



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS - CAMPUS DE CURITIBANOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOSISTEMAS AGRÍCOLAS E NATURAIS

Leticia de Andrade Dias

Tecnologia para Descarte e Tratamento de Resíduos de Agrotóxicos: Avaliação de
Materiais Alternativos no Substrato de *Biobeds*

Curitibanos, SC
2020

Leticia de Andrade Dias

**Tecnologia para Descarte e Tratamento de Resíduos de Agrotóxicos: Avaliação de
Materiais Alternativos no Substrato de *Biobeds***

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas e Naturais (PPGEAN), da Universidade Federal de Santa Catarina – Campus de Curitibanos, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Adriana Terumi Itako, Dr.

Coorientadora: Profa. Júlia Carina Niemeyer, PhD.

Curitibanos, SC

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dias, Leticia de Andrade

Tecnologia para descarte e tratamento de resíduos de
agrotóxicos: : Avaliação de materiais alternativos no
substrato de biobeds / Leticia de Andrade Dias ;
orientadora, Adriana Terumi Itako, coorientadora, Júlia
Carina Niemeyer, 2020.

115 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Campus Curitibanos, Programa de Pós-Graduação em
Ecossistemas Agrícolas e Naturais, Curitibanos, 2020.

Inclui referências.

1. Ecossistemas Agrícolas e Naturais. 2. Tratamento de
Agrotóxicos. 3. Biobeds. 4. Biodegradação. 5. Microbiologia
e Ecotoxicologia. I. Itako, Adriana Terumi . II. Niemeyer,
Júlia Carina . III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ecossistemas Agrícolas
e Naturais. IV. Título.

Leticia de Andrade Dias

Tecnologia para Descarte e Tratamento de Resíduos de Agrotóxicos: Avaliação de
Materiais Alternativos no Substrato de *Biobeds*

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Osmar Klauberg Filho, Dr.

Universidade do Estado de Santa Catarina - Centro de Ciências Agroveterinárias

Profa. Leosane Cristina Bosco, Dra.

Universidade Federal de Santa Catarina - Centro de Ciências Rurais, Campus de Curitibanos

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Prof. Alexandre Siminski, Dr.

Coordenador do Programa

Profa. Adriana Terumi Itako, Dra.

Orientadora

Curitibanos, 19 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho à minha querida família.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por ter me abençoado com saúde, e com capacidade física e mental para desenvolver este projeto de mestrado, e levar este período como um grande aprendizado pessoal e profissional.

E então levo meus agradecimentos aos meus pais, Jaques e Marlise, meu irmão João Vítor, e ao meu namorado Paulo Phellipp, por todo o apoio que me deram durante esta jornada. Assim como às amigas da faculdade. A companhia de vocês, mesmo que à distância, foi primordial para que eu aproveitasse o mestrado da melhor forma possível, colocando todas as minhas energias na pós-graduação, mas sabendo que eu poderia ter uma válvula de escape com vocês, todas as vezes que fossem necessárias.

Às minhas queridas orientadoras, Professoras Adriana Itako e Júlia Niemeyer. Me senti acolhida por vocês desde o início. Sua didática e a experiência em suas áreas de conhecimento, que são diferentes, mas se completaram de forma perfeita, me incentivaram a seguir em frente quando as coisas deram certo, mas também quando elas deram errado, pois eu sabia que poderia contar com vocês me ensinando. Agradeço ainda ao professor João Tolentino, pela ajuda na definição dos delineamentos experimentais e por ter me guiado durante as análises estatísticas. Ao Luciano Gebler, da Embrapa, que me apresentou o mundo da pesquisa em *Biobeds*, e foi fundamental para que este projeto de mestrado fosse executado até o final. Aos pesquisadores do CEPARC de Santa Maria, pelas análises químicas do projeto. A todo o corpo docente do PPGEAN, que é responsável pela pessoa que sou hoje, pensando de forma totalmente diferente do que eu pensava há dois anos. Aos servidores da UFSC, seus serviços são primordiais para que os estudantes consigam realizar as atividades diárias.

Agradeço muito aos colegas do mestrado, pela companhia, amizade, risadas e apoio diários. Aos colegas de laboratório, obrigada pela amizade e pela ajuda que me ofereceram sempre que precisei. Não poderia citar nomes pois corro o risco de esquecer alguém. Convivi e fiz amizades com pessoas muito queridas, que levarei em meu coração para a vida, e torço para que seus caminhos sejam de muita prosperidade.

E finalmente, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de pesquisa que me permitiu ter a dedicação exclusiva ao mestrado.

RESUMO

O uso de agrotóxicos gera a contaminação ambiental dos tipos difusa e pontual, sendo esta última causada, principalmente, pelo descarte inadequado de efluentes de agrotóxicos. O *biobed* é um reator biológico desenvolvido para receber e degradar estes efluentes e, assim, evitar o contato deste resíduo com o meio ambiente. Sua eficiência baseia-se na atividade de uma microbiota nativa, adaptada ao contato com agrotóxicos, em paralelo com processos de sorção física. O propósito dos estudos envolvendo o *biobed* é que ele seja executável pelo agricultor, na propriedade agrícola, e com materiais de fácil acesso. O *biobed* é composto por uma escavação no solo da propriedade, que é impermeabilizada, preenchida por uma biomistura, e coberta por grama. A biomistura tradicional é composta por solo agrícola, palha e turfa. Este trabalho teve como objetivo avaliar duas composições da biomistura, em paralelo à biomistura padrão, quanto à sua eficiência em gerar uma comunidade fúngica tolerante, e reduzir os níveis ecotoxicológicos e químicos de um inseticida organofosforado (fosmete). Desta forma, foram montados *biobeds* laboratoriais alternativos com acícula de pinus (BA) ou com húmus de minhoca (BH) em substituição à turfa. As biomisturas foram avaliadas paralelamente ao *biobed* padrão (BP). As avaliações da comunidade fúngica envolveram o monitoramento da maturação biológica e as respostas destas comunidades após a aplicação do inseticida, através da contagem de colônias, no formato de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); assim como a avaliação do crescimento micelial de isolados dos *biobeds* em um meio de cultura contaminado por fosmete. A dose de fosmete aplicada nos *biobeds* laboratoriais foi de 35 mg kg⁻¹. Para os ensaios ecotoxicológicos crônicos de reprodução, com amostras dos mesmos *biobeds* laboratoriais, foram utilizados colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), para amostras coletadas aos 0, 30, 60 e 90 dias após a aplicação do agrotóxico; e o residual químico de fosmete foi determinado através da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (UPLC-MS/MS). A biomistura BA apresentou um maior número de colônias de fungos após 90 dias de maturação biológica, e o impacto da aplicação do agrotóxico foi maior sobre seu número de colônias; entre os isolados fúngicos que tiveram seu crescimento micelial avaliado, 11% responderam positivamente ao fosmete. A época ideal para iniciar a contaminação dos *biobeds* laboratoriais, representada pelo momento em que a comunidade de fungos esteve mais ativa, foi a partir dos 30 dias de maturação biológica. Nos ensaios de ecotoxicidade, os colêmbolos foram mais sensíveis do que os enquitreídeos às biomisturas contaminadas pelo agrotóxico. Na biomistura BP ainda foi detectada ecotoxicidade para colêmbolos, mesmo após 90 dias de degradação do agrotóxico; e os ensaios com enquitreídeos já não indicaram ecotoxicidade aos 30 dias para as três biomisturas. As análises químicas indicaram que em BA o fosmete foi degradado mais rapidamente, com a meia-vida de 12,20 dias, porém BH reduziu a concentração aplicada do fosmete em 99%, enquanto BA reduziu em 96% e BP em 91%. Os resultados indicaram que as três biomisturas foram eficientes em promover a maturação de biomassa fúngica e o crescimento de fungos tolerantes ao agrotóxico, e em reduzir os níveis ecotoxicológicos e químicos. BA e BH foram considerados substituintes promissores da biomistura tradicional de *biobeds*, para a região sul do Brasil.

Palavras-Chave: Agrotóxicos; Comunidades Fúngicas; Ecotoxicologia; Tratamento *on farm*.

ABSTRACT

*The use of pesticides causes diffuse and punctual environmental contamination. Punctual contamination is caused by inadequate discharge of pesticide effluents. Biobeds are indicated for receiving and degrading these effluents, avoiding them to reach the environment. Its efficiency is based on a microbiota that is native and adapted to pesticides, at the same time that sorption processes happen. Studies involving biobeds aim to make it executable by the farmer, with easy access materials. Biobeds are composed by a waterproofed excavation on the soil, that is filled with a biomixture and covered by grass. Standard biomixture is composed by agricultural soil, straw and peat. The objective of this work is to evaluate new materials for the biomixture, being pine leaves (PB) or vermicompost (VB), replacing peat, compared to the standard biomixture (SB). Their efficiency was evaluated through fungal communities' evaluation, and reduction of the initial concentration and ecotoxicity caused by an organophosphate insecticide (phosmet). Fungal communities' evaluations involved monitoring the maturation process and the response of these communities to the pesticide application, through Colony Forming Units counting (CFU); and micelial grown of fungi isolated from the biomixtures, over a culture medium contaminated by phosmet (100 mg L⁻¹). The dose of the pesticide applied on the laboratory biobeds was 35 mg kg⁻¹. Ecotoxicological chronic, reproduction assays were applied with collembolans (*Folsomia candida*) and enchytraeid (*Enchytraeus crypticus*), for evaluations at 0, 30, 60 and 90 days after pesticide application. Chemical residues of phosmet were established through liquid chromatography coupled to a mass spectrometer (UPLC-MS/MS). The biomix PB presented higher CFU numbers after a 90-day maturation. Among the fungal isolates, 11% showed a positive response through micelial grown over phosmet. The ideal time to contaminate the biobeds, where there was higher fungal activity, was identified as the period after 30 days of biological maturation. On ecotoxicity evaluations, collembolans showed to be more sensitive than enchytraeid. The biomix SB showed ecotoxicity for collembolans even after 90 days of the pesticide degradation. Enchytraeid reproduction showed no ecotoxicity after 30 days of degradation, for all tree biomixtures. Chemical analysis indicated that PB rapidly degraded the pesticide, with a half-life of 12.20 days. However, VB reduced its concentration in 99%, while PB reduced 96% and SB reduced 91%. Results indicated that all tree biomixtures were efficient in promoting tolerant fungal communities grown, and reducing both ecotoxicity and initial concentration of the pesticide. PB and VB were considered as promising substitutes for the standard biobed, in south Brazil.*

Keywords: *Pesticides; Fungal Communities; Ecotoxicity, On farm treatment.*

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 – DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BIOBEDS*: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS FUTURAS NA AMÉRICA LATINA

Figura 1 – *Biobeds* instalados no Brasil.26

CAPÍTULO 2 – COMUNIDADE FÚNGICA EM *BIOBEDS*: MATURAÇÃO BIOLÓGICA DAS BIOMISTURAS, ISOLAMENTO DE FUNGOS E EXPOSIÇÃO A UM INSETICIDA ORGANOFOSFORADO

Figura 1 – Ilustração do procedimento aplicado para isolar e armazenar colônias de fungos a partir do monitoramento quinzenal dos *biobeds* laboratoriais56

Figura 2 – Imagens representativas das coletas do início (tempo 0), meio (tempo 3) e final (tempo 6) dos 90 dias de maturação biológica dos *biobeds* laboratoriais. As placas de Petri (diâmetro = 90 mm) com meio BDA possuem fungos que se desenvolveram por 7 dias a partir do inóculo dos três *biobeds* laboratoriais avaliados, utilizadas para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC)63

Figura 3 – Unidades Formadoras de Colônias por grama de substrato (UFC x 10⁴ g⁻¹) durante a maturação biológica dos *biobeds* laboratoriais BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de avaliações quinzenais64

Figura 4 – Exemplares de colônias de fungos com 10 dias de idade isoladas dos *biobeds* laboratoriais, crescendo sobre meio de cultura BDA, em placas de Petri (diâmetro = 90 mm). Os fungos filamentosos apresentados na imagem foram obtidos a partir dos *biobeds* Padrão e Húmus, e a levedura foi coletada no *Biobed* Acícula66

Figura 5 – P-valor obtido a partir do teste não paramétrico de Mann-Whitney na comparação entre placas Testemunhas vs. Contaminadas, para cada isolado de fungo66

CAPÍTULO 3 – ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ANÁLISES QUÍMICAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE FOSMETE EM SISTEMAS DE DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE AGRÓXICOS – *BIOBEDS*

Figura 1 – Esquema experimental da amostragem destrutiva dos *biobeds* laboratoriais, ao longo dos 90 dias de monitoramento ecotoxicológico e químico da degradação do fosmete82

Figura 2 – Imagens retratando os ensaios com colêmbolos (*F. candida*) e os organismos utilizados85

Figura 3 – Imagens retratando os ensaios com enquitreídeos (*E. crypticus*) e os organismos utilizados86

Figura 4 – Curvas de degradação do fosmete, em valores percentuais, ao longo de 90 dias de avaliações mensais, para os três *biobeds* avaliados no projeto (BP, BA e BH). A época de coleta zero ocorreu logo após a aplicação do produto87

Figura 5 – Reprodução de *F. candida*, nos substratos BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de degradação do fosmete89

Figura 6 – Reprodução de *E. crypticus*, nos substratos BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de degradação do fosmete91

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1 – DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BIOBEDS*: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS FUTURAS NA AMÉRICA LATINA

Tabela 1 – Resumo da composição de substratos alternativos para a biomistura, com diferentes proporções de materiais, avaliados com resultados promissores na América Latina..... 31

Tabela 2 – Organismos-teste, Endpoints, e Agrotóxicos avaliados em ensaios de ecotoxicidade de *biobeds* na América-Latina..... 388

CAPÍTULO 2 – COMUNIDADE FÚNGICA EM *BIOBEDS*: MATURAÇÃO BIOLÓGICA DAS BIOMISTURAS, ISOLAMENTO DE FUNGOS E EXPOSIÇÃO A UM INSETICIDA ORGANOFOSFORADO

Tabela 1 – Propriedades químicas do solo agrícola utilizado no projeto54

Tabela 2 – Propriedades químicas dos três *biobeds* laboratoriais avaliados (*Biobed* Padrão, *Biobed* Húmus e *Biobed* Acícula), após 90 dias de maturação biológica62

Tabela 3 – Unidades Formadoras de Colônias por grama de substrato, para cada *biobed* laboratorial, após zero dias e 90 dias da contaminação por fosmete65

CAPÍTULO 3 – ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ANÁLISES QUÍMICAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE FOSMETE EM SISTEMAS DE DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE AGRÓXICOS – *BIOBEDS*

Tabela 1 – Juvenis de *F. candida* (média \pm desvio-padrão) nos diferentes substratos, contaminados com fosmete e testemunhas, após 0, 30, 60 e 90 dias da contaminação88

Tabela 2 – Juvenis de *E. crypticus* (média \pm desvio padrão) nos diferentes substratos, contaminados com fosmete e testemunhas, após 0, 30, 60 e 90 dias da contaminação90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AACCM	Área Abaixo da Curva do Crescimento Micelial
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AGREQUIMA	Associação das Indústrias de Agrotóxicos da Guatemala
BDA	Batata-Dextrose Ágar
BPA	Boas Práticas Agrícolas
CE ₅₀	Concentração de efeito para 50% da população
CEPARC	Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes
CL ₅₀	Concentração letal para 50% dos indivíduos
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
CRA	Capacidade de retenção de água
DBO	Estufa incubadora do tipo Demanda Bioquímica de Oxigênio
DHA	Atividade desidrogenase
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos indivíduos
DT ₅₀	Tempo de meia dia (do inglês, “Disappearance Time”)
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FDA	Método de hidrólise do diacetato de fluoresceína
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada
IA	Ingrediente ativo
ISO	Organização Internacional de Normalização
IVCM	Índice de Velocidade de Crescimento Micelial
MMS	Meio Mineral Sólido
MO	Matéria Orgânica
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PIC	Porcentagem de Inibição do Crescimento
POP	Poluente Orgânico Persistente
SAT	Solo Artificial Tropical
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFC	Unidades Formadoras de Folônias
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
UPLC-MS/MS	Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (do inglês, Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1	HIPÓTESES	16
1.1.1	Hipótese geral	16
1.1.2	Hipóteses específicas	16
1.2	OBJETIVOS	17
1.2.1	Objetivo geral	17
1.2.2	Objetivos específicos	17
1.3	ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO.....	17
	REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 1	21	
DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM <i>BIOBEDS</i>: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS FUTURAS NA AMÉRICA LATINA	21	
	RESUMO	22
1	INTRODUÇÃO	23
2	CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELO DESCARTE DE AGROTÓXICOS	24
3	SISTEMA <i>BIOBED</i>	25
3.1	PANORAMA GERAL DA TEMÁTICA ESTUDADA	26
3.2	HISTÓRICO NA AMÉRICA LATINA.....	27
4	LINHAS DE PESQUISAS EM <i>BIOBEDS</i> NOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS	29
4.1	FONTES ALTERNATIVAS DE MATERIAIS.....	30
4.2	INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS.....	32
4.3	INFLUÊNCIA DA RIZOSFERA, BIOAUMENTAÇÃO E POPULAÇÕES MICROBIANAS	33
4.4	FORMAS DE AVALIAR A EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO.....	35
4.4.1	Análise química e biológica	35

4.4.2	Ensaio ecotoxicológicos.....	36
5	DESAFIOS PARA A IMPLANTAÇÃO DE <i>BIOBEDS</i>	38
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	40
	REFERÊNCIAS.....	42
	CAPÍTULO 2	49
	COMUNIDADE FÚNGICA EM <i>BIOBEDS</i>: MATURAÇÃO BIOLÓGICA DAS BIOMISTURAS, ISOLAMENTO DE FUNGOS E EXPOSIÇÃO A UM INSETICIDA ORGANOFOFORADO	49
	RESUMO.....	50
1	INTRODUÇÃO.....	51
2	MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1	MATURAÇÃO BIOLÓGICA DOS <i>BIOBEDS</i> LABORATORIAIS.....	55
2.1.1	Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	55
2.2	CONTAMINAÇÃO DOS <i>BIOBEDS</i> LABORATORIAIS.....	56
2.2.1	Fosmete (Imidan® 500WP)	57
2.2.2	Procedimento de contaminação.....	57
2.3	TESTES <i>IN VITRO</i> DE TOLERÂNCIA DE FUNGOS AO AGROTÓXICO	58
2.3.1	Inoculação por discos	59
2.3.2	Inoculação através de solução de esporos.....	59
2.3.3	Obtenção de índices de crescimento.....	60
2.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
2.4.1	Contagem de UFC	60
2.4.2	Tolerância de isolados	61
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.1	CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS	61
3.2	CRESCIMENTO E CONTAGEM DE FUNGOS.....	62
3.3	TOLERÂNCIA DE ISOLADOS FÚNGICOS AO FOSMETE.....	65
3.4	DISCUSSÃO	67

3.4.1	Maturação biológica das biomisturas	67
3.4.2	Resposta de fungos ao fosmete	68
4	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71
	CAPÍTULO 3	76
	ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ANÁLISES QUÍMICAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE FOSMETE EM SISTEMAS DE DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE AGRÓXICOS – <i>BIOBEDS</i>¹	76
	RESUMO	77
1	INTRODUÇÃO	78
2	MATERIAL E MÉTODOS	81
2.1	<i>BIOBEDS</i> LABORATORIAIS	81
2.2	DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO FOSMETE.....	82
2.3	PREPARAÇÃO AMOSTRAL PARA OS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE .	83
2.4	ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ORGANISMOS-TESTE	83
2.4.1	Reprodução de colêmbolos	84
2.4.2	Reprodução de enquitreídeos	85
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	86
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	86
3.1	ANÁLISES QUÍMICAS RESIDUAIS DO FOSMETE	87
3.2	ENSAIOS DE REPRODUÇÃO COM COLÊMBOLOS.....	87
3.3	ENSAIOS DE REPRODUÇÃO COM ENQUITREÍDEOS	89
3.4	DISCUSSÃO	91
3.4.1	Organismos-teste	91
3.4.2	Eficiência das biomisturas propostas	93
4	CONCLUSÕES	94
	REFERÊNCIAS	95
	CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO GERAL	99

APÊNDICE A – Dados de AACCM e PIC dos 52 isolados de fungos 101

1 INTRODUÇÃO GERAL

O uso de agrotóxicos pode gerar contaminação ambiental dos tipos pontual ou difusa. A contaminação difusa ocorre, principalmente, durante a aplicação das caldas químicas sobre a cultura agrícola. A contaminação pontual se dá pelo descarte inadequado de resíduos de agrotóxicos gerados durante a atividade agrícola, principalmente restos de calda e efluentes oriundos da lavagem de pulverizadores (FOGG et al., 2003; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). O *biobed* é uma tecnologia desenvolvida com o propósito de descarte e tratamento destes resíduos (CASTILLO; TORSTENSSON, 2007). *Biobeds* possuem baixo custo e são de fácil manuseio, construídos na propriedade agrícola; e são compostos por uma biomistura que contém solo agrícola, uma fonte de lignocelulose e um componente húmico (BRICEÑO et al., 2014). Sua eficiência na degradação dos agrotóxicos se baseia na atividade decompositora de uma microbiota ativa e nos processos de sorção mantidos pelos substratos (DIEZ, 2010). O *biobed* vem sendo utilizado oficialmente nas propriedades agrícolas, como tecnologia de proteção ambiental contra agrotóxicos, em países como Guatemala, Reino Unido, Suécia e França (RISE, 2020).

Na América Latina, o *biobed* tem sido difundido na forma de comunicados oficiais e manuais, que podem ser utilizados pelos produtores agrícolas como guia para a montagem e o uso da tecnologia. Como exemplo, pode-se citar manuais produzidos no sul do Brasil (GEBLER, 2015; GEBLER, 2017), e para regiões específicas do Chile (DIEZ et al., 2013), Costa Rica (CICA, 2015) e Uruguai (DIGEGRA, 2014). A partir destes documentos, o produtor encontra-se amparado tanto na questão técnica, já que os manuais são detalhados e as instituições responsáveis por eles, normalmente, têm a preocupação de desenvolver um relacionamento com os agricultores; quanto na questão legal, pois as adaptações da tecnologia já foram desenvolvidas de acordo com as especificações legais de cada região, em relação ao manuseio de agrotóxicos e à proteção ambiental.

Diversos aspectos a respeito do *biobed* já foram estudados, como forma de adaptá-lo às exigências legais e à disponibilidade de materiais em cada região, para garantir sua eficiência na degradação dos agrotóxicos (FOGG et al., 2003; CHU; EIVAZI, 2016). Outros estudos visaram avaliar a capacidade da sua microbiota na degradação de agrotóxicos (CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2016), avaliar seus riscos ecotoxicológicos (HUETE-SOTO et al., 2017), ou desenvolver métodos de análise que facilitem a determinação residual dos agrotóxicos adicionados ao *biobed* (RIVERO et al., 2016). Porém, estudos avaliando a eficiência de novas

biomisturas em degradar agrotóxicos, compostas por materiais alternativos oriundos do sul do Brasil ainda são escassos, principalmente com relação à turfa, que é um substrato de difícil acesso e preço elevado. Além disso são necessários mais estudos envolvendo a microbiota fúngica do *biobed*, de forma que seja identificado o momento ideal para contaminação do *biobed*, aonde a microbiota está mais ativa, e que seja avaliada a capacidade da biomistura em promover o desenvolvimento de organismos capazes de, efetivamente, atuarem na degradação dos agrotóxicos.

1.1 HIPÓTESES

1.1.1 Hipótese geral

A acícula de pinus e o húmus de minhoca são materiais promissores para substituir a turfa na biomistura que compõe *biobeds*.

1.1.2 Hipóteses específicas

Foi possível definir algumas hipóteses específicas, que foram testadas ao longo deste projeto:

- A contagem de fungos permite acompanhar o processo inicial de maturação biológica por fungos nas biomisturas e avaliar a resposta destes fungos após a aplicação de um agrotóxico;
- Dentre os fungos isolados ao longo da execução do projeto, alguns são capazes de se desenvolver sobre um meio de cultura contaminado pelo mesmo agrotóxico;
- Os ensaios ecotoxicológicos e as análises químicas, em conjunto, permitem acompanhar o processo de degradação do agrotóxico nas biomisturas;
- A acícula de pinus e/ou o húmus de minhoca são capazes de substituir a turfa, garantindo algum nível de eficiência da degradação do agrotóxico pelas novas biomisturas;
- A partir dos resultados deste projeto será possível definir a composição de pelo menos uma biomistura alternativa com substratos acessíveis para o Sul do Brasil.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Esta dissertação teve como objetivo principal avaliar a eficiência de novas biomisturas para *biobeds* na degradação do inseticida organofosforado fosmete (Imidan 500WP), sendo estas biomisturas compostas por acícula de pinus ou húmus de minhoca na substituição da turfa.

1.2.2 Objetivos específicos

- Comparar *biobeds* laboratoriais quanto à sua eficiência na degradação do inseticida organofosforado fosmete (Imidan®), utilizando a biomistura tradicional e duas alternativas: uma com acícula de pinus e outra com húmus de minhoca no lugar da turfa;
- Avaliar a colonização fúngica durante a maturação biológica das biomisturas, para determinar a época ideal para aplicação do agrotóxico, e o comportamento destas comunidades de fungos nos *biobeds* laboratoriais após a aplicação do agrotóxico;
- Avaliar a tolerância de isolado fúngicos obtidos nas biomisturas ao fosmete, através de medições do crescimento micelial;
- Realizar ensaios ecotoxicológicos crônicos em amostras das biomisturas, para monitorar a redução da ecotoxicidade do agrotóxico ao longo do tempo, utilizando colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*);
- Avaliar a degradação do fosmete nas biomisturas, a partir de análises químicas residuais do agrotóxico, para confirmar sua degradação ao longo do tempo.

1.3 ORGANIZAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação está dividida em três capítulos. O Capítulo 1 apresenta-se como um referencial teórico à temática estudada, e aborda, especificamente, o estado da arte sobre as pesquisas em *biobeds* na América Latina. Este capítulo baseia-se em um artigo de revisão bibliográfica publicado (*in press*) na revista *Chemosphere*.

O Capítulo 2 apresenta a avaliação da comunidade fúngica proveniente das biomisturas de dois *biobeds* alternativos, e suas respostas ao inseticida fosmete, em comparação com o *biobed* padrão.

O Capítulo 3 apresenta a avaliação da eficiência das mesmas biomisturas alternativas em reduzir a ecotoxicidade e degradar o inseticida fosmete, em comparação com a biomistura tradicional.

REFERÊNCIAS

- BRICEÑO, G.; TORTELLA, G.; RUBILAR, O.; PALMA, G.; DIEZ, M. C. Advances in Chile for the treatment of pesticide residues: biobeds technology. p. 53-66, 2014. In: ALVAREZ, A.; POLTI, M. A. **Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives**. Springer, 2014. DOI 10.1007/978-3-319-05738-5
- RISE - RESEARCH INSTITUTES OF SWEDEN. **Biobeds**. Disponível em <http://biobeds.net/en/about-us-2/>. Acesso em: 21 jan. 2020.
- CASTILLO, M. P.; TORSTENSSON, L. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, p.5725-5733, 2007. DOI 10.1021/jf0707637
- CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; CAMINAL, G.; VICENT, T.; CARAJOROJAS, E.; MORA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. A microbial consortium from a biomixture swiftly degrades high concentrations of carbofuran in fluidized-bed reactors. **Process Biochemistry**, v.51, p.1585–1593, 2016. DOI 10.1016/j.procbio.2016.07.003
- CHU, B.; EIVAZI, F. Enhanced Dissipation of Selected Herbicides in a Simulated Organic Matrix Biobed: A System to Control On-Farm Point-Source Pollution. **Journal of Environmental Quality**, Special Section – Environmental Indicators, Dec./2016. DOI 10.2134/jeq2016.04.0124
- CICA – CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. **Manual de uso de biobeds**. Universidad de Costa Rica, San José – CR, 2015
- DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.10(3), p.244-267, 2010.
- DIEZ, M. C.; CIFUENTES, G. P.; QUIJADA, C. A.; BRICEÑO, G.; RAMÍREZ, C. C.; SÁNCHEZ, J. D.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. Manual de construcción y operación de lechos biológicos. Proyecto D09R1006. **Ediciones Universidad de La Frontera**, Universidad de La Frontera, Instituto de Agroindustria, Chile, abr./2013.
- DIGEGRA - DIRECCIÓN GENERAL DE LA GRANJA. **Guía de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de frutas y hortalizas frescas en Uruguay**. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Uruguay, 77p., 2014.
- FOGG, P.; BOXALL, A.; WALKER, A.; JUKES, A. A. Pesticide degradation in a ‘biobed’ composting substrate. **Pest Management Science**, v.59, p.527–537, 2003. DOI 10.1002/ps.685
- GEBLER, L. **Sistema Biobed Brasil: Tecnologia para Disposição Final de Efluentes Contaminados com Agrotóxicos Originados na Produção de Frutas de Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015, 47p. (EMBRAPA UVA E VINHO. Documentos: 94).

GEBLER, L. **Orientações para o Dimensionamento e Operação de Biobeds no Brasil.** Comunicado Técnico, 204. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 5p, 2017.

HUETE-SOTO, A.; MASÍS-MORA, M.; LIZANO-FALLAS, V.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: Detoxification and effect of oxytetracycline. **Chemosphere**, v.169, p.558-567, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.11.106

RIVERO, A.; NIELL, S.; CERDEIRAS, M. P.; HEINZEN, H.; CESIO, M. V.; Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. **Talanta**, v.153, p.17–22, 2016. DOI /10.1016/j.talanta.2016.02.025

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; LIZANO-FALLAS, V. Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in biopurification systems. In: BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N. **Toxicity and biodegradation testing: Methods in pharmacology and toxicology.** Springer Science+Business Media, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7425-2

CAPÍTULO 1

DESTINAÇÃO FINAL DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM *BIOBEDS*: ESTADO DA ARTE E PERSPECTIVAS FUTURAS NA AMÉRICA LATINA

Publicado como:

DIAS, L. A.; GEBLER, L; NIEMEYER, J. C.; ITAKO, A. T. Destination of pesticide residues on biobeds: state of the art and future perspectives in Latin America. **Chemosphere**, v.248, 2020.
DOI 10.1016/j.chemosphere.2020.126038

Publicado na revista *Chemosphere*.

