

Análise de sensibilidade e de efeitos toxicológicos da aplicação de lodo de esgoto em sementes

Lodo de esgoto é um resíduo gerado ao final do processo de tratamento de esgotos e que deve ter sua disposição final de modo adequado. Uma possibilidade de disposição desse resíduo é sua utilização na agricultura, aproveitando os nutrientes e matéria orgânica presentes. No entanto, apesar desse potencial nutritivo o lodo pode conter componentes que podem causar toxicidade ao solo. O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade de sementes bem como as diferentes doses de aplicação de lodo em solo cultivado. Os experimentos foram realizados em área coberta e o solo avaliado foi submetido a cinco tratamentos de aplicação de lodo seco, incluindo adubação mineral. Para os ensaios de avaliação de toxicidade foram usadas sementes de Alface (*Lactuca sativa*), Couve Flor (*Brassica oleracea*) e Rúcula (*Eruca sativa*). Os resultados obtidos são provenientes de três campanhas de amostragem realizada em triplicata, e indicam que doses maiores de lodo podem causar inibição do crescimento das raízes. Entre as espécies vegetais, o Alface apresentou maior sensibilidade aos tratamentos, quando comparado ao Couve Flor e a Rúcula, com menor crescimento de raiz. No tocante aos tratamentos, constatou-se menor eficiência de crescimento de raiz para dose superior ao recomendado na resolução Conama 375/2006 de adição de lodo ao solo; enquanto maior eficiência confirmou-se com a dose de nitrogênio recomendada pela referida resolução.

Palavras-chave: Fitotoxicidade; Reuso de Lodo na Agricultura; Toxicidade do Lodo.

Sensitivity analysis and toxicological effects of sewage sludge application in seeds

Sewage sludge is a waste generated at the end of the sewage treatment process and should be properly disposed. One possibility of disposal is use in agriculture, taking advantage of the nutrients and organic matter present. However, despite this nutritional potential the sludge may contain components that may cause toxicity to the soil. The aim of this study was to evaluate the sensitivity of seeds and different sludge application rates in cultivated soil. The experiments were carried out under cover at and soil was submitted to five treatments with dry sludge application, including mineral fertilizer. For tests of toxicity were used seed to - lettuce (*Lactuca sativa*), cauliflower (*Brassica oleracea*) and arugula (*Eruca sativa*). Were performed three sampling campaigns and results indicate that higher doses of sludge can cause growth inhibition of roots. Among the plant species, the lettuce is more sensitive to treatment, compared to cauliflower and arugula with less root growth. Regarding to treatment, there was less root growth efficiency for dose recommended in resolution CONAMA 375/2006 added to the soil sludge; while greater efficiency was obtained with the dose of nitrogen recommended by the resolution.

Keywords: Phytotoxicity; Reuse of Sludge in Agriculture; Sludge Toxicity.

Topic: **Engenharia Sanitária**

Reviewed anonymously in the process of blind peer.

Elaine Cristina Catapani Polleti
Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/0517805915866063>
elainec@ft.unicamp.br

Julianne de Pádua Pereira da Silva
Universidade Federal de São Carlos, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/8858112716536843>
juliannepadua@gmail.com

Matheus Fernandes Amorim
Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/4738172690520527>
matheus_dec@hotmail.com

Received: **22/10/2016**

Approved: **30/01/2017**

Jorge Luiz Paixão Filho
Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/2321161996869676>
jorgepaixao@gmail.com

Marta Siviero Guilherme Pires
Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
<http://lattes.cnpq.br/8266551989579822>
marta@ft.unicamp.br



DOI: 10.6008/SPC2179-6858.2017.002.0011

Referencing this:

POLLETI, E. C. C.; SILVA, J. P. P.; AMORM, M. F.; PAIXÃO FILHO, J. L.; PIRES, M. S. G.. Análise de sensibilidade e de efeitos toxicológicos da aplicação de lodo de esgoto em sementes. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v.8, n.2, p.130-137, 2017. DOI: <http://doi.org/10.6008/SPC2179-6858.2017.002.0011>

INTRODUÇÃO

O uso agrícola do lodo de esgoto é uma solução ecologicamente correta e economicamente viável para destinação final do resíduo que promove a reciclagem de nutrientes e pode diminuir a utilização de fertilizantes nitrogenados devido à grande quantidade desse nutriente no lodo (Andrade et al., 2010). Além disso, de acordo com Roig et al. (2012), o solo, ao receber o lodo, pode apresentar melhoria nas propriedades como porosidade, estabilidade de agregados e capacidade de retenção de água, além de ser interessante do ponto de vista econômico e ambiental.

