

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos ¹
Montcharles da Silva Pontes ²
Yaovi Abel Kissi ³
Aline Lazzaretti Cassol ⁴
Margareth Batistote ⁵
Etenaldo Felipe Santiago ⁶

RESUMO

O lodo de esgoto (LE) é o resíduo final proveniente do tratamento de esgoto, ele pode promover benefícios aos vegetais devido à sua carga nutricional. Por outro lado, o desequilíbrio de seus nutrientes pode causar fitotoxicidade. Portanto, o uso de bactérias biorremediadoras pode ser uma alternativa para mitigar a toxicidade desse resíduo e viabilizar sua utilização como componente de substratos para produção de mudas de espécies nativas. Nesse estudo foram avaliadas as respostas germinativas de sementes de *Alibertia edulis* (L.C. Rich) A.C. Rich. sem inóculo (SI), e inoculadas com *Bacillus licheniformis* (CI), submetidas a diferentes doses de LE (0%, 25%, 50%, 75%, e 100%). A fim de avaliar se os efeitos tóxicos do LE poderiam ser atenuados pela bactéria inoculada. Os resultados obtidos mostram maior percentual germinativo (%G) para 0% LE SI. No entanto, o %G observado em sementes CI sugere melhor performance germinativa para todas as concentrações de LE. Diante disso, conclui-se que a inoculação de *B. licheniformis* em sementes de *A. edulis* diminuiu os efeitos do estresse provocado pelo LE e promoveu aumento no %G, indicando que a bactéria inoculada agiu como possível biorremediadora de compostos tóxicos presentes no LE atenuando a toxicidade deste resíduo.

Palavras-chave: Inoculação bacteriana; Semente; *Alibertia edulis*; Lodo de esgoto; Biorremediação.

¹ Mestre em Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. jaquesiquera@hotmail.com

² Mestre em Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. montcharles.pontes@gmail.com

³ Mestre em Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. kissiabel@yahoo.fr

⁴ Mestre em Recursos Naturais pela Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. aline_lc3@hotmail.com

⁵ Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil. Docente na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. margareth@uems.br

⁶ Doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Vegetal) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP, Docente na Universidade Estadual do Mato Grosso do Sul, UEMS, Brasil. felipe@uems.br

O tratamento de efluentes urbanos gera, diariamente, quantidades cada vez maiores de lodo de esgoto (LE); sua superacumulação nos aterros sanitários tem se tornado um grave problema ambiental, causando considerável aumento dos níveis de poluição.

O armazenamento do LE requer grandes áreas, o que além de envolver riscos ambientais, torna-se dispendioso, fazendo-se necessário encontrar destinos e aplicabilidades viáveis para este resíduo (Scheer et al. 2012). Diante disso, uma boa alternativa para destinação e aproveitamento do LE é sua utilização como insumo para culturas florestais, bem como sua incorporação na composição de substrato para produção de mudas de espécies nativas, tendo em vista a economia de fertilizantes e a despoluição ambiental (Meng et al. 2017; Nóbrega et al. 2017; Zhen et al. 2017).

O LE é rico em minerais fundamentais para as plantas, além de possuir constituintes orgânicos necessários para o desenvolvimento vegetal (Mazzeo et al. 2016). Todavia, concomitantemente, ele contém elevadas quantidades de contaminantes oriundas da rotina diária, dentre estas substâncias, estão derivados de petróleo, medicamentos, materiais para limpeza, entre outros (Guedes et al. 2016). Portanto, dependendo das proporções utilizadas, bem como da sensibilidade ou resistência da espécie vegetal o LE pode atuar como adubo fertilizante (Meng et al. 2017) ou pode causar fitotoxidez, ocasionando danos osmóticos aos vegetais (Citeau et al. 2011, He et al. 2016).

Os estádios germinativos e de desenvolvimento inicial implicam no período de maior suscetibilidade do organismo vegetal aos condicionantes do meio. Desta forma, estudos sobre a germinação de sementes submetidas à LE colaboram com o entendimento da tolerância das plantas ao uso deste resíduo. Na literatura, referências a sua influência na germinação de sementes são encontradas nos trabalhos de Pontes et al. (2015) que descreveram os efeitos do LE na redução dos percentuais germinativos de *Maclura tinctoria* (Moraceae). Kratka e Correia (2015) mostraram que o LE inibiu o crescimento inicial em plântulas de *Myracrodruon urundeuva* (Anacardiaceae). Por outro lado, Cabreira et al. (2017) e Pontes et al. (2016) descreveram resultados positivos em mudas de *Peltophorobium dubim*, *Lafoensia pacari*, *Ceiba speciosa* (Bombacaceae), e *Sesbania virgata* expostas a LE.

Junto aos possíveis benefícios da utilização do LE em culturas vegetais existe também a possibilidade dele ser tóxico para algumas espécies, diante disso, a biorremediação do LE consiste em uma alternativa para a viabilização do uso deste resíduo (Liang et al. 2014), uma vez que, os tratamentos químicos, são em geral de alto custo, justificando a preferência por tratamentos biológicos, que vem se mostrando eficazes para a remoção de diferentes tipos de contaminantes (Naik & Dubey 2013).

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol, Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

Os habitats que possuem condições extremas de temperatura, irradiância, ou mesmo de restrição nutricional são conhecidos por serem repositórios de novos microrganismos com potenciais aplicações de biorremediação (Paraneeiswaran et al. 2015). Frente a isso, neste estudo isolamos a bactéria *Bacillus licheniformis* a partir de uma espécie nativa do cerrado *sensu stricto*. *Alibertia edulis*, uma árvore de pequeno porte, dioica, com frutos do tipo baga, medindo de quatro a oito centímetros de diâmetro, de coloração marrom escuro quando maduro, com sementes recalcitrantes (Souza & Lorenzi 2005). É uma planta que apresenta potencial farmacológico e etnobotânico (Menegati et al. 2016), e os frutos são bastante apreciados pela fauna nativa, que exerce papel de dispersores das sementes, facilitando o processo de restauração de áreas degradadas (Neri et al. 2005).