RESUMO

A intensificação do uso do solo e da aplicação de agrotóxicos, para garantir a qualidade de produção, são algumas das consequências do aumento populacional. Um dos impactos causados pelo uso de agrotóxicos é a contaminação ambiental gerada pelo descarte incorreto de resíduos concentrados destes produtos, com a consequente contaminação do solo e corpos hídricos. Assim, é necessário encontrar alternativas para a destinação correta ou tratamento deste efluente, como o *biobed*, que é uma tecnologia europeia indicada para o tratamento de resíduos de agrotóxicos, e tem sua eficácia comprovada cientificamente há mais de 20 anos. É um reator biológico *in situ*, de fácil montagem e custo relativamente baixo. As pesquisas latino-americanas apontaram adaptações necessárias que garantissem a eficácia do *biobed* em países cuja produção agrícola e o clima diferem do europeu, o que faz com que estejam disponíveis outros tipos de resíduos orgânicos e substratos para o *biobed*. O objetivo deste artigo foi avaliar o estado da arte dos estudos científicos em *biobeds* na América Latina, até junho de 2019, como uma forma de unir em um único artigo os principais resultados publicados até o momento. A Guatemala é o país latino-americano que já desenvolveu um *biobed* adaptado e utiliza oficialmente esta tecnologia para o descarte de resíduos de agrotóxicos. O Brasil, Argentina, Costa Rica e Chile estão entre os países que vem realizando pesquisas a respeito da adaptação e de outros tópicos pertinentes ao uso do *biobed*. Busca-se gerar uma base sólida de evidências científicas, para que seja possível utilizá-las para indicar o *biobed* como sistema de segurança ambiental para o manejo de resíduos de agrotóxicos, e de proteção de águas. Por ser um sistema simplificado, com eficiência de tratamento cientificamente comprovada, o *biobed* representa uma solução rápida e concreta para os problemas de manejo ou destinação inadequados destes causadores da contaminação ambiental pontual observada nos países latino-americanos.

Palavras-Chave: Agrotóxicos; Biodegradação; Poluentes orgânicos; Tratamento *on farm*.

ABSTRACT

Land-use intensification with a high demand for pesticides is a consequence of human population increase. Feasible alternatives for correct concentrated residues discharge are necessary to avoid soil and water resources contamination. Biobeds are in situ bioreactors for treating pesticide residues, used by several European and American countries due to its low cost and simple construction, whose efficiency has been scientifically proved for over 20 years. Latin American researches point out the adaptations that are important to assure the biobed's efficiency in every country, according to their climate and available substrates. This review presents the state of the art of biobeds in Latin America (LA), identifying advances and future research needs. Factors affecting the efficiency of biobeds are discussed, like ideal temperature, moisture, and microbial communities, followed by methods for evaluating the bioreactor's efficiency. It was necessary to adapt this technology to the climatic and economic conditions of Latin-American countries, due to its European origins. The objective of this paper was to evaluate the state of the art from scientific research applied on biobeds in Latin-America, until June 2019, as a way to bring together the main results obtained until this moment. Guatemala is the LA country that uses biobeds as official technology. Brazil, Argentina, Costa Rica and Chile are examples of countries that are actively investigating new substrates and pursuing legal aspects for the establishment of the biobeds. Robust scientific evidences may enable farmers start using this technology, which is an environmentally safe system to protect

water resources, and presents a quick and concrete solution for the problems of inadequate handling of pesticide residues in LA countries.

Keywords: *Pesticides; Biodegradation; Organic Pollutants; On-Farm Treatment.*

1. INTRODUÇÃO

O uso de agrotóxicos gera riscos de contaminação ambiental, em algum nível, ao longo de todas as suas etapas. Esta contaminação pode ser difusa, que ocorre durante a aplicação do produto e apresenta difícil controle, ou pontual, com possibilidade de ser controlada. O manuseio e descarte inadequados de agrotóxicos geram resíduos que podem causar a contaminação de corpos d'água superficiais, subterrâneos, e do solo (BRICEÑO et al., 2014; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). Representam riscos para a saúde dos organismos e do homem, caso venham a permanecer na água de consumo humano (VAZ JR., 2019).

Biobeds são reatores biológicos desenvolvidos com o propósito de tratar os resíduos de agrotóxicos gerados durante a atividade de produção agrícola. Dentre estes resíduos pode-se citar a água proveniente da lavagem dos equipamentos de pulverização ou ainda qualquer resíduo que venha a permanecer no ambiente de preparação da calda de agrotóxico (CASTILLO et al., 2008; DIEZ, 2010).

A estrutura original do *biobed* vem sendo adaptada para as características do solo, clima e produção agrícola dos países latino-americanos, com o objetivo de garantir que a tecnologia seja de fácil acesso em todas as regiões, e que mantenha sua eficiência no tratamento biológico. Um dos focos de estudo são as alterações estruturais para uma profundidade ideal, a impermeabilização e a avaliação do uso de um telhado em regiões com alta pluviosidade (GEBLER et al, 2015; LESCANO et al., 2018). Outras linhas de pesquisas latinas envolvendo *biobeds* visam testar materiais alternativos para as biomisturas e identificar espécies de fungos ou bactérias provenientes destas biomisturas avaliando a capacidade de diferentes espécies na degradação dos agrotóxicos. A colonização microbiana e a umidade da biomistura também são parâmetros importantes estudados (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2018).

Neste sentido, realizou-se uma bibliometria com meta-análise das publicações sobre estudos com *biobeds* na América Latina, buscando apresentar o estado da arte e as perspectivas futuras para as pesquisas e implantação deste sistema. Foram pesquisadas publicações no banco de dados do “Scopus” e “Google Scholar” através das seguintes palavras-chaves: “*Biobed*”, “*Lecho Biologico*” e “*Biopurification System*”. A pesquisa englobou a análise de todas as

publicações até junho de 2019 que foram de autoria de países latino-americanos (BIOBEDS.ORG, 2019; LECHOS BIOLÓGICOS, 2019). Outras fontes utilizadas foram sites oficiais de *biobeds* e dos grupos de pesquisa, além de um questionário fechado enviado a representantes dos grupos de pesquisa latino-americanos em *biobeds*.

2. CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL CAUSADA PELO DESCARTE DE AGROTÓXICOS

A contaminação ambiental por agrotóxicos é um tópico frequentemente discutido no ambiente acadêmico. Uma série de técnicas já foram avaliadas para reduzir esta contaminação, aonde incluem-se a modelagem do ciclo de pragas agrícolas, que auxilia na identificação de épocas corretas para aplicação de agrotóxicos (JACQUES et al., 2019), o controle biológico de pragas (ARAÚJO et al., 2018; MEYER et al., 2019), e o uso de agrotóxicos menos persistentes (CALDAS, 2019). Quando aplicados, os agrotóxicos representam fontes de contaminação ambiental difusas, que são de difícil controle. Porém eles também podem gerar contaminações pontuais, devido ao descarte inadequado de efluentes contendo misturas concentradas de agrotóxicos (FOGG et al., 2003).

Durante a contaminação pontual tem-se a concentração de gramas ou quilos de agrotóxicos derramados por poucos metros quadrados (CARTER, 2000). Na contaminação difusa esta carga equivalente é rapidamente espalhada em hectares de terreno. Sendo assim, o descarte no ambiente de pequenas quantidades de resíduos contendo produtos concentrados podem gerar um grande problema de contaminação ambiental regional, principalmente nos recursos hídricos, representando problemas diretos para a saúde humana (GEBLER; FIALHO, 2011). Fernandes Neto e Sarcinelli (2009) afirmam que a água para consumo pode ser uma importante fonte de exposição da população humana a agrotóxicos.

A legislação brasileira não especifica a forma correta para realizar o descarte destes resíduos de agrotóxicos. Na Lei Federal nº 7.802/89, intitulada “Lei dos Agrotóxicos”, cita-se que o agrotóxico puro deve ser enviado de volta ao seu fabricante, que providenciará o descarte de acordo com a bula do produto. E a NBR/ABNT nº 10004/2004 considera que o agrotóxico deve ser tratado como resíduo perigoso quanto está misturado com óleos e graxas, devendo ser incinerado, tratado, ou disposto em aterro sanitário industrial (ABNT, 2004).

Porém a NBR nº 10004/2004 não leva em consideração as particularidades da atividade agrícola, onde é baixo o volume de resíduo perigoso gerado, se comparado com aquele das

atividades industriais e urbanas. Além disso, a destinação indicada pela norma envolve custos altos e a necessidade de estar próximo ou transportar o resíduo para os locais de destinação correta, o que se torna um processo inexecutável para os pequenos agricultores.

Também é necessário levar em consideração a resolução do CONAMA nº430/2011, que determina condições e padrões de lançamentos de efluentes orgânicos e inorgânicos em corpos d'água, citando que estes efluentes não devem causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos presentes no corpo receptor. Neste sentido a Portaria do Ministério da Saúde nº 2.914/2011, que fala sobre procedimentos de vigilância e padrões de potabilidade da qualidade da água para consumo humano, cita valores de concentrações máximas permitidas para agrotóxicos como o 2,4 D, clorpirifós, glifosato e mancozebe.

A “Lei dos Agrotóxicos” não traz alternativas de tratamento específicas para os efluentes contendo resíduos de agrotóxicos, apesar de citar a necessidade de destiná-los corretamente. Além disso, as normas supracitadas tornam clara a proibição de descartar estes efluentes no meio ambiente e citam limites de agrotóxicos presentes na água para consumo humano que devem ser respeitados. Desta forma, o *biobed* vem como uma tecnologia simplificada, de eficiência cientificamente comprovada, que permite o descarte e tratamento destes efluentes na propriedade agrícola. Ele está sendo adaptado para o Brasil, de forma que todas as exigências legais de proteção ambiental sejam cumpridas, garantindo ao produtor agrícola o amparo técnico suficiente para que ele utilize o sistema de forma correta.

3. SISTEMA *BIOBED*

O sistema *biobed* é uma tecnologia desenvolvida na Suécia, publicada inicialmente por Torstensson & Castillo (1997). É descrito como uma escavação no solo da propriedade agrícola preenchida com uma biomistura, composta por turfa (25%), palha de trigo (50%) e solo agrícola (25%), e coberta por gramíneas. Nele são descartados os resíduos dos agrotóxicos, provenientes de restos de caldas e da lavagem de equipamentos de pulverização, que serão degradados a partir da ação da microbiota que se desenvolve em seu substrato (COOPER et al., 2016). Concomitantemente ocorre a adsorção físico-química do produto nas partículas da biomistura (CASTILLO et al., 2008). A Figura 1 ilustra os *biobeds* estudados no Brasil.

Figura 1 – *Biobeds* instalados no Brasil.



- (A) Apresentação do *Biobed* em profundidade, projetado para receber o maquinário agrícola em sua superfície.
 (B) *Biobeds* menores utilizados para propósitos experimentais, ou para o descarte de pequenos volumes residuais.

Fonte: O autor, 2019.

Diez et al. (2013c) afirmam que, no Chile, o *biobed* pode ser utilizado por até 5 anos. Este período pode ser menor, de acordo com o clima de cada região, ser devendo ser monitorado a partir de reduções na altura da biomistura. Um *biobed* da Costa Rica que recebeu aplicações contínuas de carbofurano por um ano, apresentou uma queda na eficiência de degradação com apenas seis meses de uso, o que sugere que as condições climáticas nos trópicos podem reduzir a vida útil dos *biobeds* (CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2017). Estes resultados indicam a importância de avaliar a vida útil do *biobed* para cada região, antes de aplicá-lo como tecnologia de proteção ambiental.

Recomenda-se que a troca de toda a biomistura ocorra após a redução da sua altura para 1/3 com relação à altura inicial (DIEZ et al., 2013c). Neste momento, a biomistura deve ser submetida a seis meses de compostagem (TORSTENSSON, 2000), realizado de acordo com as normas específicas de cada país ou região. No caso do Brasil, a compostagem deve ser realizada de acordo com a Resolução CONAMA nº 481/17, que estabelece critérios para a compostagem, exigindo a impermeabilização e cobertura do local da composteira (CONAMA, 2017). Após esse processo, a biomistura pode ser descartada no solo da propriedade agrícola, através da técnica de *landfarming*, no qual irá atingir o equilíbrio natural.

3.1 PANORAMA GERAL DA TEMÁTICA ESTUDADA

Estudos realizados nos Estados Unidos e em países Europeus que têm adotado o *biobed* como mecanismo de segurança para o manejo de agrotóxicos e a consequente proteção dos

recursos hídricos, seja na fase de testes ou em uso oficial, relatam a eficiente redução da concentração de uma série de produtos testados (TORSTENSSON; CASTILLO, 1997). Este sistema foi capaz de degradar 91% de uma mistura de 15 agrotóxicos, aonde estão incluídos produtos como o 2,4 D e metsulfurom-metílico (COOPER, 2016), e degradou mais de 80% de uma mistura de atrazina e clorpirifós (DIEZ et al., 2017). Entre os países que indicam e utilizam a tecnologia de forma oficial estão o Reino Unido, Suécia (país de origem do *biobed*, com mais de 1.500 unidades instaladas), França, Bélgica, Guatemala, Espanha e Polônia (BIOBEDS.ORG, 2019).

A maioria dos países que já aplicam o *biobed* oficialmente pertencem à União Europeia (UE) devido à existência das diretivas que limitam a presença de agrotóxicos na água potável desde 1980, com a publicação da primeira Diretiva da Água Potável nº 80/778/EEC, que foi revisada e encontra-se publicada nas Diretivas nº 98/83/EC e nº 2015/1787 (CARTER, 2000). Em 2008 a UE publicou a diretiva de Padrões de Qualidade Ambiental (*Directive* nº 2008/105/EC), que estabeleceu concentrações limite para a presença de 33 substâncias de prioridade em águas superficiais da UE, aonde incluem-se agrotóxicos como atrazina e endosulfan (EUROPEAN COMMISSION, 2016).

Na América Latina, os estudos científicos em *biobed* concentram-se no Chile (DIEZ et al., 2013c; BRICEÑO et al., 2017), Costa Rica (CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2018), Brasil (GEBLER, 2015), Argentina (LESCANO et al., 2018), México (GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2018) e Uruguai (RIVERO et al., 2016). Estes estudos relatam a eficiência do *biobed* em degradar diversos ingredientes ativos. Os países latino-americanos organizam, periodicamente, workshops para divulgação dos resultados mais recentes de cada grupo de pesquisa em *biobeds*, sendo que o último encontro ocorreu no Brasil (GEBLER, 2017b).

3.2 HISTÓRICO NA AMÉRICA LATINA

A primeira publicação científica de pesquisa em *biobeds* na América Latina foi de autoria de Diez (2010), da Universidad de La Frontera, Chile. O artigo foi uma revisão bibliográfica a respeito da contaminação ambiental pelo uso de agrotóxicos, a possibilidade de seu tratamento biológico e os microrganismos envolvidos neste processo, onde foi inserido o sistema *biobed* e seus propósitos de uso.

Este, e outros autores, compõem o grupo de pesquisa “Lechos Biológicos.CL” da Universidad de La Frontera, no Chile, que possui registro de pesquisas no assunto desde 2008,

sendo pioneiro na América Latina. O grupo publicou o “*Manual de Construcción y Operación de Lechos Biológicos*” (DIEZ et al., 2013c), com instruções detalhadas para uso do *biobed* (também chamado de leito biológico) pelos produtores da região frutícola de *La Araucanía*. Briceño et al. (2014) publicaram o capítulo 4 do livro intitulado “*Bioremediation in Latin America*”, abordando os avanços em tratamentos de resíduos de agrotóxicos no Chile, afirmando que este país foi o pioneiro da tecnologia na América Latina, com quatro *biobeds* em escala real sendo utilizados no campo, até o ano da publicação.

Outro país que possui uma contribuição científica considerável para a temática, a Costa Rica dispõe de um grupo de pesquisa em *biobeds* que faz parte do Centro de Investigação em Contaminação Ambiental, da *Universidad de Costa Rica*. A primeira publicação do grupo foi uma revisão bibliográfica da autoria de Rodríguez-Rodríguez et al. (2013), a respeito do papel dos fungos filamentosos brancos no tratamento de águas contaminadas por agrotóxicos, dentro do sistema do *biobed*. O grupo também vem trabalhando com ensaios ecotoxicológicos (CHIN-PAMPILLO et al., 2016), avaliando a degradação de antibióticos de uso agrícola em associação à mistura de agrotóxicos, e também desenvolveu uma nova composição para a biomistura (RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2018). Recentemente, o grupo produziu um capítulo do caderno da *Springer Protocols* que aborda métodos de avaliação da toxicidade e biodegradação (Rodríguez-Rodríguez et al., 2018).

O Brasil foi o responsável pelos primeiros estudos latino-americanos abordando ensaios de ecotoxicidade associados com análises químicas, na avaliação da eficiência de *biobeds* (GEBLER et al., 2015; CARNIEL, 2015). Este grupo é composto por pesquisadores da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), e Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC). Invertebrados do solo foram utilizados para monitorar a redução da ecotoxicidade de mancozebe e clorpirifós em *biobeds* e em dois tipos de solos brasileiros. Os ensaios indicaram riscos potenciais para a fauna do solo quando os resíduos de agrotóxicos são descartados diretamente no solo (CARNIEL, 2015). Gebler (2015) publicou o primeiro manual para construção de *biobeds* em português, e Vareli et al. (2018) relataram o uso da cromatografia gasosa para determinar a concentração de ditiocarbamatos no *biobed*. Atualmente novas parcerias foram feitas para expandir o grupo brasileiro, com a inclusão da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Campus de Curitibanos, resultando na avaliação de novos substratos para *biobeds*.

Uruguai, México e Argentina também possuem resultados significantes. Rivero et al. (2016) desenvolveram metodologias analíticas para avaliar a eficiência do *biobed* no tratamento

de pesticidas organoclorados recalcitrantes. No México, Góngora-Echeverría et al., (2018) testaram novos substratos provenientes da região sudeste do país. E na Argentina Lescano et al. (2018) avaliaram a eficiência de materiais de fácil acesso para o país. A Argentina está desenvolvendo uma norma para construção e funcionamento de *biobeds* no país, em parceria com a comissão de solos do Instituto Argentino de Normatização e Certificação, com vias a facilitar a implementação oficial do sistema.

Na Guatemala o processo não teve sua origem em centros de pesquisa, e sim na aplicação direta fomentada por empresas, através de uma associação nacional das indústrias de agrotóxicos (AGREQUIMA). Neste caso, a AGREQUIMA atua promovendo cursos de treinamento e indicando novas tecnologias para os agricultores da Guatemala, como forma de garantir o manuseio correto dos agrotóxicos. Devido à demanda da indústria, este foi o primeiro país latino-americano a implantar o *biobed* como tecnologia oficial para o descarte de resíduos de agrotóxicos. Esta tecnologia está sendo utilizada em larga escala pelos agricultores do país, com um sistema adaptado nomeado de *Biodep*, e já ultrapassou 3.000 unidades implementadas (AGREQUIMA, 2019). Do ponto de vista de aplicação do sistema, a Guatemala se destaca na AL, pela aplicação direta do *biobed* fomentada por empresas.

O caso da Guatemala torna clara a vantagem que a iniciativa privada trouxe para efetivar a implantação do *biobed* neste país, com resultados científicos que foram rapidamente aplicados no campo, garantindo o apoio técnico para o agricultor. Os outros países latino-americanos têm divulgado pesquisas com resultados promissores, porém a oficialização do uso do *biobed* nas propriedades agrícolas ainda é uma etapa inacabada. O interesse da iniciativa privada, assim como o apoio dos órgãos governamentais, poderiam ser grandes influenciadores no processo de atingir esta etapa.

4. LINHAS DE PESQUISAS EM *BIOBEDS* NOS PAÍSES LATINO-AMERICANOS

A eficiência do *biobed* em degradar agrotóxicos envolve fatores intrínsecos de cada *biobed* desenvolvido, como os materiais utilizados, o papel das gramíneas e a microbiota presente no substrato. Envolve também fatores externos de temperatura e umidade. Nós tópicos seguintes, apresentaram-se estes e outros fatores de forma separada, abordando os trabalhos publicados até o momento. Também foram abordadas as diferentes formas utilizadas para

avaliar a eficiência de degradação das novas biomisturas desenvolvidas.

4.1 FONTES ALTERNATIVAS DE MATERIAIS

Um dos principais focos da pesquisa em *biobeds* é a adaptação da biomistura com materiais de fácil acesso, com o objetivo de garantir que um maior número de produtores agrícolas possa utilizá-lo sem ter grandes gastos financeiros. Isso é necessário pois a tecnologia está adaptada para a Suécia, seu país de origem, onde definiu-se a composição padrão da biomistura com duas partes de palha de trigo, para uma parte de turfa e uma parte de solo (CASTILLO et al., 2008). Deve-se considerar que a turfa não é um substrato barato na América Latina, e nem todas as regiões produzem o trigo em grande escala.

A palha representa a fonte inicial de energia para a microbiota, estimulando a excreção de enzimas celulares lignolíticas. Além disso, ela atua como suporte físico para o estabelecimento inicial dos microrganismos, processo chamado de maturação biológica, e garante a aeração da biomistura (URRUTIA et al., 2013). O solo é o inoculo inicial dos microrganismos que se desenvolverão no *biobed* e atuarão na degradação do agrotóxico, e deve ser coletado na mesma região agrícola em que o *biobed* for instalado, para que a microbiota seja nativa e já esteja adaptada à aplicação de agrotóxicos (GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2018; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Em relação à substituição da palha do trigo, alguns materiais igualaram-se e outros superaram sua eficiência. Saez et al. (2018) testaram o bagaço de cana de açúcar para substituir a palha do trigo, com resultados positivos quanto à degradação de lindano. Diez et al. (2013a) testaram a casca de cevada e a serragem de *Pinus* sp., em diferentes proporções, para degradar uma mistura de atrazina, isoproturon, iprodiona, clorpirifós, diazinon e carbendazim. A maior taxa de degradação, de 90%, ocorreu em uma biomistura contendo a casca de cevada e a palha de trigo na composição.

A turfa é um composto húmico altamente poroso que garante a boa mistura dos componentes e promove uma alta capacidade de sorção das partículas, além de atuar na estabilização da umidade da biomistura (DIEZ et al., 2013a; URRUTIA et al., 2015). Sua substituição é mais complexa, devido à especificidade de suas características. Diez et al. (2013b) realizaram uma série de testes utilizando o biochar produzido a partir da pirólise da madeira de *Pinus radiata*, misturado à turfa em diferentes proporções. O composto gerou uma degradação eficiente de atrazina, carbendazim, clorpirifós, e outros agrotóxicos, ao final de um

teste de 40 dias, porém com um percentual menor que o da turfa. Apesar disso, o biochar ainda foi considerado um substituinte promissor do composto húmico original para a região do Chile.

Na Costa Rica utiliza-se uma biomistura composta por fibra de coco, resíduos vegetais compostados e solo. Já foram realizadas avaliações químicas e a nível ecotoxicológico, que relataram a eficiente degradação de carbofurano, imidacloprida, thiametoxam e outros produtos nesta biomistura (CHIN-PAMPILLO et al., 2016; RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2018). No México, Góngora-Echeverría et al. (2018) avaliaram polpa de sisal, resíduo vegetal compostado, palha de milho e algas marinhas. Os materiais foram misturados ao solo agrícola em diferentes proporções, para substituir a turfa e a palha de trigo. Relatou-se uma redução da toxicidade de uma mistura de agrotóxicos (atrazina, carbofuran, diazinon, glifosato e 2,4-D) superior a 90% para todos os produtos. As biomisturas mais eficientes foram aquelas que continham a palha de milho na sua composição.

Urrutia et al. (2013) avaliaram casca de cevada, serragem e casca de aveia como substituintes totais ou parciais da palha de trigo (50% da fonte de lignocelulose). Observou-se uma melhor eficiência na biomistura de casca de aveia. Na Argentina, Lescano et al. (2018) avaliaram a degradação de glifosato em escala de laboratório pela mistura de palha de alfafa, palha de trigo e lodo de rio, misturados com solo agrícola. A mistura de solo e palha de trigo garantiu uma degradação de 99% do agrotóxico, ao final de 63 dias. Na Tabela 1 é possível observar os substratos avaliados que trouxeram melhores resultados para a composição da biomistura, ou substrato do *biobed*.

Tabela 1 – Resumo da composição de substratos alternativos avaliados para a biomistura, em diferentes proporções de materiais, com resultados promissores na América Latina.

Composição do Substrato	Referência
Fibra de coco (45%), resíduo de poda compostado (13%), solo (42%)	Chin-Pampillo et al., 2016
Casca de arroz (30%), resíduo de poda compostado (43%), solo (27%)	Ruiz-Hidalgo et al., 2016a
Bagaço de cana de açúcar (50%), turfa (25%), solo (25%)	Saez et al., 2018
Casca de aveia (50%), turfa (25%), solo (25%)	Urrutia et al., 2013
Casca de cevada (25%), palha de trigo (25), turfa (25%), solo (25%)	Urrutia et al., 2013
Serragem de pinheiro (25%), palha de trigo (25), turfa (25%), solo (25%)	Urrutia et al., 2013
Palha de trigo (50%), biochar (25%), solo (25%)	Diez et al., 2013b
Palha de trigo (45%), acícula de pinus (5%), turfa (25%), solo (25%)	Tortella et al., 2013b
Palha de trigo (45%), folhas de eucalipto (5%), turfa (25%), solo (25%)	Tortella et al., 2013b
Palha de trigo (45%), cascas de laranja (5%), turfa (25%), solo (25%)	Tortella et al., 2013b
Solo (50%), polpa de sisal (12,5%), resíduo vegetal compostado (12,5%), palha de milho (12,5%), algas marinhas (12,5%)	Góngora-Echeverría et al., 2018
Palha de trigo (50%); solo (50%)	Lescano et al., 2018

Fonte: O autor (2019)

Diversos materiais já foram indicados como substituintes promissores dos componentes originais da biomistura. Desta forma, aponta-se a necessidade de continuar a desenvolver novas biomisturas para os países que ainda não realizaram esta etapa, de acordo com a disponibilidade de materiais em cada região. Avaliar a capacidade das biomisturas já desenvolvidas em degradarem misturas complexas de agrotóxicos ou produtos altamente recalcitrantes também é importante, já que nem todas as biomisturas foram eficientes nestes casos (RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2018).

4.2 INFLUÊNCIA DE FATORES ABIÓTICOS

Além dos seus componentes, fatores como o tempo de maturação biológica e a umidade da biomistura também afetam diretamente a eficiência da biodegradação. Fernández-Alberti et al. (2012) avaliaram a degradação de clorpirifós e a formação do metabólito TCP (3,5,6-trichloro-2-pyridinol) em um *biobed* tradicional submetido a diferentes tempos de maturação (0, 15 e 30 dias) e diferentes níveis de umidade (40%, 60% e 80% da capacidade de campo). Nos tempos de maturação de 15 e 30 dias, com 60% da capacidade de campo, observou-se a degradação de 70% do composto. A maturação biológica, ou desenvolvimento inicial da microbiota, pode ser responsável pela eficiência de degradação, apesar de existirem poucos estudos abordando essa temática. Durante este período, as condições de umidade da biomistura são ajustadas para garantir as melhores condições para o estabelecimento inicial dos microrganismos (TORTELLA et al., 2012).

A adição de terpenos sintéticos em um *biobed* permitiu atingir índices de degradação de atrazina superiores a 70% (TORTELLA et al., 2013a). O uso de resíduos orgânicos ricos em terpenos, como a acícula de pinus, cascas de laranja e folhas de eucalipto, adicionados em um *biobed* na proporção de 5%, indicou índices de degradação de até 80% do mesmo produto (TORTELLA et al., 2013b). Estes estudos indicam que, de forma geral, os terpenos induzem a degradação dos agrotóxicos em *biobeds*.

A adição de antibióticos de uso agrícola, oxitetraciclina e gentamicina, foi avaliada quanto à sua interferência na degradação de alguns agrotóxicos, como forma de uso alternativo do *biobed* para descarte destes produtos. Relatou-se que estes antibióticos não afetaram consideravelmente a performance do *biobed* (HUETE-SOTO et al, 2017). Castillo-González et

al. (2017) afirmaram que a influência dos antibióticos sobre os níveis de degradação dos agrotóxicos depende do tipo de produto e das características da comunidade microbiana do *biobed*, que pode apresentar resistência a alguns antibióticos.

Em relação a estudos sobre o efeito de umidade e temperatura, Gebler et al. (2015) adaptaram a estrutura do *biobed* para a realidade climática do sul brasileiro, realizando testes com reatores colunares de PVC. A profundidade entre 80 cm e um metro foi a que garantiu a melhor eficiência de degradação de clorpirifós e glifosinato, devido à manutenção mais eficiente de temperatura e umidade. Os autores também afirmam que os *biobeds* brasileiros devem ser cobertos por uma cobertura translúcida, devido ao grande índice pluviométrico de boa parte do país, garantindo ainda o acesso da luz solar ao *biobed*. Sem esta cobertura corre-se o risco de que ocorram inundações nos *biobeds*, o que afetaria sua eficiência.

4.3 INFLUÊNCIA DA RIZOSFERA, BIOAUMENTAÇÃO E POPULAÇÕES MICROBIANAS

Considerando que a rizosfera das gramíneas que cobrem o *biobed* é responsável pela dissipação do contaminante e possui microrganismos que auxiliam na degradação do agrotóxico, Urrutia et al. (2015), no Chile, avaliaram esta influência no tratamento de uma mistura de atrazina, clorpirifós e isoproturon. Para isso, montaram em laboratório recipientes contendo a biomistura composta por turfa, solo e casca de aveia, com a presença de cobertura de gramínea e sem esta cobertura. Análises do aumento da atividade da biomassa fúngica indicaram que a degradação mais eficiente ocorreu nos recipientes contendo a rizosfera da gramínea. Ainda, Diez et al. (2017) obtiveram o mesmo resultado, avaliando dissipação de atrazina, clorpirifós e iprodiona, com aumento da degradação pela presença da rizosfera nos 30 cm iniciais de substrato, atingindo níveis superiores a 95%.

Tortella et al. (2010) avaliaram a técnica de bioestimulação através da adição do fertilizante inorgânico NPK (nitrogênio, fósforo, potássio), em diferentes doses, para avaliar a degradação de clorpirifós. Os resultados indicaram que doses de NPK superiores a 0,5% aumentaram as taxas de degradação nos primeiros dias de degradação. Outras doses modificaram a comunidade bacteriana e mostraram resultados menos eficientes.

A associação entre estratégias de otimização também foi avaliada. Campos et al. (2017) verificaram a influência que o melhoramento pela presença da rizosfera e a bioaumentação com bactérias *Arthrobacter* poderia ter sobre a degradação de iprodiona, e relataram que a associação

das duas técnicas permite otimizar o tratamento. A técnica de bioaumentação por fungos ou bactérias tem sido estudada como uma forma de potencializar o processo de biodegradação, utilizando espécies de microrganismos cuja capacidade de degradar o agrotóxico já é conhecida. Esta técnica também permite aumentar a eficiência da degradação de agrotóxicos altamente recalcitrantes, como triazóis e neonicotinóides (LIZANO-FALLAS et al., 2017; MASÍS-MORA et al., 2019).