O reaproveitamento do lodo de esgoto pode contribuir para uma gestão adequada do resíduo valorizando seu potencial nutritivo e evitando impactos ambientais advindos do seu descarte inadequado, como por exemplo, em rios. Dentre as formas mais usadas para sua destinação final, a reutilização agrícola é uma prática sustentável e de grande relevância ambiental.

Entretanto, embora a utilização agrícola do lodo apresente vantagens do ponto de vista ambiental e de manejo de resíduos, é preciso considerar os aspectos relacionados à segurança sanitária e ambiental, tais como a presença de certos componentes (metais e poluentes orgânicos, entre outros) que pode trazer riscos à essas práticas (Tabaczinski, 2010).

A fim de garantir que o lodo de esgoto possa ser usado com segurança na aplicação agrícola, avaliações de características dos resíduos e seus possíveis efeitos na planta e no solo se fazem necessárias. Uma forma de verificar a viabilidade da utilização do lodo é através da realização de testes de toxicidade, que avaliam a sensibilidade de crescimento de sementes quando expostas a uma determinada concentração de substâncias que podem causar toxicidade (Da Matta e Umbuzeiro, 2014).

Esses testes podem ser utilizados para avaliar o impacto da aplicação do lodo no solo e podem ser realizados com vários organismos tais como sementes, bactérias, organismos aquáticos, entre outros. Além disso, podem complementar os ensaios físico-químicos dos lodos antes de sua utilização em solos agrícolas, garantindo uma utilização segura ao homem e ao meio ambiente.

De acordo com Oleszczuk e Hollert (2011) os testes biológicos são sensíveis para avaliar o perigo relacionado à aplicação de lodo de esgoto, além de permitirem uma avaliação prática da aplicação desse tipo de resíduo na agricultura.

Entre os testes de toxicidade destaca-se o de germinação e alongamento de raiz por ser um teste simples, rápido, de baixo custo e que possibilita avaliação dos efeitos causados por diversos compostos (Da Matta e Umbuzeiro, 2014). Além disso, são testes confiáveis e apresentam vantagens de serem mais sensíveis ao estresse ambiental (Valerio et al, 2007; Visioli et al, 2014).

Esses testes têm sido utilizados em várias pesquisas para analisar os efeitos na germinação de sementes de milho, feijão, cevada, ervilha e soja quando expostas aos metais (Fuentes et al, 2006; Walter, et al, 2006; Pirselova, 2011). Muitos estudos utilizam a *Lactuca sativa* (Alface) como indicador de toxicidade pois está na lista de organismos descritos na padronização do teste feito nos Estados Unidos (Usepa, 1996).

A *Brassica oleracea* (Couve Flor) é outra semente que pode ser usada para estudos de fitotoxicidade e também se encontra na lista da Usepa.

Assim sendo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar em sementes os efeitos ecotoxicológicos da aplicação de lodo de esgoto no solo de cultivo, sob diferentes concentrações do resíduo, bem como constatar possíveis diferenças de sensibilidade entre as sementes utilizadas e em relação aos tratamentos propostos.

MATERIAL E MÉTODOS

Esse estudo avaliou a toxicidade do solo que recebeu diferentes concentrações de aplicação de lodo de esgoto e adubação mineral. O lodo utilizado no experimento é proveniente de uma lagoa facultativa primária de uma ETE do interior de SP. Após dezoito anos de operação, o lodo acumulado na lagoa foi retirado por meio de dragagem e acondicionamento em BAG geotêxtil com adição de polímero catiônico, desaguado por dois anos. Na Tabela 1 são apresentados os resultados de caracterização do lodo utilizado na pesquisa.

Tabela 1: Caracterização química do lodo utilizado.