Considerando que as atividades metabólicas de *Bacillus licheniformis* atuam como biorremediadoras de ambientes contaminados (Paraneeiswaran et al. 2015), sobretudo beneficiando a germinação de sementes, crescimento e aumento da tolerância de plantas a patógenos (Kefela et al. 2015). Levantamos a hipótese de que os efeitos estressores de concentrações elevadas de LE na germinação de sementes de *A. edulis* possam ser atenuados pela atividade de *B. licheniformis*.

Assim, no presente estudo foram avaliadas as respostas germinativas de sementes de *A. edulis* sem inóculo (SI), e inoculadas com *B. licheniformis* (CI), submetidas a diferentes doses de LE. A fim de aprimorar as técnicas de produção de mudas de espécies nativas do cerrado *stricto sensu* a partir do aproveitamento de resíduos.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA E PREPARO DA SOLUÇÃO DE LODO DE ESGOTO

O LE sólido utilizado nesse estudo foi obtido na estação de tratamento de esgoto Guaxinim, vinculada à Empresa de Saneamento Básico do Estado de Mato Grosso do Sul (SANESUL), Dourados, MS, Brasil. A maturação e secagem do LE foi realizada segundo a metodologia proposta por Scheer et al. (2012). A solução 100% LE foi preparada a partir da diluição com água de 500g L⁻¹ do lodo sólido, depois essa solução concentrada foi diluída nas concentrações 0%, 25%, 50%, e 75% LE. As análises físico-química do LE foram realizadas na Embrapa Agropecuária Oeste, utilizando espectrofotômetro de absorção atômica e espectrofotômetro de absorção molecular, como apresenta a tabela 1.

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De Bacillus Licheniformis E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

Tabela 1 – Principais características físico-químicas do lodo de esgoto proveniente da Estação de
Tratamento Guaxinim – SANESUL

Parâmetros químicos-físicos Presentes no lodo	Media ± DP	Unidades
N	2,93 ± 0.03	%
P	0,90 ± 0.02	%
K	0,07 ± 0	%
Ca	1,55 ± 0.05	%
Mg	0,21 ± 0.007	%
Na	0,07 ± 0	%
Cu	325,44 ± 17.69	mg/Kg
Fe	12524,53 ± 221.11	mg/Kg
Mn	271,23 ± 7.99	mg/Kg
Zn	769,38 ± 20.78	mg/Kg
CTOTAL	22,57	%
Umidade	53,44	%
pH	7,39	-

Fonte: Média de vinte leituras, seguida, do DP (desvio padrão das amostras). Embrapa/Dourados, MS.

COLETA E TRATAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Os frutos e plantas jovens de *A. edulis* foram coletados em diversas matrizes localizadas num fragmento de cerrado *stricto sensu*, nas coordenadas 22°08'25.0"S e 55°08'17.0"W, Dourados, MS, Brasil. As plantas jovens mediam entre 5 a 15 cm centímetros, retiradas do solo por inteiro, preservando raiz, caule e folha.

O material botânico foi levado para o Laboratório de Ecologia, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, onde foram processados no período de até 24 horas após a coleta. Para retirada das sementes, os frutos foram beneficiados manualmente, utilizando peneira sob água corrente. As plantas foram lavadas utilizando detergente neutro para retirar possíveis microrganismos epifíticos. Em câmara asséptica, todo o material vegetal foi desinfetado em álcool 70% por um minuto, em seguida em hipoclorito de sódio 3% por quatro minutos, e novamente em álcool 70% por 30 segundos, finalmente o material vegetal foi lavado com água ultrapura, seguindo a metodologia de (Pereira et al. 1993).

ISOLAMENTO E CRESCIMENTO DA BACTÉRIA

Para promover a formação de colônias de bactérias endofíticas, fragmentos de 8 x 8 mm da raiz, caule e folha foram macerados em 10 mL de solução salina estéril (0,85%), utilizando cápsula de porcelana e pistilo. A partir do homogenato foram feitas diluições de 1×10^{-1} até 1×10^{-6} . Em seguida, 1,0 mL de cada diluição foi plaqueado em meio sólido Mueller Hinton. As placas foram incubadas a 37

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De Bacillus Licheniformis E Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol, Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

°C até o crescimento das unidades formadoras de colônia (UFC). A identificação das bactérias presentes no extrato vegetal foi realizada no Hospital da Universidade Federal da Grande Dourados–UFGD, utilizando o equipamento Phoenix: 6.01A, com 99% de confiabilidade, sendo selecionada para inoculação nas sementes a bactéria *B. licheniformis*.

Para a obtenção da biomassa celular, a bactéria foi cultivada em erlenmeyer contendo 50 mL do meio Brain Heart Infusion (BHI), incubado a 37 °C e 200 rpm. Após o crescimento as células foram centrifugadas por 20 minutos, ressuspensas e lavadas por três vezes em solução salina estéril 0,85%. A biomassa obtida após esse processo (109 mg) foi diluída em 1 mL de solução salina estéril 0,85% e imediatamente inoculada nas sementes.