Na Costa Rica, Rodríguez-Rodríguez et al. (2017) avaliaram a bioaumentação pelo fungo lignolítico *Trametes versicolor* de um *biobed* composto por casca de arroz, material vegetal compostado e solo. De forma geral, a técnica não promoveu um aumento no índice de degradação de carbamatos, mas reduziu a geração de metabólitos. A eficiência do fungo branco *T. versicolor* também foi avaliada na degradação de carbofurano, em um *biobed* composto por palha de arroz, resíduo orgânico e solo, e outro composto por palha de arroz, turfa e solo. A bioaumentação trouxe bons resultados apenas no *biobed* composto por turfa (MADRIGAL-ZÚÑIGA et al., 2016). Díez et al. (2016) avaliaram o efeito da inoculação de três outras espécies de fungos brancos (*Inonotus sp.*, *Stereum hirsutum* e *T. versicolor*). *Stereum hirsutum* trouxe os melhores resultados na degradação de atrazina, depois de 60 dias em incubadora.

Saez et al. (2018) avaliaram a degradação de lindano em um *biobed* inoculado com *T. versicolor* e bactérias *Streptomyces sp.* A degradação foi avaliada na contaminação e recontaminação, e a taxa de degradação foi superior a 80% ao final de 66 dias, devido às técnicas de bioaumentação. Briceño et al. (2017) realizaram testes com o mesmo gênero de bactérias e concluíram que o inóculo promoveu um aumento na taxa de degradação de uma mistura de clorpirifós e diazinon. E Castro-Gutiérrez et al. (2016) identificaram um consórcio de bactérias capazes de degradar carbofurano (*Cupriavidus*, *Achromobacter* e *Pseudomonas*), afirmando que consórcios de organismos podem ser melhores que colônias isoladas para promover a biorremediação de produtos recalcitrantes. Este consórcio foi utilizado na bioaumentação do *biobed* (CASTRO-GUTIÉRREZ et al. 2018), não gerando diferenças na degradação, sendo que o fator que mais influenciou na degradação foi o envelhecimento do substrato.

Desta forma a eficiência da bioaumentação, seja por fungos ou bactérias, depende do tipo de produto que se deseja tratar no *biobed*, e na sua influência sobre cada espécie utilizada. A identificação de um consórcio de espécies, capazes de degradar uma gama de produtos, pode se mostrar a alternativa capaz de trazer as taxas mais altas da degradação de agrotóxicos em *biobeds*, tendo como base os estudos já divulgados.

4.4 FORMAS DE AVALIAR A EFICIÊNCIA DE DEGRADAÇÃO

4.4.1 Análise química e biológica

Na América Latina, algumas técnicas de extração e quantificação de agrotóxicos têm sido adaptadas para o *biobed*, que é composto por uma matriz orgânica complexa que não pode ser analisada através de métodos convencionais desenvolvidos para o solo ou para a água.

Rivero et al. (2016) testaram uma série de métodos analíticos para avaliar a biorremediação de clorpirifós, seus principais metabólitos, e edosulforan, em uma biomistura composta por farelo, turfa e solo. A melhor metodologia para avaliar a degradação dos agrotóxicos foi a extração com etil-acetato com auxílio do ultrassom, cuja análise atingiu uma acurácia de 72% - 109% do agrotóxico remanescente na amostra, após 27 dias. Vareli et al. (2018), no Brasil, divulgaram um método analítico para avaliar a degradação do ditiocarbamato mancozebe, utilizando cromatografia gasosa através do método de espectrometria de massa em tandem (GC-MS). A metodologia atingiu uma acurácia de 89% - 96% na recuperação do produto remanescente na amostra.

Pesquisadores chilenos utilizaram cromatografia líquida de alta performance (HPLC) após extração com acetona, seguida de um detector de matriz de diodos, para avaliar as concentrações residuais de clorpirifós, atrazina, carbendanzin e diazinon em *biobeds* (FERNÁNDEZ-ALBERTI et al., 2012; DIEZ et al., 2013b; BRICEÑO et al., 2016). Na Costa Rica, a quantificação tem sido realizada através de cromatografia líquida de ultra performance acoplada à espectrometria de massas sequencial (LC-MS/MS), na avaliação de carbofurano (CHIN-PAMPILLO et al., 2015), carbofurano e oxitetraciclina (JIMÉNEZ-GAMBOA et al., 2018), clorpirifós com antibióticos (CASTILLO-GONZÁLEZ et al., 2017), oxitetraciclina e herbicidas (CAMBRONERO-HEINRICHS et al., 2018), entre outros.

Estudos de mineralização utilizando compostos radiomarcados e técnicas com líquidos fluorescentes também são aplicados na Costa Rica, para determinar a oxidação completa de agrotóxicos. Ruiz-Hidalgo et al. (2014) descreveram o uso da técnica na avaliação da mineralização de carbofurano, Castillo-González et al (2017) aplicaram este método para clorpirifós, e Rodríguez Castillo et al. (2018) na avaliação da mineralização de imidacloprida, um produto altamente recalcitrante, identificando que a biomistura reduziu a meia-vida do produto, que atingiu 3.466 dias na biomistura e 8.667 dias no solo.

Gebler et al. (2015) utilizaram do método de hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), para avaliar a atividade microbiana da amostra de um *biobed* tradicional contaminado por clorpirifós e glufosinato de amônia, com algum sucesso na identificação de tendências de decomposição dos contaminantes. Tortella et al. (2013b) também aplicaram FDA para monitorar a atividade hidrolítica de um *biobed* adicionado de terpenos sintéticos, na degradação de atrazina. A técnica de FDA apresentou resultados similares aos obtidos na atividade da enzima fenoloxidase, que também foi avaliada pelos autores. Em Tortella et al. (2013a), a atividade enzimática foi utilizada para avaliar os impactos de atrazina sobre a comunidade microbiana de um *biobed*. A atividade da fenoloxidase, da fosfatase ácida e alcalina, e a atividade desidrogenase (DHA), mostraram que a atrazina pode inibir ou estimular a microbiota, sendo que os efeitos negativos ocorrem momentos após a aplicação do agrotóxico, apresentando uma melhora com o passar do tempo.

4.4.2 Ensaios ecotoxicológicos

Alguns organismos não-alvo são utilizados em ensaios ecotoxicológicos, de acordo com metodologias estabelecidas, devido à sua alta sensibilidade a poluentes, e a qualquer mudança em seu ambiente. Esta sensibilidade permite estimar níveis de redução da ecotoxicidade, a partir da resposta destes organismos diante do contato com a biomistura contaminada. Ensaios ecotoxicológicos combinados com análises químicas permitem avaliar a segurança ambiental das biomisturas contaminadas e envelhecidas (MASIN et al., 2018; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

Na Costa Rica, Huete-Soto et al, (2017) realizaram testes ecotoxicológicos com o microcrustáceo *Daphnia magna* e testes de germinação de sementes *Lactuca sativa*, em um *biobed* composto por fibra de coco, material vegetal compostado e solo, para verificar a degradação de um grupo de agrotóxicos e oxitetraciclina, ao longo de 115 dias. As análises químicas mostraram que os níveis de remoção para herbicidas foram mais altos, e não houveram resultados significativos com relação aos neocotinóides e triazóis avaliados. Além disso, não se observou uma redução da ecotoxicidade para *D. magna*, somente para a fitotoxicidade. Lizano-Fallas et al. (2017) realizaram os mesmos ensaios para avaliar a degradação de uma mistura de clorpirifós e três herbicidas do grupo das triazinas. Neste caso os resultados foram invertidos, ou seja, a ecotoxicidade para *D. magna* reduziu rapidamente ao longo de 60 dias de tratamento, e não se observaram mudanças significativas para *L. sativa*.

No Brasil, Carniel (2015) realizou ensaios de toxicidade crônica com colêmbolos (*Folsomia candida*), minhocas (*Eisenia andrei*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*), para comparar a eficiência de um *biobed* de campo e de dois tipos de solos subtropicais, na degradação de uma mistura de mancozebe e clorpirifós, ao receberem uma sequência de aplicações destes produtos. Todos os tratamentos mostraram ecotoxicidade aos 90 e 270 dias após o descarte dos resíduos. Ao final de 420 dias de tratamento não foram mais observados efeitos ecotoxicológicos em um dos solos testados (Nitossolo) e no *biobed*. A autora também avaliou a degradação de um litro de clorpirifós descartado no *biobed* uma única vez, de forma que representaria o pior cenário de contaminação. A partir de ensaios com os mesmos organismos citados anteriormente, e após 420 dias de tratamento em campo, foram observados efeitos negativos significativos apenas sobre a reprodução de colêmbolos. Afirmou-se que ensaios de reprodução com colêmbolos são uma boa opção para monitorar a eficiência de *biobeds*.

No estudo de Gebler et al. (2015) foram utilizadas minhocas para avaliar a degradação de glufosinato de amônia e clorpirifós em um *biobed* padrão. As minhocas reagiram rapidamente às concentrações do contaminante, tendo altas taxas de mortalidade, e com o passar do tempo começaram a mostrar preferência pelo material contaminado, em testes de fuga. Também foi avaliada a redução da ecotoxicidade de mancozebe e clorpirifós em uma segunda etapa, em *biobeds* tradicionais, utilizando ensaios de reprodução com *Eisenia foetida*, *E. crypticus* e *F. candida*. Os colêmbolos tiveram uma taxa de reprodução baixa no início do teste, e um aumento desta taxa à medida que os produtos foram degradados no *biobed*. Na Tabela 2 encontra-se uma síntese destes e dos demais testes ecotoxicológicos divulgados na América Latina até o período desta revisão.

Deve-se considerar que a sensibilidade dos organismos-teste depende do tipo de agrotóxico avaliado. Sendo assim, informações a respeito da resposta de cada organismo a determinado produto podem auxiliar na definição da melhor espécie a ser utilizada para o propósito de biomonitoramento de *biobeds*. Considera-se importante que ao menos um dos organismos selecionados seja representante da fauna edáfica, já que o descarte das biomisturas envelhecidas, após o período de degradação dos agrotóxicos, deve ocorrer no solo. Desta forma os ensaios ecotoxicológicos, por si só, possuem capacidade de indicar o perigo potencial que esta biomistura poderia representar para aquele ecossistema.

Tabela 2 – Organismos-teste, Endpoints, e Agrotóxicos avaliados em ensaios de ecotoxicidade de *biobeds* na América-Latina.

Bioindicador	Endpoint	Agrotóxico(s)	Referência
<i>D. magna</i> / <i>L. sativa</i>	Imobilização (ensaio agudo) / Germinação de sementes	Diversar misturas: atrazina, ametrina, linuron, imidacloprid, tiametoxam, carbendazim, metalaxil, tebuconazole, triadimenol	Huete-Soto et al., 2017
<i>D. magna</i> / <i>L. sativa</i>	Imobilização (ensaio agudo) / Germinação de sementes	Mistura: atrazina, terbutilazina, terbutrin, clorpirifós	Lizano-Fallas et al., 2017
<i>D. magna</i>	Imobilização (ensaio agudo)	Mistura: aldicarbe, carbofuran, metiocarbe, metomil	Rodríguez-Rodríguez et al., 2017
<i>D. magna</i>	Imobilização (ensaio agudo)	Mistura: metalaxil, Epoxiconazole, Fenbuconazole, Carbendanzim, Tebuconazole, Triadimenol, edifenphos.	Murillo-Zamora et al., 2017
<i>D. magna</i>	Imobilização (ensaio agudo)	Mistura: carbofuran e clorpirifós	Chin-Pampillo et al., 2016
<i>D. magna</i> / <i>Oreochromis aureus</i>	Reprodução semi-estática (ensaio crônico) / Alterações fisiológicas	Carbofuran	Ruiz-Hidalgo et al., 2016b
<i>E. fetida</i>	Sobrevivência (ensaio agudo) / Reprodução (ensaio crônico)	Glifosato	Masin et al., 2018
<i>F. candida</i> / <i>E. crypticus</i> / <i>E. fetida</i> / <i>L. sativa</i>	Reprodução (ensaio crônico) / Fuga / Germinação	Mistura: glufosinato de amônia e clorpirifós / mancozebe e clorpirifós	Gebler et al., 2015
<i>F. candida</i> / <i>E. crypticus</i> / <i>E. andrei</i>	Reprodução (ensaio crônico)	Mistura: mancozebe e clorpirifós	Carniel, 2015

Fonte: O autor (2019).

5. DESAFIOS PARA A IMPLANTAÇÃO DE *BIOBEDS*

Considerando que a Guatemala é o único país latino-americano onde o *biobed* é utilizado como tecnologia oficial, discute-se sobre o momento em que os outros países da região podem atingir este ponto. A principal diferença entre os dois casos foi abordada anteriormente nesta revisão. Na Guatemala, a iniciativa partiu de uma instituição privada associada à indústria de agrotóxicos (AGREQUIMA, 2019). Nos outros países latino-americanos a iniciativa de estudar o *biobed* vem de instituições públicas, que já apresentam resultados promissores que permitiriam que a tecnologia fosse aplicada no campo. Porém, em todos esses casos ainda é necessário que o *biobed* torne-se a tecnologia oficial de descarte de resíduos de agrotóxicos no campo.

Além de ter definido normas oficiais que regem o gerenciamento e descarte de resíduos de agrotóxicos, a Guatemala forneceu ainda um guia oficial para isso, através do uso do *biobed*. Informações foram obtidas a partir do contato com pesquisadores e agentes de instituições governamentais da Argentina, Chile, Brasil, Costa Rica, Honduras, Paraguai e Uruguai. Todos estes países possuem leis relacionadas a agrotóxicos, com exceção do Chile, que não possui legislação específica abordando o descarte de agrotóxicos, e da Argentina, que não possui leis específicas para reger o uso de agrotóxicos. Porém, nenhum destes países possui um guia ou documento oficial que indique a forma correta de descartar resíduos de agrotóxicos, com a exceção daqueles classificados como Poluentes Orgânicos Persistentes (POP), como os organoclorados.

Apenas Argentina e Paraguai declararam que, como na Guatemala, existe um interesse do setor particular no assunto, o que vem gerando avanços relacionados à padronização ou regularização metodológica pelo governo. Nos outros países consultados não se observa um apoio explícito deste setor, em relação à aplicação do *biobed* como uma solução para os problemas relacionados ao descarte incorreto de resíduos de agrotóxicos. Apesar disso todos os países citados possuem algum interesse governamental em sistemas para descarte de agrotóxicos, inclusive *biobeds*. A principal forma de abordar o *biobed* tem sido através de programas de Boas Práticas Agrícolas (BPA), ou através de manuais produzidos por instituições de pesquisa, como exemplo do que ocorre no Brasil (GEBLER, 2015; GEBLER, 2017a), Chile (DIEZ et al., 2013c), Costa Rica (CICA, 2015; MAG, 2019) e Uruguai (DIGEGRA, 2014). Estes documentos e todos os estudo latino-americanos publicados objetivam que a tecnologia do *biobed* tenha um bom custo-benefício e esteja de acordo com o exigido pelas leis oficiais de cada país. A aplicação do *Biobed* daria suporte às exigências dos órgãos de fiscalização no cumprimento de demandas que derivem da implementação dessas leis e, ao mesmo tempo, garante segurança técnica e jurídica aos produtores rurais.

As BPA constituem uma ferramenta para a gestão de riscos, tendo sua aplicação monitorada pelos órgãos de fiscalização (IICA, 2017). Estas ferramentas são desenvolvidas especificamente para cada propriedade agrícola e são voltadas para a proteção ambiental, segurança dos trabalhadores e dos animais, e inocuidade alimentar. Permitem então que o produtor identifique ações ambientalmente corretas a serem tomadas durante toda a atividade produtiva, desde o momento do plantio, uso de defensivos agrícolas, colheita, transporte de produtos e gerenciamento de resíduos (GEBLER, 2015; IICA, 2017).

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

Uma das principais questões que garante a aplicação eficiente de *biobeds* na América Latina é o estudo de novos substratos. Diante de alguns resultados positivos, pode-se afirmar que é possível desenvolver biomisturas tão eficientes quanto a original (com palha de trigo, turfa e solo agrícola). É importante que, antes da efetiva aplicação da tecnologia, estes novos substratos locais tenham sua eficiência validada no laboratório, em escala piloto, e também em campo. A avaliação do tempo e eficiência de degradação de todos os agrotóxicos que possam ser utilizados no *biobed*, de acordo com cada região para a qual ele está sendo testado, também é uma etapa importante.

A alta persistência de neonicotinóides, triazóis e organoclorados deve ser levada em consideração no processo de adaptação das biomisturas, sendo esta considerada como uma das principais falhas a ser preenchida pelos próximos estudos (MASÍS-MORA et al., 2019; HUETE-SOTO et al., 2017; RIVERO et al., 2016). Adaptações estruturais para garantir a eficiência do sistema na realidade climática de cada país ou região, e para evitar riscos de vazamento de agrotóxicos para o solo e lençol freático, também devem continuar a ser estudadas. Incluindo-se estudos para a aplicação do *biobed* como instrumento de proteção de águas (superficiais e subterrâneas) no âmbito de bacias hidrográficas, a exemplo do ocorrido na Inglaterra (FOGG et al., 2003; FOGG et al., 2004).

Levando em consideração a alta eficiência do *biobed* em degradar uma gama de agrotóxicos, outro foco dos estudos latino-americanos deve ser o seu uso para tratar efluentes agroindustriais. Como foi proposto na Grécia, aonde o *biobed* foi eficientemente aplicado para otimizar o tratamento de efluentes contaminados por agrotóxicos, provenientes de uma indústria de seleção e embalagem de frutas (KARAS et al., 2015; KARAS et al., 2016).

As pesquisas avançaram e tornaram disponíveis informações técnicas a respeito do sistema *biobed*, mostrando que ele é mais seguro que as soluções utilizadas atualmente para descarte deste tipo de resíduo, que é, na maioria das vezes, disposto no solo. É necessário envolver a comunidade e as instituições privadas do setor agrícola (indústria, comércio e usuários), para que a temática seja discutida e oficializada, para propósitos de segurança ambiental. Como ocorre nos países europeus, em que o *biobed* é utilizado para este fim. Por ser um sistema simplificado e de baixo custo, com eficiência de tratamento cientificamente comprovada, o *biobed* representa uma solução rápida e concreta para os problemas de manejo

ou destinação inadequados de resíduos de agrotóxicos, causadores da contaminação ambiental pontual observada nos países latino-americanos.

REFERÊNCIAS

ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10004: Resíduos sólidos**: Classificação. Rio de Janeiro, 2004. 71 p.

AGREQUIMA. **Presentaciones biodep**. Disponível em: <https://agrequima.com.gt/site/presentaciones-biodep/#>. Acesso em: 15 mar. 2019.

ARAÚJO, E. A.; FERNANDES, S. D.; ROQUE, F.; DELGADO, M. N. Levantamento de plantas fitossanitárias utilizadas no manejo de pragas agrícolas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Nota Agroecológica. v.13, n.4, p.163-174, 2018.

BIOBEDS.ORG. **The international biobed site**. Disponível em: <https://bricksite.com/biobed>. Acesso em: 15 mai. 2019.

BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder legislativo, Brasília, 11 de Julho de 1989.

BRICEÑO, G.; TORTELLA, G.; RUBILAR, O.; PALMA, G.; DIEZ, M. C. Advances in chile for the treatment of pesticide residues: biobeds technology. p. 53-66, 2014. In: ALVAREZ, A.; POLTI, M. A. **Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives**. Springer, 2014. DOI 10.1007/978-3-319-05738-5

BRICEÑO, G.; VERGARA, K.; Schalchli, H.; PALMA, G.; TORTELLA, G.; FUENTES, M. S.; DIEZ, M. C. Organophosphorus pesticide mixture removal from environmental matrices by a soil *Streptomyces* mixed culture. **Environmental Science and Pollution Research**, Advances in environmental biotechnology and engineering – 2016, 12p.; 2017. DOI 10.1007/s11356-017-9790-y.

CALDAS, E. D. toxicological Aspects of Pesticides. p. 275-305, 2019. In: Vaz Jr. S. (eds) **Sustainable Agrochemistry**. Springer, Cham., 2019. DOI 10.1007/978-3-030-17891-8_9

CAMBRONERO-HEINRICHS, J. C.; MASÍS-MORA, M.; QUIRÓS-FOURNIER, J. P.; LIZANO-FALLAS, V.; MATA-ARAYA, I.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., 2018. Removal of herbicides in a biopurification system is not negatively affected by oxytetracycline or fungally pretreated oxytetracycline. **Chemosphere**, v.198, p.198-203. DOI 10.1016/j.chemosphere.2018.01.122

CAMPOS, M.; PERRUCHON, C.; KARAS, P. A.; KARAVASILIS, D.; DIEZ, M. C.; KARPOUZAS, D. G. Bioaugmentation and rhizosphere-assisted biodegradation as strategies for optimization of the dissipation capacity of biobeds. **Journal of Environmental Management**, v. 187, p. 103-110, 2017. DOI 10.1016/j.jenvman.2016.11.031.

CARTER, A. How pesticides get into water – and proposed reduction measures. **Pesticide Outlook**, p. 149 – 156, ago./2000. DOI 10.1039/b006243j

CARNIEL, L. S. C. Avaliação do risco ecológico de mancozebe e clorpirifós para representantes da

macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, 140 p., 2015.

CASTILLO, M. del P.; TORSTENSSON, L.; STENSTROM, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 6206-6219, 2008.

CASTILLO-GONZÁLEZ, H. PÉREZ-VILLANUEVA, M.; MASÍS-MORA, M.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Antibiotics do not affect the degradation of fungicides and enhance the mineralization of chlorpyrifos in biomixtures. **Ecotoxicology Environmentally Safety**, v. 139, p. 481–487, 2017. DOI 10.1016/j.ecoenv.2017.02.008

CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; CAMINAL, G.; VICENT, T.; CARAZO-ROJAS, E.; MORA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. A microbial consortium from a biomixture swiftly degrades high concentrations of carbofuran in fluidized-bed reactors. **Process Biochemistry**. v.51, p.1585-1593, 2016. DOI 10.1016/j.procbio.2016.07.003

CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; DIEZ, M. C.; TORTELLA, G. R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Aging of biomixtures: Effects on carbofuran removal and microbial community structure. **Chemosphere**, v. 168, p. 418-425, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.10.065

CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; CARAZO-ROJAS, E.; MORA-LÓPEZ, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Impact of oxytetracycline and bacterial bioaugmentation on the efficiency and microbial community structure of a pesticide-degrading biomixture. **Environmental Science and Pollution Research**. 13p, Fev/2018. DOI 10.1007/s11356-018-1436-1

CHIN-PAMPILLO, J. S.; RUIZ-HIDALGO, K.; MASÍS-MORA, M.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Design of an optimized biomixture for the degradation of carbofuran based on pesticide removal and toxicity reduction of the matrix. **Environmental Science Pollution Research**. v.22, p.19184-19193. 2015. DOI 10.1007/s11356-015-5093-3

CHIN-PAMPILLO, J. S.; MASÍS-MORA, M.; RUIZ-HIDALGO, K.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; E. Removal of carbofuran is not affected by co-application of chlorpyrifos in a coconut fiber/compost based biomixture after aging or pre-exposure. **Journal of Environmental Sciences**, v. 46, p. 182–189, 2016. DOI 10.1016/j.jes.2015.12.026.

CICA – CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN CONTAMINACIÓN AMBIENTAL. **Manual de uso de biobeds**. Universidad de Costa Rica, San José – CR, 2015.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Resolução nº 481, de 03 de outubro de 2017**. Estabelece critérios e procedimentos para garantir o controle e a qualidade ambiental do processo de compostagem de resíduos orgânicos, e dá outras providências. Out./2017.

_____. **Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011**. Dispõe sobre as condições e padrões de

lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA. Mai./2011.

COOPER, R. J.; FITT, P.; HISCOCK, K. M.; LOVETT, A. A.; GUMM, L.; DUGDALE, S. J.; RAMBOHUL, J.; WILLIAMSON, A.; NOBLE, L.; BEAMISH, J.; HOVESEN, P., 2016. Assessing the effectiveness of a three-stage on-farm biobed in treating pesticide contaminated wastewater, *J. Environ. Man.* v.181, p.874-882. DOI 10.1016/j.jenvman.2016.06.047

DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition.** v.10, n.3, p.244-267, 2010.

DIEZ, M. C.; TORTELLA, G. R.; BRICEÑO, G.; CASTILLO, M. DEL P.; DÍAZ, J.; PALMA, G. ALTAMIRANO, C.; CALDERÓN, C.; RUBILAR, O. Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses. **Electronic Journal of Biotechnology.** 11p., 2013a. DOI 10.2225/vol16-issue6-fulltext-17.

DIEZ, M. C.; LEVIO, M.; BRICEÑO, G.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.; GALLARDO, F. Biochar as a partial replacement of peat in pesticide-degrading biomixtures formulated with different soil types. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy,** v. 7, p. 1–7, 2013b. DOI 10.1166/jbmb.2013.1376

DIEZ, M. C.; CIFUENTES, G. P.; QUIJADA, C. A.; BRICEÑO, G.; RAMÍREZ, C. C.; SÁNCHEZ, J. D.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. Manual de construcción y operación de lechos biológicos. Proyecto D09R1006. **Ediciones Universidad de La Frontera,** Universidad de La Frontera, Instituto de Agroindustria, Chile, abr./2013c.

DIEZ, M. C.; ELGUETA, S.; SANTOS, C.; LIMA, N. Atrazine dissipation in a biobed system inoculated with immobilized white-rot-fungi. **Archives of Agronomy and Soil Science,** 2016. DOI: 10.1080/03650340.2016.1155699

DIEZ, M. C.; ELGUETA, S.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; SCHALCHLI, H.; BORNHARDT, C.; GALLARDO, F. Pesticide dissipation and microbial community changes in a biopurification system: influence of the rhizosphere. **Biodegradation,** v. 28, p. 395–412, 2017. DOI 10.1007/s10532-017-9804-y

DIGEGRA - DIRECCIÓN GENERAL DE LA GRANJA. **Guia de Buenas Prácticas Agrícolas para la producción de frutas y hortalizas frescas en Uruguay.** Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Uruguay, 77p., 2014.

EUROPEAN COMMISSION. **Priority substances under the water framework directive,** 2016. Disponível em: http://ec.europa.eu/environment/water/waterdangersub/pri_substances.htm#dir_prior. Acesso em: 18 mar./2019.

FERNÁNDEZ-ALBERTI, S.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. Chlorpyrifos degradation in a Biomix: Effect of pre-incubation and water holding capacity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition,** V. 12 (4), P. 785-799, 2012.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária e Ambiental,** v.14 n.1, p. 69-78, jan/mar 2009.

FOGG, P.; BOXALL, A. B. A.; WALKER, A.; JUKES, A. Pesticide degradation in a biobed

composting substrate. **Pest Management Science**, v. 59, n. 5, p. 527-537, May/2003.

_____. Degradation and leaching potential of pesticides in biobed systems. **Pest Management Science**, v. 60, p. 645–654, 2004.

GEBLER, L., FIALHO, F. B. Introduzindo critérios de risco em modelos de contaminação pontual para locais de carga de agrotóxicos. **Pesticidas: relação ecotoxicológica e meio ambiente**, Curitiba, v. 21, p. 85-94, jan./dez. 2011.

GEBLER, L.; PIZZUTTI, I. R.; CARDOSO, C. D.; KLAUBERG FILHO, O.; MIQUELLUTI, D. J.; SANTOS, R. S. S. Bioreactors to Organize the Disposal of Phytosanitary Effluents of Brazilian Apple Production. **Chemical engineering transactions**, v.43, 2015.

GEBLER, L. **Sistema Biobed Brasil: Tecnologia para Disposição Final de Efluentes Contaminados com Agrotóxicos Originados na Produção de Frutas de Clima Temperado**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2015, 47p. (EMBRAPA UVA E VINHO. Documentos: 94).

GEBLER, L. **Orientações para o Dimensionamento e Operação de Biobeds no Brasil**. Comunicado Técnico, 204. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 5p, 2017a.

GEBLER, L. Workshop Latino Americano sobre Biobed. **Anais do III Workshop Latino Americano sobre Biobed**, Bento Gonçalves, RS, set./2017, Embrapa Uva e Vinho, 2017b. 34 p. (Documentos, 104).

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, V. R.; QUINTAL-FRANCO, C.; ARENA-ORTIZ, M. L.; GIÁCOMAN-VALLEJOS, G.; PONCE-CABALLERO, C. Identification of microbial species present in a pesticide dissipation process in biobed systems using typical substrates from southeastern Mexico as a biomixture at a laboratory scale. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 528–538, 2018. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.02.082.

HUETE-SOTO, A.; MASÍS-MORA, M.; LIZANO-FALLAS, V.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: Detoxification and effect of oxytetracycline. *Chemosphere*. v.169, p. 558 – 567, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.11.106.

IICA - Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura. **Boas práticas agrícolas para uma agricultura mais resiliente: Diretrizes para orientação de produtores**. San José, Costa Rica: IICA, 72 p., 2017.

JACQUES, J.; SAMPAIO, F.; SANTOS, H. T.; MARCHIORO, C. A. Climate change and voltinism of *Mythimna sequax*: the location and choice of phenological models matter. **Agricultural and Forest Entomology**. v.21, p. 431–444, 2019. DOI 10.1111/afe.12350

JIMÉNEZ-GAMBOA, D.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; DRICEÑO-GUEVARA, S.; MASÍS-MORA, M.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; MORA-LÓPEZ, M.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., 2018. Expanding the application scope of on-farm Biopurification systems: Effect and removal of oxytetracycline in a biomixture. **Journal of**

Hazardous Materials, v.342, p.553-560. DOI 10.1016/j.jhazmat.2017.08.059

KARAS, P.; METSOVITI, A.; ZISIS, V.; EHALIOTIS, C.; OMIROU, M.; PAPADOPOULOU, S.; MENKISSOGLU-SPIROUDI, U.; MANTA, S.; KOMIOTIS, D.; KARPOUZAS, D. G., 2015. Dissipation, metabolism and sorption of pesticides used in fruit-packaging plants: Towards an optimized depuration of their pesticide-contaminated agroindustrial effluents. **Science of the Total Environment**, v.530-531, p.129-139. DOI 10.1016/j.scitotenv.2015.05.086

KARAS, P.; PERRUCHON, C.; KARANASIOS, E.; PAPADOPOULOU, E. S.; MANTHOU, E.; SITRA, S.; EHALIOTIS, C.; KARPOUZAS, D. G., 2016. Integrated biodepuration of pesticide-contaminated wastewaters from the fruit-packaging industry using biobeds: Bioaugmentation, risk assessment and optimized management. **J. Hazard. Mater.** v.320, p.635-644. DOI 10.1016/j.jhazmat.2016.07.071

LECHOS BIOLOGICOS. Início da página: **Lechos Biologicos.CL**. Disponível em: <https://lechosbiologicos.wordpress.com/> Acesso em: 15 mar. 2019.