Parâmetros	Resultado (base seca)
Umidade (% m/m)	70,9
pH (g/kg)	8,1
Carbono Orgânico (mg/kg)	131
Nitrogênio amoniacal (mg/kg)	955
Nitrogênio nitrato-nitrito (mg/kg)	39,5
Nitrogênio total (g/Kg)	14,2
Arsênio* (mg/Kg)	3,3
Bário* (mg/Kg)	260
Cádmio* (mg/Kg)	0,60
Chumbo* (mg/Kg)	37,5
Cobre* (mg/Kg)	84,4
Cromo* (mg/Kg)	26,4
Fósforo* (g/Kg)	3,7
Mercúrio* (mg/Kg)	<1,0
Molibdênio* (mg/Kg)	0,80
Níquel* (mg/Kg)	6,1
Selênio* (mg/Kg)	<1,0
Zinco* (mg/Kg)	316

Assim, de acordo com a Tabela 1, verifica-se que lodo avaliado apresenta potencial agronômico pela presença de nutrientes, N e P e os valores de metais encontrados estão dentro do limite permitido pelo Conama 375 (2006). Os tratamentos de aplicação do lodo utilizados nos experimentos no solo foram:

- T1 = 0 Mg de lodo seco ha⁻¹ (testemunha);
- T2 = 12 Mg de lodo seco ha⁻¹ ou 144 g planta⁻¹ (50% da dose calculada de lodo);
- T3 = 24 Mg de lodo seco ha⁻¹ ou 288 g planta⁻¹ (100% da dose calculada de lodo);
- T4 = 36 Mg de lodo seco ha⁻¹ ou 432 g planta⁻¹ (150% da dose calculada de lodo);
- T5 = Adubação mineral recomendada 100 kg N ha⁻¹.

As taxas de aplicação do lodo em área agrícola utilizadas seguiram em conformidade com a resolução Conama 375 (2006), com fator de mineralização de lodo de 20% e aplicação subsuperficial. Todos os tratamentos receberam complementação de fósforo (280 kg ha⁻¹) e potássio (300 kg ha⁻¹) visto que o lodo de esgoto apresenta baixa quantidade desses elementos. No tratamento com adubação convencional (T5) foi utilizado sulfato de amônio, além disso, ressalta-se que o T3 apresenta a dose recomendada de nitrogênio segundo a Conama 375/06 para aplicação subsuperficial.

A metodologia utilizada no teste de toxicidade nas sementes foi a descrita na Norma USEPA *Ecological Effects Teste Guidelines OPPTS 850.4200 – Seed Germination / Root Elongation Toxicity Teste* (Usepa, 1996), para avaliação do efeito fitotóxico de soluções aquosas no processo de desenvolvimento das raízes das plântulas nos primeiros cinco dias de alongamento.

O efeito toxicológico da aplicação do lodo no solo foi avaliado a partir de 3 campanhas de amostragem e as sementes utilizadas foram: (EV): EV1 – Alface (*Lactuca sativa*), EV2 – Couve-Flor (*Brassica oleracea*) e EV3 – Rúcula (*Eruca sativa*).

Para a realização dos testes com sementes, as amostras da mistura solo/lodo coletadas foram solubilizadas. As amostras coletadas foram submetidas ao processo de secagem em estufa a 60°C, até peso constante (5 dias), antes de serem trituradas em moinho tipo Wiley. Na sequência, 100 g de cada amostra foi transferida para um frasco e adicionado 400 mL de água destilada, resultando em uma proporção 1:4. Os frascos foram colocados em um agitador de ‘tombo’, com velocidade de aproximadamente 1440 rpm por 24 horas.

A separação das fases se deu por aproximadamente 1 hora, após os frascos permanecerem em repouso em temperatura ambiente. Os extratos aquosos das amostras para a realização dos testes de fitotoxicidade foram obtidos retirando-se uma alíquota para centrifugação em um outro recipiente, a uma velocidade de 3500 rpm, durante 10 minutos. Os testes foram realizados na concentração de 100%.