MONTAGEM DO EXPERIMENTO E DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os tratamentos considerados nesse estudo foram sementes com inóculo (CI) e sem inóculo (SI), umedecidas com 10 mL de diferentes concentrações de LE, sendo estas: 0% (controle), 25%, 50%, 75%, e 100%. Cada tratamento constituído por quatro repetições com 25 sementes. Os tratamentos foram acondicionados em placas de petri forradas com dupla folha de papel Germitest®. O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado. O experimento foi conduzido por 30 dias em câmara de germinação do tipo BOD a 25°C. Foram avaliados os parâmetros germinativos: %G: percentual germinativo, *T*: tempo médio de germinação, *V_i*: velocidade média de germinação, *CV_i*: coeficiente de variação do tempo, *U*: incerteza e *Z*: índice de sincronia.

Um segundo experimento foi realizado para testar o efeito de diferentes concentrações de inóculo sob as sementes. Para tanto, os seguintes tratamentos foram considerados: 0, 20, 30, 80, 100 e 150 µl (alíquotas retiradas de uma solução a 109 mg/mL biomassa bacteriana/solução salina estéril a 0,85%). As alíquotas foram dissolvidas em 10 mL de LE a 50% e logo foram despejadas sobre as sementes. Em delineamento inteiramente casualizado, com 4 repetições de 25 sementes, o experimento foi conduzido em BOD a 25°C por 30 dias.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (Anova) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey (5% de significância). Para os dados das diferentes concentrações de inóculo foi efetuado o ajuste de regressão. Todos os procedimentos estatísticos foram realizados utilizando os softwares R e BioEstat 5.0.

RESULTADOS

Foram verificadas diferenças para todos os parâmetros germinativos de *A. edulis* avaliados, com exceção de *U* para as sementes inoculadas (Tabela 2).

Tabela 2 – Avaliação da influência de diferentes concentrações de lodo de esgoto sobre a germinação de sementes de *Alibertia edulis* (Rubiaceae), nas condições sem inóculo e com inóculo de *Bacillus licheniformis*.

	Dinâmica de germinação					
	%G	T	<i>Vi</i>	<i>CV_i</i>	U	Z
SI						
0% LE	69 ± 1,43a	18,22 ± 0,07a	0,05 ± 0,0002b	31,85 ± 0,33a	-0,99 ± 0,01a	0,08 ± 0,002b
25% LE	37 ± 1,10b	20,05 ± 0,08a	0,04 ± 0,0002b	26,73 ± 0,57a	-0,73 ± 0,03a	0,10 ± 0,003b
50% LE	45 ± 1,32b	16,19 ± 0,10b	0,06 ± 0,0004a	19,18 ± 0,42b	-1,44 ± 0,03b	0,25 ± 0,01a
75% LE	36 ± 1,60b	16,47 ± 0,29b	0,06 ± 0,001a	26,00 ± 0,13a	-0,72 ± 0,05a	0,10 ± 0,008b
100% LE	0c	0c	0b	0c	0a	0c
CI						
0% LE	48 ± 0,73a	17,45 ± 0,08a	0,05 ± 0,0002a	28,02 ± 0,23a	-0,88 ± 0,01a	0,10 ± 0,003b
25% LE	49 ± 1,57a	16,21 ± 0,10a	0,06 ± 0,0004a	19,57 ± 0,27a	-0,93 ± 0,04a	0,12 ± 0,004b
50% LE	56 ± 2,42a	16,40 ± 0,07a	0,06 ± 0,0002a	30,05 ± 0,59a	-0,88 ± 0,03a	0,08 ± 0,001b
75% LE	49 ± 1,99a	15,44 ± 0,08a	0,06 ± 0,0003a	21,88 ± 0,50a	-0,78 ± 0,06a	0,08 ± 0,005b
100% LE	7 ± 0,94b	8,55 ± 0,99b	0,02 ± 0,0033b	0,69 ± 0,138b	-0,65 ± 0,07a	0,4 ± 0,048a

SI: sem inóculo; CI: com inóculo; %G: porcentagem de germinação; T: tempo médio de germinação; *Vi*: velocidade média de germinação; *CV_i*: coeficiente de variação do tempo de germinação; U: incerteza; Z: índice de sincronia de germinação; ± erro padrão. Médias seguidas pela mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Na condição sem inóculo (SI) o LE afetou negativamente a germinação, mesmo na menor concentração utilizada (25%), sendo observada a redução do percentual germinativo (%G) quando comparado ao controle (sem LE). Além disso, 100% LE SI não apresentou germinação. Para os tratamentos com inóculo (CI) não houve diferença estatística entre o %G da maioria das concentrações de lodo, exceto para 100% LE, que exibiu apenas 7% de germinação. Contudo, fazendo a comparação entre o %G de sementes SI e CI observamos aproximadamente 15% de melhora para sementes CI (Tabela 2).

Avaliando os parâmetros germinativos, T, *Vi*, *CV_i*, U, e Z, na condição SI verificou-se que o aumento das concentrações de LE promoveu redução do T, e aumento de *Vi*. Na concentração 50% LE, foi verificado menores médias de *CV_i* e U, bem como aumento no Z. Para os tratamentos CI não foi constatada diferenças para %G até 75% de LE, sendo a concentração 100% de LE aquela com