LESCANO, M. R.; PIZZUL, L.; CASTILLO, M.D.P.; ZALAZAR, C.S. Glyphosate and aminomethylphosphonic acid degradation in biomixtures based on alfalfa straw, wheat stubble and river waste. **Journal of Environmental Management**, 228, p. 451–457, 2018. DOI j.jenvman.2018.09.009

LIZANO-FALLAS, V.; MASÍS-MORA, M.; ESPINOZA-VILLALOBOS, D.; LIZANO-BRENES, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. **Chemosphere**, v. 182, p. 106-113, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2017.04.147

MADRIGAL-ZÚÑIGA, K.; RUIZ-HIDALGO, K.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; MASÍS-MORA, M.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Fungal bioaugmentation of two rice husk-based biomixtures for the removal of carbofuran in on-farm biopurification systems. **Biology and Fertility of Soils**, v.52, p.243-250, 2016. DOI 10.1007/s00374-015-1071-7

MAG - MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA., 2019. **Manual de buenas prácticas agrícolas para la producción sostenible del cultivo de la piña (*Ananas comosus L.*)**. Servicio Fitosanitario del Estado. San José, Costa Rica : MAG-SFE/IICA/INTA/MINAE/MS/AYA, 2019. 2 ed., 88 p. Disponível em: <https://www.sfe.go.cr/SitePages/Publicaciones.aspx>. Acesso em: 25 nov. 2019.

MASIN, C. E.; LESCANO, M. R.; RODRÍGUEZ, A. R.; GODOY, J. L.; ZALAZAR, C. S. Earthworms to assess the innocuousness of spent biomixtures employed for glyphosate degradation. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 2018. DOI 10.1080/03601234.2018.1462922

MASÍS-MORA, C.; LIZANO-FALLAS, V.; TORTELLA, G.; BEITA-SANDÍ, W.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., 2019. Removal of triazines, triazoles and organophosphates in biomixtures and application of a biopurification system for the treatment of laboratory wastewaters. **Chemosphere**, v..233, p. 733-743. DOI 10.1016/j.chemosphere.2019.06.001

MEYER, M. C.; CAMPOS, H. D.; GODOY, C. V.; UTIAMADA, C.; OLIVEIRA, M. C.; JACCOUD

FILHO, D. S.; VENANCIO, W. S.; MEDEIROS, F. H. V.; JULIATTI, F. C.; CARNEIRO, J. C.; NUNES JPUNIOR, J.; MARTINS, M. C. Experimentos cooperativos de controle biológico de *Sclerotinia sclerotiorum* na cultura da soja: Resultados sumarizados da safra 2018/2019. **Embrapa**, Circular Técnica, 155. Londrina, PR, 2019.

MURILLO-ZAMORA, S.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; LIZANO-FALLAS, V.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Elimination of fungicides in biopurification systems: Effect of fungal bioaugmentation on removal performance and microbial community Structure. **Chemosphere**, v. 186, p. 625-634, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2017.07.162

MS – MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Dez., 2011.

RIVERO, A.; NIELL, S.; CERDEIRAS, M. Pía; HEINZEN, H.; CESIO, M. V. Development of analytical methodologies to assess recalcitrant pesticide bioremediation in biobeds at laboratory scale. **Talanta**, v. 153, p. 17–22, 2016. DOI 10.1016/j.talanta.2016.02.025

RODRÍGUEZ-CASTILLO, G.; MOLINA- RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ-VILLANUEVA, M.; MASÍS-MORA, M.; RODRÍGUEZ- RODRÍGUEZ, C. Removal of two neonicotinoid insecticides and mineralization of 14C-imidacloprid in biomixtures. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, 2018. DOI 10.1007/s00128-018-2370-0

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; RUIZ-HIDALGO, K. On-farm biopurification systems: role of white rot fungi in depuration of pesticide-containing wastewaters. **Federation of European Microbiological Societies**. v. 345, p. 1-12, 2013. DOI 10.1111/1574-6968.12161

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; MADRIGAL-LEÓN, K.; MASÍS-MORA, M.; PÉREZ-VILLANUEVA, M. P.; CHIN-PAMPILLO, J. S. Removal of carbamates and detoxification potential in a biomixture: Fungal bioaugmentation versus traditional use. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 252–258, 2017. DOI 10.1016/j.ecoenv.2016.10.011

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; LIZANO-FALLAS, V. Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in biopurification systems. In: BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N. **Toxicity and biodegradation testing: Methods in pharmacology and toxicology**. Springer Science+Business Media, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7425-2

RUIZ-HIDALGO, K. CHIN-PAMPILLO, J. S.; MASÍS-MORA, M.; CARAZO, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., 2014. Degradation of carbofuran by *Trametes versicolor* in rice husk as a potential lignocellulosic substrate for biomixtures: From mineralization to toxicity reduction. **Process Biochemistry**. v.49, p.2266-2271. DOI 10.1016/j.procbio.2014.10.006

RUIZ-HIDALGO, K.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; MASÍS-MORA, M.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Optimization of a Fungally Bioaugmented Biomixture for Carbofuran Removal in On-Farm Biopurification Systems. **Water Air Soil Pollution**, v. 227:3, 14p.,

2016a. DOI 10.1007/s11270-015-2681-2

RUIZ-HIDALGO, K.; MASÍS-MORA, M.; BARBIERI, E.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Ecotoxicological analysis during the removal of carbofuran in fungal bioaugmented matrices. **Chemosphere**, v. 144, p. 864–871, 2016b. DOI 10.1016/j.chemosphere.2015.09.056

SAEZ, J. M.; BIGLIARDO, A. L.; RAIMONDO, E. E.; BRICEÑO, G. E.; POLTI, E. A.; BENIMELI, C. S. Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.156, p. 97–105, 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.03.011

TORSTENSSON, L.; CASTILLO, M. del P. Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spray equipment. **Pesticide Outlook**, v.8, p.24-27, 1997.

TORSTENSSON, L. Experiences of biobeds in practical use in Sweden. **Pesticide Outlook**. Oct. 2000, p. 206-211, 2000.

TORTELLA, G.R.; RUBILAR, O.; CEA, M.; WULFF, C.; MARTÍNEZ, O.; MIEZ, M. C. Biostimulation of agricultural biobeds with NPK fertilizer on chlorpyrifos degradation to avoid soil and water contamination. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 4, p. 464 – 475, 2010.

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; CASTILLO, M. P.; CEA, M.; MELLA-HERRERA, R.; DIEZ, M. C. Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. **Chemosphere**, v.88, p.224–228, 2012. DOI 10.1016/j.chemosphere.2012.02.072

TORTELLA, G. R.; MELLA-HERRERA, R. A.; SOUSA, D. Z.; RUBILAR, O.; ACUÑA, J. J.; BRICEÑO, G.; DIEZ, M. C. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 459– 467, 2013a. DOI 10.1016/j.jhazmat.2013.05.059

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; CEA, M.; BRICEÑO, G.; QUIROZ, A.; DIEZ, M. C.; PARRA, L. Natural wastes rich in terpenes and their relevance in the matrix of an on-farm biopurification system for the biodegradation of atrazine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 8-15, 2013b. DOI 10.1016/j.ibiod.2013.06.003

URRUTIA, C.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. Degradation of pesticide mixture on modified matrix of a biopurification system with alternatives lignocellulosic wastes. **Chemosphere**, v. 92, p. 1361–1366, 2013. DOI 10.1016/j.chemosphere.2013.04.088

URRUTIA, C.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.; CASTILLO, J. M.; ROMERO, E.; AZCÓN, R.; CASTILLO, M. del P.; DIEZ, M. C. Influence of the rhizosphere in a biopurification system on the dissipation of a pesticide mixture. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.15, n.4, p.914-927, 2015.

VARELI, C. S.; PIZZUTTI, I. R.; GEBLER, L.; CARDOSO, C. D.; GAI, D. E. H.; FONTANA, M. E. Z. Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in biobeds in South of Brazil. **Talanta**, 22 p., 2018. DOI 10.1016/j.talanta.2018.03.009

CAPÍTULO 2

COMUNIDADE FÚNGICA EM *BIOBEDS*: MATURAÇÃO BIOLÓGICA DAS BIOMISTURAS, ISOLAMENTO DE FUNGOS E EXPOSIÇÃO A UM INSETICIDA ORGANOFOSFORADO

RESUMO

O sistema *biobed* foi desenvolvido para receber descarte de efluentes de agrotóxicos na propriedade agrícola, proporcionando a degradação destes resíduos e reduzindo a contaminação ambiental. A eficiência do *biobed* depende da ação da microbiota que se desenvolve em seu substrato. Esta microbiota, por sua vez, depende da umidade, disponibilidade de nutrientes e matéria orgânica, que são variáveis de acordo com o tipo de substrato que compõe o *biobed*. O presente trabalho buscou avaliar o desenvolvimento fúngico em três biomisturas para *biobeds*: o *biobed* padrão (BP), composto por solo agrícola, palha e turfa; e dois *biobeds* alternativos, um recebendo acícula de pinus (BA) e outro recebendo húmus de minhoca (BH), em substituição à turfa. A maturação biológica dos *biobeds* pela comunidade fúngica foi avaliada quinzenalmente ao longo de 90 dias, através da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), seguida de estudos para entender a resposta desta comunidade (UFC) e dos organismos isolados (crescimento micelial em um meio de cultura), ao contato com o inseticida organofosforado fosmete. Os dados de UFC foram avaliados pela ANOVA seguida pelo teste estatístico de Tukey ($p < 0,05$). O crescimento micelial dos isolados de fungos, em um meio de cultura sólido adicionado de 100 mg L^{-1} de fosmete, foi avaliado através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney ($p < 0,10$), pela comparação das placas testemunha com as placas contaminadas. O estudo da maturação biológica mostrou um aumento significativo na quantidade de UFC após a primeira quinzena, e um número maior de fungos em BA ($3,72 \pm 2,04 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$). Após a aplicação do fosmete, a resposta da comunidade de fungos de BA contaminado apresentou uma queda que perdurou durante os 90 dias de avaliação da degradação do produto ($1,68 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ na biomistura contaminada, contra $2,73 \times 10^4 \text{ UFC g}^{-1}$ na biomistura limpa); em BH e BP a queda no número de UFC ocorreu apenas entre as épocas de avaliação (zero dias e 90 dias). Entre os isolados de fungos que tiveram seu crescimento micelial em fosmete avaliado, 11% apresentaram o crescimento impulsionado pelo contato com o produto. Estes fungos foram isolados no período entre a primeira e a quarta quinzena de maturação biológica, sendo originários de BA ou BP. A partir destes resultados, é possível indicar que o melhor período para contaminar os *biobeds* foi a partir dos 30 dias de maturação biológica, por ser neste período que foi encontrada a maior abundância de fungos.

Palavras-chave: Crescimento Micelial; Fosmete; Unidades Formadoras de Colônias.

ABSTRACT

Biobeds were designed to receive pesticide effluents on the rural property, allowing these residues to be degraded, and reducing environmental contamination. The efficiency of this system depends on the development of a microbiota responsible for pesticides degradation. That microbiota depends on nutrients, organic matter and moisture, which are variable according to the biobed's substrates. This research evaluated the fungal development on three biomixtures: the standard biobed (SB), composed of agricultural soil, straw and peat; and two alternative biobeds, one with pine leaves – PB, and other with vermicompost - VB, replacing peat. Fungal maturation was evaluated every two weeks, through colony-forming units counting (CFU), over 90 days; followed by studies with fungal communities (CFU) and isolates, after exposure to the insecticide phosmet. CFU statistical analysis occurred through ANOVA followed by Tukey test ($p < 0,05$); micelial growth, over a culture medium added by phosmet (100 mg L^{-1}) was evaluated by the non-parametric Mann-Whitney test ($p < 0,10$). Maturation study showed a significant CFU increase after 15 days, and PB presented a higher CFU number

($3,72 \pm 2,04 \times 10^4$ CFU g⁻¹). After pesticide application, PB showed lower CFU numbers in contaminated samples ($1,68 \times 10^4$ CFU g⁻¹ in contaminated biomixture, compared to $2,73 \times 10^4$ CFU g⁻¹ in clean biomixture); for SB and VB lower CFU numbers only occurred after the 90 days' degradation, in both clean and contaminated biomixtures. Among fungal isolates, 11% showed a positive response after being exposed to the pesticide. These isolates were obtained between the 15 and 60 days of maturation. This study allowed to identify the probable best period to contaminate the biobeds, after 30 days of biological maturity, because this period presented greater propagules abundance, and its fungal isolates were the ones that responded positively to the pesticide.

Keywords: *Micelial Growth; Phosmet; Colony Forming Units.*

1. INTRODUÇÃO

Agrotóxicos são compostos comumente utilizados para garantir a qualidade e o volume de produção agrícola atuais, buscando suprir a demanda alimentar da população mundial (ALVARENGA et al., 2015). Porém, seu uso vem gerando preocupações a respeito do destino deste produto no ambiente após a aplicação (MONTAGNER et al., 2017). Outra questão levantada é a respeito do gerenciamento dos resíduos produzidos ao longo do processo de uso do agrotóxico. Restos de calda de pulverização e a água de lavagem dos equipamentos são os principais exemplos de resíduos de agrotóxicos gerados que, comumente, não possuem forma de descarte prevista (BRICEÑO et al., 2014; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018).

O desenvolvimento de novas técnicas para degradação dos agrotóxicos e seus resíduos é essencial para minimizar seus problemas de contaminação ambiental (ALVARENGA et al., 2015). Os *Biobeds* são uma alternativa viável para o descarte e tratamento do resíduo de agrotóxicos gerado no campo. São compostos por uma biomistura simplificada (solo agrícola, palha triturada e turfa), que preenche uma cavidade aberta no solo da propriedade agrícola (CASTILLO; TORSTENSSON, 2007). Estes sistemas se baseiam, principalmente, na atividade de uma microbiota que se desenvolve a partir desta biomistura e é responsável pela biodegradação das partículas do resíduo de agrotóxicos (DIEZ, 2010; TORTELLA et al.; 2013b).

A biodegradação é considerada a melhor alternativa para o tratamento de substâncias químicas. Ela se utiliza da capacidade de organismos em degradar substâncias complexas e não necessitar da adição de reagentes químicos, o que torna o processo menos custoso (CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2017). Nela, as moléculas do agrotóxico são transformadas em compostos orgânicos e inorgânicos simplificados, sendo que a biodegradação ideal é aquela em que se tem

a mineralização do material (RAYMOND et al., 2001; RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2018). No *biobed*, a biodegradação é acelerada pela manutenção de condições ideais de temperatura e umidade, além da disponibilidade de matéria orgânica e lignocelulose. Já existem trabalhos comprovando que a biodegradação ocorre de forma mais rápida e eficiente no *biobed* do que no solo (CARNIEL, 2015; LIZANO-FALLAS et al., 2017).

Diversos estudos têm apontado a necessidade de adaptar a estrutura do *biobed* (originária da Suécia) para a realidade climática e os materiais orgânicos de fácil acesso de cada local que venha a utilizar esta tecnologia (BRICEÑO et al., 2014; CHU; EIVAZI, 2016; GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2018). Objetiva-se, desta forma, garantir que o produtor rural tenha a capacidade de montar o *biobed* com substratos já disponíveis em sua propriedade ou no seu entorno. Tais substratos devem ser previamente avaliados por pesquisadores, para garantir que a eficiência de degradação do *biobed* não seja comprometida. Como exemplo, o composto húmico indicado na biomistura original é a turfa; porém, materiais como o biochar e resíduos de poda compostados já foram avaliados e representam substituintes promissores da turfa (DIEZ et al., 2013a; DIEZ et al., 2013b).

Outros possíveis substitutos para a turfa são o húmus de minhoca e a acícula de pinus. Também chamado vermicomposto, o húmus de minhoca é utilizado como fertilizante orgânico. Devido ao processo de biodegradação que sofre durante sua produção, principalmente pela ação das minhocas, é altamente poroso e rico em substâncias húmicas. Estas substâncias garantem a este substrato a capacidade de atuar como adsorvente de uma série de partículas orgânicas complexas. Além disso, ele melhorara a absorção de água e a porosidade do substrato ao qual é misturado (DIAZ et al., 2017; PERUZZO et al., 2018). Em relação à acícula de pinus, este é um material rico em compostos orgânicos voláteis, mais especificamente os terpenos, que são hidrocarbonetos conhecidos pela sua capacidade de promover a bioestimulação de comunidades microbianas (DUDÁSOVÁ et al., 2012; LÁSZLOVÁ et al., 2016).

Ao montar o *biobed*, deve-se levar em consideração que a microbiota que se desenvolve na biomistura, responsável pela biodegradação, origina-se principalmente do solo agrícola que compõe essa mistura (GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2018). Uma etapa essencial que garante a eficiência dos *biobeds* é o estabelecimento inicial da microbiota na biomistura, processo chamado de maturação biológica (FERNÁNDEZ-ALBERTI et al., 2012). Esta maturação deve ocorrer imediatamente após a montagem do *biobed*, por um período que varia de 1 a 3 meses, de acordo com os substratos utilizados e as condições climáticas (CASTRO-GUTIÉRREZ et al., 2017). Por ser variável, é importante que um estudo prévio seja realizado

para identificar o tempo mínimo de ocorrência da maturação biológica para cada região em que o *biobed* será implantado.

Os fungos lignolíticos, também chamados fungos filamentosos brancos, representam o principal grupo de fungos do solo capazes de induzir a degradação do material lignolítico. Através de sua atividade enzimática, degradam uma série de compostos recalcitrantes e xenobióticos, incluindo os agrotóxicos (TORTELLA et al., 2013b; KUES, 2015). Segundo Novotný et al. (2004), fungos lignolíticos podem secretar três tipos principais de enzimas lignolíticas ao longo da sua atividade: a lignina peroxidase, a Mn-dependente peroxidase e a fenol oxidase. Outras enzimas secundárias também são produzidas em paralelo. Estas enzimas reagem com os compostos de interesse, formando o ciclo da degradação da lignina, que representa a fonte principal de energia do fungo, e ocorre concomitantemente à degradação do agrotóxico.

As espécies de fungos lignolíticos mais encontradas em *biobeds*, com resultados promissores em testes de degradação *in vitro*, são *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* e *Pleurotus ostreatus* (DIEZ, 2010). Porém representantes de *Penicillium* e *Trichoderma*, espécies não lignolíticas, também têm apresentado a capacidade de degradar agrotóxicos (STAMATIUS-SÁNCHEZ et al., 2015). O estudo e a identificação das espécies de fungos que se desenvolvem nas biomisturas regionais é importante, levando em consideração que as espécies nativas podem ser diferentes daquelas mais comumente conhecidas.

O objetivo deste capítulo foi avaliar a maturação biológica por fungos, promovida por duas biomisturas alternativas de *biobeds*, compostas por húmus de minhoca ou acícula de pinus adicionados no lugar da turfa. Estas novas biomisturas foram comparadas com a biomistura tradicional de *biobeds*. A maturação biológica foi acompanhada através da contagem de fungos e a resposta destes fungos foi avaliada após o contato com o inseticida organofosforado fosmete (Imidan 500 WP).

2. MATERIAL E MÉTODOS

O procedimento de montagem dos *biobeds* laboratoriais foi realizado no laboratório de Ecologia da UFSC, Campus de Curitibanos. Foram montados três tipos de *biobeds* laboratoriais: *Biobed* Padrão (BP), constituído de solo agrícola, palha de milho e turfa; *Biobed* Acícula (BA), com solo agrícola, palha de milho e acícula de pinus; e *Biobed* Húmus (BH), com solo, agrícola, palha de milho e húmus de minhoca, todos na proporção 1:2:1. Cada

biomistura foi produzida separadamente, adicionando o solo, a palha, e um dos três componentes avaliados (turfa, húmus de minhoca ou acícula de pinus). A umidade foi corrigida para 40% a 60% da capacidade de retenção de água. Cada repetição foi composta por 500 g da biomistura acondicionada em sacos de polipropileno, simulando *biobeds* laboratoriais. As épocas de coletas avaliadas foram quinzenais, ao longo de três meses de avaliação da maturação biológica dos *biobeds*; além de uma coleta imediatamente após a contaminação, e outra coleta após 90 dias da contaminação dos *biobeds*. Cada tratamento (representado pela época de coleta) foi composto por três repetições.

O solo agrícola e a palha de milho foram coletados na lavoura da área experimental da UFSC, Campus de Curitibanos, no período entre junho e agosto de 2018. O solo foi coletado nos primeiros 10 cm superficiais, seco em local sombreado e peneirado, e suas propriedades químicas estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Propriedades químicas do solo agrícola utilizado no projeto.

Propriedade	Resultado
pH	5,90
Índice SMP	6,70
Ca (cmolc/dm ³)	10,20
Mg (cmolc/dm ³)	3,10
Al (cmolc/dm ³)	0,00
H+Al (cmolc/dm ³)	2,95
CTC efetiva (cmolc/dm ³)	16,43
MO (g/dm ³)	49,59
P (mg/dm ³)	20,75
K (mg/dm ³)	70,38
Cu (mg/dm ³)	2,65
Fe (mg/dm ³)	26,98
Zn (mg/dm ³)	1,90
Mn (mg/dm ³)	59,18
SB (cmolc/dm ³)	13,48

CTC = capacidade de troca catiônica.

Fonte: O autor (2020).

A palha de milho foi triturada em moinho de facas. A turfa de *Sphagnum*, marca Jiffy, foi adquirida comercialmente através da empresa Vega e Flora (Curitiba – PR). O húmus de minhoca foi coletado no Laboratório de Ecologia da UFSC-Curitibanos, a partir de criações de minhocas mantidas com estrume bovino e pó de casca de coco, de acordo com a norma ABNT/NBR ISO 15.537/2014 (ABNT, 2014). O húmus de minhoca passou por um processo de desfaunação, que consistiu no congelamento a -18°C seguido de descongelamento. E a acícula de pinus foi coletada em uma área de plantio de pinus de 2005, localizada próximo ao Campus da UFSC em Curitibanos. A camada superficial de acícula foi removida, apenas a camada inferior mais próxima ao solo (em decomposição) foi coletada para o projeto.

Durante os meses de avaliação da maturação biológica, os *biobeds* laboratoriais foram mantidos em incubadora do tipo DBO (demanda biológica de oxigênio), a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ no escuro. O monitoramento da umidade foi mantido a partir da avaliação visual dos substratos, duas vezes por semana, da forma descrita por Gebler (2017), adicionando-se água quando necessário. Mensalmente, foi realizada a avaliação da umidade pela pesagem e secagem de amostras em estufa de circulação de ar, à temperatura de 55°C . O acompanhamento da maturação biológica das biomisturas foi realizado da forma descrita no item 2.1, ao longo de 90 dias.

2.1 MATURAÇÃO BIOLÓGICA DOS *BIOBEDS* LABORATORIAIS

A maturação biológica dos *biobeds* foi acompanhada através da contagem de fungos crescendo sobre um meio de cultura sólido. Esta contagem ocorreu antes de os *biobeds* serem inseridos na incubadora (tempo zero), e ao longo dos 90 dias iniciais de maturação biológica. Foram realizadas coletas quinzenais, aos 0, 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias de maturação biológica.

Todas as avaliações *in vitro* foram realizados no Laboratório de Biologia Celular da UFSC, em Curitibanos. Após os 90 dias de maturação biológica, amostras compostas das três repetições de cada biomisturas foram enviadas para o Laboratório de Análises Químicas do Solo, do Centro de Ciências Agroveterinárias da Universidade do Estado de Santa Catarina (CAV/UDESC), para obtenção das propriedades químicas das biomisturas.

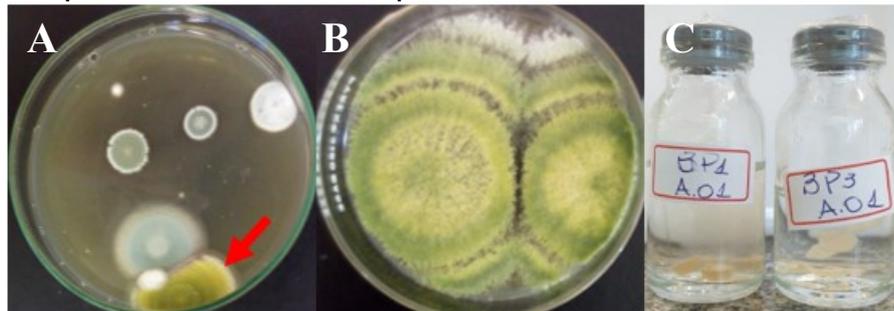
2.1.1 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

A contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de fungos foi baseada na metodologia de Castillo et al. (2001). Quinzenalmente, foram coletadas três subamostras de

cada repetição das biomisturas. As subamostras foram agitadas em água de peptona (2%), e então realizaram-se quatro diluições seriadas, a partir de uma alíquota de 1 mL da amostra adicionada em 9 mL de água de peptona (2%). Alíquotas de 0,1 mL das diluições de concentração 10^{-2} e 10^{-4} de cada subamostra foram espalhadas, em triplicata, na superfície do meio de cultura extrato de malte-ágar (2,5%) adicionado de 0,1% do antibiótico tetraciclina. O extrato de malte-ágar é um dos meios de cultura indicados para o estudo de fungos de madeira e solo (LAZAROTTO et al., 2015). As placas contendo os inóculos foram incubadas a 25°C, em fotoperíodo de 12/12 horas (claro/escuro) por sete dias. Durante este período foram contadas as colônias crescidas, mantendo-se um registro diário. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado com esquema fatorial, cujos fatores avaliados foram a biomistura e a época de coleta.

Como ilustrado na Figura 1, após os sete dias de avaliação de cada quinzena, foram obtidas culturas puras de fungos. As colônias fúngicas maiores, de bordas individuais, foram coletadas com auxílio de uma alça bacteriológica e isoladas em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar), sendo mantidas na incubadora a 25°C em fotoperíodo de 12/12 horas. Após dez dias de crescimento estas culturas foram armazenadas pelo método de Castellani, que consiste em discos miceliais inseridos em frascos de vidro contendo água destilada e esterilizada, e armazenados em temperatura ambiente (SOLA et al., 2012).

Figura 1 – Ilustração do procedimento aplicado para isolar e armazenar culturas de fungos a partir do monitoramento quinzenal dos *biobeds* laboratoriais.



(A) Cultura de bordas individuais indicada pela flecha. (B) Cultura isolada em meio BDA, com 10 dias de idade.
(C) Cultura armazenada através do método de Castellani.

Fonte: O autor (2019).

2.2 CONTAMINAÇÃO DOS *BIOBEDS* LABORATORIAIS

2.2.1 Fosmete (Imidan® 500WP)

O ingrediente ativo (ia) selecionado para esse projeto foi o fosmete ($C_{11}H_{12}NO_4PS_2$), que é um inseticida e acaricida organofosforado do tipo não persistente no ambiente, com uma meia-vida (DT_{50}) inferior a 30 dias (União Internacional de Química Pura e Aplicada - IUPAC, 2019). Esta característica garante resultados mais rápidos a respeito da eficiência de degradação do produto no *biobed*.

O fosmete tem leve mobilidade no solo e possui baixa solubilidade em água, e sua fotólise em fase aquosa ocorre de forma moderadamente rápida. É um produto moderadamente tóxico (classe III) classificado como perigoso ao meio ambiente e altamente tóxico para organismos aquáticos (AGROFIT, 2019). Age através do contato e ingestão, e no Brasil é aplicado para controlar pragas de culturas como citros, pêsego e maçã (AGROFIT, 2019). O fosmete foi obtido através da formulação comercial Imidan® (500 WP), que é um pó molhável composto por 50% de fosmete, de registro da empresa CrossLink Consultoria e Comércio Ltda.

2.2.2 Procedimento de contaminação

Os *biobeds* laboratoriais foram contaminados com o inseticida fosmete aos 150 dias após sua montagem. Para isso, utilizou-se a calda indicada no rótulo comercial do Imidan®, que tem a concentração de 200 g de produto para 100 L de água.

A dose de contaminação, padrão para as três biomisturas, foi calculada a partir da umidade e peso fresco dos substratos (DIEZ et al., 2017). A umidade de uma amostra de peso conhecido de cada biomistura foi medida em estufa de circulação forçada a $55^{\circ}C$, antes e depois da manutenção semanal da umidade. Durante esta manutenção foram registrados os volumes de água adicionados. O volume de água necessário para que as amostras permanecessem com a umidade de aproximadamente 60% da capacidade de campo foi o valor selecionado para definir a dose de contaminação dos *biobeds* laboratoriais (TORTELLA et al., 2013d). Identificou-se um volume médio de 35 mL kg^{-1} . O Imidan comercial possui em sua composição 50% do ia (fosmete). Considerando a concentração de calda comercial, definiu-se a dose de contaminação de 35 mg de fosmete por quilograma de peso fresco do substrato (35 mg ia kg^{-1}).

O experimento de contaminação seguiu o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições por período de avaliação. Além disso, foi mantida uma testemunha (sem agrotóxico) por biomistura e para cada período de amostragem. O experimento foi mantido em

incubadora por mais 90 dias após a contaminação, para avaliação da resposta do número de fungos com o passar do tempo. A população de fungos foi avaliada nos tempos 0 e 90 dias, relativos ao início e final do experimento de avaliação da degradação do fosmete. Para isso, foram avaliados os *biobeds* laboratoriais com fosmete versus *biobeds* laboratoriais sem fosmete, relacionando o fator contaminação com a época de coleta (0 e 90 dias), em um esquema fatorial. A coleta das amostras utilizadas para as avaliações ecotoxicológica e química (Capítulo 3), foi realizada nas mesmas repetições consideradas para a contagem de colônias de fungos.

2.3 TESTES *IN VITRO* DE TOLERÂNCIA DE FUNGOS AO AGROTÓXICO

Para estas avaliações *in vitro*, foram utilizados os isolados fúngicos obtidos ao longo do procedimento de avaliação da maturação biológica dos *biobeds* laboratoriais (item 2.1). Os ensaios ocorreram em Meio Mineral Sólido (MMS) contaminado com o agrotóxico, que é um meio de cultura seletivo composto majoritariamente por sais minerais, e recebe o agrotóxico como fonte principal de carbono para os fungos (RAMOS, 2014). Estas avaliações foram baseadas na metodologia de Stamatiu-Sánchez et al. (2015), na qual foi avaliada a capacidade de desenvolvimento de isolados fúngicos em um meio de cultura contaminado por agrotóxicos.

A composição do MMS foi de: 0,5 g (NH₄)SO₂ + 0,5 g KH₂PO₄ + 0,2 g KCl + 0,2 g MgSO₄:7H₂O + 0,1 g CaCl₂ + 20 g ágar, em um litro de água destilada, com 0,1% de tetraciclina (STAMATIU-SÁNCHEZ et al. 2015).