A montagem dos testes foi feita em placa de Petri onde foi colocado, inicialmente, papel de filtro. As placas foram identificadas com a diluição, amostra correspondente e datas de início e término do experimento. O papel de filtro foi saturado com 4 mL da diluição da amostra a ser testada. Com auxílio de pinça foram colocadas em cada placa de Petri 20 sementes. O experimento foi realizado em triplicata para cada tratamento (T1, T2, T3, T4 e T5). Para o controle foi utilizado água destilada.

A placa de Petri foi vedada para não ocorrer perda de umidade e, em seguida coberta com papel escuro. As placas foram incubadas por 120 h a temperatura de 22±1°C. Terminado o tempo de exposição, foi medido o comprimento das raízes de cada uma das plântulas, correspondente a cada concentração (Figura 1).



Figura 1. Placas com crescimentos das raízes – leitura final do experimento.

Os resultados foram avaliados de acordo com Tam e Tiquia (1994), sendo determinado o alongamento relativo das raízes. Para análise do crescimento do sistema radicular foi utilizando a equação:

$$IC = \frac{CA}{CG} \times 100$$

Onde:

IC representa o índice de crescimento das raízes;

CA indica o crescimento das raízes da amostra em centímetros;

CG representa o crescimento das raízes no controle em centímetros.

Para a análise dos resultados, utilizando-se o software estatístico R, realizou-se análise de variância para inferência sobre os tratamentos e aplicou-se o teste F de modo a se verificar a existência de diferença entre as médias das diferentes taxas de aplicação. O nível de significância considerado foi $\alpha = 0.05$. Para a comparação de contrastes entre duas médias realizou-se o teste de Tukey e, após a comparação entre as médias, aplicou-se o teste de Dunnett comparando os tratamentos, dois a dois, em relação à testemunha. Desta forma pôde-se fazer a discussão entre possíveis diferenças significativas, com 95% de confiabilidade, da adição de diferentes proporções de resíduos ao solo, comparado à testemunha.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As espécies vegetais – EV1, EV2 e EV3 foram utilizadas para avaliar a toxicidade de um solo submetido a cinco tratamentos diferentes, incluindo a testemunha (T1 - Testemunha, T2, T3, T4 e T5) com o intuito de se avaliar os efeitos de toxicidade nessas sementes, verificando a germinação e o crescimento das raízes perante diferentes proporções de adição de resíduos ao substrato e a diferença de sensibilidade nas sementes avaliadas. Na Tabela 2 e Figura 2 estão apresentados os resultados obtidos para as 3 sementes, nos diferentes tratamentos utilizados.

Tabela 2. Médias de crescimento das raízes das sementes obtidas nos diferentes tratamentos.

Espécie Vegetal	Tratamentos	Média \pm Erro Padrão
EV1	T1	2.18 ^{ab} \pm 0.13
	T2	2.52 ^a \pm 0.14
	T3	1.91 ^{bc} \pm 0.15
	T4	1.55 ^c \pm 0.13
	T5	1.83 ^{bc} \pm 0.14
EV2	T1	2.92 ^{bc} \pm 0.11
	T2	3.29 ^{ab} \pm 0.08
	T3	3.37 ^a \pm 0.10
	T4	1.88 ^d \pm 0.09
	T5	2.68 ^c \pm 0.13
EV3	T1	2.70 ^{bc} \pm 0.12
	T2	2.95 ^{ab} \pm 0.12
	T3	3.29 ^a \pm 0.13
	T4	2.40 ^c \pm 0.11
	T5	2.62 ^{bc} \pm 0.13

De acordo com a Tabela 2, para EV1, ($p < 0.05$), verifica-se que a média do crescimento da raiz é significativamente diferente para os diferentes tipos de tratamentos a que foram submetidas as sementes. Através da análise de Tukey, para comparação de contrastes entre duas médias de tratamentos, verificou-se que T1 diferiu significativamente de T3, T4 e T5; bem como T2 também diferiu significativamente de T3, T4 e T5, conforme indicado na tabela pelas letras a, b, e c. A testemunha (T1) não diferiu estatisticamente de T2 cuja concentração é 50% da dose recomendada pelo Conama 375/06.