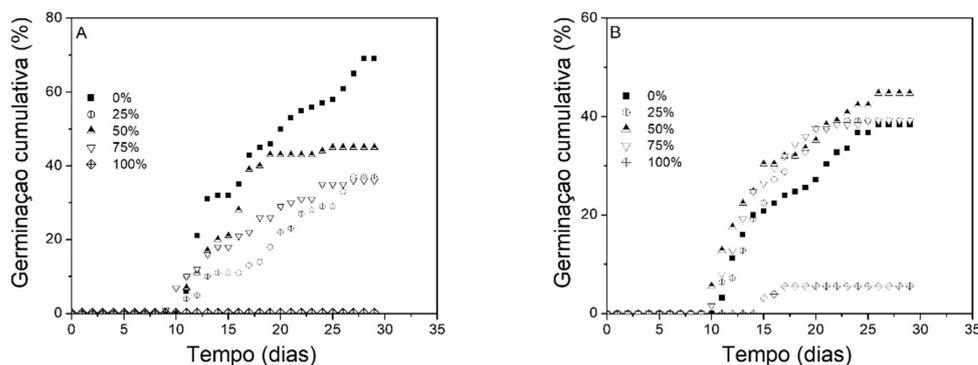
Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

menor percentual germinativo (7%). O mesmo comportamento foi observado para as variáveis T , V_i e CV_p , sendo a concentração 100% LE aquela com maior Z (Tabela 2).

A germinação cumulativa mostra que, as sementes iniciaram a germinação entre 8-10 dias em todos os tratamentos (Figura 1 A e 1B). A curva germinativa acumulada no 0% LE SI foi sempre superior aos demais tratamentos ao longo de todo o período experimental, atingindo a maior $G\%$. As curvas da germinação cumulativa nos tratamentos SI não se sobrepuseram ao longo de todo o período experimental, contudo, apresentaram comportamento heterogêneo para as diferentes concentrações de LE (Figura 1 A). Em contrapartida, na condição CI foram homogêneas em quase todos os tratamentos, com exceção da concentração 100% LE (Figura 1 B).

Figura 1. Germinação cumulativa de sementes de *Alibertia edulis* (Rubiaceae) embebidas nas concentrações: 0, 25, 50, 75, e 100% lodo de esgoto, testadas nas condições: (A) - sem inóculo (SI) e (B) - com inóculo de *Bacillus licheniformis* (CI).

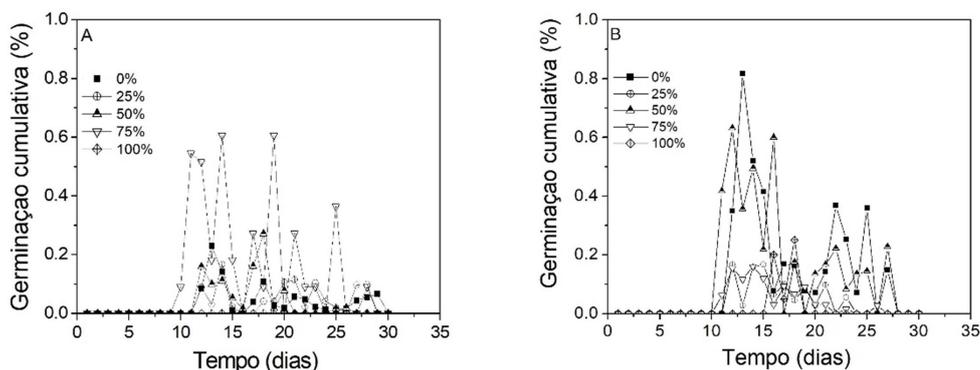


Para a frequência relativa de germinação (FR) se observou que, exceto para 100% LE na condição SI, todos os demais tratamentos apresentaram distribuição polimodal independente da presença de inóculo. A germinação em ambos os tratamentos esteve distribuída ao longo de 08-29 dias (Figura 2 A e 2 B). Na condição SI, para todos os tratamentos de LE, os picos de FR apresentaram comportamento similar ao longo do tempo, sendo o 75% LE aquele com maior FR (Figura 2 A). Para as sementes inoculadas com *B. licheniformis* ainda que polimodal, é possível distinguir as maiores FR entre o 10° e 18° dias, em especial para o controle e o tratamento 50% (Figura 2B).

Figura 2. Frequência relativa de germinação (FR) de sementes de *Alibertia edulis* (Rubiaceae) embebidas nas concentrações: 0, 25, 50, 75 e 100% lodo de esgoto, testadas nas condições: (A) - sem inóculo (SI) e (B) - com inóculo de *Bacillus licheniformis* (CI).

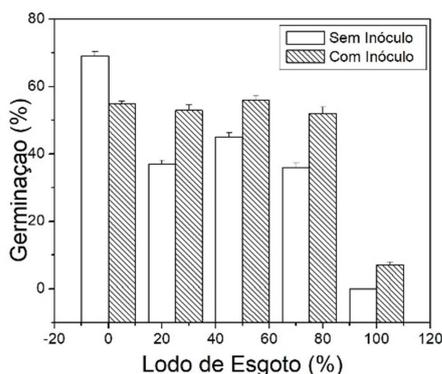
Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago



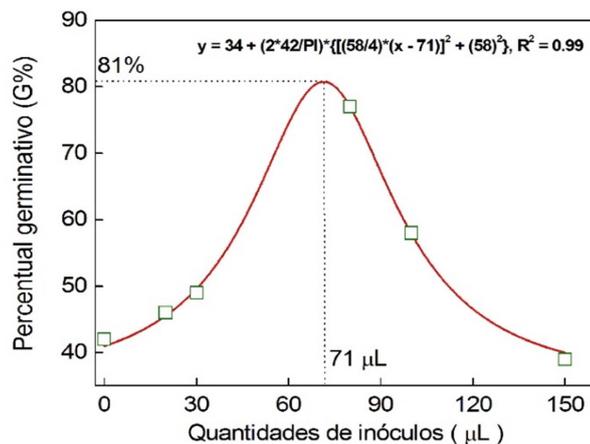
Comparando o percentual germinativo entre as condições SI e CI nas diferentes concentrações de LE foi observada diferença ($P < 0,05$) somente em 0% de LE. Embora a concentração 100% de LE tenha sido a mais efetiva para inibir a germinação das sementes de *A. edulis*, nesta concentração somente na condição CI foi observada germinação (Figura 3).