O agrotóxico foi adicionado ao meio de cultura fundente, e a concentração de diluição foi 10% de fosmete (STAMATIU-SÁNCHEZ et al. 2015) a partir da calda comercial do imidan® (100 mg L⁻¹). Para estes ensaios foram utilizadas culturas fúngicas de mesma idade (aproximadamente 10 dias), mantidas em BDA. A inoculação dos fungos no MMS ocorreu de duas formas diferentes, de acordo com as características reprodutivas do isolado (itens 2.3.1 e 2.3.2). Foram montados ensaios de avaliação por isolado de fungo com seis placas de Petri Testemunhas e seis placas Contaminadas por fosmete, em um delineamento experimental inteiramente casualizado.

2.3.1 Inoculação por discos

A inoculação por discos é o método mais comum e foi aplicado para grande parte dos isolados. Segundo o proposto por Stamatiu-Sánchez et al. (2015), no centro das placas-teste inoculou-se um disco de 5 mm proveniente de cada isolado fúngico. As placas inoculadas foram mantidas em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12h/12h. O monitoramento do crescimento micelial dos isolados foi realizado a cada 24 horas, através da medição do diâmetro radial (média dos diâmetros horizontal e vertical da cultura), utilizando uma régua graduada (STAMATIUS-SÁNCHEZ et al., 2015).

Os ensaios foram mantidos em incubadora até que um dos grupos de cada isolado, testemunha ou contaminado, preenchesse 3/4 do diâmetro da placa (CELAR; KOS, 2016). Para o caso das colônias de crescimento lento foi necessário medir o ensaio até um dos grupos atingirem o tamanho máximo, baseado nos dados de crescimento medidos nas respectivas placas mãe com 10 dias de idade.

2.3.2 Inoculação através de solução de esporos

Foi necessário utilizar a solução de esporos para inocular os isolados que produziram um grande número de esporos durante os dez dias iniciais do crescimento micelial, o que não permitia a inoculação de discos sem que ocorresse o espalhamento das estruturas reprodutivas sobre o meio de cultura.

Em adaptação da metodologia proposta por Colla et al. (2008), foi realizada uma inoculação pontual da suspensão de esporos do isolado no centro da placa contendo o meio MMS. Para tanto, foi preparada uma suspensão de esporos em frascos de vidro do tipo penicilina. Cada frasco contendo 100 mL de água destilada e 0,2% de ágar recebeu 3 discos de 5 mm do isolado a ser avaliado. Esta suspensão de esporos foi inoculada com um micropipetador. As placas foram mantidas em incubadora a 25°C e fotoperíodo de 12h/12h (claro/escuro). A medição do crescimento micelial foi realizada diariamente da mesma forma que o indicado no item 2.3.1.

2.3.3 Obtenção de índices de crescimento

Os dados de diâmetro radial das colônias avaliadas foram utilizados para o cálculo dos seguintes índices:

- Área abaixo da curva do crescimento micelial (AACCM)

Relaciona o diâmetro radial atual pelo medido no dia anterior, multiplicados pelo número de horas que se passaram entre uma avaliação e outra. Ao final gera-se um somatório do índice calculado para cada período de avaliação. A fórmula, apresentada na equação 1, foi desenvolvida por Campbell e Madden (1990).

$$AACCM = \sum \left(\frac{y_i + y_{i-1}}{2} \right) \times (t_i - t_{i-1}) \quad (1)$$

Onde:

y_i e y_{i-1} = valores de diâmetro radial da observação atual e anterior;

t_i e t_{i-1} = período das avaliações em horas (hora final e hora inicial);

- Porcentagem de inibição do crescimento (PIC)

Permite avaliar a inibição do crescimento do fungo pelo agrotóxico em um único valor de porcentagem, utilizando os valores médios de AACCM, ou de forma isolada para cada repetição, relacionando-as com a média das testemunhas. A fórmula do índice PIC está apresentada na equação 2, desenvolvida por Edgington et al. (1971).

$$PIC = \left(\frac{\bar{x}_{testemunha} - \bar{x}_{tratamento}}{\bar{x}_{testemunha}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde:

x = valores médios para o AACCM referente a cada isolado.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.4.1 Contagem de UFC

Para as análises estatísticas do número UFC foram utilizados os dados de contagem da diluição 10^{-2} , na qual foi obtido o maior número de colônias fúngicas, entre 10 e 150 UFC. A

média do número de colônias por tratamento foi convertida para o formato de unidades formadoras de colônias por grama de amostra (UFC g⁻¹).

A normalidade dos dados foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade através do teste de Fligner-Killen, no software RStudio© (2019). Confirmada a normalidade, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) para experimentos fatoriais seguida do Teste de Tukey ($p < 0,05$), comparando as três biomisturas e as quinzenas de coleta para os dados da maturação biológica. Após a aplicação do agrotóxico, os mesmos testes estatísticos foram aplicados para relacionar o fator contaminação e as duas épocas de avaliação de cada biomistura (zero dias e 90 dias após a aplicação do fosmete). Os gráficos foram produzidos nos softwares Excel e RStudio© (2019).

2.4.2 Tolerância de isolados

No software RStudio© (2019) verificou-se a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade através do teste de Fligner-Killen. Como os dados foram acusados como não normais, foi aplicado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, para o valor de significância inferior a 10% (WILCOXON et al., 1965). Os valores de PIC foram utilizados para obter o P-valor da significância do teste estatístico e, a partir deste, avaliar se houve diferença significativa entre o crescimento nas placas Testemunhas e Contaminadas de cada isolado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

As características químicas dos *biobeds* laboratoriais, aos 90 dias da maturação biológica e, portanto, antes da aplicação do fosmete, encontram-se na Tabela 2. A biomistura BP apresentou a maior porcentagem de matéria orgânica (MO), sendo essa 26,7%, em comparação aos 24,2% de BH e 23,9% de BA, respectivamente.

Tabela 2 – Propriedades químicas dos três *biobeds* laboratoriais avaliados (*Biobed* Padrão, *Biobed* Húmus e *Biobed* Acícula), após 90 dias de maturação biológica.

Propriedade	Biomistura		
	<i>Biobed</i> Padrão	<i>Biobed</i> Húmus	<i>Biobed</i> Acícula
pH	5,70	5,60	6,10
Índice SMP	6,50	6,60	6,40
Ca (cmolc/dm ³)	7,20	6,12	5,44
Mg (cmolc/dm ³)	3,37	4,67	2,39
Al (cmolc/dm ³)	0,06	0,08	0,00
H+Al (cmolc/dm ³)	2,50	2,20	2,80
CTC efetiva (cmolc/dm ³)	12,18	11,69	9,11
CTC - pH 7,0 (cmolc/dm ³)	14,62	13,81	11,91
MO (%)	26,70	24,20	23,90
Argila (%)	29,00	22,00	24,00
P (mg/dm ³)	21,90	32,80	9,30
K (mg/dm ³)	605	320	500
Ca/Mg	2,10	1,30	2,30

Fonte: O autor (2019).

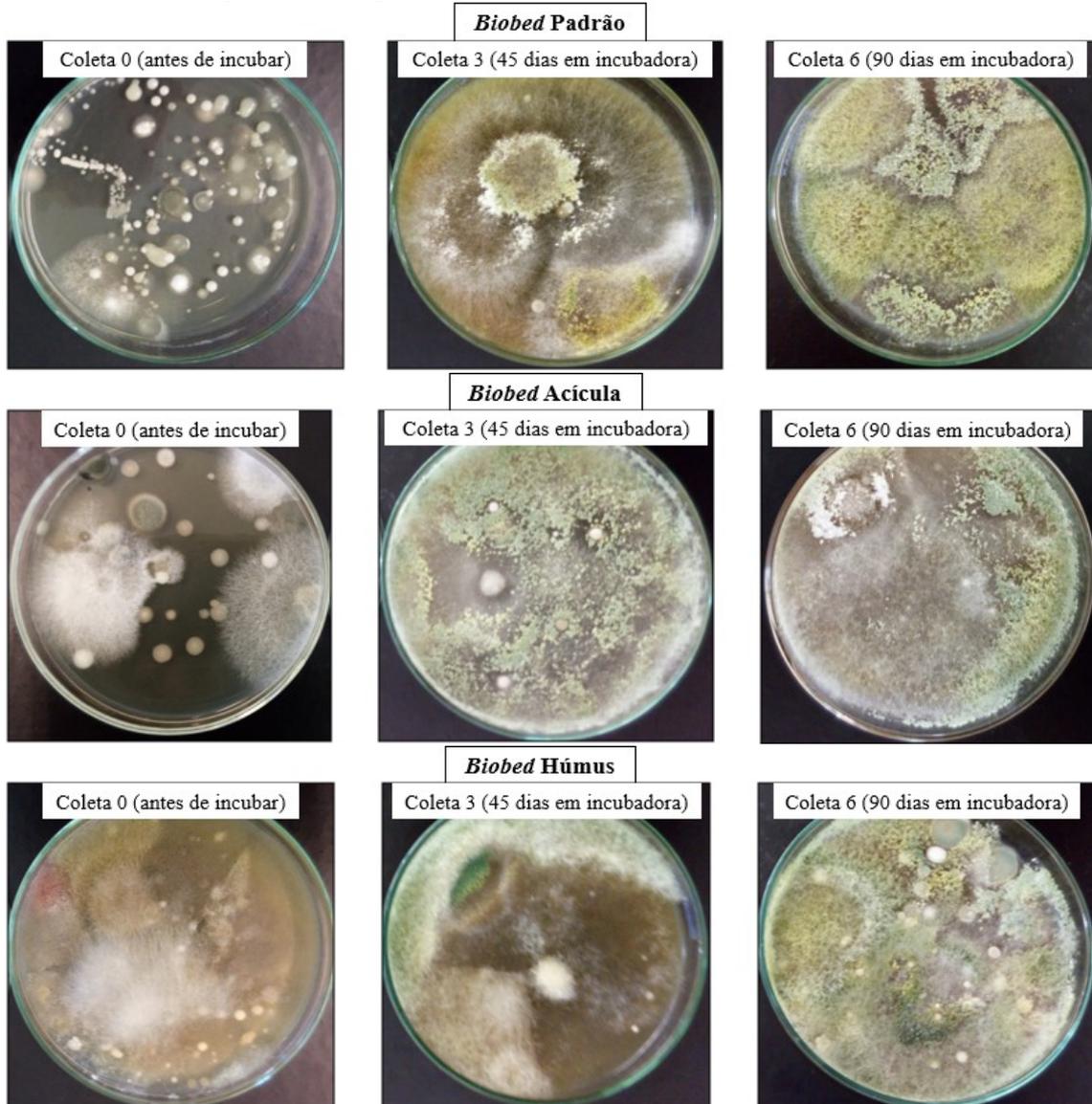
3.2 CRESCIMENTO E CONTAGEM DE FUNGOS

Em relação ao crescimento de fungos durante a maturação biológica das diferentes biomisturas, na Figura 2 constam imagens de placas de Petri após sete dias de incubação, representativas do início, meio e final do experimento de maturação. Verificou-se uma mudança nas características das colônias de fungos ao longo do tempo. Na coleta de tempo zero prevaleceram colônias menores e brancas. Com o passar do tempo observou-se um aumento da presença de fungos filamentosos, que podem ser percebidos, entre outras características, pelo aspecto algodinoso das colônias (AMORIM et al., 2016).

Em relação ao comportamento do número médio de UFC durante a maturação biológica, na Figura 3 constam gráficos relacionando este índice de acordo com cada tipo de biomistura e os sete períodos de amostragens. A biomistura BA apresentou o número médio de UFC mais alto, $3,72 \pm 2,04 \times 10^4$ UFC g⁻¹ (Figura 3A).

Figura 2 – Imagens representativas das coletas do início (tempo 0), meio (tempo 3) e final (tempo 6) dos 90 dias de maturação biológica dos *biobeds* laboratoriais.

As placas de Petri (diâmetro = 90 mm) com meio BDA possuem fungos que se desenvolveram por 7 dias a partir do inóculo dos três *biobeds* laboratoriais avaliados, utilizadas para a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC).

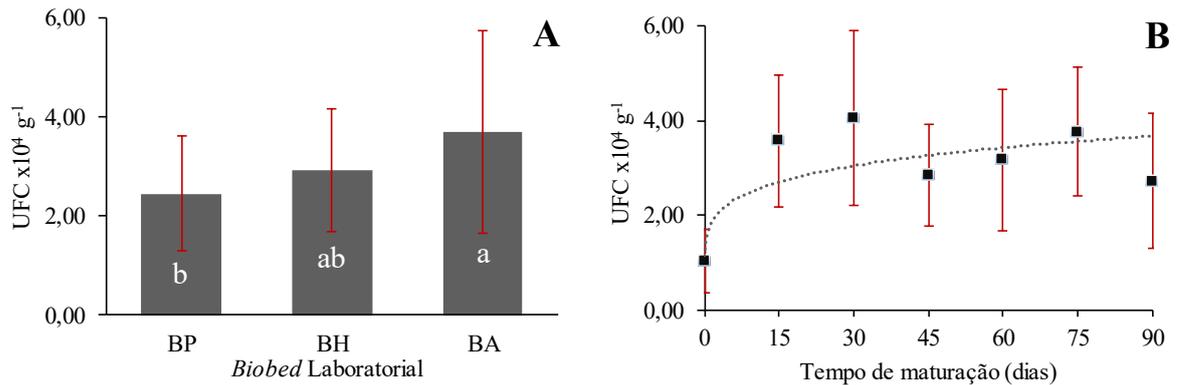


Fonte: O autor (2019).

Em relação ao crescimento de colônias avaliado ao longo das quinzenas, a única diferença significativa ocorreu no tempo zero da montagem dos *biobeds* laboratoriais (Figura 3B). Os valores médios de UFC foram de $1,04 \pm 0,66 \times 10^4$ UFC g⁻¹ aos zero dias para $3,58 \pm 1,38 \times 10^4$ UFC g⁻¹ aos 15 dias, ou seja, a colonização ocorreu de forma abundante durante a primeira quinzena de incubação, e o valor mais alto foi aos 30 dias ($4,06 \pm 1,83 \times 10^4$ UFC g⁻¹).

¹). Durante os 60 dias restantes, ocorreu um aumento no número de colônias de forma oscilatória e menos significativa, e mesmo os baixos picos não foram inferiores à média obtida na amostragem zero.

Figura 3 – Unidades Formadoras de Colônias por grama de substrato (UFC x 10⁴ g⁻¹) durante a maturação biológica dos *biobeds* laboratoriais BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de avaliações quinzenais.



(A) Relação entre as médias de UFC e o tipo de biomistura, durante a maturação biológica. As letras dentro das barras indicam a diferença estatística entre as biomisturas (Tukey, $p < 0,05$). (B) Relação entre as médias de UFC e os períodos de amostragem ao longo da maturação dos três *biobeds* laboratoriais. BA = *biobed* acícula, BH = *Biobed* húmus, BP = *biobed* padrão. As barras de erro indicam o desvio-padrão das médias.

Fonte: O autor (2019).

Passado o período de maturação biológica, seguido da contaminação dos *biobeds* laboratoriais pelo fosmete, foi utilizado o mesmo método de contagem de unidades formadoras de colônias fúngicas para avaliar o número de colônias após zero e 90 dias da contaminação. Na Tabela 3 estão apresentados os resultados do número de colônias de fungos obtidos nestes períodos, para as três biomisturas avaliadas separadamente.

Após 90 dias de aplicação do agrotóxico na biomistura BP, sua média de UFC foi inferior à obtida em zero dias ($0,74$ e $1,51 \times 10^4$ UFC g⁻¹, respectivamente), e o mesmo ocorreu para BH, com $0,7 \times 10^4$ UFC g⁻¹ aos 90 dias e $2,64 \times 10^4$ UFC g⁻¹ aos zero dias. BA não apresentou grandes diferenças de UFC entre os dois períodos amostrais, mas esta foi a única biomistura que apresentou diferenças relacionadas ao fator contaminação, com a média das amostras sem fosmete ($2,73 \times 10^4$ UFC g⁻¹) sendo superior à média das amostras com fosmete ($1,68 \times 10^4$ UFC g⁻¹, na Tabela 3).

Tabela 3 – Unidades Formadoras de Colônias por grama de substrato, para cada *biobed* laboratorial, após zero dias e 90 dias da contaminação por fosmete.

Unidades Formadoras de Colônias após Contaminação por Fosmete (x 10⁴ UFC g⁻¹)			
<i>Biobed Padrão</i>			
	0 dias	90 dias	Média
Com Fosmete	1,14 ± 0,38	0,81 ± 0,25	0,98 ± 0,34 ^{NS}
Sem Fosmete	1,88 ± 0,89	0,66 ± 0,21	1,26 ± 0,87 ^{NS}
Média	1,51 ± 0,73 a	0,74 ± 0,22 b	1,13 ± 0,65
<i>Biobed Acícula</i>			
	0 dias	90 dias	Média
Com Fosmete	1,93 ± 0,17	1,44 ± 0,58	1,68 ± 0,46 b
Sem Fosmete	2,9 ± 0,55	2,55 ± 0,29	2,73 ± 0,44 a
Média	2,42 ± 0,64 ^{NS}	2,00 ± 0,74 ^{NS}	2,21 ± 0,68
<i>Biobed Húmus</i>			
	0 dias	90 dias	Média
Com Fosmete	1,90 ± 0,34	1,00 ± 0,80	1,45 ± 0,74 ^{NS}
Sem Fosmete	3,39 ± 2,31	0,40 ± 0,31	1,88 ± 2,21 ^{NS}
Média	2,64 ± 1,68 a	0,7 ± 0,63 b	1,66 ± 1,59

^{NS} = não significativo. Médias ± Desvio-Padrão seguidas por letras diferem entre si pelo Teste de Tukey (p<0,05).

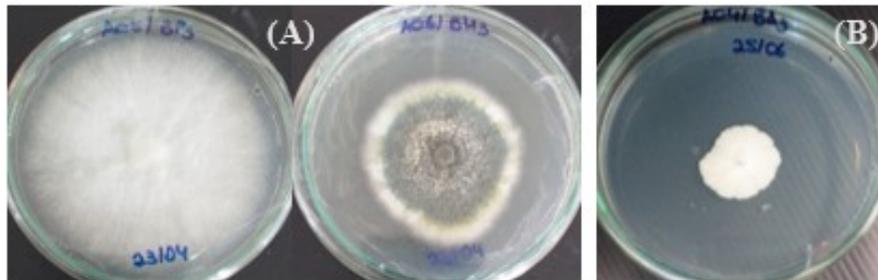
Fonte: O autor (2019).

3.3 TOLERÂNCIA DE ISOLADOS FÚNGICOS AO FOSMETE

Ao longo do monitoramento da maturação por fungos foi possível obter 52 isolados diferentes, de forma aleatória, os quais foram avaliados quanto à sua tolerância ao fosmete. Os dados de AACCM e PIC obtidos para cada isolado, assim como sua época de coleta e biomistura de origem, estão apresentados na Tabela do Apêndice A.

Através da avaliação visual de características morfológicas e macroscópicas, três isolados foram classificados como leveduras, e os outros 49 isolados foram fungos filamentosos, conforme a definição de Amorim et al. (2016). Todas as leveduras foram coletadas na biomistura BA. Os fungos filamentosos, de forma geral, caracterizaram-se pelo crescimento micelial algodinoso, pulverulento ou aveludado. A superfície das colônias apresentou cor variável entre branca a amarelada, diversos tons de verde, com alguns casos apresentando tons rosados e cinzas. As leveduras apresentavam colônias menores com superfície lisa de aspecto cremoso, e coloração clara (AMORIM et al., 2016). A Figura 4 ilustra exemplares de colônias de fungos com estas características diferenciadas.

Figura 4 – Exemplos de colônias de fungos com 10 dias de idade isoladas dos *biobeds* laboratoriais, crescendo sobre meio de cultura BDA, em placas de Petri (diâmetro = 90 mm). Os fungos filamentosos apresentados na imagem foram obtidos a partir dos *biobeds* Padrão e Húmus, e a levedura foi coletada no *Biobed* Acícula.

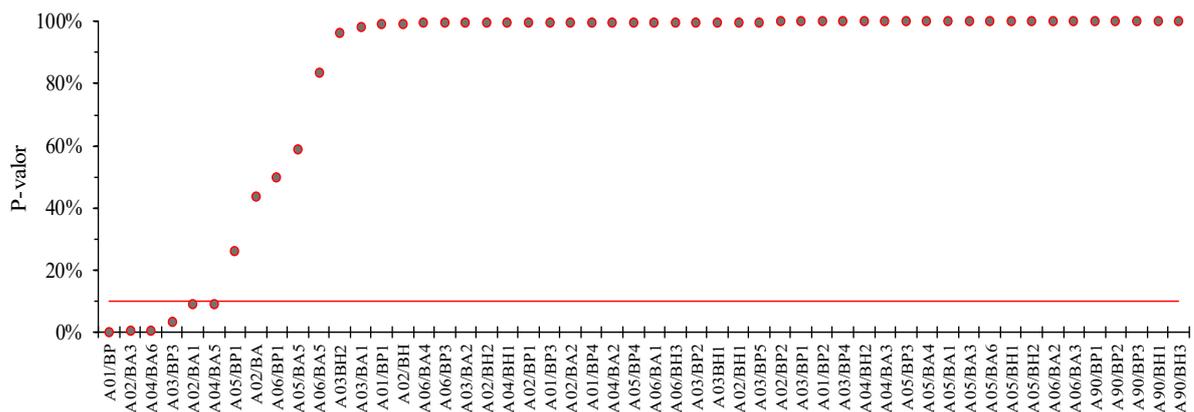


(A) Fungos filamentosos. (B) Levedura.

Fonte: O autor (2019).

Os P-valores obtidos no teste estatístico de comparação unilateral (apresentado no item 2.4.2) de todos os isolados estão indicados no gráfico da Figura 5. A partir destes valores foi possível definir quais isolados apresentaram um crescimento superior nos tratamentos com fosmete. O nível de significância considerado para o teste estatístico ($p < 0,10$) foi o valor de corte utilizado para enumerar estes isolados, que foram os seis indicados abaixo da linha do gráfico.

Figura 5 – P-valor obtido a partir do teste não paramétrico de Mann-Whitney na comparação entre placas Testemunhas vs. Contaminadas, para cada isolado de fungo.



A linha vermelha indica o nível de significância ($p < 0,10$) considerado para o teste estatístico.

Fonte: O autor (2019).

A nomenclatura dos isolados é composta por uma primeira parte de letras e números que indica a época de coleta, e a segunda parte de letras que indica a biomistura da qual o

isolado foi coletado. As épocas de coleta corresponderam às seis quinzenas avaliadas após a montagem dos *biobeds* laboratoriais (A01 até A06, desconsiderando a avaliação zero), e a uma coleta realizada durante a avaliação de 90 dias de degradação do fosmete (A90). Os isolados que apresentaram P-valor significativo foram A01/BP, A02/BA3, A04/BA6, A03/BP3, A02/BA1 e A04/BA5, representando 11% do total de isolados fúngicos avaliados.

Os isolados com P-valor significativo foram obtidos, em sua maioria, da biomistura BA. A biomistura BP também gerou isolados de índice significativo, em menor proporção (2 de 6 isolados). As coletas destes isolados ocorreu durante as quatro quinzenas iniciais da maturação.

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Maturação biológica das biomisturas

O método de contagem de unidades formadoras de colônias de fungos, aplicado de forma quinzenal, permitiu acompanhar o processo inicial de maturação das biomisturas por estes organismos. Ao longo destes 90 dias iniciais ocorreram modificações nas características visuais dos fungos (Figura 2), assim como no número médio de UFC entre as quinzenas (Figura 3), mostrando que as comunidades fúngicas passaram por processos adaptativos nas biomisturas. O valor médio de UFC indicou que o período ideal para contaminação dos *biobeds* laboratoriais avaliados foi a partir dos 30 dias de maturação biológica.

Fernández-Alberti et al. (2012) afirmam que o tempo de maturação biológica e a estabilização da umidade são fatores que influenciam diretamente sobre a eficiência dos *biobeds* na degradação de agrotóxicos. Os autores avaliaram a degradação de clorpirifós, outro inseticida organofosforado, em um *biobed* tradicional, durante diferentes períodos de maturação biológica (0, 15 e 30 dias) e sob diferentes níveis de umidade (40, 60 e 80% da capacidade de retenção de água). Os níveis mais altos de degradação do produto ocorreram com 60% da capacidade de retenção de água, e, assim como neste trabalho, após 30 dias de maturação.

Além dos fatores atmosféricos, o tipo de substrato e a origem do solo que compõe a biomistura podem influenciar diretamente no desenvolvimento da microbiota do *biobed*, já que eles definem a quantidade de matéria orgânica e lignocelulose que estará disponível para esta microbiota (CASTILLO et al., 2008; SAEZ et al., 2018). As três biomisturas avaliadas

apresentaram valores próximos de matéria orgânica (26,7% em BP, 24,2% em BH e 23,9% em BA) e de todas as outras propriedades químicas avaliadas, com exceção do fósforo, que foi inferior em BA (9,30 mg dm⁻³). Os valores de UFC apresentaram uma diferenciação em BA também, tendo o valor mais alto, $3,72 \pm 2,04 \times 10^4$ UFC g⁻¹. Isto torna clara a necessidade de associar análises que indiquem efetivamente o estado da microbiota ou da atividade microbiana do material, junto das análises de propriedades químicas do *biobed*, de forma que seja possível relacioná-las. Para este propósito, além da contagem de fungos, estudos em *biobeds* utilizam metodologias de análises enzimáticas para a obtenção de índices de respiração microbiana (TORTELLA et al., 2013a; GEBLER et al., 2015) e de perfis fisiológicos a nível de comunidade (TORTELLA et al., 2013c).

A adição de húmus de minhoca já foi avaliada em outros tipos de biomisturas, em concentrações diferentes das apresentadas neste trabalho. Diaz et al. (2016) avaliaram novas biomisturas quanto à sua eficiência em promover o crescimento microbiano e degradar efluentes compostos por dimetoato, imidacloprido, tebuconazole, metalaxil e oxyfluorfen, ao longo de 30 dias. As biomisturas foram compostas por solo agrícola, resíduos vegetais e húmus de minhoca proveniente de diferentes fontes. A avaliação da abundância das comunidades de fungos e bactérias comprovou que o húmus de minhoca gerou um alto crescimento microbiano, sendo considerado um bom substrato para compor o *biobed*.

Tanto a acícula de pinus quanto o húmus de minhoca se mostraram eficientes promotores do crescimento da comunidade fúngica, gerando valores de UFC mais altos que a biomistura BP, com turfa. Desta forma, os dois substratos apresentam o potencial de garantir a eficiência dos *biobeds* alternativos na degradação de agrotóxicos.

3.4.2 Resposta de fungos ao fosmete

Na Tabela 3 é possível observar uma queda no número de colônias fúngicas entre as biomisturas limpas e contaminadas de BA. Ou seja, a adição do produto foi, provavelmente, o principal fator que gerou impactos negativos sobre a comunidade fúngica desta biomistura, já que esta comunidade não apresentou uma recuperação ou similaridade com o número de colônias apresentado por BA limpo, mesmo após 90 dias da contaminação. Em BH e BP a queda nas médias de UFC ocorreu apenas entre as épocas de avaliação, caindo após 90 dias, e indicando um possível efeito do envelhecimento destas biomisturas sobre as comunidades

fúngicas. Nestas duas biomisturas o efeito do agrotóxico, isoladamente, não gerou diferenças nos números de colônias.

Outros autores também relatam a redução no número de colônias após a aplicação de agrotóxicos no *biobed*. Tortella et al. (2013c) avaliaram o número de colônias de fungos, crescendo em um *biobed* padrão limpo e outro contaminado por atrazina, ao longo de 90 dias. O número médio de UFC oscilou ao longo dos períodos de avaliações, realizadas a cada 10 dias. O valor obtido no substrato limpo foi de $3,4 \times 10^5$ UFC g⁻¹ aos 0 dias de incubação para $7,4 \times 10^5$ UFC g⁻¹ aos 90 dias de incubação. Já no substrato contaminado os números foram inferiores, de 2,1 para $6,9 \times 10^5$ UFC g⁻¹ aos 0 e 90 dias, respectivamente.

Comportamento similar foi obtido para a biomistura BA desta dissertação, que apresentou a média geral de $2,73 \times 10^4$ UFC g⁻¹ sem fosmete, e $1,68 \times 10^4$ UFC g⁻¹ com a presença do fosmete (Tabela 3). Os valores médios da biomistura BP, que é composta pelos mesmos substratos do *biobed* de Tortella et al. (2013c), não apresentaram uma queda significativa nos valores, causada pela adição do agrotóxico. Saez et al. (2018) afirmam que, assim como as características físico-químicas do *biobed*, o índice UFC varia de acordo com o local de origem dos substratos que compõem a biomistura. Portanto, esta queda nos valores médios das populações microbianas pode ser esperada em alguns casos, desde que não venha a interferir na eficiência da degradação do agrotóxico no *biobed*.

Dentre os isolados fúngicos obtidos ao longo deste estudo, 11% apresentaram resultados promissores em relação à tolerância ao fosmete. Isso indica que estes isolados podem ser potenciais degradadores do fosmete na natureza. Porém, a maioria dos isolados (89%) não apresentaram P-valores significativos, ou seja, o fosmete não gerou mudanças em seu crescimento. As épocas de coleta destes 11% de isolados compreenderam as quatro quinzenas iniciais da maturação biológica, período que abrange os 15 até os 60 dias de maturação. Isso indica que, provavelmente, este foi o período em que os *biobeds* laboratoriais tiveram as colônias fúngicas que poderiam atuar mais ativamente na degradação do fosmete.

Em estudos similares com fungos expostos a agrotóxicos organofosforados, em que foi realizada a etapa de identificação de colônias, Alvarenga et al. (2015) e Zehra et al. (2018) avaliaram a degradação de organofosforados por fungos filamentosos, com resultados promissores para representantes dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Trichoderma*. Jauregui et al. (2003) identificaram cepas das espécies *Bjerkandera adusta*, *Pleurotus ostreatus* e *Phanerochaete chrysosporium*, capazes de degradar fosmete e outros organofosforados. Representantes dos gêneros *Fusarium* sp. e *Penicillium* sp., além de cepas de *Mucor*

circinelloides e *Alternaria alternata* apresentaram potencial de uso para a biorremediação de clorpirifós, outro inseticida organofosforado (STAMATIÚ-SÁNCHEZ et al., 2015). E Mir-Tutusaus et al. (2014) indicaram a capacidade do *Trametes versicolor* em degradar uma mistura de agrotóxicos e antibióticos. Desta forma percebe-se que uma série de fungos possuem a capacidade de degradar estes agrotóxicos, e suas espécies são diferentes para cada local de avaliação. Por isso é importante que estes tipos de estudo sejam realizados em todas as regiões aonde o *biobed* é implantado.

