

APRIMORAMENTO DO ENSAIO TOXICOLÓGICO COM GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ALFACE: CONFIABILIDADE E ACURÁCIA DO MÉTODO

PABLO MACHADO MENDES¹; LUCAS LOURENÇO CASTIGLIONI GUIDONI²;
DANIELI SARAIVA CARDOSO²; GIULIA VERRUCK TORTOLA²; PÂMELA LAIS
CABRAL SILVA²; ÉRICO KUNDE CORRÊA³

¹Universidade Federal de Pelotas/PPGCTA – pablomachadomendes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas/NEPERS

³Universidade Federal de Pelotas/CEng – ericokundecorrea@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

A análise de fitotoxicidade vem sendo empregada na avaliação de compostos, biossólidos, efluentes industriais, efluentes de biorreatores anaeróbicos e qualidade de águas de origens distintas, a fim de analisar o efeito destes sobre o crescimento radicular de diferentes espécies de plantas (ZUCCONI *et al.*, 1981; TIQUIA; TAM, 1998; CHARLES *et al.*, 2011; YOUNG *et al.*, 2012; MENDES *et al.*, 2016, GERBER, *et al.* 2017).

Os ensaios fitotóxicológicos com germinação de sementes tem sido bastante utilizados atualmente como indicadores de poluição ambiental por causa da simplicidade e economicidade proporcionada pelo método em comparação com outros tipos de análises e apesar de não ser possível identificar diretamente qual composto está conferindo o caráter tóxico, esse teste consegue comparar níveis de toxicidade através do comprimento e porcentagem de germinação das sementes, compondo um índice, o IG (índice de germinação), que é inversamente proporcional ao nível de toxicidade das amostras testadas. Quanto menor o IG maior a toxicidade do composto analisado, justamente por inibir totalmente ou parcialmente o crescimento das raízes das sementes.

Apesar da importância desse tipo de análise, ainda não existe um padrão a ser seguido como uma norma da ABNT ou NBR. Isso não quer dizer que essa padronização não é necessária, muito pelo contrário, a cada dia mais autores (RAMANA *et al.*, 2002; AVIANI *et al.*, 2010; ÖZKARA *et al.*, 2011; MITELUT e POPA, 2011; KHAN *et al.*, 2014, GERBER *et al.*, 2017, MENDES *et al.*, 2016) utilizam essa técnica para classificar o nível de toxicidade em suas amostras e fazem adaptações aos métodos atualmente encontrados nos artigos científicos. É necessário uma padronização para que se tenha um protocolo padrão afim de gerar uma norma técnica ou metodologia padrão, comparável as indicadas para outras análises, como por exemplo no "standard methods for the examination of water and wastewater" ou NBRs ou ABNTs.

Análises de toxicidade são raramente exigidas pelos órgãos ambientais, o que parece ser um erro, já que testes como o de germinação com sementes são econômicos e fáceis de serem implementados pela maioria dos laboratórios credenciados pelos órgãos ambientais e trazem a resposta global que mais importa: o nível de toxicidade da amostra analisada. O ensaio de fitotoxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) se destaca por ser um teste rápido, confiável, econômico e de fácil implementação (CHARLES *et al.*, 2011). A semente de alface é indicada como bioindicador para avaliar riscos potenciais no ambiente segundo a US Environmental Protection Agency (EPA), para a detecção de efeitos ecotoxicológicos (Johnson *et al.*, 2015).

O objetivo deste estudo consistiu em avaliar diferentes variações na metodologia de fitotoxicidade com germinação de sementes de alface com o intuito de criar um método padrão confiável.

2. METODOLOGIA

Baseado nas pesquisas em artigos que utilizaram métodos de germinação de sementes, foi elaborada a Figura 1 com as variações testadas. Todas as metodologias foram testadas em quintuplicata, com água destilada. Os cálculos dos IGs levam em consideração o branco quando se incuba amostras, mas nesse caso em específico não existe branco pois as próprias amostras são os padrões. Nesse caso foi utilizada a comparação de desvio padrão e análise de variância (que representa o quadrado do desvio padrão) para cada tratamento.