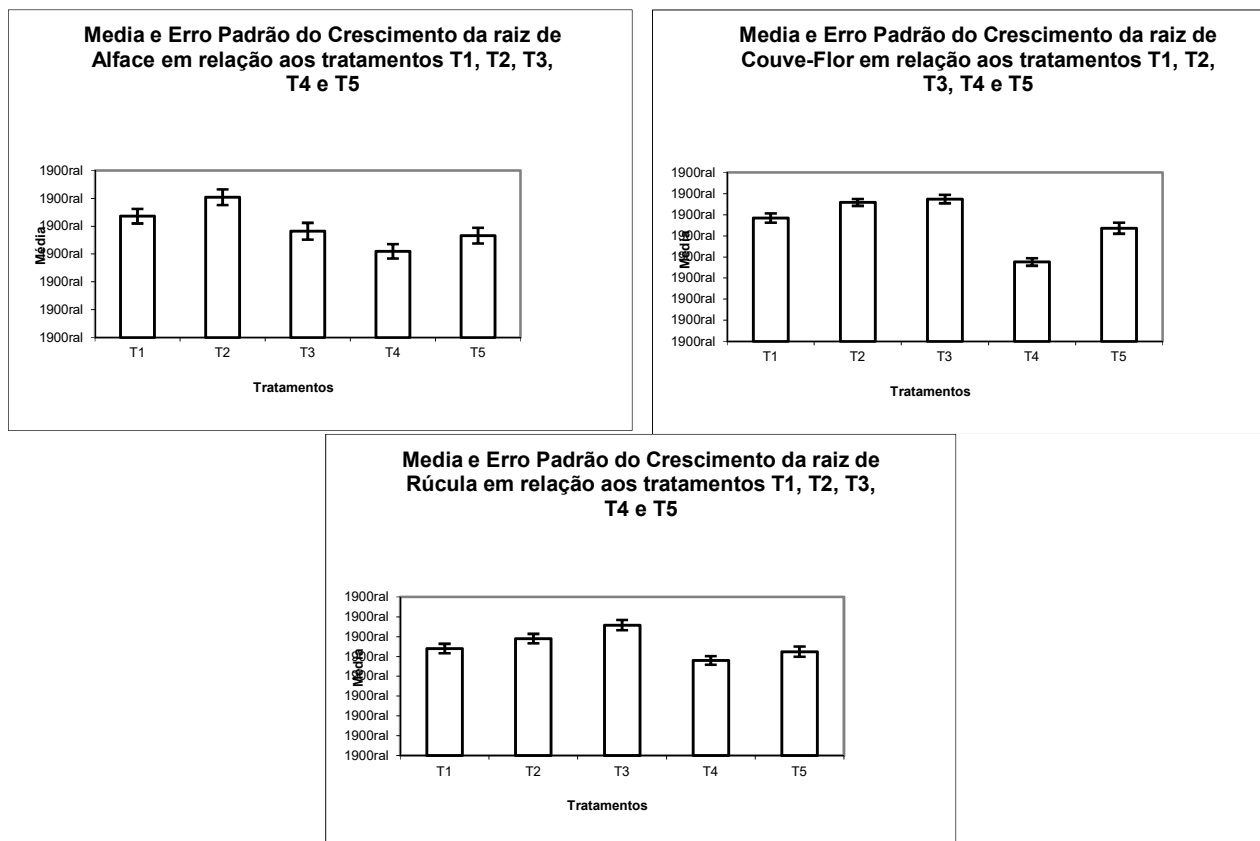


Figura 2. Médias de crescimento das raízes das sementes obtidas nos diferentes tratamentos.

De acordo com o teste de Dunnett, com limite de 95% confiabilidade, verificou-se para EV1 que apenas o tratamento T4 teve diferença significativa da testemunha. Além disso T2 mostrou-se mais eficiente no crescimento da raiz desta espécie vegetal, dose do resíduo 50 % a menos que o recomendado (T3), Conama 375/06. T4 apresentou-se menos eficiente nas análises e, ressalta-se que T2 não diferiu estatisticamente da testemunha.

Verifica-se, desta forma, que a utilização de uma baixa dose de lodo de esgoto pode estimular o crescimento de raízes como observado no T2 para as sementes de Alface, tal como observado por Ramírez et al., (2008).