Avaliações após os 90 dias de degradação do fosmete, permitiriam identificar o momento em que o número de colônias fúngicas atingisse um valor mínimo, inferior ao obtido no início da maturação biológica. Esta queda no valor de UFC, se relacionada com resultados de novas análises químicas das biomisturas que indicassem a redução da matéria orgânica, poderia representar o fim da vida útil do *biobed*. A identificação molecular dos isolados fúngicos apresentados neste estudo, além da avaliação de suas respostas a outros agrotóxicos, permitiria que estes isolados fossem utilizados para potencializar a eficiência do *biobed*.

4. CONCLUSÕES

A contagem de fungos permitiu observar que todas as biomisturas foram eficientes em promover a atividade fúngica, durante o período de maturação biológica e após a aplicação do agrotóxico. A biomistura do *Biobed* Acícula apresentou o número mais alto de fungos na maturação biológica, e após a aplicação do fosmete, os valores de UFC apresentados por esta biomistura contaminada mostraram um impacto maior, sendo inferiores aos valores obtidas na mesma biomistura limpa. Para BP e BH o impacto maior sofrido pelas comunidades fúngicas, apresentado pela queda em valores de UFC, ocorreu após 90 dias de aplicação do agrotóxico, podendo ser influenciados pelo envelhecimento do material. A época ideal para iniciar a contaminação destes *biobeds* foi, provavelmente, a partir dos 30 dias de maturação biológica.

Os dados de crescimento micelial na presença de fosmete indicaram que, dentre os fungos isolados, apenas 11% apresentaram um aumento no crescimento pelo contato com o produto. A identificação destes organismos, a nível de espécie, apresenta-se como uma etapa necessária que permitirá o uso efetivo destes organismos em *biobeds*.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Dados do ingrediente ativo - fosmete**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 3 nov. 2019.
- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR ISO 15537**: Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (*Lumbricidae*). Rio de Janeiro, 2014.
- ALVARENGA, N.; BIROLI, W. G.; PORTO, A. L. M. Biodegradation of organophosphate and pyrethroid pesticides by microorganisms. In: LICHTFOUSE, E.; SCHWARZBAUER, J.; ROBERT, D. (eds) Pollutants in Buildings, Water and Living Organisms. **Environmental Chemistry for a Sustainable World**, vol 7. Springer, 2015. DOI 10.1007/978-3-319-19276-5_3
- AMORIM, L.; REZENDE, J.; BERGAMIM FILHO, A.; CAMARGO, L. (Editores.) **Manual de Fitopatologia**. Agronômica Ceres, v. 2, ed. 5, 820 p., 2016.
- BRICEÑO, G.; TORTELLA, G.; RUBILAR, O.; PALMA, G.; DIEZ, M. C. Advances in Chile for the treatment of pesticide residues: biobeds technology. p. 53-66, 2014. In: ALVAREZ, A.; POLTI, M. A. **Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives**. Springer, 2014. DOI 10.1007/978-3-319-05738-5
- CAMPBELL, C.L. AND MADDEN, L.V. (1990) **Introduction to Plant Disease Epidemiology**. John Wiley & Sons, New York.
- CARNIEL, L. S. C. Avaliação do risco ecológico de Mancozebe e Clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte. **Dissertação (Mestrado)**, Lages: Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, 2015, 140 p.
- CASTILLO, M. del P., ANDERSSON, A., ANDER, P., STENSTROM, J., TORSTENSSON, L. Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. v. 17, p. 627-633, 2001. DOI 10.1023/A:1012242042211
- CASTILLO, M. del P.; TORSTENSSON, L. Effect of biobed composition, moisture, and temperature on the degradation of pesticides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p.5725-5733, 2007. DOI 10.1021/jf0707637
- CASTILLO, M. del P.; TORSTENSSON, L.; STENSTROM, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 6206-6219, 2008.
- CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; DIEZ, M. C.; TORTELLA, G. R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Aging of biomixtures: Effects on carbofuran removal and microbial community structure. **Chemosphere**, v. 168, p. 418-425, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.10.065
- CELAR, F. A.; KOS, K. Effects of selected herbicides and fungicides on growth, sporulation and conidial germination of entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. **Pest Management Science**, v.72, p. 2110-2117, 2016. DOI 10.1002/ps.4240
- CHU, B.; EIVAZI, F. Enhanced Dissipation of Selected Herbicides in a Simulated Organic

Matrix Biobed: A System to Control On-Farm Point-Source Pollution. **Journal of Environmental Quality**, Special Section – Environmental Indicators, Dec./2016. DOI 10.2134/jeq2016.04.0124

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; DE LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia: Lavras-MG**, v.32, n.3, p.809-813, 2008.

DIAZ, J. M. C.; DELGADO-MORENO, L.; NÚÑEZ, R.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts. **Bioresource Technology**. v.214, p. 234–241, 2016. DOI: 10.1016/j.biortech.2016.04.105

DIAZ, J. M. C.; MARTIN-LAURENT, F.; BEGUET, J.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Fate and effect of imidacloprid on vermicompost-amended soils under dissimilar conditions: Risk for soil functions, structure, and bacterial abundance. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1111-1119, 2017. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.11.082

DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.10, n.3, p.244-267, 2010.

DIEZ, M. C.; TORTELLA, G. R.; BRICEÑO, G.; CASTILLO, M. DEL P.; DÍAZ, J.; PALMA, G. ALTAMIRANO, C.; CALDERÓN, C.; RUBILAR, O. Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses. **Electronic Journal of Biotechnology**. 11p., 2013a. DOI: 10.2225/vol16-issue6-fulltext-17.

DIEZ, M. C.; LEVIO, M.; BRICEÑO, G.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.; GALLARDO, F. Biochar as a partial replacement of peat in pesticide-degrading biomixtures formulated with different soil types. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**. v. 7, p. 1–7, 2013b. DOI:10.1166/jbmb.2013.1376

DIEZ, M. C.; ELGUETA, S.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; SCHALCHLI, H.; BORNHARDT, C.; GALLARDO, F. Pesticide dissipation and microbial community changes in a biopurification system: influence of the rhizosphere. **Biodegradation**, v.28, p.395–412, 2017. DOI 10.1007/s10532-017-9804-y

DUDÁSOVÁ, H., LUKÁCOVÁ, L., MURÍNOVÁ, S., DERCOVÁ, K. Effects of plant terpenes on biodegradation of polychlorinated biphenyls PCBs. **International Biodeterioration and Biodegradation**. v. 69, p. 23-27, 2012. DOI: 10.1016/j.ibiod.2012.01.003

EDGINGTON, L.V.; KNEW, K.L. & BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**. St. Paul, v.61, n.1, p.42-44, 1971.

FERNÁNDEZ-ALBERTI, S.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C. Chlorpyrifos degradation in a Biomix: Effect of pre-incubation and water holding capacity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, V. 12 (4), P. 785-799, 2012.

GEBLER, L.; PIZZUTTI, I. R.; CARDOSO, C. D.; KLAUBERG FILHO, O.; MIQUELLUTI, D. J.; SANTOS, R. S. S. Bioreactors to Organize the Disposal of Phytosanitary Effluents of Brazilian Apple Production. **Chemical engineering transactions**. v.43, 2015. DOI: 10.3303/CET1543058.

GEBLER, L. Orientações para o dimensionamento e operação de Biobeds no Brasil. Embrapa – Bento Gonçalves/RS. **Comunicado Técnico n° 204**, 5p., 2017.

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, V. R.; QUINTAL-FRANCO, C.; ARENA-ORTIZ, M. L.; GIÁCOMAN-VALLEJOS, G.; PONCE-CABALLERO, C. Identification of microbial species present in a pesticide dissipation process in biobed systems using typical substrates from southeastern Mexico as a biomixture at a laboratory scale. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 528–538, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.082.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Pesticide Properties Database**. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm>. Acesso em: 3 nov. 2019.

JAUREGUI, J.; VALDERRAMA, B.; ALBORES, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. **Biodegradation** v.14, p.397–406, 2003.

KUES, U. Fungal enzymes for environmental management. **Current Opinion in Biotechnology**. v.33, p.268–278, 2015. DOI: 10.1016/j.copbio.2015.03.006

LAZAROTTO, M.; OLIVEIRA, L. S.; HARAKAVA, R.; ZANATTA, P.; FARIAS, C. R. J. Identificação de Fungos Emboloradores em Madeira de *Pinus* spp. em Laboratório. **Floresta e Ambiente**, 2015. DOI: 10.1590/2179-8087.144615

LÁSZLOVÁ, K.; DERCOVÁ, K.; HORVÁTHOVÁ, H.; MURÍNOVÁ, S.; ŠKARBA, J.; DUDÁŠOVÁ, H. Assisted bioremediation approaches - biostimulation and bioaugmentation - used in the removal of organochlorinated pollutants from the contaminated bottom sediments. **International Journal of Environmental Research**. v.10(3), p.367-378, Summer 2016.

LIZANO-FALLAS, V.; MASÍS-MORA, M.; ESPINOZA-VILLALOBOS, D.; LIZANO-BRENES, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of pesticides and ecotoxicological changes during the simultaneous treatment of triazines and chlorpyrifos in biomixtures. **Chemosphere**, v. 182, p. 106-113, 2017. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.04.147

MIR-TUTUSAUS, J. A.; MASÍS-MORA, M.; CORCELLAS, C.; ELJARRAT, E.; BARCELÓ, D.; SARRÁ, M.; CAMINAL, G.; VICENT, T.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. **Science of the Total Environment**, v.500–501, p.235–242, 2014. DOI 10.1016/j.scitotenv.2014.08.116

MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Revista Química Nova**. v.40, n.9, p.1094-1110, 2017. DOI: 10.21577/0100-4042.20170091

NOVOTNÝ, C., SVOBODOVÁ, K., ERBANOVA, P., CAJTHAML, T., KASINATH, A., LANG, E., SASEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**. v.36, p.1545–1551, 2004. DOI: 10.1016/j.soilbio.2004.07.019

PERUZZO, R.; HEMERICH, D.; MISTURA, C. M.; BARÃO, F. R. Comparação do uso de vermicomposto e composto como agente de degradação de biodiesel b100. **Revista CIATEC – UPF**, v.10 (2), p.14-26, 2018.

RAMOS, S. M. S. Isolamento e seleção de fungos de solo para a biodegradação do pesticida organofosforado clorpirifós. **Dissertação** (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.

RAYMOND, J. ROGERS, T., SHONNARD, D., KLINE, A. A review of structure-based biodegradation estimation methods. **Journal of Hazardous Materials**, v. 84, p. 189–215, 2001. DOI: 10.1016/S0304-3894(01)00207-2

RODRÍGUEZ-CASTILLO, G.; MOLINA-RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ-VILLANUEVA, M.; MASÍS-MORA, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. removal of two neonicotinoid insecticides and mineralization of 14c-imidacloprid in biomixtures. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Online Publication, p.1-7, 2018. DOI: 10.1007/s00128-018-2370-0

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E.; CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; LIZANO-FALLAS, V. Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in biopurification systems. In: BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N. **Toxicity and biodegradation testing: Methods in pharmacology and toxicology**. Springer Science+Business Media, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7425-2.

RSTUDIO© Desktop. Version 1.1.423: **RStudio**, 2009-2019.

SAEZ, J. M.; BIGLIARDO, A. L.; RAIMONDO, E. E.; BRICEÑO, G. E.; POLTI, M. A.; BENIMELI, C. S. Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.156, p. 97–105, 2018. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.03.011

SOLA, M. C.; OLIVEIRA, A. P.; FEISTEL, J. C.; REZENDE, C. S. M. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.8, n.14; p. 1398-1418, 2012.

STAMATIU-SÁNCHEZ, K., ALARCÓN, A., FERRERA-CERRATO, R., NAVA-DÍAZ, C., SÁNCHEZ-ESCUADERO, J., CRUZ-SÁNCHEZ, J. S., CASTILLO, M. P. Tolerancia de hongos filamentosos a edosulforán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones in vitro. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. v. 31, n. 1, p. 23-37, 2015.

TORTELLA, G. R.; RUBILAR, O.; CEA, M.; BRICEÑO, G.; QUIROZ, A.; DIEZ, M. C.; PARRA, L. Natural wastes rich in terpenes and their relevance in the matrix of an on-farm biopurification system for the biodegradation of atrazine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p. 8-15, 2013a. DOI: 10.1016/j.ibiod.2013.06.003

TORTELLA, G.; DURÁN, N.; RUBILAR, O.; PARADA, M.; DIEZ, M. C. Are white-rot fungi a real biotechnological option for the improvement of environmental health? **Critical Reviews in Biotechnology**. Early Online, p.1-8, 2013b. DOI: 10.3109/07388551.2013.823597

TORTELLA, G. R.; MELLA-HERRERA, R. A.; SOUSA, D. Z.; RUBILAR, O.; ACUÑA, J. J.; BRICEÑO, G.; DIEZ, M. C. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. **Journal of Hazardous Materials**. v.260, p.459– 467, 2013c. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2013.05.059

TORTELLA, G. R.; MELLA-HERRERA, R. A.; SOUSA, D. Z.; RUBILAR, O.; BRICEÑO, G.; PARRA, L.; DIEZ, M. C. Carbendazim dissipation in the biomixture of on-farm biopurification systems and its effect on microbial communities. **Chemosphere**, v.93, p.1084–1093, 2013d. DOI

10.1016/j.chemosphere.2013.05.084

WILCOXON, F.; KATTI, S. K.; WILCOX, R. A. Critical values and probability levels for the Wilcoxon Rank sum test and the Wilcoxon Signed rank test. 1965. In: HARTER, H. L.; OWEN, D. B. **Selected tables in mathematical statistics**. Institute of Mathematical Statistics, v.1, 1973, 403p.

ZEHRA, A.; DUBEY, M. K.; MEENA, M.; AAMIR, M.; PATEL, C.; UPADHYAY, R. Role of *penicillium* species in bioremediation processes. **New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering**, p. 247–260, 2018. DOI 10.1016/b978-0-444-63501-3.00014-4

CAPÍTULO 3

ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ANÁLISES QUÍMICAS NA AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DE FOSMETE EM SISTEMAS DE DISPOSIÇÃO DE RESÍDUOS DE AGRÓNICOS – *BIOBEDS*¹

¹ Parte deste capítulo foi apresentado no XIV Congresso Brasileiro de Ecologia do Brasil, em setembro de 2019, em São Lourenço, MG.

RESUMO

O uso de agrotóxicos gera efluentes concentrados, compostos por restos de calda e resíduos oriundos da lavagem dos pulverizadores. *Biobeds* são desenvolvidos com o propósito de receber e degradar estes efluentes, evitando que eles venham causar contaminação ambiental. Estudos envolvendo *biobeds* necessitam de análises para avaliar sua eficiência na degradação do resíduo de agrotóxicos. Ensaio com organismos não-alvo do solo têm sido considerados como uma importante ferramenta para o monitoramento desta eficiência. Em paralelo, as análises químicas permitem confirmar que, além da redução da ecotoxicidade, o *biobed* pode reduzir a concentração do agrotóxico ao longo do tempo. Neste estudo, foram utilizados colêmbolos (*Folsomia candida*) e enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) em ensaios crônicos de reprodução, para monitorar a degradação do inseticida organofosforado fosmete (35 mg kg⁻¹) em *biobeds* laboratoriais. Foi utilizada a biomistura padrão de *biobeds* (BP), composta por solo agrícola palha e turfa; comparando-a com duas biomisturas alternativas, que levaram húmus de minhoca (BH) ou acícula de pinus (BA) no lugar da turfa. Junto a estes ensaios foi avaliada a queda na concentração do produto, através de análises químicas. As análises foram realizadas aos 0, 30, 60 e 90 dias após a contaminação dos *biobeds* laboratoriais. A análise estatística dos dados de ecotoxicidade foi realizada com ANOVA seguida do teste de Dunnett ($p < 0,05$), comparando a reprodução nos substratos contaminados com seus controles (substratos limpos), para cada biomistura. Para as análises químicas foi gerada a curva de degradação e realizado o cálculo da meia-vida (DT₅₀) do fosmete nas biomisturas. Os colêmbolos mostraram-se mais sensíveis ao inseticida que os enquitreídeos. As biomisturas BA e BH foram capazes de reduzir a ecotoxicidade para colêmbolos aos 60 dias de degradação, porém ainda foi detectada ecotoxicidade para BP mesmo após 90 dias; para enquitreídeos não foi detectada ecotoxicidade após 30 dias de degradação nos três *biobeds*. Nas curvas de degradação do agrotóxico, o *biobed* alternativo com acícula promoveu uma degradação mais rápida, e a meia vida mais baixa (DT₅₀ = 12,20 dias); enquanto que o BH apresentou maior taxa de degradação, chegando a degradar 99% da dose de fosmete adicionada, ao passo que BA degradou 96%. Este trabalho permitiu concluir que acícula de pinus e húmus de minhoca têm potencial para substituírem a turfa como materiais alternativos na biomistura de *biobeds*, já que mostraram eficiência na degradação e redução da ecotoxicidade do inseticida avaliado.

Palavras-Chave: Degradação; Ecotoxicidade; Fauna Edáfica; Organofosforado.

ABSTRACT

*The use of pesticides generates concentrated effluents composed of spraying residues and washings from spraying equipments. Biobeds are used for disposing off and degrading these effluents, avoiding them to cause environmental contamination. Biobeds studies need evaluations on their efficiency in degrading pesticide residues. Non-target, edaphic organisms are considered an important tool for efficiency monitoring. At the same time, chemical analyzes allow to confirm that, in addition to reducing ecotoxicity, biobeds are reducing pesticide concentration over time. At this study, collembolans (*Folsomia candida*) and enchytraeid (*Enchytraeus crypticus*) were used on chronic reproductive tests, to monitor the degradation of an organophosphate insecticide, phosmet (35 mg kg⁻¹), at the standard biobed's biomixture (SB), composed of soil, straw and peat; comparing it to alternative biomixtures, with pine leaves (PB), or vermicompost (VB), replacing peat. At the same time, degradation of the product was evaluated through chemical analysis. Evaluations occurred at the times of 0, 30,*

60 and 90 days after pesticide application. Experimental design of the studies was completely randomized. Ecotoxicity statistical analysis occurred through ANOVA followed by Dunnett test ($p < 0,05$), comparing the reproduction in contaminated versus clean biomixtures; for chemical analysis data, degradation curves and phosmet half-life (DT_{50}) were estimated. Collembolans showed to be more sensitive than enchytraeid. Biomixtures PB and VP showed complete ecotoxicity reduction for collembolans after 60 days, however in SB there was still ecotoxicity even after 90 days; for enchytraeid, no ecotoxicity was detected after 30 days, for all three biomixtures. Degradation curves of phosmet showed that PB induced a faster degradation, with the lowest half-life ($DT_{50} = 12,20$ d); although VB showed almost complete degradation, reducing phosmet concentration in 99%, when PB reduced it in 96%. This work showed that both pine leaves and vermicompost are potentially substitutes for peat in alternative biomixtures, since they were efficient in degrading the pesticide and reducing its ecotoxicity.

Keywords: Degradation; Ecotoxicity; edaphic fauna; Organophosphate.

1. INTRODUÇÃO

Os *biobeds* são reatores biológicos utilizados para descarte e tratamento de efluentes de agrotóxicos provenientes das atividades agrícolas, evitando a contaminação pontual do solo e dos corpos hídricos, que pode ocorrer pelo descarte incorreto (CASTILLO et al., 2008; DIEZ, 2010). Nestes sistemas ocorrem processos de biodegradação promovidos por microrganismos, além da adsorção físico-química e fotólise. Portanto, a eficiência do sistema *biobed* está relacionada com a capacidade do reator em degradar e reter as moléculas de agrotóxicos, e será diretamente dependente dos materiais que compõem seu substrato (RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). Esta tecnologia foi desenvolvida na Suécia e publicada inicialmente por Torstensson e Castillo (1997). O substrato original é composto de uma proporção 2:1:1 de palha de trigo, turfa e solo agrícola. Por ter sido desenvolvido para as condições europeias, faz-se importante que sua composição seja adaptada de acordo com os materiais disponíveis em cada região onde ele será utilizado.

Diversos materiais já foram identificados como bons substitutos da palha de trigo ou da turfa na biomistura original. Dentre eles, pode-se citar o biochar (DIEZ et al., 2013), bagaço de cana de açúcar (SAEZ et al., 2018), fibra de coco (CHIN-PAMPILLO et al., 2016) e resíduos vegetais compostados (GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2018). Estes foram avaliados quanto à sua eficiência em promover a degradação de uma série de produtos químicos de uso agrícola. Para que seja possível indicar um substrato alternativo e ambientalmente seguro para o *biobed*, é importante que a sua eficiência seja avaliada em relação à degradação química e quanto à redução da ecotoxicidade do agrotóxico. A análise química permite avaliar a

capacidade do *biobed* em reduzir a concentração do agrotóxico ao longo do tempo. Porém, estas análises limitam-se a identificar determinadas moléculas e dentro de um limite de quantificação (VARELI et al., 2018). A limitação é que as análises não detectam os metabólitos, nem podem assegurar que, mesmo em baixas concentrações, não hajam efeitos de toxicidade para os organismos presentes no solo onde a biomistura será descartada, após o período de degradação e compostagem (HUETE-SOTO et al., 2017).

A forma de monitorar o decréscimo da ecotoxicidade é a partir dos ensaios ecotoxicológicos (RODRÍGUEZ-CASTILLO et al., 2018). A Ecotoxicologia é a ciência responsável por avaliar a toxicidade de determinadas substâncias, naturais ou sintéticas, sobre um ecossistema como um todo (NIVA; BROWN, 2019). O objetivo é prevenir a ocorrência dos efeitos adversos de substância emitidas pelo homem sobre o ecossistema, suas funções, estruturas e biodiversidade. Baseia-se na observação do efeito destas substâncias sobre organismos-teste de espécies conhecidas, representantes das populações do ecossistema em questão (NIEMEYER et al., 2012; TARAZONA; RAMOS-PERALONSO, 2014).

O monitoramento com os ensaios permite uma determinação direta do nível de toxicidade em que se encontra a biomistura, prevendo efeitos que possam ocorrer no ambiente, de acordo com as respostas dos organismos-teste (BARETTA et al., 2003; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ et al., 2018). Através de ensaios crônicos é possível avaliar o efeito de um contaminante sobre a reprodução dos organismos, sendo que a assimilação da substância química pode ocorrer de forma dérmica ou alimentar (ABNT, 2011; ISO, 2011). Os ensaios agudos de letalidade baseiam-se na exposição dos organismos-teste à amostra contaminada e à amostra limpa, durante um período de 14 dias. Tem-se como objetivo avaliar a letalidade através da comparação do número de sobreviventes em cada amostra (ABNT, 2012).

O uso de invertebrados do solo nos ensaios tem sido amplamente aplicado devido à facilidade de cultivo, ciclo de vida reduzido e dimensões corporais pequenas. Para garantir a confiabilidade dos resultados são utilizadas espécies sensíveis cujas funções nos ecossistemas sejam importantes e conhecidas. Este é o caso dos enquitreídeos e colêmbolos, que são organismos geobiontes, ou seja, possuem uma alta sensibilidade a qualquer impacto no solo pois seu ciclo de vida ocorre inteiramente nele (MENTA, 2012). Eles são sensíveis a uma série de contaminantes (NIVA; BROWN, 2019), podendo citar os metais (BUCH et al., 2016; ZHU et al., 2016), compostos orgânicos como os hidrocarbonetos de petróleo (GAINER et al., 2018; KHAN et al., 2018), nanomateriais (HUND-RINKE et al., 2016), e agrotóxicos (AMORIM et al., 2012; NIEMEYER et al., 2017).

Enquitreídeos são anelídeos oligoquetas escavadores do solo, que contribuem para a segregação da matéria orgânica e a ciclagem de nutrientes, sendo comum sua presença em associação a minhocas (NIVA; BROWN, 2019). Devido a estas características, são considerados bioindicadores ecologicamente relevantes, e possuem norma própria da ABNT para realização dos ensaios crônicos. São de fácil manuseio e possuem um ciclo de vida mais rápido que o das minhocas, apresentando então uma vantagem para os ensaios ecotoxicológicos (ABNT, 2012). Colêmbolos são invertebrados artrópodes, sendo um dos grupos de organismos mais abundantes na fauna edáfica. São utilizados em ensaios de ecotoxicidade por serem de fácil criação e possuírem um papel importante nos processos de mineralização do solo (ABNT, 2011; AMORIM et al, 2012), e por sua alta sensibilidade a qualquer alteração que venha a ocorrer em seu ambiente (NIVA; BROWN, 2019). Ensaio de reprodução e de comportamento de fuga com estes organismos são padronizados internacionalmente (ABNT, 2011; ISO, 2011).

Em *biobeds*, é importante que seja avaliada a resposta dos organismos do solo às biomisturas envelhecidas, e estes ensaios vêm sendo utilizados para acompanhar a redução da ecotoxicidade do agrotóxico. Avaliações utilizando organismos do solo foram feitas por Masin et al. (2018), que aplicaram ensaios de letalidade e reprodução com minhocas da espécie *Eisenia fetida* para avaliar e comparar a eficiência de oito novas biomisturas em degradar glifosato. Os maiores índices de reprodução ocorreram nos substratos que levaram palha de trigo e solo argiloso na composição. Huete-Soto et al. (2017) aplicaram ensaios de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*, onde se observou a redução do efeito da toxicidade de uma mistura de herbicidas e inseticidas sobre o desenvolvimento das plântulas.

No Brasil, Carniel (2015) avaliou a degradação de uma série de aplicações de mancozebe e clorpirifós em um *biobed* a campo, e comparou com dois tipos de solos subtropicais. O pior cenário de uso do *biobed* também foi avaliado, através do derrame acidental de um litro de clorpirifós no *biobed*. Ensaio de reprodução foram realizados com espécies de colêmbolos (*Folsomia candida*), enquitreídeos (*Enchytraeus crypticus*) e minhocas (*Eisenia andrei*). Os ensaios indicaram algum nível de efeito de toxicidade, que foi reduzindo ao longo de 420 dias de avaliação para todos os tratamentos. Com exceção dos colêmbolos, que apresentaram considerável sensibilidade ao clorpirifós, um inseticida organofosforado, mesmo após 420 dias de aplicação do produto em uma amostra de latossolo, e após 420 dias no caso de derrame acidental no *biobed*. Gebler et al. (2015) utilizaram *E. fetida* na avaliação de um *biobed* que recebeu aplicações de glufosinato de amônia e clorpirifós. As taxas de mortalidade e fuga foram altas durante as aplicações iniciais, e reduziram à medida em que mais aplicações

foram realizadas, indicando uma preferência das minhocas pelo *biobed* contaminado, nos ensaios de fuga.

O estudo apresentado neste capítulo visou avaliar três biomisturas diferentes na composição de *biobeds* laboratoriais (a original e duas alternativas). Buscou-se avaliar a eficiência destas biomisturas em reduzir a ecotoxicidade do inseticida organofosforado fosmete (Imidan®) sobre colêmbolos e enquitreídeos, ao longo de 90 dias. Como forma de confirmar esta eficiência, foram apresentados resultados da análise química de degradação do produto ao longo do tempo, nas biomisturas dos *biobeds* laboratoriais.

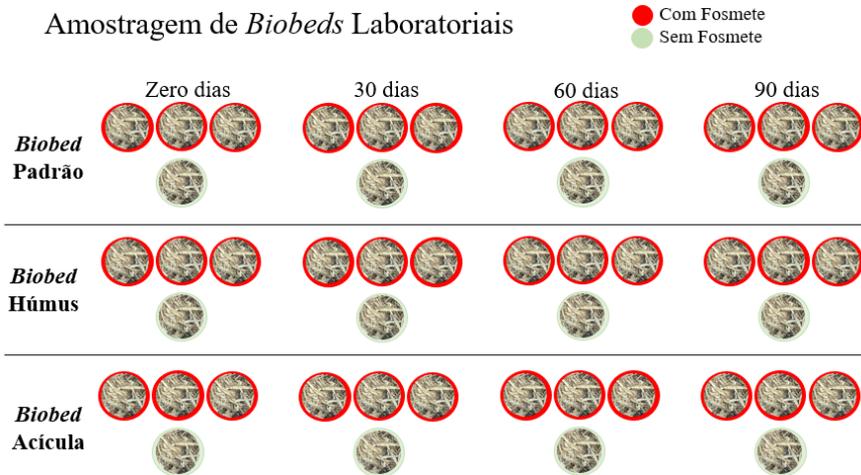
2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 BIOBEDS LABORATORIAIS

Foram utilizados neste capítulo os mesmos *biobeds* laboratoriais montados e descritos no Capítulo 2. O *Biobed* Padrão (BP), *Biobed* Acícula (BA) e *Biobed* Húmus (BH) foram mantidos em incubadora do tipo DBO, na temperatura de $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante os 9 meses de duração do projeto, correspondentes aos períodos de maturação biológica, seguida da aplicação do fosmete e avaliação da degradação.

Como previamente descrito, a dose aplicada de fosmete, através do Imidan® (500 WP), foi de 35 mg ia kg^{-1} . Após este procedimento, as reduções a nível de ecotoxicidade e de concentração química do fosmete foram avaliadas por 90 dias, durante os quais retiraram-se amostras mensais destrutivas, dos *biobeds* laboratoriais com fosmete e sem fosmete, nos períodos de 0, 30, 60 e 90 dias depois da contaminação. Um resumo das amostragens realizadas pode ser visualizado no esquema experimental da Figura 1. Para as análises ecotoxicológicas foi realizada uma amostragem composta das três repetições da biomistura contaminada, e para as análises químicas foram coletadas três subamostras desta biomistura. Para ambos os casos foi realizada uma amostragem simplificada da biomistura limpa. Estas amostras foram acondicionadas em recipiente plástico e mantidas em congelador a -18°C .

Figura 1 – Esquema experimental da amostragem destrutiva dos *biobeds* laboratoriais, ao longo dos 90 dias de monitoramento ecotoxicológico e químico da degradação do fosmete.



Fonte: O autor (2020).

2.2 DETERMINAÇÃO QUÍMICA DO FOSMETE

A determinação química do fosmete nos *biobeds* laboratoriais foi realizada por laboratório parceiro do grupo de pesquisa em *biobeds* no Brasil. O CEPARC (Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes) está estabelecido no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), no município de Santa Maria – RS. Neste local são desenvolvidos e aplicados métodos analíticos para determinação de resíduos de agrotóxicos e micotoxinas (CEPARC, 2019).

O procedimento para extração residual do fosmete foi baseado no estudo otimizado e validado para determinação individual e multirresidual de agrotóxicos em *biobeds*, desenvolvido por Vareli (2019). Após a extração em acetona, a determinação dos resíduos foi feita por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS, do inglês *Ultra Performance Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*), a partir da metodologia para determinação multirresidual de agrotóxicos em frutas e vegetais, desenvolvido por Dias et al. (2017). Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) para o fosmete em *biobeds* foram de 0,02 mg kg⁻¹ (LOD) e 0,1 mg kg⁻¹ (LOQ).