Figura 3. Comparação das médias das porcentagens germinativas (%G) de sementes de *Alibertia edulis* (Rubiaceae), embebidas nas concentrações: 0, 25, 50, 75 e 100% lodo de esgoto, testadas nas condições: sem inóculo e com inóculo de *Bacillus licheniformis*.



Avaliando a influência das concentrações de inóculo sobre a %G das sementes de *A. edulis* (Figura 4), a concentração 80 μL se sobressaiu em relação as demais, com 77% de sementes germinadas, ao passo que, a menor porcentagem germinativa foi observada na concentração 150 μL , com 39% de sementes germinadas. Foi registrado ajuste de regressão ($R^2 = 0,99$) com ponto de máxima de 81% de germinação a uma concentração de 71 μL de inoculante.

Figura 4. Germinação de sementes de *Alibertia edulis* embebidas com 50% de solução de lodo de esgoto, submetidas a inóculo bacteriano formulado com *Bacillus licheniformis*, nas seguintes concentrações: 0, 20, 30, 80, 100 e 150 μL .



DISCUSSÃO

Avaliando a influência das diferentes concentrações das soluções de LE, sem analisar o efeito do inóculo, foi observado redução no percentual germinativo para as sementes de *A. edulis* embebidas com LE. Resultados similares foram vistos por Pontes et al. (2015) ao estudar a germinação de sementes de *Maclura tinctoria* expostas a esse resíduo. Essa resposta pode estar relacionada ao efeito osmótico das soluções de LE afetando a absorção de água durante a fase II da germinação e conseqüentemente, o balanço hídrico do eixo embrionário, bem como, aos efeitos fitotóxicos em virtude das concentrações minerais presentes no mesmo (Oleszczuk 2008; Barroso et al. 2011).

Na tabela 1 são descritas algumas das principais propriedades do LE utilizado no presente estudo, evidenciando o seu desbalanço quanto às quantidades dos minerais presentes, com destaque para os elevados teores de Fe e Zn. Os nutrientes vegetais no LE se apresentam em quantidade suficiente para, dependendo das concentrações empregadas, saturar a solução de embebição às quais as sementes foram expostas. O acréscimo de solutos, por exemplo, elementos minerais aplicados na adubação, alteram os potenciais osmóticos e condutividade elétrica das soluções (Nobre et al. 2010).

De maneira geral, quando sementes são colocadas em soluções salinas, mesmo quando muito concentradas, como é o caso do LE, observa-se a embebição, que, neste caso ocorre por conta dos fortes potenciais matriciais presentes nas sementes (Ávila et al. 2007). Os potenciais matriciais, no entanto, tendem a zero com a entrada de água na fase I da germinação. Assim, os prováveis efeitos osmóticos das concentrações de LE estariam restritos à fase III, uma vez que, nesta fase a entrada de

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De Bacillus Licheniformis E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

água é dependente da relação entre os potenciais osmóticos celulares e o potencial da solução de embebição (Villela et al. 2003).

As sementes SI expostas à diferentes concentrações de LE apresentaram menor $G\%$, com total ausência de germinação em 100% LE. Evidenciando o efeito inibitório do LE sobre as sementes de *A. edulis*, principalmente, na ausência do inóculo. Tais efeitos podem estar relacionados a danos osmótico e/ou fitotóxicos provocados pelo LE durante fase III da germinação. Portanto, considerando que não foram evidentes alterações no volume das sementes, provavelmente o LE não promoveu interferências durante a embebição na fase I da germinação.

A redução do T e aumento de Vi quando não acompanhadas de aumento no $\%G$ podem ser interpretadas como negativas, pois expressam o estresse promovido pelo LE, principalmente quando não existe linearidade entre as concentrações de LE e as variáveis CV_p , U e Z (Tabela 2). Portanto, ainda que a embebição na fase I da germinação não tenha sido diretamente afetada, sementes embebidas em soluções salinas podem apresentar alterações no T , Vi e Z (Oliveira & Gomes-Filho 2009). Em geral, atrasos no início da germinação refletem aumento no T e redução na Vi (Lavezo et al. 2015).

Germinação rápida e uniforme são condições preferíveis na produção de mudas para fins de restauração ambiental (Pacheco et al. 2006). Todavia, a germinação heterogênea pode ser característica da própria espécie vegetal, ou mesmo pode ser imposta por fatores externos (Pontes et al. 2015). Aumentos no T , CV_p , e alterações no Z podem ser decorrentes de problemas relacionados à absorção de água pela semente (Teixeira et al. 2011). Além disso, alterações nestes parâmetros podem refletir o tempo que as sementes levaram para acionar mecanismos de ajustes fisiológicos, frente às condições de estresse imposta pelo meio (Pinto et al. 2008).

Além do efeito osmótico, sementes imersas em solução de LE podem apresentar problemas relacionados à fitotoxicidade de compostos presentes neste resíduo (Ramírez et al. 2008), ou mesmo ocasionados pelo desbalanço nutricional, influenciando na sobrevivência das espécies (Antolín et al. 2010). Durante a germinação, sementes em contato com LE podem apresentar danos em suas membranas celulares, em decorrência da sensibilidade de algumas espécies vegetais à elementos como o alumínio, cádmio, cobre, entre outros, que estão disponíveis no LE em quantidades representativas (Li et al. 2016, Fang et al. 2017).