Figura 1: Tratamentos aplicados/Delineamento experimental

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16
Temp.	25	25	25	25	25	25	25	25	20	20	20	20	20	20	20	20
T.A.	1min	1min	1h	1h+1h ¹	1h	1h	1min	1h	1min	1min	1h	1h+1h ¹	1h	1h	1min	1h
T.R.	24h	Over	Over	Zero	Zero	Zero	Over	Over	24h	Over	Over	Zero	Zero	Zero	Over	Over
Vol.	4	4	4	5	4	5	2,5	5	4	4	4	5	4	5	2,5	5
T.P.	90	90	90	90	90	90	60	90	90	90	90	90	90	90	60	90

*T1, T2, T3... = diferentes tratamentos
 *Temp. = Temperatura de incubação, em graus Celsius (°C)
 *T.A. = Tempo de Agitação
 *T.R. = Tempo de Repouso
 *Vol. = Volume de amostra a ser colocado em cada placa, em mL
 *T.P. = Tamanho da Placa de petri
 *Over = Overnight (de 16 a 18h, aproximadamente)
¹ = com 1h de repouso entre as agitações
 N = 80 placas com 10 sementes cada, totalizando 800 sementes de alface (Variedade Giovana com 100% de taxa de germinação)

Em relação aos procedimentos, baseado em MENDES et al., 2016 e em CHARLES et al., 2011, promoveu-se as variações de temperatura, volume de amostra na placa, tamanho da placa, tempo de repouso e tempo de agitação. Os cálculos do desvio padrão e variância foram feitos para cada tratamento. A comparação foi realizada através da classificação dos tratamentos, do menor valor de desvio padrão para o maior, o que pode ser conferido na Tabela 1.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em relação a germinação relativa, a Tabela 1 demonstra como se comportou cada tratamento. Quando se pensa em padronização de método de germinação de sementes como bioindicador de poluição ambiental, algumas coisas são importantes como o fato de 100% das sementes germinarem no padrão com água destilada, já que não existe inibição nesse caso. A resposta biológica esperada é a de que todas as sementes germinassem no branco (padrão, testemunha, etc.) pois sempre é utilizada água destilada, apenas. Percebe-se nos dados da Tabela 1, que os tratamentos T1, T2, T3, T4, T5, T9, T10, T11, T12 e T14 obtiveram 100% de germinação, ou seja, a média das sementes nas 5 repetições foi de 10, já que 10 sementes do total de 10 germinaram em cada uma das 5 placas da repetição. Esses tratamentos foram preferidos, como sendo um primeiro passo na determinação da escolha do método a ser indicado como método padrão de análise de fitotoxicidade com sementes de alface.

É imprescindível que um método padrão para qualquer tipo de análise proporcione o mínimo de variação entre suas repetições, obtendo assim o menor desvio padrão possível.

Tabela 1 - Média das sementes germinadas e do Alongamento e Desvio Padrão e Variância do Alongamento das sementes entre repetições de cada tratamento

Amostra	Média Germ.	Média Along.	Desvio Padrão	Variância	Classificação
T1	10	166.19	9.96	99.25	4
T2	10	154.44	16.18	261.67	7
T3	10	150.65	11.85	140.49	6
T4	10	132.95	18.96	359.30	13
T5	10	115.26	17.02	289.54	10
T6	9.6	128.31	16.49	272.06	9
T7	8.8	115.66	18.59	345.48	12
T8	9.2	116.45	28.99	840.25	16
T9	10	110.84	2.94	8.65	1
T10	10	116.44	10.24	104.88	5
T11	10	112.59	16.49	271.96	8
T12	10	116.54	20.32	412.82	14
T13	9.8	119.60	9.20	84.63	3
T14	10	121.16	17.36	301.25	11
T15	9.6	94.81	6.48	41.99	2
T16	9.4	78.50	20.19	407.46	15

O alongamento de raiz foi colocado em segundo plano, visto que essa classificação como critério principal não faz sentido quando se busca uma padronização de método, da mesma forma que se pensa quando se obtém uma certificação ISO9000, ou seja, não importa o que se produz, se é bom ou ruim, só importa que se produz sempre a mesma coisa, com desvio padrão e variância dentro de limites estabelecidos pelas normas, geralmente sendo valores mínimos.