O cálculo de meia-vida do agrotóxico (DT_{50}) foi realizado a partir da Equação Cinética de Primeira Ordem (KARANASIOS et al., 2012), apresentada na Equação 1.

$$C_t = C_0 \times e^{-k.t} \quad (1)$$

Onde:

C = concentração do agrotóxico no tempo t

C_0 = concentração inicial do agrotóxico

k = constante do modelo de primeira ordem

2.3 PREPARAÇÃO AMOSTRAL PARA OS ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

Todas as avaliações e procedimentos descritos nos próximos itens deste capítulo foram realizados no laboratório de Ecologia da UFSC, Campus de Curitibanos. Antes de cada ensaio, as amostras foram desfaunadas por três ciclos de congelamento e descongelamento, buscando eliminar possíveis invertebrados presentes (p.e. ácaros e moscas) nas biomisturas.

Para os ensaios de ecotoxicidade, as biomisturas sem agrotóxico foram utilizadas como controle para efeitos de comparações estatísticas com as biomisturas contaminadas. Adicionalmente, foi usado como controle do ambiente de ensaio o solo artificial tropical (SAT). O SAT é uma modificação do solo artificial OECD (OECD, 1984), proposta por Garcia (2004), onde a turfa é substituída por pó de casca de coco. Este substrato padrão é o recomendado para as avaliações ecotoxicológicas em regiões de clima tropical (ALVES et al., 2013). Para o presente estudo, o SAT foi composto por 5% de pó de casca de coco (seco e peneirado), 75% de areia fina (lavada e seca) e 20% de caulim, com o pH ajustado para a faixa entre 5,5 e 6,5 com adição de $CaCO_3$.

2.4 ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE E ORGANISMOS-TESTE

Foram realizados ensaios para avaliação crônica da reprodução dos invertebrados terrestres, com organismos de criações sincronizadas em laboratório, das espécies *F. candida* (Colêmbolo) e *E. crypticus* (Enquitreídeo). Os ensaios foram aplicados de acordo com as normas ABNT, em dois momentos do presente projeto. O primeiro momento envolveu a

avaliação das três biomisturas contaminadas (BP, BH, BA), coletadas nos tempos de 0 e 30 dias de degradação do fosmete. O segundo momento visou avaliar a ecotoxicidade aos 60 e 90 dias de degradação. Em todos os ensaios, foram usados como controles as biomisturas limpas (testemunhas dos ensaios) e o SAT. O SAT é utilizado com o objetivo de atestar a confiabilidade do ensaio, através da validação de parâmetros mínimos de reprodução dos organismos. Todos os tratamentos foram realizados com cinco réplicas, contando ainda com uma réplica adicional, sem organismos, para o controle de umidade e pH finais. Umidade e pH foram medidos também no início dos ensaios, servindo não só para monitoramento dos parâmetros dos ensaios ecotoxicológicos, mas para controle de umidade e pH dos *biobeds*. Os ensaios foram conduzidos como experimentos inteiramente casualizados.

2.4.1 Reprodução de colêmbolos

De acordo com a norma ABNT NBR/ISO 11.267 (ABNT, 2011), as criações de *F. candida* (Figura 2B) foram mantidas em recipientes plásticos contendo um substrato composto por carvão ativado e gesso na proporção de 1:10. As culturas foram mantidas em câmara tipo DBO, a $20\pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo claro/escuro de 16h/8h, e recebendo o fermento seco como alimento semanal. Os adultos foram trocados de substrato como forma de estímulo à reprodução, com auxílio de um aparato de sucção, composto por uma pipeta Pasteur, filtro de tecido, algodão e mangueira. Os ovos para o ensaio foram coletados e depositados em um novo recipiente com substrato, quatro dias após a troca dos adultos. Dois dias após a eclosão dos primeiros juvenis, o restante dos ovos foi descartado. Os juvenis foram usados para ensaio com idade entre 10 e 12 dias.

Para a montagem dos ensaios, as réplicas amostrais de 30 g receberam dez exemplares juvenis de *F. candida*. Os ensaios foram incubados em DBO por 28 dias a $20\pm 1^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h claro / 8 h escuro. A manutenção da umidade foi realizada semanalmente, repondo água perdida, através da pesagem e adição de água destilada. Os organismos receberam aproximadamente 2 mg de fermento seco no 1º dia e no 14º dia. Aos 28 dias foi realizada a leitura do ensaio, adicionando água e gotas de tinta de carimbo. Após agitação com um bastão de vidro, os organismos vivos flotavam na superfície do líquido, permitindo o registro fotográfico para posterior contagem no programa ImageJ® (Figura 2A).

Os ensaios foram considerados válidos quando o mínimo de 100 juvenis por recipiente foi atingido nos controles (testemunhas e SAT), não excedendo 30% de variação, e o percentual de letalidade dos adultos menor ou igual a 20%.

Figura 2 – Imagens retratando os ensaios com colêmbolos (*F. candida*) e os organismos utilizados.



(A) Leitura de um ensaio com *F. candida*, aonde é possível observar os colêmbolos flutuando na superfície do líquido. (B) Imagem de um dos recipientes utilizados para a criação dos organismos-teste, cujos exemplares são visualizados a partir da fotografia em lupa (40x).

Fonte: O autor (2019).

2.4.2 Reprodução de enquitreídeos

Para a criação de *E. crypticus* (Figura 3) seguiu-se a norma ABNT NBR/ISO 16.387 (ABNT, 2012), que traz especificações para o cultivo dos organismos. O cultivo foi realizado em SAT umedecido com água destilada, à temperatura de $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo claro/escuro de 16h/8h, alimentando os organismos semanalmente com aveia fina. A manutenção das criações foi feita a partir da transferência periódica de alguns organismos para um novo recipiente.

Para a montagem dos ensaios, foram usadas cinco réplicas de 30 g de peso fresco para cada tratamento, onde foram inseridos dez adultos clitelados de *E. crypticus*. Os recipientes foram mantidos em DBO a $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 16h/8h, ao longo de 28 dias. A manutenção da umidade foi realizada semanalmente, quando também foram adicionados aproximadamente 25 mg de aveia fina como alimento.

Transcorridos os 28 dias, foi realizada a adição de álcool 70% e algumas gotas de corante rosa bengala para corar os juvenis. A partir de sete dias deste procedimento, iniciou-se a contagem de juvenis em lupa estereoscópica binocular (40x), Figura 3. Os ensaios foram

considerados válidos quando a média de 25 juvenis foi obtida por recipiente-teste nos controles, não excedendo 50% no coeficiente de variação.

Figura 3 – Imagens retratando os ensaios com enquitreídeos (*E. crypticus*) e os organismos utilizados.



(A) Contagem da reprodução de *E. crypticus*. (B) Organismos de cor rosada visualizados na lupa (40x).
Fonte: O autor (2019).

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de ecotoxicidade foram analisados no software RStudio© (2019). A normalidade foi verificada através do teste de Shapiro-Wilk, enquanto a homogeneidade foi verificada através dos testes de Bartlett e Fligner-Killeen. Após, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) seguida do teste de comparações múltiplas de Dunnet ($p < 0,05$), comparando o número de juvenis das biomisturas contaminadas com o número de juvenis dos respectivos controles (biomisturas não contaminadas). Nos casos em que os dados não foram normais, realizou-se a transformação através do método de Box-Cox, para então prosseguir com a aplicação da ANOVA e teste de Dunnet.

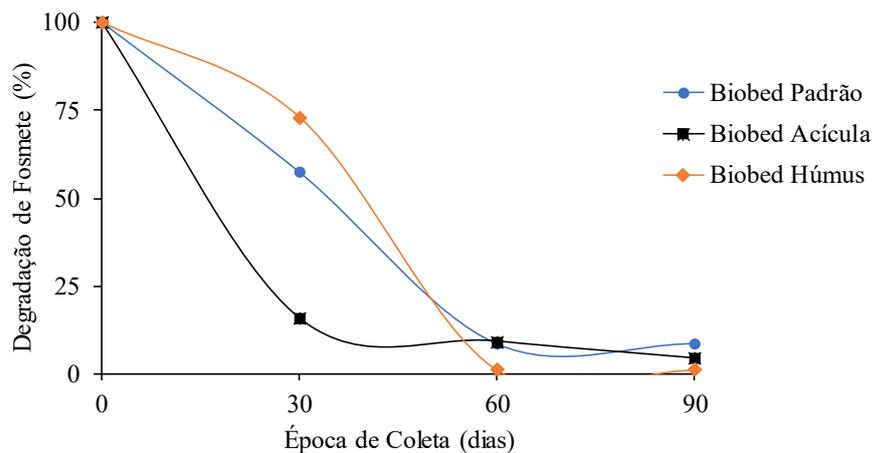
Os parâmetros do modelo cinético de degradação química do fosmete foram estimados no RStudio© (2019).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ANÁLISES QUÍMICAS RESIDUAIS DO FOSMETE

As curvas de degradação percentual do fosmete encontram-se na Figura 4. Inicialmente, o *Biobed* Acícula foi o que induziu uma queda mais rápida da concentração do produto, seguido de BP e então BH. A partir dos 60 dias as três biomisturas apresentaram concentrações similares do agrotóxico, sendo que ainda ocorreu uma queda menos pronunciada, porém ainda existente em BA, e quase inexistente para as outras duas biomisturas. Em valores percentuais, BA reduziu a concentração de fosmete em 96%, BP reduziu em 91%, e BH foi a biomistura mais eficiente na degradação do fosmete, reduzindo sua concentração em 99%. A dose inicial aplicada foi de 35 mg ia kg⁻¹.

Figura 4 – Curvas de degradação do fosmete, em valores percentuais, ao longo de 90 dias de avaliações mensais, para os três *biobeds* avaliados no projeto (BP, BA e BH). A época de coleta zero ocorreu logo após a aplicação do produto.



Valores percentuais baseados na média de três subamostras.
Fonte: O autor (2020).

Quanto aos valores de meia vida do fosmete, BA apresentou $DT_{50} = 12,20$ dias, seguido de BP ($DT_{50} = 26,03$ dias) e BH ($DT_{50} = 26,46$ dias), que foram similares.

3.2 ENSAIOS DE REPRODUÇÃO COM COLÊMBOLOS

Considerando que os ensaios de ecotoxicidade foram realizados em dois momentos separados, foi necessário desenvolver gráficos de colunas a partir da proporcionalidade do número de juvenis obtidos na parte 1 e parte 2, em relação às suas respectivas testemunhas. O

SAT foi avaliado para fins de validação, sendo que os valores mínimos de reprodução foram atingidos em todos os ensaios.

A síntese das médias reprodutivas de *F. candida* em cada um dos *biobeds* avaliados encontra-se na Tabela 1. Os dados das avaliações de 0 e 30 dias foram comparados com a Testemunha 1, e os dados das avaliações de 60 e 90 dias foram comparados com a Testemunha 2. Para BH os dados dos quatro períodos foram comparados com apenas uma Testemunha.

Tabela 1 – Juvenis de *F. candida* (média \pm desvio-padrão) nas diferentes biomisturas, contaminadas com fosmete e testemunhas, após 0, 30, 60 e 90 dias da contaminação.

Número Médio de Juvenis – <i>F. candida</i>		
	Amostra	Média \pm DP
<i>Biobed</i> Padrão	<i>Testemunha.1</i>	208,5 \pm 46,3
	0 dias	2,6 \pm 1,7 *
	30 dias	6,6 \pm 7,1 *
	<i>Testemunha.2</i>	273,4 \pm 28,6
	60 dias	148,8 \pm 53,7 *
	90 dias	191,0 \pm 68,4 *
<i>Biobed</i> Acícula	<i>Testemunha.1</i>	303,6 \pm 100,5
	0 dias	18,4 \pm 6,9 *
	30 dias	80,2 \pm 41,6 *
	<i>Testemunha.2</i>	308,8 \pm 84,0
	60 dias	307,6 \pm 24,0
	90 dias	321,8 \pm 89,0
<i>Biobed</i> Húmus	<i>Testemunha</i>	417,2 \pm 106,7
	0 dias	26,4 \pm 12,5 *
	30 dias	52,4 \pm 17,0 *
	60 dias	439,8 \pm 94,9
	90 dias	400,4 \pm 89,0

* Número de juvenis significativamente menor que na testemunha (Dunnett, $p < 0,05$). Os dados das avaliações de 0 e 30 dias foram comparados com a Testemunha 1, e os dados das avaliações de 60 e 90 dias foram comparados com a Testemunha 2. Para BH os dados dos quatro períodos foram comparados com apenas uma Testemunha.

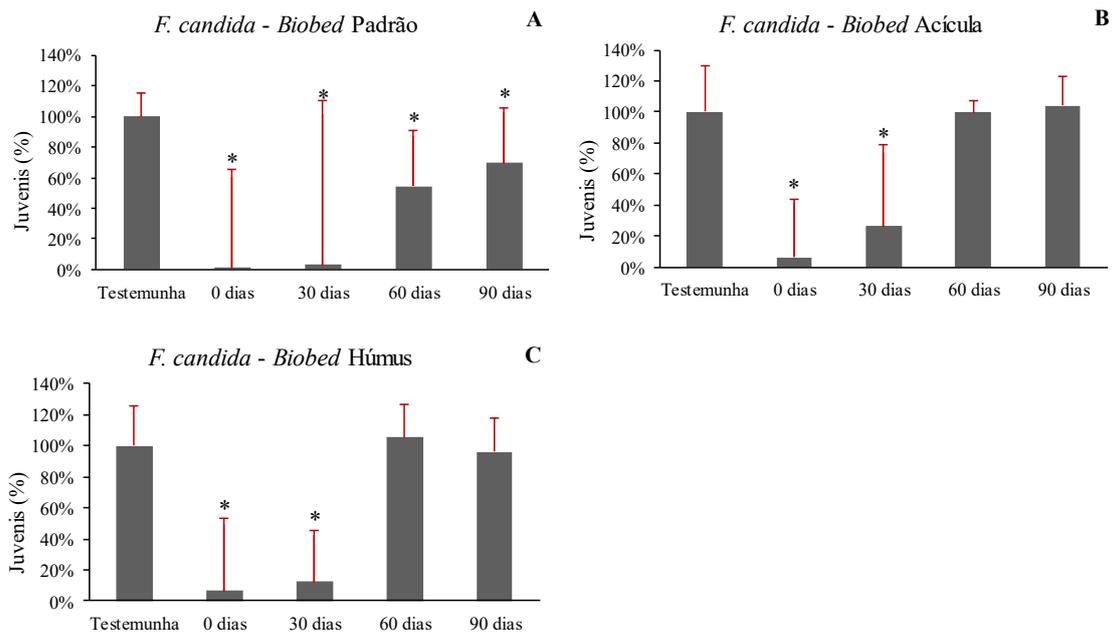
Fonte: O autor (2019).

Para o BP contaminado, foi possível observar que em nenhum momento a resposta do ensaio de reprodução atingiu a semelhança de 100% em relação à biomistura BP limpa (testemunha). O valor máximo atingido foi de aproximadamente 70% de semelhança da

resposta reprodutiva no tempo máximo avaliado de 90 dias de degradação do fosmete, aonde manteve-se a diferença estatística significativa (Figura 5A). Isso correspondeu a uma média de $191,0 \pm 68$ juvenis aos 90 dias, para $273,4 \pm 28,6$ juvenis na Testemunha 2, e indica que para esta biomistura seriam necessários mais ensaios de ecotoxicidade após os 90 dias para identificar o mês em que esta diferença estatística deixasse de ocorrer.

Para BA a diferença deixou de ser significativa aos 60 dias, com a média de $307,6 \pm 24,0$ no tratamento, e $308,8 \pm 84,0$ juvenis na Testemunha 2. A reprodução continuou a aumentar aos 90 dias, o que pode ser observado na Figura 5B. Em BH a diferença significativa também deixou de ocorrer aos 60 dias, porém, apresentou uma queda na reprodução aos 90 dias. Neste período, as médias caíram de $439,8 \pm 94,9$ para $400,4 \pm 89,0$ juvenis, respectivamente (Figura 5C).

Figura 5 – Reprodução de *F. candida*, nas biomisturas BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de degradação do fosmete.



* Número de juvenis significativamente menor que na testemunha (Dunnett, $p < 0,05$). Os dados são apresentados em porcentagem pois representam a relação da reprodução obtida em cada época de coleta com suas diferentes testemunhas.

Fonte: O autor (2019).

3.3 ENSAIOS DE REPRODUÇÃO COM ENQUITREÍDEOS

Os resultados dos ensaios de reprodução com *E. crypticus* encontram-se na Tabela 2. A reprodução sob efeito do fosmete foi inferior às testemunhas apenas no tempo zero, se tornando

superior a elas a partir dos 30 dias de degradação, em todas as biomisturas avaliadas. Após este período, foi possível observar uma queda na reprodução em algum momento das avaliações.

Tabela 2 - Juvenis de *E. crypticus* (média \pm desvio padrão) nas diferentes biomisturas, contaminadas com fosmete e testemunhas, após 0, 30, 60 e 90 dias da contaminação.

Número Médio de Juvenis - <i>E. crypticus</i>	
Amostra	Média \pm DP
<i>Testemunha.1</i>	918,6 \pm 40,8
0 dias	699,0 \pm 130,3 *
30 dias	1021,0 \pm 94,9
<i>Testemunha.2</i>	1075,8 \pm 96,5
60 dias	1265,6 \pm 251,7
90 dias	1132,6 \pm 184,6
<i>Testemunha.1</i>	1085,8 \pm 105,2
0 dias	601,8 \pm 68,4 *
30 dias	1278,4 \pm 177,7
<i>Testemunha.2</i>	1074,6 \pm 186,2
60 dias	1230,4 \pm 170,9
90 dias	1185,4 \pm 295,1
<i>Testemunha.1</i>	823,6 \pm 196,1
0 dias	737,0 \pm 165,1
30 dias	1122,8 \pm 109,0
<i>Testemunha.2</i>	1005,5 \pm 130,0
60 dias	1247,0 \pm 108,5
90 dias	930,6 \pm 169,0

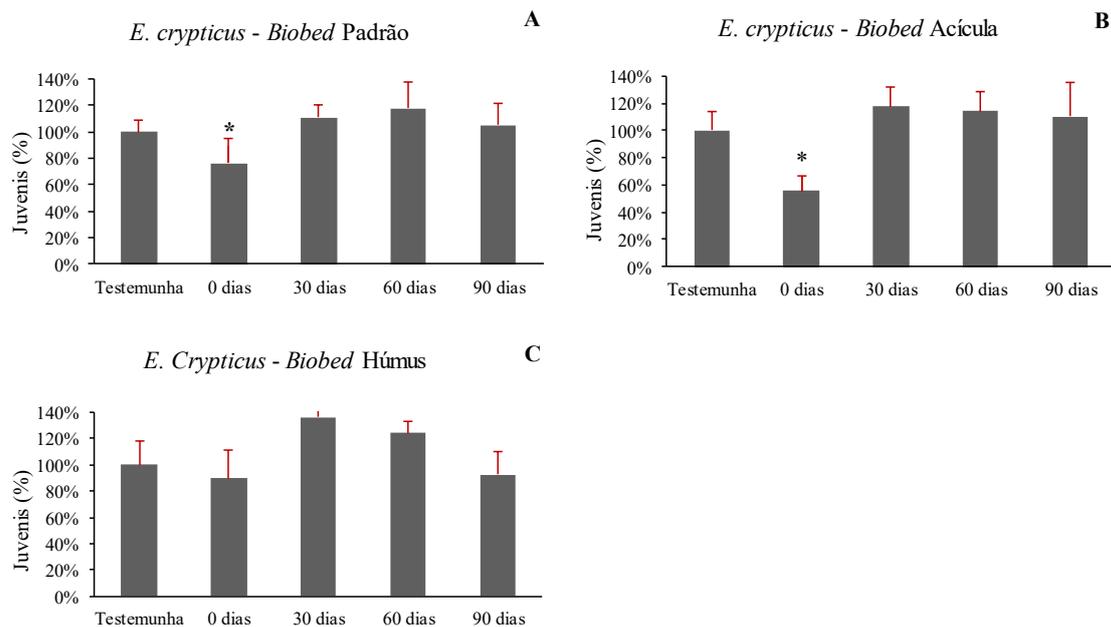
* Número de juvenis significativamente menor que na testemunha (Dunnett, $p < 0,05$). Os dados das avaliações de 0 d e 30 d foram comparados com a Testemunha 1, e os dados das avaliações de 60 d e 90 d foram comparados com a Testemunha 2.

Fonte: O autor (2019).

No caso de BP (Figura 6A) e BA (Figura 6B), a média das testemunhas foi estatisticamente superior à reprodução de 0 dias, sendo 918,6 \pm 40,8 na Testemunha 1 para 699,0 \pm 130,3 juvenis no tempo zero, e 1085,8 \pm 105,2 juvenis na Testemunha 1 para 601,8 \pm 68,4 no tempo zero, respectivamente. A partir dos 30 dias não foi possível observar efeitos do produto sobre a reprodução dos enquitreídeos. As testemunhas de BH, cujas médias de juvenis

foram $823,6 \pm 196,1$ e $1005,5 \pm 130,0$ (Tabela 2), não foram significativamente superiores a nenhum dos períodos de avaliação da ecotoxicidade de fosmete. Ainda, foi observada uma queda considerável no número de juvenis a partir da avaliação de 30 dias, passando de $1122,8 \pm 109,0$ para $930,6 \pm 169,0$ juvenis aos 90 dias. Apesar disso, este valor não foi estatisticamente inferior àquele apresentado pelas testemunhas.

Figura 6 – Reprodução de *E. crypticus*, nas biomisturas BP, BA e BH, ao longo de 90 dias de degradação do fosmete.



* Número de juvenis significativamente menor que na testemunha (Dunnett, $p < 0,05$). Os dados são apresentados em porcentagem pois representam a relação da reprodução obtida em cada época de coleta com sua respectiva testemunha.

Fonte: O autor (2019).

3.4 DISCUSSÃO

3.4.1 Organismos-teste

Segundo dados fornecidos pela IUPAC (2019), o fosmete possui resultados importantes relacionados a ensaios de ecotoxicidade com minhocas (*Eisenia foetida*), que indicaram a concentração de efeito de $0,144 \text{ mg kg}^{-1}$ nos ensaios crônicos de reprodução, e dose letal para 50% dos indivíduos (DL_{50}) de 52 mg kg^{-1} .

De forma geral, os enquitreídeos vem sendo considerados menos sensíveis que colêmbolos em ensaios com inseticidas (NIEMEYER et al., 2017). Apesar disso, a resposta deste grupo, associada à resposta dos colêmbolos permite obter um panorama mais completo a respeito dos níveis de redução de ecotoxicidade do material avaliado. Considerando estudos envolvendo produtos similares ao fosmete, que é um inseticida organofosforado, Natal-da-Luz (2012) avaliaram o efeito do diazinon sobre a reprodução e fuga de *E. crypticus* e *F. candida*. Para isso, foram utilizadas amostras de uma área agrícola que recebeu o produto. Os colêmbolos foram os organismos mais sensíveis, apresentando concentrações de efeito para 50% da população (CE₅₀) de 0,288 mg i.a. kg⁻¹ para os ensaios de reprodução. A reprodução de *E. crypticus* não apresentou alterações diante do contato com o produto (NATAL-DA-LUZ et al., 2012). Os colêmbolos também foram mais sensíveis ao contato com o inseticida organofosforado diazinon no estudo de Carniel (2015), que avaliou o efeito de uma biomistura e dois solos naturais contaminados por clorpirifós sobre a reprodução de *F. candida* e *E. crypticus*.

Amorim et al. (2012) avaliaram a resposta aguda e crônica em ensaios com *F. candida* exposto a dimetoato (outro inseticida organofosforado) e lindano (inseticida organoclorado). Os valores de CE₅₀ foram de 1,6 mg i.a. kg⁻¹ e 0,8 mg i.a. kg⁻¹, respectivamente. Pereira et al. (2013) afirmam ainda que inseticidas organofosforados podem gerar falsas conclusões em ensaios de fuga com *F. candida*, já que ele causa paralisia corporal e impede os organismos de escaparem do solo contaminado.

Os herbicidas organofosforados, por sua vez, não apresentam o mesmo efeito sobre os colêmbolos. Niemeyer et al. (2018) avaliaram a resposta de invertebrados do solo a doses recomendadas de produtos à base de glifosato. Nenhuma dose afetou de forma significativa a reprodução de colêmbolos. Resposta similar foi encontrada por Santos et al. (2012), ao avaliar um produto à base de glifosato. Estas respostas indicam que herbicidas não afetam os colêmbolos de forma tão intensa quanto os inseticidas. Portanto, em se tratando de estudos sobre o monitoramento da eficiência de *biobeds*, a escolha das espécies deve levar em conta a sensibilidade destas aos produtos em avaliação. Pode-se levar em consideração dados da literatura, ou ainda realizar ensaios preliminares de letalidade, de forma a determinar a concentração que causa efeito letal para 50% da população (CL₅₀).

3.4.2 Eficiência das biomisturas propostas

Biomisturas alternativas compostas por húmus de minhoca têm sido consideradas boas opções para uso no *biobed*. Diaz et al. (2017), avaliando a deposição de húmus de minhoca em um solo contaminado por imidacloprida, obtiveram níveis de mineralização do produto de até 10% superiores ao solo que não recebeu este substrato, o que indicou um potencial de uso de húmus de minhoca em *biobeds*. Delgado-Moreno et al. (2019) também relataram bons resultados ao avaliar, dentre outras composições, um *biobed* composto por solo, vermicomposto e restos de poda de oliveiras. Ao final de 84 dias de incubação do *biobed* foi possível atingir uma taxa de degradação de 94% dos contaminantes emergentes presentes em águas residuais (diclofenaco, ibuprofeno e triclosan). Romero et al. (2019) comprovaram a eficiência de um *biobed* composto por solo, brotos de videira e vermicomposto proveniente de vinhaça, na degradação de imidacloprid, metalaxil e tebuconazole.

Em se tratando da biomistura com acícula de pinus, Tortella et al. (2013a) avaliaram o efeito que a acícula de pinus recém depositada, além de outros resíduos orgânicos ricos em terpenos, poderia causar sobre a eficiência da biodegradação de atrazina em um *biobed* original. A acícula de pinus não gerou diferenças na eficiência da degradação de atrazina, em comparação com a biomistura tradicional. Diferentemente dos resultados obtidos neste trabalho, aonde o *Biobed* Acícula gerou a meia vida mais baixa de fosmete ($DT_{50} = 12,20$ dias), e uma degradação de 96% do produto, superior à biomistura tradicional (BP).

Castro-Gutiérrez et al. (2017) apontam a importância de estudos a campo para identificar, previamente ao seu uso efetivo, o tempo em que o *biobed* poderá ser utilizado antes de envelhecer e perder sua eficiência na biodegradação, o que também é chamado de vida útil das biomisturas. Condições de alta temperatura e umidade possuem a tendência de intensificar a atividade microbiana na biomistura e, conseqüentemente, seu envelhecimento ocorre de forma mais rápida. Como o presente estudo mostrou altos percentuais de degradação do fosmete nos *biobeds* laboratoriais, pode-se presumir que tais níveis de eficiência também sejam obtidos em *biobeds* em campo, desde que se mantenham as condições estáveis de temperatura e umidade para o desenvolvimento da comunidade microbiana. Porém, é importante saber por quanto tempo este alto nível da atividade microbiana será mantido em cada biomistura.

4. CONCLUSÕES

As biomisturas avaliadas mostraram altos níveis de eficiência na redução da ecotoxicidade e degradação do fosmete. Os colêmbolos foram mais sensíveis ao fosmete que os enquitreídeos, sendo que as biomisturas BA e BH apresentaram a maior capacidade em reduzir o efeito crônico provocado pelo fosmete sobre a reprodução de colêmbolos. Na biomistura BP, desenvolvida originalmente para o *biobed*, os ensaios de reprodução com colêmbolos indicaram que BP não foi capaz de reduzir totalmente a ecotoxicidade, após 90 dias de avaliação. O efeito negativo do fosmete foi mais brando sobre a recuperação dos enquitreídeos, que deixaram de apresentar ecotoxicidade após 30 dias. Apesar de a degradação ter ocorrido de forma mais rápida em BA ($DT_{50} = 12,20$ dias), a taxa mais alta de degradação foi atingida por BH.

Novos estudos com *biobeds* instalados no campo, e com mais de uma aplicação do fosmete, poderiam confirmar os resultados obtidos neste estudo a respeito da eficiência das biomisturas em degradar o agrotóxico. Para conclusões mais completas, recomenda-se avaliações futuras envolvendo também a formação dos metabólitos do agrotóxico, ao longo da sua degradação. Estudos avaliando a aplicação de uma mistura de agrotóxicos também devem ser levados em consideração. Estes estudos em campo associados a análises químicas serão importantes para estimar o tempo de vida útil efetiva de cada biomistura.

REFERÊNCIAS

- ABNT. **NBR ISO 11267**: Qualidade do solo - Inibição da reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) por poluentes do solo. Rio de Janeiro, 2011.
- ABNT. **NBR ISO 16387**: Qualidade do solo – Efeitos de poluentes em Enchytraeidae (*Enchytraeus* sp.) – Determinação de efeitos sobre reprodução e sobrevivência. Rio de Janeiro, 2012.
- ALVES, P.R.L.; CARDOSO, E.J.B.N.; MARTINES, A.M.; SOUSA, J.P.; PASINI, A. Earthworm ecotoxicological assessments of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, v. 90, p.2674–2682, 2013. DOI10.1016/j.chemosphere.2012.11.046.
- AMORIM, M. J. B., PEREIRA, C., MENEZES-OLIVEIRA, V. B., CAMPOS, B., SOARES, A. M. V. M., LOUREIRO, S. Assessing single and joint effects of chemicals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* (Collembola) in soil. **Environmental pollution**, v.160, p.145-52, 2012. DOI: 10.1016/j.envpol.2011.09.005
- BARETTA, D.; SANTOS, J.C.P.; MAFRA, A.L.; WILDNER, L.P.; MIQUELLUTI, D.J. Fauna Edáfica Avaliada por Armadilhas e Catação Manual Afetada pelo Manejo do Solo na Região Oeste Catarinense. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.2, p.97-106, 2003.
- BUCH, A. C.; NIEMEYER, J. C.; CORREIA, M. E. F.; SILVA-FILHO, E. V. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: Baseline for ecological risk assessment. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.127, p.22–29, 2016. DOI 10.1016/j.ecoenv.2016.01.009
- CASTILLO, M. del P., TORSTENSSON, L., STENSTROM, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use - A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 6206-6219, 2008.
- CASTRO-GUTIÉRREZ, V.; MASÍS-MORA, M.; DIEZ, M. C.; TORTELLA, G. R.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Aging of biomixtures: Effects on carbofuran removal and microbial community structure. **Chemosphere**. v. 168, p. 418-425, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.10.065
- CARNIEL, L. S. C. Avaliação do risco ecológico de mancozebe e clorpirifós para representantes da macro e mesofauna do solo e eficiência de leitos biológicos de descarte. **Dissertação (Mestrado)**. Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, 140 p., 2015.
- CEPARC - **Centro de Pesquisa e Análise de Resíduos e Contaminantes**. Página inicial. Disponível em: <http://www.ceparc.com.br/>. Acesso em: 19 set. 2019.
- CHIN-PAMPILLO, J. S.; MASÍS-MORA, M.; RUIZ-HIDALGO, K.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C.; E. Removal of carbofuran is not affected by co-application of chlorpyrifos in a coconut fiber/compost based biomixture after aging or pre-exposure. **Journal of Environmental Sciences**, v. 46, p. 182–189, 2016. DOI 10.1016/j.jes.2015.12.026
- DELGADO-MORENO, L.; BAZHARI, S.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Innovative application of biobed bioremediation systems to remove emerging contaminants: Adsorption, degradation and bioaccessibility. **Science of the Total Environment**, v.651, p.990–997, 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2018.09.268

DIAS, J. V.; PIZZUTTI, I. R.; KOK, A.; SCHOLTEN, J.; KIEDROWSKA, B.; CARDOSO, C. D. New efficient approach for the NL-Acetone extraction method for pesticide residue analysis in fruits and vegetables by LC and GC-MS/MS. In: **6th Latin American Pesticide Residue Workshop**, 2017.