Ainda para a semente de Alface, comparando-se a aplicação de lodo de esgoto na dose recomendada pela Conama 375/06 (T3) e a dose usual com fertilizantes convencionais (T5), observa-se (conforme Tabela 2) que não há diferença estatística. O aumento da dose de lodo aplicada mostrou-se menos eficiente no crescimento de raízes do Alface.

Kinney et al (2012) utilizaram testes com sementes de Alface para avaliar o efeito da aplicação e estabilização de lodo no solo e encontraram que altas concentrações de lodo tiveram um impacto na germinação dessas sementes e esse efeito negativo foi sendo reduzido à medida que o lodo estabilizava no solo. Os autores concluíram que a estabilização do lodo pode diminuir os compostos tóxicos presentes ou sua biodisponibilidade para as sementes testadas.

A toxicidade do solo que recebeu aplicação de lodo de esgoto também foi avaliada por Zapusek e Lestan (2011) após 1 ano. Os autores realizaram testes de toxicidade com semente de Alface e constataram que doses maiores de lodo inibiram o crescimento das raízes dessas sementes, quando comparados com solo

que recebeu menor aplicação de lodo. Os resultados obtidos por esses pesquisadores corroboram com os encontrados nessa pesquisa para a semente de Alface.

Para EV2, Tabela 2, constata-se diferença significativa para os diferentes tipos de tratamentos, pois T1 diferiu significativamente de T3 e de T4; T2 diferiu de T4 e T5; T3 diferiu de T1, T4 e T5. Comparando-se dois a dois, os tratamentos em relação à testemunha, constata-se diferença significativa entre T1 e T3 e entre T1 e T4. De modo geral o tratamento T4 apresentou-se menos eficiente no crescimento da raiz desta espécie vegetal enquanto T3 potencializou o crescimento.

Para a EV3, Tabela 2, verifica-se que T1 diferiu significativamente de T3; T2 diferiu de T4 e T3 diferiu significativamente de T1, T4 e T5. Em relação à testemunha, constatou-se diferença significativa apenas em relação T3. Verificou-se que T3 também potencializou o crescimento da raiz da espécie vegetal, enquanto T4 apresentou menor eficiência.

De modo geral, pode-se observar que todas as sementes apresentaram sensibilidade aos testes realizados, o que indica o potencial de utilização das sementes para a realização dos testes de toxicidade. Entretanto, a semente que se mostrou mais sensível foi a de Alface sendo essa espécie a mais afetada negativamente nos tratamentos utilizados. Também é possível observar que as sementes apresentaram diferenças significativas em relação aos diferentes tratamentos utilizados.

Menor eficiência de crescimento de raiz foi observada quando foi aplicada uma dose superior ao recomendado. Neste caso, a aplicação do lodo de lagoa facultativa na agricultura na dose recomendada pelo Conama 375/06 não apresentou efeito tóxico.

Os melhores resultados no crescimento das raízes foi o tratamento T3 – dose de nitrogênio recomendada pela Resolução Conama 375/2006 para as sementes de Couve Flor e Rúcula, assim como observado por outros autores no tocante à Rúcula, que apresenta uma resistência maior que outras sementes em testes de toxicidade.

O tratamento T4, cuja dose de aplicação de lodo era 150% da dose calculada de lodo, acima do que a Resolução Conama 375 (Brasil, 2006) recomenda, apresentou menor crescimento das raízes em todas as espécies vegetais utilizadas, o que indica que doses maiores de lodo podem causar inibição do crescimento das raízes, não sendo recomendado para o cultivo. Esses resultados corroboram com alguns encontrados na literatura, tais como em Oleszczuk e Hollert (2011) que enfatizam que a aplicação de lodo afeta o crescimento das raízes à medida que a concentração aumenta.

