebimento do lodo da estação de tratamento de água pelo sistema de tratamento de esgoto por lodo ativado em bateladas e aeração prolongada do município de Juquitiba-SP**. 2007. 123 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) – Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

SZKLARZ, G.; ANTIBUS, R.K.; SINSABAUGH, R.L.; LINKINS, A.E. Production of phenoloxidases and peroxidases by wood-rotting fungi. **Mycologia**, New York, v. 81, p. 234-240, 1989.

TAMOUTSIDIS, E.; LAZARIDOU, M.; PAPADOPOULOS, I.; SPANOS, T.; PAPATHANASIOU, F.; TAMOUTSIDOU, M.; MITLIANGA, P.; VASILIOU, G. The effect of treated urban wastewater on soil properties, plant tissue composition and biomass productivity in berseem clover and corn. **Journal of Food, Agricultura & Environment**, Helsinki, v. 7, p. 782-786, 2009.

TARTARI, R. DÍAZ-MORA, N. MÓDENES, A.N.; PIANARO, S.A. Lodo gerado na estação de tratamento de água Tamanduá, Foz do Iguaçu, PR, como aditivo em argilas para cerâmica vermelha. **Cerâmica**, São Paulo, v. 57, n. 343, p. 288-293, 2011.

TEIXEIRA, S.T.; MELO, W.J.; SILVA, E.T. Aplicação de lodo da estação de tratamento de água em solo degradado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 91-94, jan. 2005.

TIEN, M.; KIRK, T.K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> requiring oxygenase. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, v. 81, p. 2280-2284, 1984.

TIGINI, V.; GIANANTI, P.; MANGIAVILLANO, A.; PANNOCCHIA, A.; VARESE, G.C. Evaluation of toxicity, genotoxicity and environmental risk of simulated textile and tannery wastewaters with a battery of biotests. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 74, p. 866-873, 2011.

TOMSETT, A.B. Genetics and molecular biology of metal tolerance. In: JENNINGS, D.H. **Stress tolerance of fungi**. New York: M. Dekker, 1993. chap. 3, p. 35 -37.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuate* assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, p. 265-271, 1997.

TUOMELA, M.; VIKMAN, M.; HATAKKA, A.; ITAVAARA, M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. **Bioresource Technology**, Essex, v. 72, p. 169-183, 2000.

ULLAH, R.; BAKHT, J.; SHAFI, M.; IQBAL, M.; KHAN, A.; SAEED, M. Phyto-accumulation of heavy metals by sunflower (*Helianthus annuus* L.) grown on contaminated soil. **African Journal of Biotechnology**, Nairobi, v. 10, n. 75, p. 17192-17198, 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Method 3051A**: toxicological review of hexavalent chromium: method microwave assisted digestion of sediments and sludges, soils and oils. Washington, 1998. 25 p.

VAZ, J.L.N. **Bioavailability and toxicity of metals to plants**: influence of ageing and the type contamination matrix. 2010. 34 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

WADT, L.C. **Cultivo de *Pleurotus* spp. em vinhaça a produção de biomassa e exopolissacarídeos**. 2008. 72 p. Dissertação (Mestrado em Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2008.

WATANABE, T.; KOLLER, K.; MESSNER, K. Copper-dependent depolymerization of lignin in the presence of fungal metabolite, pyridine. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 62, n. 6, p. 221-230, 1998.

ZAGATO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática**: princípios e aplicações. São Carlos: RiMa, 2006. 464 p.

ZAVASCHI, E. **Volatilização de amônia e produtividade do milho em função da aplicação de uréia revestida com polímeros**. 2010. 92 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

ZHOU, Q.; XU, C.; ZHANG, Y.; LIU, W. Enantioselectivity in the phytotoxicity of herbicide imazathapyr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 1624-1631, 2009.