Em 100% LE ocorreu o menor $\%G$, sendo que, as sementes sem inóculo não germinaram, e as inoculadas germinaram apenas 7%. Evidenciando que altas quantidades de íons solúveis podem ter

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

afetado severamente o crescimento do embrião em sementes submetidas à esta concentração. Tais efeitos negativos podem estar relacionados aos danos osmóticos, bem como aos fitotóxicos, pois, nesta concentração, a inoculação não foi suficiente para atenuar significativamente os efeitos do estresse.

Embora o LE tenha potencial biofertilizante, devido a sua carga nutricional (Mazzeo et al. 2016), ele apresenta também alta toxidez (He et al. 2016). Nesse sentido, a utilização de bactérias biorremediadoras pode ser uma alternativa sustentável para diminuir o teor tóxico deste resíduo e viabilizar seu uso como componente de substrato para espécies vegetais (Siripornadulsil & Siripornadulsil 2013). Assim, *B. licheniformis*, por meio de suas atividades metabólicas possui potencial para remediar metais como: Cu, Fe, e Mn, encontrados em grande quantidade no LE (Polonio et al. 2014).

Brunetti et al. (2012) testaram a capacidade de fitoextração de Cr, Cu, Pb e Zn por três espécies de Brassicaceae cultivadas em substrato inoculado com *B. licheniformis*, e obtiveram em sua pesquisa resultados positivos. Esses dados corroboram com os resultados observados no presente trabalho, visto que, as sementes inoculadas e embebidas em LE apresentaram melhor germinação e maior homogeneidade dos parâmetros germinativos avaliados.

Resultados de melhora germinativa a partir da inoculação de espécies de *Bacillus* foram observados também por Radhakrishnan e Lee. (2016), que registraram aumento da germinação em sementes de alface inoculadas com *Bacillus methylotrophicus*. Em outro estudo, Chávez et al. (2016) analisando *Bacillus* isolados da rizosfera de *Mammillaria coryphantha* (Cactaceae) e reinoculados posteriormente nas sementes da mesma espécie notaram efeitos positivos na germinação. Na mesma vertente, Shahzad et al. (2016) examinando isolados de *B. amyloliquefaciens* obtiveram melhora germinativa em sementes de arroz.

No presente estudo o uso do inóculo com *B. licheniformis* parece ter agido minimizando efeitos do desajuste fisiológico causado pelo lodo à germinação de *A. edulis*. De acordo com Polonio et al. (2014) essa bactéria auxilia no processo de absorção de alguns nutrientes, disponíveis no lodo em grandes quantidades. Para *A. edulis* não se descarta que *B. licheniformis* agiu amenizando efeitos negativos promovidos pelo desbalanço nutricional desse resíduo, absorvendo ou metabolizando metais pesados, diminuindo seu teor tóxico, abrandando dessa forma o efeito de uma eventual condição de estresse na qual o vegetal estava exposto.

Bactérias do gênero *Bacillus* são citadas na literatura científica como produtoras de giberelina (Radhakrishnan & Lee 2016, Shahzad et al. 2016). Todavia, considerando a atuação desse hormônio

como regulador de crescimento, diretamente envolvido na germinação de sementes. Os resultados obtidos no presente trabalho, parecem não apontar *B. licheniformis* como produtora deste fitormônio, pois na ausência do LE sementes SI apresentaram $G\%$ maior que sementes CI. Indicando que, a bactéria não agiu como produtora de hormônios relacionados ao crescimento vegetal. No entanto, atuou como remediadora dos contaminantes presentes no LE.

No presente estudo quando testada a influência de diferentes concentrações de inóculo sobre sementes tratadas com 50% de LE, observou-se comportamento quadrático, com maior germinação na concentração 80 μl . Portanto, sabendo que *B. licheniformis* sintetiza amilase (Afrisham et al. 2016), a justificativa desse maior $\%G$ provavelmente é que, ao hidrolisar o amido presente na semente para uso em suas atividades metabólicas, a bactéria favoreceu a assimilação das reservas pelo eixo embrionário em desenvolvimento. Por outro lado, a não manutenção do rendimento germinativo nas maiores concentrações do inóculo pode estar associado à maiores quantidades de produtos liberados pelas bactérias, durante suas atividades metabólicas, podendo estes se ligarem a receptores presentes nas membranas celulares do embrião, interferindo no sucesso germinativo (Sansinenea & Ortiz 2011).

CONCLUSÃO

Através deste estudo foi possível concluir que a toxicidade do LE para a germinação de *A. edulis* está diretamente relacionada a concentração utilizada deste resíduo. Desta forma, concentrações mais baixas foram mais toleradas, enquanto que, sementes embebidas em 100% LE apresentaram pouca e nenhuma germinação para semente CI e SI, respectivamente. A toxicidade observada provavelmente está relacionada a danos osmóticos e/ou fitotóxicos promovido pelo alto teor de contaminantes presentes no LE.

Em relação a inoculação com *B. licheniformis* foram observados resultados positivos, pois sementes CI submetidas a diferentes concentrações de LE apresentaram $G\%$ maior e germinação mais uniforme, quando comparadas com sementes SI. Portanto, os resultados sugerem que *B. licheniformis* atuou como biorremediadora, diminuindo a toxicidade do LE. Assim sendo, sementes inoculadas com *B. licheniformis* podem viabilizar a utilização do LE como componente de substrato para produção de mudas de espécies nativas.