CONCLUSÃO

As sementes testadas apresentaram sensibilidade aos tratamentos avaliados e a semente que apresentou maior sensibilidade foi a de Alface. Sobre as aplicações de lodo no solo, a que continha dose de 50 % de lodo de esgoto acima do recomendado pela Conama nº 375 de 2006 apresentou uma inibição no crescimento das raízes das três espécies vegetais. O teste de toxicidade com sementes é uma ferramenta fácil de ser usada e permite uma avaliação preliminar da possibilidade do reuso agrícola do lodo de esgoto,

tendo em vista a necessidade de disposição adequada do resíduo e o potencial nutritivo do componente gerado na etapa final do processo de tratamento de esgoto.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C. A.; BOEIRA, R. C.; PIRES, A. M. M.. Nitrogênio presente em lodo de esgoto e a Resolução nº 375 do CONAMA. In: COSCINE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M.. **Uso agrícola de lodo de esgoto: Avaliação após a Resolução nº375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Resolução 375/06**: Critérios e procedimentos, para o uso agrícola de lodos de esgoto gerados em estações de tratamento de esgoto sanitário e seus produtos derivados. Brasília: CONAMA, 2006.
- DA MATTA, M. E.M.; UMBUZEIRO, G. A.. Sewage sludge hazard index based on bioassays: strategic tool for the decision-making process on sludge agricultural use. **Revinter Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v.7, n.2, p.76- 82, 2014.
- FUENTES, A.; LLORÉNS, M.; SÁEZ, J.; AGUILAR, M. A.; PÉREZ-MARÍN, A. B.; ORTUÑO, J. F.; MESEGUER, V. F.. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. **Environmental Pollution**, v.143, p.355-360, 2006.
- KINNEY, C. A.; CAMPBELL, B. R.; THOMPSON, R.; FURLONG, E. T.; KOLPIN, D. W.; BURKHARDT, M. R.; ZAUGG, S. D.; WERNER, S. L.; HAY, A. G.. Earthworm bioassays and seedling emergence for monitoring toxicity, aging and bioaccumulation of anthropogenic waste indicator compounds in biosolids-amended soil. **Science of the Total Environment**, v.433, p.507-515, 2012.
- OLESZCZUK, P.; HOLLERT, H.. Comparasion of sewage sludge toxicity to plants and invertebrates in three different soils. **Chemosphere**, v.83, p.502-509, 2011.
- PIRSELOVA, B.. Monitoring the sensitivity of selected crops to lead, cadmium and arsenic. **Journal of Stress Physiology & Biochemistry**, v.7, p.31-38, 2011.
- RAMÍREZ, W. A.; DOMENE, X.; ORTIZ, O.; ALCAÑIZ, J. M.. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. **Bioresource Technology**, v.99, p.7168-7175, 2008.
- ROIG, N.; SIERRA, J.; NADAL, M.; MARTÍ, E.; NAVALÓN-MADRIGAL, P.; SCHUHMACHER, M.; DOMINGO, J. L.. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. **Science of the Total Environment**, v.425, p.99-109, 2012.
- TABACZENSKI, R. R.. Visão geral da Resolução CONAMA 375/06. In: COSCINE, A. R.; NOGUEIRA, T. A. R.; PIRES, A. M. M.. **Uso agrícola de lodo de esgoto: Avaliação após a Resolução nº375 do CONAMA**. Botucatu: FEPAF, 2010.
- TAM, N. F. Y.; TIQUIA, S. M.. Assessing toxicity of 'spent sawdust pig-litter' using seed germination technique. **Resource Conservation Recycling**, v.11, p.261-274, 1994.
- VALERIO, M. E.; GARCIA, J. F.; PEINADO, F. M.. Determination oh phytotoxicity of soluble elements in soils, based on boassy with lettuce (*Lactuca sativa* L). **Science of the Total Environment**, p.378, p.63-66, 2007.
- VISIOLI, G.; CONTI, F. D.; GARDI, C.; MENTA, C.. Germination na root elongation bioassays in six difftent plant species for testing Ni contamination in soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v.92, p.490-496, 2014.
- USEPA. **Ecological Effects Test Guidelines (OPPTS 850,4200)**: Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. 1996.
- WALTER, I. F.; MARTÍNEZ, V. C.. Heavy metal speciation and phytotoxic effects of three representative sewage sludges for agricultural uses. **Environmental Pollution**, v.139, n.3, p.507-514, 2006.
- ZAPUSEK, U.; LESTAN, D.. Functioning and toxicity of artificial soil mixtures with metal-bearing sewage sludge. **Ecological Engineering**, v.37, p.1977-1982, 2011.