**ANEXOS**





## Anexo A - Massa fresca e seca do milho com 30 e 60 dias de crescimento

	Tratamento	Massa fresca (g)		Massa seca (g)	
		Raízes	Aéreo	Raízes	Aéreo
30 dias	<i>P. sajor-caju</i>	10,76	10,63*	1,31	1,06
	<i>P. ostreatus</i>	12,97*	6,26	1,74	0,77
	Controle	9,14	6,06	0,60	0,71
60 dias	<i>P. sajor-caju</i>	15,32	22,05	2,28	5,12
	<i>P. ostreatus</i>	24,24	5,32*	4,78	1,68
	Controle	22,08	18,19	3,08	3,16

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

## Anexo B - Massa fresca e seca do girassol com 30 e 60 dias de crescimento

	Tratamento	Massa fresca (g)		Massa seca (g)	
		Raízes	Aéreo	Raízes	Aéreo
30 dias	<i>P. sajor-caju</i>	1,45	3,98*	0,60	0,44
	<i>P. ostreatus</i>	2,35*	4,40*	0,81	0,50
	Controle	0,52	1,22	0,43	0,39
60 dias	<i>P. sajor-caju</i>	3,34	7,70*	1,08	2,26*
	<i>P. ostreatus</i>	2,65	4,28	0,86	1,16
	Controle	1,94	2,13	0,65	0,5

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

## Anexo C - Massa fresca e seca das flores de girassol com 60 dias

Tratamento	Massa fresca (g)	Massa seca (g)
<i>P. sajor-caju</i>	4,90	0,80
<i>P. ostreatus</i>	2,70	0,36
Controle	3,52	0,44

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

Anexo D - Concentração de elementos em mg kg<sup>-1</sup> nas raízes de *Z. mays*

	30 dias			60 dias		
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	Controle	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	Controle
Al	1,456*	51,100*	67,010	55,417*	49,305*	73,375
Ca	40,243	57,363*	42,225	22,634*	54,035*	40,847
Fe	0,743*	18,006*	24,758	14,577*	15,971*	26,489
K	476,587*	346,609	350,868	322,817*	368,521*	203,512
Mg	21,316	37,899*	25,019	10,831	29,852*	17,586
Na	0,922*	28,218	25,809	10,617	14,079	15,271
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	38,609*	236,173	257,019	220,435	170,491	159,410
Si	48,893*	56,087*	69,232	59,764*	72,632	71,663
As	0,006*	0,010	0,010	0,005*	0,009*	0,014
B	0,509*	0,105	0,110	0,113	0,145	0,102
Ba	0,075*	0,267*	0,328	0,1235	0,174	0,3370
Cd	0,001*	0,001	0,002	0,002	0,001	0,001
Cr	0,033*	0,226	0,221	0,176	0,316*	0,212
Cu	0,025*	0,089	0,099	0,077	0,059*	0,094
Mn	1,875*	1,176	1,125	0,779	1,433	1,068
Ni	0,015*	0,044*	0,062	0,031*	0,044*	0,076
Pb	0,042*	0,044	0,049	0,042	0,031*	0,049
Se	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Sr	0,299*	0,473*	0,346	0,220*	0,449*	0,331
Zn	0,247*	0,576	0,549	0,423	0,419	0,366

\*Dunnett (p&lt;0,05)

Anexo E - Concentração de elementos em mg kg<sup>-1</sup> na parte aérea de *Z. mays*

	30 dias			60 dias		
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	Controle	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajor-caju</i>	Controle
Al	1,978*	1,115*	1,473	3,228*	1,799*	1,492
Ca	42,483*	33,870	54,082	50,310*	45,076	37,745
Fe	0,914	1,150	1,145	1,729	52,598*	0,838
K	480,892*	664,664	619,249	443,038	402,271	465,809
Mg	19,214*	32,047	31,015	21,005	19,401	20,747
Na	1,925*	3,599*	3,049	1,159*	1,244*	0,710
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	51,914*	112,882*	99,606	47,979*	43,573	43,884
Si	62,691	40,014*	60,361	70,531*	43,910	41,528
As	0,002*	0,010*	0,013	0,003*	0,011	0,007
B	0,184*	0,945*	1,381	0,232*	0,447*	0,492
Ba	0,036*	0,041	0,047	0,055*	0,045*	0,071
Cd	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Cr	0,035*	0,023*	0,044	0,127	8,678*	0,034
Cu	0,031	0,054*	0,038	0,037	0,117	0,026
Mn	1,505*	1,509*	1,681	2,256	2,294*	2,099
Ni	0,014*	0,012*	0,022	0,016	0,141*	0,016
Pb	0,012	0,019	0,018	0,018	0,024	0,013
Se	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	0,002
Sr	0,392	0,396	0,410	0,458*	0,266*	0,298
Zn	0,397	0,551*	0,432	0,328	0,298	0,286