REFERÊNCIAS

- Afrisham S, Badoei-Dalfard A, Namaki-Shoushtari A, Karami Z 2016. Characterization of a thermostable, CaCl₂-activated and raw-starch hydrolyzing alpha-amylase from *Bacillus licheniformis* AT70: Production under solid-state fermentation by utilizing agricultural wastes. *J Mol Catal B Enzym* 132:98-106.
- Antolín MC, Muro I, Sánchez-Díaz M 2010. Application of sewage sludge improves growth, photosynthesis and antioxidant activities of nodulated alfalfa plants under drought conditions. *Environ Exp Bot* 68:75-82.
- Ávila MR, Braccini ADL, Scapim CA, Fagliari, JR. Santos, JD 2007. Influência do estresse hídrico simulado com manitol na germinação de sementes e crescimento de plântulas de canola. *Rev bras Sementes* 29:98-106.
- Barroso LB, Wolff, DB 2011. Reúso de esgoto sanitário na irrigação de culturas agrícolas. *Eng Amb: Pesq e Tecnologia* 8:225-236.
- Brunetti G, Farrag K, Soler-Rovira P, Ferrara M, Nigro F, Senesi N 2012. The effect of compost and *Bacillus licheniformis* on the phytoextraction of Cr, Cu, Pb and Zn by three brassicaceae species from contaminated soils in the Apulia region, Southern Italy. *Geoderma* 170:322-330.
- Cabreira GV, Santos LPS, Alonso JM, Abreu AHM, Lopes NF, Santos GR 2017. Biossólido como componente de substrato para produção de mudas florestais. *Floresta* 47:165-176.
- Chávez ALA, Hernández MA, Cabrera LJA, Luna ML, Pacheco AJR 2016. Aislados de *Bacillus* provenientes de la rizósfera de cactus incrementan la germinación y la floración en *Mammillaria* spp. (Cactaceae). *Rev Argent Microbiol* 48:333-341.
- Citeau M, Larue O, Vorobiev E 2011. Influence of salt, pH and polyelectrolyte on the pressure electro-dewatering of sewage sludge. *Water Res* 45:2167-2180.
- Freitas R 2016. Growth of *Mimosa caesalpiniiifolia* Benth., under shade in the Northeast semi-arid region of Brazil. *Rev. Caatinga* 29:384-392.
- Guedes P, Mateus EP, Almeida J, Ferreira AR, Couto N, Ribeiro AB 2016. Electrodialytic treatment of sewage sludge: Current intensity influence on phosphorus recovery and organic contaminants removal. *Chem Eng J* 306:1058-1066.
- He X, Zhang Y, Shen M, Zeng G, Zhou M, LI M 2016. Effect of vermicomposting on concentration and speciation of heavy metals in sewage sludge with additive materials. *Bioresour Technol* 218:867-873.
- Kefela T, Gachomo EW, Kotchoni SO 2015. *Paenibacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* and *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promote faster seed germination rate, growth and disease resistance under pathogenic pressure. *Journal of Plant Biochemistry & Physiology*. 3:45-50.
- Kratka PC, Correia CRMA 2005. Crescimento inicial de aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão) em diferentes substratos. *Rev. Árvore* 39:551-559.

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol, Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

Lavezo A, Braga L, Batistão A, Bonfante L 2015. Estresse osmótico na germinação de sementes de *Petiveria alliacea* L. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17:622-630.

Li J, Gan J, Hu Y 2016. Characteristics of Heavy Metal Species Transformation of Pb, Cu, Zn from Municipal Sewage Sludge by Thermal Drying. *Procedia Environ Sci* 31:961-969.

Liang Q, Lei M, Chen T, Yang J, Wan X, Yang S 2014. Application of sewage sludge and intermittent aeration strategy to the bioremediation of DDT-and HCH-contaminated soil. *J Environ Sci* 26:1673-1680.

Mazzeo DEC, Casado M, Piña B, Marin-Morales MA 2016. Detoxification of sewage sludge by natural attenuation and implications for its use as a fertilizer on agricultural soils. *Sci. Total Environ* 572:978-985.

Menegati SELT, Lima FF, Traesel, GK, Souza RIC, Santos AC, Santana ADF, Oesterreich SA 2016. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. *J Ethnopharmacol* 194:1096-1102.

Meng L, Li W, Zhang S, Wu C, LV L 2017. Feasibility of co-composting of sewage sludge, spent mushroom substrate and wheat straw. *Bioresour Technol* 226:39-45.

Naik MM, Dubey SK 2013. Lead resistant bacteria: lead resistance mechanisms, their applications in lead bioremediation and biomonitoring. *Ecotoxicol Environ Saf* 98:1-7.

Neri AV, Campos ED, Duarte TG, Meira Neto JAA, Silva AD, Valente GE 2005. Regeneração de espécies nativas lenhosas sob plantio de *Eucalyptus* em área de Cerrado na Floresta Nacional de Paraopeba, MG, Brasil. *Acta Bot Bras* 19:369-376.

Nobre RG, Gheyi HR, Correia KG, Soares FAL, Andrade LO 2010. Crescimento e floração do girassol sob estresse salino e adubação nitrogenada. *Rev Ciênc Agron.* 41:358-365.

Nobrega MAS, Pontes MS, Santiago EF 2017. Incorporação do lodo de esgoto na composição de substrato para produção de mudas nativas. *Acta Biomed. Bras.* 8:43-55.

Oleszczuk P 2008 Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol Environ Saf* 69: 496-505.

Oliveira, A. B. D. & Gomes-Filho, E. 2009. Germination and vigor of sorghum seeds under water and salt stress. *Rev bras Sementes* 31:48-56.

Pacheco MV, Matos VP, Ferreira RLC, Feliciano ALP, Pinto KMS 2006. Efeito de temperaturas e substratos na germinação de sementes de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). *Rev Árvore* 30:359-367.