Percebe-se que existe grande diferença entre os valores de todos os tratamentos, sendo que o T9 obteve tanto o menor Desvio Padrão quanto a menor Variância. A diferença entre os Desvios Padrões do T9 (classificado como 1) e o T15 (classificado como 2) foi de 220,41% (T15 maior do que o T9). Para as diferenças de variância entre os mesmos tratamentos temos que o T15 foi 485,43% maior do que o T9. As diferenças só aumentam do T9 em relação aos valores dos tratamentos classificados acima de 3, chegando ao aumento de 986,05% para o Desvio Padrão do T9 em relação ao T8 (pior tratamento segundo os critérios adotados). Já para a Variância, esse valor sobe, sendo o T8 9.713,87% maior do que o T9.

4. CONCLUSÕES

Constatou-se diferença entre as metodologias (tratamentos) aplicadas, comprovando que deve-se aprofundar cada vez mais o conhecimento sobre a utilização de sementes como bioindicadores, de maneira que métodos com maior credibilidade, ou seja, que obtenham valores baixos de desvio padrão e variância sejam preferidos. Dentre os métodos utilizados, destaca-se o T9 (1 minuto de agitação com bastão de vidro, tempo de repouso de 24h na ausência de luz, placa de 9cm, 4mL de amostra na placa, 20°C de temperatura de incubação), que obteve os melhores resultados, de 2,94 para o desvio padrão e 8,65 para a variância.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: APHA, 1998, 937p.

Aviani, I., Laor, Y., Medina, S., Krassnovsky, A., Raviv, M., 2010. **Co-composting of solid and liquid olive mill wastes: management aspects and the horticultural value of the resulting composts**. Bioresour. Technol. 101, 6699–6706.

Charles, J., Sancey, B., Crini, M.N., Badot, P., Degiorgi, F., Trunfio, G., Crini, G., 2011. **Evaluation of the phytotoxicity of polycontaminated industrial effluents using the lettuce plant (*Lactuca sativa*) as a bioindicator**. Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 2057–2064.

Johnson, M., T. Shiroyama, D. Olszyk, AND J. Novak. **A Quick-Test for Biochar Effects on Seed Germination**. Soil Science of America Annual Meeting, Minneapolis, MN, November 15 - 18, 2015. Office of Research and Development Publications/EPA-USA. Disponível em <https://cfpub.epa.gov/ecotox/>, acesso em 9 de outubro de 2017.

Khan, N., Clark, I., Sánchez-Monedero, M., Shea, S., Meier, S., Bolan, N., 2014. **Maturity indices in co-composting of chicken manure and sawdust with biochar**. Bioresour. Technol. 168, 245–251.

Mendes, P.M., Becker, R., Corrêa, L.B., Bianchi, I., Dai Prá, M.A., Lucia Jr., T., Corrêa, E.K., 2016. **Phytotoxicity as an indicator of stability of broiler production residues**. J. Environ. Manag. 167, 156–159.

Mitelut, A., Popa, M., 2011. **Seed germination bioassay for toxicity evaluation of different composting biodegradable materials**. Roman. Biotechnol. Lett. 16, 121–129 (Suppl.).

Ramana, S., Biswas, A., Kundu, S., Saha, J.K., Yadava, R.B., 2002. **Effect of distillery effluent on seed germination in some vegetable crops**. Bioresour. Technol. 82, 273–275.

Tiquia S. M. and N. F. Y. Tam (1998). **Elimination of phytotoxicity during co-composting of spent pig manure sawdust litter and pig sludge**. Bioresource Technology, 65: 43–9.

Young, B.J., Riera, N.I., Beily, M.E., Bres, P.A., Crespo, D.C., 2012. **Toxicity of the effluent from an anaerobic bioreactor treating cereal residues on *Lactuca sativa***. Ecotoxicol. Environ. Saf. 76, 182–186.

Zucconi, F., Pera, A., Forte, M., Bertoldi, M., 1981. **Evaluating toxicity in immature compost**. Biocycle 22, 54–57.