\*Dunnett (p&lt;0,05)

Anexo F - Concentração de elementos em  $\text{mg kg}^{-1}$  nas raízes de *H. annuus*

	30 dias			60 dias		
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajour-caju</i>	Controle	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajour-caju</i>	Controle
Al	129,145	104,311	100,086	76,306	72,447	102,086
Ca	60,750	51,094	46,413	47,987	57,628	48,493
Fe	48,182	45,921	34,521	28,874	25,890	36,868
K	461,046	486,231	433,206	447,573	549,638	427,658
Mg	43,915	33,258	23,159	17,905	27,425	19,045
Na	17,390	17,318	34,576	20,264	21,182	24,847
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	161,015	172,170	260,375	179,841	137,457	163,259
Si	54,791	86,018	95,813	25,471	70,840	94,468
As	0,046	0,046	0,022	0,031	0,037	0,028
B	0,197	0,187	0,217	0,212	0,198	0,209
Ba	0,538	0,487	0,492	0,492	0,463	0,491
Cd	0,003	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002
Cr	1,048	2,354	0,667	0,956	0,317	0,654
Cu	0,168	0,156	0,124	0,130	0,107	0,109
Mn	1,171	1,643	0,853	1,103	0,936	0,897
Ni	0,154	0,162	0,075	0,070	0,058	0,072
Pb	0,074	0,070	0,073	0,060	0,533	0,073
Se	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Sr	0,601	0,562	0,592	0,647*	0,602	0,595
Zn	0,503	0,361	0,448	0,339	0,316	0,331

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

Anexo G - Concentração de elementos em  $\text{mg kg}^{-1}$  na parte aérea de *H. annuus*

	30 dias			60 dias		
	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajour-caju</i>	Controle	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. sajour-caju</i>	Controle
Al	0,990	2,119	2,409	1,039	1,202	1,249
Ca	131,73	105,988	105,402	136,595	115,181	89,680
Fe	1,094	1,422	1,906	1,118	1,195	1,274
K	430,200	561,951	477,036	423,080	397,420	338,877
Mg	38,862	43,108	35,641	42,665	33,750	31,711
Na	0,505	2,072	2,201	1,003	0,767	0,607
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	78,469	119,569	103,838	74,102	21,459	72,457
Si	32,210	30,992	33,777	40,330	37,021	31,572
As	0,004	0,003	0,004	0,004	0,003	0,004
B	0,813	0,995	0,754	0,830	0,684	0,665
Ba	0,301	0,071	0,112	0,320	0,233	0,139
Cd	0,007	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Cr	0,112	0,003	0,084	0,022	0,026	0,079
Cu	0,044	0,057	0,072	0,045	0,045	0,052
Mn	2,126	2,266	1,862	2,283	3,250	1,688
Ni	0,008	0,013	0,015	0,010	0,011	0,012
Pb	0,105	0,012	0,029	0,014	0,024	0,015
Se	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002	<0,002
Sr	0,397	0,804	0,792	0,792	0,919	0,837
Zn	0,781	0,767	0,709	0,710	0,846	0,580

\*Dunnett ( $p < 0,05$ )

Anexo H - Concentração de elementos em mg kg<sup>-1</sup> nas flores de *H. annuus* em 60 dias de cultivo

	<i>P. ostreatus</i>	<i>P. saior-caju</i>	Controle
Al	0,771	0,876	0,491
Ca	51,654	52,827	38,776
Fe	0,793	0,813	0,794
K	285,016	303,983	317,679
Mg	34,323	32,474	31,034
Na	0,306	0,116	0,247
SO <sub>4</sub> <sup>-</sup>	79,834*	84,018	70,102
Si	9,196	8,792	7,890
As	0,001	0,002	0,002
B	0,401	0,454*	0,394
Ba	0,050	0,055	0,030
Cd	0,001	0,001	0,001
Cr	0,058	0,020	0,053
Cu	0,084	0,088	0,096
Mn	0,681	1,121	0,605
Ni	0,016	0,011	0,014
Pb	0,013	0,013	0,017
Se	<0,002	<0,002	<0,002
Sr	0,321	0,336	0,195
Zn	0,277	0,384	0,345

\*Dunnett (p&lt;0,05)