Paraneiswaran A, Shukla S K, Prashanth K, Rao TS 2015. Microbial reduction of [Co (III)-EDTA]- by *Bacillus licheniformis* SPB-2 strain isolated from a solar salt pan. *J Hazard Mater* 283:582-590.

Pereira JO Azevedo JL, Petrini O 1993. Endophytic fungi of *Stylosanthes*: a first report. *Mycologia* 85:362-364.

Germinação De Sementes De Marmelo Do Cerrado Sob Inoculação De *Bacillus Licheniformis* E
Exposição A Lodo De Esgoto.

Jaqueline da Silva Santos, Montcharles da Silva Pontes, Yaovi Abel Kissi, Aline Lazzaretti Cassol,
Margareth Batistote, Etenaldo Felipe Santiago

Pinto JRDS, Dombroski JLD, Santos Junior JHD, Souza, GOD. Ramírez WA, Domene X, Alcañiz JM 2008. Phytotoxic effects of sewage sludge extracts on the germination of three plant species. *Ecotoxicology* 17:834-844.

Polonio JC, Polli AD, Bulla LMC, Rosseto P, Santos CM, Rhoden, SA, Conte H 2014. Potencial biorremediador de microrganismos: Levantamento de resíduos industriais e urbanos tratáveis no município de Maringá-PR. *BBR- Biochem Biotechnol Rep* 3:31-45.

Pontes MS, Santiago EF, Nóbrega MAS, Barbosa VM, Motta IS 2015. Germinação de Sementes de *Maclura tinctoria* (L.) D. Dom ex Steud. (Moraceae) Embebidas em Lodo de Esgoto. *Cad Agroecol* 9: 1-8.

Pontes MS, Santiago EF, Nóbrega MAS, Santos JS, Motta IS 2016. Effects of fertirrigation with compost tea of sewage sludge on growth and physiological quality in seedlings of *Sesbania virgata* (Cav.) Pers. *Cad Agroecol* 11:1-11.

Radhakrishnan R, Lee IJ 2016. Gibberellins producing *Bacillus methylotrophicus* KE2 supports plant growth and enhances nutritional metabolites and food values of lettuce. *Plant Physiol Biochem* 109:181-189.

Sansinenea E, Ortiz A 2011. Secondary metabolites of soil *Bacillus* spp. *Biotechnol Lett* 33:1523-1538.

Scheer MB, Carneiro C, Bressan AO, Santos KG. 2012. Compostos de lodo de esgoto para a produção de mudas de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. *Cerne* 18:613-621.

Shahzad R, Waqas M. Khan AL, Asaf S, Khan MA, Kang, SM, Lee IJ 2016. Seed-borne endophytic *Bacillus amyloliquefaciens* RWL-1 produces gibberellins and regulates endogenous phytohormones of *Oryza sativa*. *Plant Physiol Biochem* 106:236-243.

Siripornadulsil S, Siripornadulsil W 2013. Cadmium-tolerant bacteria reduce the uptake of cadmium in rice: potential for microbial bioremediation. *Ecotoxicol Environ Saf* 94:94-103.

Souza VC, Lorenzi H 2005. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II*. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 768 pp.

Teixeira RN, Toledo MZ, Ferreira G, Cavariani C, Jasper SP 2011. Germinação e vigor de sementes de crambe sob estresse hídrico. *Irriga*, 16:42-51.

Timnit K, Emma W G, Simeon O K 2015. *Paenibacillus Polymyxa*, *Bacillus licheniformis* and *Bradyrhizobium japonicum* IRAT FA3 promote faster seed germination rate, growth and disease resistance under pathogenic pressure. *J Plant Physiol Biochem* 3:145.

Villela FA, Marcos Filho J, Novembre ADLC 2003. Estado energético da água na semente de milho no processo de germinação. *Rev bras sementes* 25:95-100.

Zhen G, Lu X, Kato H, Zhao Y Li YY 2017. Overview of pretreatment strategies for enhancing sewage sludge disintegration and subsequent anaerobic digestion: Current advances, full-scale application and future perspectives. *Renew Sust Energ Ver* 69:559-577.

Seed Germination Of Marmelo Do Cerrado Under Inoculation Of *Bacillus Licheniformis* And Exposure To Sewage Sludge

ABSTRACT

Sewage sludge (LE) is the final waste resulting from sewage treatment, it can promote benefits to vegetables due to its nutritional load. On the other hand, the imbalance of its nutrients can cause phytotoxicity. Therefore, the use of bioremediation bacteria can be an alternative to mitigate the toxicity of this residue and enable its use as a substrate component for the production of seedlings of native species. In that study, germinative responses from seeds of *Alibertia edulis* (L.C. Rich) A.C. Rich. without inoculum (SI) and inoculated with *Bacillus licheniformis* (CI) and submitted to different doses of LE (0%, 25%, 50%, 75%, and 100%) were evaluated. In order to assess whether the toxic effects of LE could be mitigated by the inoculated bacteria. The results obtained show a higher germinative percentage (% G) for 0% LE SI. However, the G% observed in seeds IC suggests better germinative performance to all LE concentrations. Thus, it is concluded that the inoculation of *B. licheniformis* in *A. edulis* seeds reduced the effects of stress caused by LE and promoted an increase in the %G, indicating that the inoculated bacteria acted as a efficient bioremediation processes of toxic compounds present in LE, mitigating toxicity of this residue.

Keywords: Bacterial inoculation; Seed; *Alibertia edulis*; Sewage sludge; Bioremediation.

Submissão: 10/10/2018

Aceite: 09/06/2020