DIAZ, J. M. C.; MARTIN-LAURENT, F.; BEGUET, J.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Fate and effect of imidacloprid on vermicompost-amended soils under dissimilar conditions: Risk for soil functions, structure, and bacterial abundance. **Science of the Total Environment**, v. 579, p. 1111-1119, 2017. DOI 10.1016/j.scitotenv.2016.11.082

DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.10, n.3, p.244-267, 2010.

DIEZ, M. C.; LEVIO, M.; BRICEÑO, G.; RUBILAR, O.; TORTELLA, G.; GALLARDO, F. Biochar as a partial replacement of peat in pesticide-degrading biomixtures formulated with different soil types. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, p. 1–7, 2013. DOI 10.1166/jbmb.2013.1376

GAINER, A.; COUSINS, M.; HOGAN, N.; SICILIANO, S. D. Petroleum hydrocarbon mixture toxicity and a trait based approach to soil invertebrate species for site specific risk assessments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.37, n.8, p.2222-2234, 2018. DOI 10.1002/etc.4164

GARCIA, M.V. Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions. Ecology and Development Series. No. 19. Zentrum fur Entwicklungsforschung. **University of Bonn**, Germany, 281 p, 2004.

GEBLER, L.; PIZZUTTI, I. R.; CARDOSO, C. D.; KLAUBERG FILHO, O.; MIQUELLUTI, D. J.; SANTOS, R. S. S. Bioreactors to Organize the Disposal of Phytosanitary Effluents of Brazilian Apple Production. **Chemical engineering transactions**. v.43, 2015. DOI 10.3303/CET1543058.

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, V. R.; QUINTAL-FRANCO, C.; ARENA-ORTIZ, M. L.; GIÁCOMAN-VALLEJOS, G.; PONCE-CABALLERO, C. Identification of microbial species present in a pesticide dissipation process in biobed systems using typical substrates from southeastern Mexico as a biomixture at a laboratory scale. **Science of the Total Environment**, v. 628–629, p. 528–538, 2018. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.02.082

HUETE-SOTO, A.; MASÍS-MORA, M.; LIZANO-FALLAS, V.; CHIN-PAMPILLO, J. S.; CARAZO-ROJAS, E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Simultaneous removal of structurally different pesticides in a biomixture: Detoxification and effect of oxytetracycline. **Chemosphere**. v.169, p. 558 – 567, 2017. DOI 10.1016/j.chemosphere.2016.11.106

HUND-RINKE, K.; BAUN, A.; CUPI, D.; FERNANDES, T. F.; HANDY, R.; KINROSS, J. H.; NAVAS, J. M.; PEIJNENBURG, J.; SCHLICH, K.; SHAW, B. J.; SCOTT-FORDSMAND, S. Regulatory Ecotoxicity Testing of Nanomaterials – Proposed Modifications of OECD Test Guidelines Based on Laboratory Experience with Silver and Titanium Dioxide nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 10, p. 1442-1447, 2016. DOI 10.1080/17435390.2016.1229517

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 17512-2**: Soil quality - Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behavior - Part 2: Test with collembolans (*Folsomia candida*). Geneva, 2011.

IUPAC - INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. **Pesticide Properties Database**. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/atoz.htm> Acesso em: 3 nov. 2019.

KARANASIOS, E.; KARPOUZAS, D.; TSIROPOULOS, N. Key parameters and practices controlling pesticide degradation efficiency of biobed substrates. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v.47:6, p.589-598, 2012. DOI 10.1080/03601234.2012.665753

KHAN, M. A. I.; BISWAS, B.; SMITH, E.; NAIDU, R.; MEGHARAJ, M. Toxicity assessment of fresh and weathered petroleum hydrocarbons in contaminated soil- a review. **Chemosphere**, v. 212, p. 755-767, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.08.094

MASIN, C. E.; LESCANO, M. R.; RODRÍGUEZ, A. R.; GODOY, J. L.; ZALAZAR, C. S. Earthworms to assess the innocuousness of spent biomixtures employed for glyphosate degradation. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 53, n. 8, p. 519-525, 2018. DOI:10.1080/03601234.2018.1462922

MENTA, C. Soil Fauna Diversity – Function, Soil Degradation, Biological Indices, Soil Restoration. In: LAMEED, G. A. **Biodiversity Conservation and Utilization in a Diverse World**. Ed. IntechOpen, 296 p., 2012. DOI: 10.5772/51091

NATAL-DA-LUZ, T.; MOREIRA-SANTOS, M.; RUEPERT, C.; CASTILLO, L. E.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. Ecotoxicological characterization of a tropical soil after diazinon Spraying. **Ecotoxicology**. v.21, p.2163-2176, 2012. DOI: 10.1007/s10646-012-0970-8

NIEMEYER, J. C.; LOLATA, G. B.; CARVALHO, G. M. de; SILVA, E. M. da; SOUSA, J. P.; NOGUEIRA, M. A. Microbial indicators of soil health as tools for ecological risk assessment of a metal contaminated site in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.59, p.96-105, 2012. DOI: 10.1016/j.apsoil.2012.03.019

NIEMEYER, J. C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J. P. Soil ecotoxicology in Latin America: current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.36, n.7, p.1795-1810, 2017. DOI: 10.1002/etc.3792

NIEMEYER, J. C.; DE SANTO, F. B.; GUERRA, N.; RICARDO FILHO, A. M.; PECH, T. M. Do recommended doses of glyphosate-based herbicides affect soil invertebrates? Field and laboratory screening tests to risk assessment. **Chemosphere**, v. 198, p. 154-160, 2018. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2018.01.127

NIVA, C. C.; BROWN, G. G. **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 258 p.

OECD. Guideline for Testing of Chemicals No.207: Earthworm Acute Toxicity Test. **Organization for Economic Co-operation and Development**, Paris, 1984.

PEREIRA, C. M. S.; NOVAIS, S. C.; SOARES, A. M. V. M.; AMORIM, M. J. B. Dimethoate affects cholinesterases in *Folsomia candida* and their locomotion — False negative results of an avoidance behaviour test. **Science of the Total Environment**, v. 443, p. 821–827, 2013. DOI 10.1016/j.scitotenv.2012.11.044

RODRÍGUEZ-CASTILLO, G.; MOLINA-RODRÍGUEZ, M.; PÉREZ-VILLANUEVA, M.; MASÍS-MORA, M.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E. Removal of two neonicotinoid insecticides and

mineralization of 14c-imidacloprid in biomixtures. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. v.101, p.137–143, 2018. DOI 10.1007/s00128-018-2370-0

RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, C. E., CASTRO-GUTIÉRREZ, V., LIZANO-FALLAS, V. Alternative approaches to determine the efficiency of biomixtures used for pesticide degradation in biopurification systems. In: BIDOIA, E. D., MONTAGNOLLI, R. N. **Toxicity and biodegradation testing: Methods in pharmacology and toxicology**. Springer Science+Business Media, 2018. DOI 10.1007/978-1-4939-7425-2_3

ROMERO, E.; DELGADO-MORENO, L.; NOGALES, R. Pesticide dissipation and enzyme activities in ungrassed and grassed biomixtures, composed of winery wastes, used in biobed bioremediation systems. **Water Air Soil Pollution**. p.230-233, 2019. DOI 10.1016/j.scitotenv.2019.07.087

RSTUDIO© Desktop. Version 1.1.423: **RStudio**, 2009-2019.

SAEZ, J. M.; BIGLIARDO, A. L.; RAIMONDO, E. E.; BRICEÑO, G. E.; POLTI, M. A.; BENIMELI, C. S. Lindane dissipation in a biomixture: Effect of soil properties and bioaugmentation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.156, p. 97–105, 2018. DOI 10.1016/j.ecoenv.2018.03.011

SANTOS, M.J.; FERREIRA, M.F.; CACHADA, A.; DUARTE, A.C.; SOUSA, J.P. Pesticide application to agricultural fields: effects on the reproduction and avoidance behaviour of *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Ecotoxicology**, v.21, p.2113e2122, 2012. DOI 10.1007/s10646-012-0963-7

TARAZONA, J. V.; RAMOS-PERALONSO, M. J. Ecotoxicology. In: WEXLER, P. **Encyclopedia of Toxicology**, ed. 3, v. 2, p. 276-280, 2014.

TORSTENSSON, L.; CASTILLO, M. del P. Use of biobeds in Sweden to minimize environmental spillages from agricultural spray equipment. **Pesticide Outlook**, v.8, p.24-27, 1997.

TORTELLA, G. R.; RUBILIAR, O.; CEA, M.; BRICEÑO, G.; QUIROZ, A.; DIEZ, M. C.; PARRA, L. Natural wastes rich in terpenes and their relevance in the matrix of an on-farm biopurification system for the biodegradation of atrazine. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.85, p.8-15, 2013. DOI 10.1016/j.ibiod.2013.06.003

VARELI, C. S.; PIZZUTTI, I. R.; GEBLER, L.; CARDOSO, C. D.; GAI, D. E. H.; FONTANA, M. E. Z. Analytical method validation to evaluate dithiocarbamates degradation in biobeds in South of Brazil. **Talanta**, 22 p., 2018. DOI 10.1016/j.talanta.2018.03.009

VARELI, C.S.; PIZZUTTI, I. R.; GEBLER, L.; CARDOSO, C. D.; FONTANA, M. E.; REICHERT, B.; JÄNISCH, B. D. Evaluation of two extraction approaches for pesticide residue determination in biobed using GC-MS/MS. **Analytical Methods**, v.42, p.5455-5463, 2019. DOI 10.1039/C9AY01746A

ZHU, D.; KE, X.; WU, L.; LI, Z.; CHRISTIE, P.; LUO, Y. Ecotoxicity of cadmium in a soil collembolan-predatory mite food chain: Can we use the 15N labeled litter addition method to assess soil functional change? **Environmental Pollution**, v. 219, p.37-46, 2016. DOI 10.1016/j.envpol.2016.09.051

CONCLUSÃO GERAL

As biomisturas alternativas propostas, utilizando acícula de pinus (BA) e húmus de minhoca (BH), mostraram-se eficientes em promover a colonização fúngica, reduzir a ecotoxicidade e reduzir a concentração inicial do inseticida fosmete.

Alguns dos isolados fúngicos obtidos de BA apresentaram resultados promissores quanto à sua capacidade de degradação do fosmete. Estudos mais aprofundados com estes isolados são importantes para avaliar sua resposta a outros agrotóxicos para que, futuramente, possam ser identificadas espécies fúngicas regionais cuja eficiência em degradar agrotóxicos é conhecida. Estas espécies fúngicas, por serem provenientes da região de Curitiba, poderão ser inoculadas em solos contaminados por agrotóxicos (através da técnica de biorremediação), além de serem inoculadas no próprio *biobed* para acelerar a degradação dos resíduos de agrotóxicos. A identificação de espécies locais de fungos toleráveis a agrotóxicos, e a confirmação de sua capacidade de degradação, através de determinações químicas residuais dos produtos, representa uma importante ferramenta para prevenção e remediação ambiental dos impactos ambientais causados pelo manuseio incorreto de agrotóxicos.

A partir dos resultados desta dissertação e, com o apoio do Setor Agropecuário da UFSC de Curitiba, foi possível montar um *biobed* em campo, na Fazenda Experimental Agropecuária da UFSC, Campus de Curitiba. Este *biobed* foi instalado ao lado das casas de vegetação, e está disponível para que todos os usuários da Fazenda Experimental realizem sobre ele o manuseio de agrotóxicos e o descarte de eventuais restos de caldas.

As próximas etapas deste estudo devem envolver testes em campo para verificar a vida útil das duas biomisturas propostas (BA e BH), em comparação à biomistura padrão, assim como sua eficiência na degradação de agrotóxicos, estando expostas às oscilações naturais de temperatura e umidade atmosféricas. Para isso poderão ser aplicados os mesmos métodos utilizados nesta dissertação, avaliando parâmetros ecotoxicológicos e microbiológicos. Em paralelo a eles é importante que ainda sejam aplicadas análises químicas para avaliar a eficiência das biomisturas a nível de redução da concentração do agrotóxico, e análises da geração de metabólitos do agrotóxico. Nestes estudos a campo será importante que, além do inseticida avaliado no projeto de dissertação, sejam avaliadas diferentes misturas de agrotóxicos que são utilizadas nas culturas agrícolas da região Sul do Brasil.

APÊNDICE A – DADOS DE AACCM E PIC DOS 52 ISOLADOS DE FUNGOS

Tabela – Valores obtidos para os isolados de fungos do projeto. Estão apresentados os dados para Área Abaixo da Curva de Crescimento Micelial (AACCM) e Porcentagem de Inibição do Crescimento (PIC) de todas as repetições (Testemunha vs. Fosmete) de cada isolados.

Isolado	Época	Biomistura	Placa	AACCM	PIC/AACCM (%)	PIC Médio (%)
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	620,4	-10,25413186	
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	685,2	-21,77003732	
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	677,4	-20,38386352	
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	466,8	17,04282922	
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	447,6	20,45494935	
A01/BP1	A01	padrão	Testemunha	478,8	14,91025413	29,30513595
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	464,4	17,46934423	
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	464,4	17,46934423	
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	426,0	24,2935845	
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	350,4	37,72880754	
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	312,0	44,55304781	
A01/BP1	A01	padrão	Fosmete	369,6	34,3166874	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	693,6	-0,419863906	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	738,6	-6,934993485	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	799,2	-15,70870132	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	645,6	6,529607644	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	631,8	8,527580715	
A01/BP2	A01	padrão	Testemunha	635,4	8,006370349	39,35138266
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	493,2	28,59417982	
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	389,4	43,62241205	
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	607,8	12,00231649	
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	441,6	36,06486173	
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	231,0	66,55566816	
A01/BP2	A01	padrão	Fosmete	350,4	49,26885768	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	853,2	-9,948453608	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	871,2	-12,26804124	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	857,4	-10,48969072	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	709,8	8,530927835	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	679,2	12,4742268	
A01/BP3	A01	padrão	Testemunha	685,2	11,70103093	33,96907216
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	525,6	32,26804124	
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	518,4	33,19587629	
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	529,2	31,80412371	
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	458,4	40,92783505	
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	520,8	32,88659794	
A01/BP3	A01	padrão	Fosmete	522,0	32,73195876	
A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	492,0	-1,694915254	23,06738322

A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	494,4	-2,190988012	
A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	482,4	0,289375775	
A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	462,6	4,381976023	
A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	489,0	-1,074824308	
A01/BP4	A01	padrão	Testemunha	482,4	0,289375775	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	396,0	18,14799504	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	372,0	23,10872261	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	354,0	26,82926829	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	364,2	24,72095907	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	369,6	23,60479537	
A01/BP4	A01	padrão	Fosmete	377,4	21,99255891	
<hr/>						
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	470,4	1,733862544	
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	481,2	-0,522247754	
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	476,4	0,480467934	
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	472,2	1,357844161	
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	498,0	-4,031752663	
A01/BP	A01	padrão	Testemunha	474,0	0,981825778	
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	678,0	-41,63359098	-40,96511385
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	667,2	-39,37748068	
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	709,2	-48,15124295	
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	646,8	-35,115939	
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	682,8	-42,63630666	
A01/BP	A01	padrão	Fosmete	664,8	-38,87612283	
<hr/>						
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	205,8	-4,62633452	
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	206,4	-4,931367565	
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	209,4	-6,456532791	
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	187,8	4,524656838	
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	191,4	2,694458566	
A02/BP1	A02	padrão	Testemunha	179,4	8,795119471	
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	121,8	38,07829181	34,01118454
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	133,2	32,28266396	
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	128,4	34,72292832	
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	127,2	35,33299441	
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	130,8	33,50279614	
A02/BP1	A02	padrão	Fosmete	137,4	30,14743264	
<hr/>						
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	825,6	-5,683563748	
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	739,2	5,376344086	
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	768,0	1,689708141	
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	786,0	-0,614439324	
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	793,2	-1,53609831	25,93445981
A02/BP2	A02	padrão	Testemunha	775,2	0,768049155	
A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	526,8	32,56528418	
A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	552,0	29,33947773	

A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	588,0	24,7311828	
A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	615,6	21,19815668	
A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	591,6	24,2703533	
A02/BP2	A02	padrão	Fosmete	597,6	23,50230415	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	781,2	5,583756345	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	891,6	-7,75924583	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	896,4	-8,33937636	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	717,0	13,34300218	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	831,6	-0,507614213	
A02/BH	A02	húmus	Testemunha	846,6	-2,320522117	26,64974619
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	629,4	23,93038434	
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	645,6	21,9724438	
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	660,0	20,23205221	
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	652,8	21,10224801	
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	673,2	18,63669326	
A02/BH	A02	húmus	Fosmete	380,4	54,02465555	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	933,6	1,216802455	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	939,0	0,645434346	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	970,2	-2,655803619	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	951,6	-0,687757909	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	937,8	0,772405037	
A02/BH1	A02	húmus	Testemunha	938,4	0,708919691	33,54142419
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	687,0	27,30927944	
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	582,6	38,35572955	
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	732,0	22,54787853	
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	362,4	61,65485134	
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	671,4	28,95989842	
A02/BH1	A02	húmus	Fosmete	733,2	22,42090784	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	1066,2	-5,689928628	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	1042,2	-3,310864393	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	1013,4	-0,455987312	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	973,2	3,528945282	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	984,6	2,39888977	
A02/BH2	A02	húmus	Testemunha	973,2	3,528945282	10,18041237
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	917,4	9,060269627	
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	993,0	1,566217288	
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	917,4	9,060269627	
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	859,8	14,77002379	
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	873,0	13,46153846	
A02/BH2	A02	húmus	Fosmete	876,0	13,16415543	
A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	772,2	-9,43877551	
A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	799,8	-13,35034014	-15,4478458
A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	883,8	-25,25510204	

A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	657,0	6,887755102	
A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	549,6	22,10884354	
A02/BA1	A02	acícula	Testemunha	571,2	19,04761905	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	795,0	-12,67006803	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	802,8	-13,7755102	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	844,8	-19,72789116	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	881,4	-24,91496599	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	784,2	-11,13945578	
A02/BA1	A02	acícula	Fosmete	779,4	-10,45918367	
<hr/>						
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	498,0	6,355772847	
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	516,0	2,971041745	
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	516,0	2,971041745	
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	544,2	-2,331703648	
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	588,0	-10,56788266	
A02/BA2	A02	acícula	Testemunha	528,6	0,601729974	
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	399,6	24,85896954	26,70176758
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	384,0	27,79240316	
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	386,4	27,34110568	
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	388,8	26,8898082	
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	388,8	26,8898082	
A02/BA2	A02	acícula	Fosmete	391,2	26,43851072	
<hr/>						
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1792,8	3,008006925	
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1842,0	0,346245401	
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1846,8	0,08656135	
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1851,0	-0,140662194	
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1928,4	-4,328067518	
A02/BA3	A02	acícula	Testemunha	1829,4	1,027916035	
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	1986,6	-7,476736637	-8,510062757
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	2041,8	-10,46310322	
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	1982,4	-7,249513092	
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	2113,2	-14,32590348	
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	1982,4	-7,249513092	
A02/BA3	A02	acícula	Fosmete	1927,8	-4,295607011	
<hr/>						
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	366,0	-14,01869159	
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	288,0	10,28037383	
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	349,2	-8,785046729	
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	301,2	6,168224299	
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	333,6	-3,925233645	
A02/BA	A02	acícula	Testemunha	288,0	10,28037383	-0,934579439
A02/BA	A02	acícula	Fosmete	370,8	-15,51401869	
A02/BA	A02	acícula	Fosmete	328,8	-2,429906542	
A02/BA	A02	acícula	Fosmete	316,8	1,308411215	
A02/BA	A02	acícula	Fosmete	290,4	9,53271028	

A02/BA	A02	acícua	Fosmete	349,2	-8,785046729	
A02/BA	A02	acícua	Fosmete	288,0	10,28037383	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1036,2	0,307869925	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1013,4	2,50144314	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1132,2	-8,928227824	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1018,2	2,039638253	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1031,4	0,769674812	
A03/BP1	A03	padrão	Testemunha	1005,0	3,309601693	21,35847604
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	793,2	23,68674235	
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	817,8	21,3199923	
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	817,2	21,37771791	
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	837,6	19,41504714	
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	839,4	19,24187031	
A03/BP1	A03	padrão	Fosmete	799,2	23,10948624	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	187,8	3,444730077	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	201,0	-3,341902314	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	218,4	-12,28791774	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	181,2	6,838046272	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	192,0	1,285347044	
A03/BP2	A03	padrão	Testemunha	186,6	4,061696658	53,5218509
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	91,2	53,11053985	
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	94,8	51,2596401	
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	87,6	54,96143959	
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	85,2	56,19537275	
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	91,2	53,11053985	
A03/BP2	A03	padrão	Fosmete	92,4	52,49357326	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	547,2	11,62790698	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	675,0	-9,011627907	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	629,4	-1,647286822	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	579,6	6,395348837	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	537,0	13,2751938	
A03/BP3	A03	padrão	Testemunha	747,0	-20,63953488	-4,731912145
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	721,2	-16,47286822	
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	627,6	-1,356589147	
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	637,8	-3,003875969	
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	633,0	-2,228682171	
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	682,8	-10,27131783	
A03/BP3	A03	padrão	Fosmete	588,6	4,941860465	
A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	179,4	13,70851371	
A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	211,2	-1,587301587	47,81144781
A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	194,4	6,493506494	
A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	208,2	-0,144300144	
A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	235,8	-13,41991342	

A03/BP4	A03	padrão	Testemunha	218,4	-5,050505051	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	102,0	50,93795094	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	85,8	58,73015873	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	120,0	42,27994228	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	129,6	37,66233766	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	112,8	45,74314574	
A03/BP4	A03	padrão	Fosmete	100,8	51,51515152	
A03/BP5	A03	pasrao	Testemunha	981,6	6,326939593	
A03/BP5	A03	padrão	Testemunha	1055,4	-0,715717149	
A03/BP5	A03	pasrao	Testemunha	1056,0	-0,77297452	
A03/BP5	A03	padrão	Testemunha	1051,2	-0,314915545	
A03/BP5	A03	pasrao	Testemunha	1122,0	-7,071285428	
A03/BP5	A03	padrão	Testemunha	1021,2	2,547953049	8,292776028
A03/BP5	A03	pasrao	Fosmete	963,6	8,04466075	
A03/BP5	A03	padrão	Fosmete	1010,4	3,578585743	
A03/BP5	A03	pasrao	Fosmete	930,0	11,25107358	
A03/BP5	A03	padrão	Fosmete	939,6	10,33495563	
A03/BP5	A03	pasrao	Fosmete	962,4	8,159175494	
A03/BP5	A03	padrão	Fosmete	960,0	8,388204981	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	384,0	8,462455304	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	418,8	0,166865316	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	422,4	-0,691299166	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	408,0	2,74135876	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	430,8	-2,693682956	
A03/BH1	A03	húmus	Testemunha	453,0	-7,985697259	29,84505364
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	324,6	22,62216925	
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	262,2	37,49702026	
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	261,0	37,78307509	
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	298,8	28,77234803	
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	309,6	26,19785459	
A03/BH1	A03	húmus	Fosmete	309,6	26,19785459	
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	975,0	-16,05761219	
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	298,8	64,43280562	
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	944,4	-12,41518867	
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	920,4	-9,558385906	
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	957,6	-13,98643019	4,600642781
A03/BH2	A03	húmus	Testemunha	944,4	-12,41518867	
A03/BH2	A03	húmus	Fosmete	805,8	4,08284728	
A03/BH2	A03	húmus	Fosmete	772,8	8,010951077	
A03/BH2	A03	húmus	Fosmete	832,8	0,868944173	
A03/BH2	A03	húmus	Fosmete	794,4	5,439828592	
A03/BA1	A03	acícula	Testemunha	207,6	4,472667035	7,067918277
A03/BA1	A03	acícula	Testemunha	217,2	0,055218112	

A03/BA1	A03	acícula	Testemunha	221,4	-1,877415792	
A03/BA1	A03	acícula	Testemunha	225,0	-3,533959139	
A03/BA1	A03	acícula	Testemunha	215,4	0,883489785	
A03/BA1	A03	acícula	Fosmete	208,2	4,196576477	
A03/BA1	A03	acícula	Fosmete	178,2	18,00110436	
A03/BA1	A03	acícula	Fosmete	202,8	6,681391496	
A03/BA1	A03	acícula	Fosmete	209,4	3,644395362	
A03/BA1	A03	acícula	Fosmete	211,2	2,816123689	
A03/BA2	A03	acícula	Testemunha	385,2	4,719501336	
A03/BA2	A03	acícula	Testemunha	394,2	2,49332146	
A03/BA2	A03	acícula	Testemunha	407,4	-0,771742357	
A03/BA2	A03	acícula	Testemunha	393,6	2,641733452	
A03/BA2	A03	acícula	Testemunha	441,0	-9,082813891	30,72128228
A03/BA2	A03	acícula	Fosmete	270,0	33,21460374	
A03/BA2	A03	acícula	Fosmete	286,8	29,05906797	
A03/BA2	A03	acícula	Fosmete	278,4	31,13683586	
A03/BA2	A03	acícula	Fosmete	286,8	29,05906797	
A03/BA2	A03	acícula	Fosmete	278,4	31,13683586	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	100,8	2,51450677	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	104,4	-0,967117988	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	92,4	10,63829787	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	109,2	-5,609284333	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	114,0	-10,25145068	
A04/BH1	A04	húmus	Testemunha	99,6	3,675048356	32,92069632
A04/BH1	A04	húmus	Fosmete	66,0	36,17021277	
A04/BH1	A04	húmus	Fosmete	69,6	32,68858801	
A04/BH1	A04	húmus	Fosmete	69,6	32,68858801	
A04/BH1	A04	húmus	Fosmete	69,6	32,68858801	
A04/BH1	A04	húmus	Fosmete	72,0	30,36750484	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	245,4	5,977011494	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	267,0	-2,298850575	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	259,2	0,689655172	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	277,2	-6,206896552	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	276,0	-5,747126437	
A04/BH2	A04	húmus	Testemunha	241,2	7,586206897	36,39846743
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	195,6	25,05747126	
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	175,8	32,64367816	
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	185,4	28,96551724	
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	129,0	50,57471264	
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	150,0	42,52873563	
A04/BH2	A04	húmus	Fosmete	160,2	38,62068966	
A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	304,8	-5,103448276	21,13793103
A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	282,6	2,551724138	

A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	288,6	0,482758621	
A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	292,2	-0,75862069	
A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	285,6	1,517241379	
A04/BA2	A04	acícula	Testemunha	286,2	1,310344828	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	236,4	18,48275862	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	236,4	18,48275862	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	228,6	21,17241379	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	239,4	17,44827586	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	191,4	34	
A04/BA2	A04	acícula	Fosmete	240,0	17,24137931	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	602,4	-0,466977985	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	555,0	7,438292195	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	599,4	0,03335557	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	611,4	-1,967978652	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	597,0	0,433622415	
A04/BA3	A04	acícula	Testemunha	632,4	-5,470313542	47,68178786
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	307,2	48,7658439	
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	312,0	47,96531021	
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	330,0	44,96330887	
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	352,8	41,16077385	
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	276,0	53,96931288	
A04/BA3	A04	acícula	Fosmete	304,2	49,26617745	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	799,2	-2,606239569	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	801,6	-2,914366414	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	621,6	20,195147	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	841,8	-8,075491077	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	805,2	-3,376556683	
A04/BA5	A04	acícula	Testemunha	804,0	-3,22249326	-6,419309282
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	835,8	-7,305173963	
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	789,6	-1,373732186	
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	834,0	-7,074078829	
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	828,6	-6,380793427	
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	816,0	-4,763127487	
A04/BA5	A04	acícula	Fosmete	869,4	-11,6189498	
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	310,8	-3,393213573	
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	298,8	0,598802395	
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	320,4	-6,586826347	
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	290,4	3,393213573	
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	279,6	6,986027944	-12,3087159
A04/BA6	A04	acícula	Testemunha	303,6	-0,998003992	
A04/BA6	A04	acícula	Fosmete	351,6	-16,96606786	
A04/BA6	A04	acícula	Fosmete	360,0	-19,76047904	
A04/BA6	A04	acícula	Fosmete	310,8	-3,393213573	

A04/BA6	A04	acícua	Fosmete	320,4	-6,586826347	
A04/BA6	A04	acícua	Fosmete	334,8	-11,37724551	
A04/BA6	A04	acícua	Fosmete	348,0	-15,76846307	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	411,6	-14,33333333	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	367,2	-2	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	382,8	-6,333333333	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	402,0	-11,66666667	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	310,8	13,66666667	
A05/BP1	A05	padrão	Testemunha	285,6	20,66666667	-9,666666667
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	352,8	2	
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	372,0	-3,333333333	
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	382,8	-6,333333333	
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	480,0	-33,33333333	
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	394,8	-9,666666667	
A05/BP1	A05	padrão	Fosmete	386,4	-7,333333333	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	838,8	-0,551426516	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	799,8	4,12371134	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	792,0	5,058738912	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	824,4	1,174778231	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	900,6	-7,959721889	
A05/BP3	A05	padrão	Testemunha	849,6	-1,846080077	56,84488132
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	352,2	57,77990889	
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	325,2	61,0165428	
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	379,8	54,4713498	
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	367,8	55,90985375	
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	402,6	51,73819228	
A05/BP3	A05	padrão	Fosmete	332,4	60,15344042	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	390,6	0,686498856	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	378,6	3,737604882	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	403,8	-2,669717773	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	392,4	0,228832952	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	400,2	-1,754385965	
A05/BP4	A05	padrão	Testemunha	394,2	-0,228832952	24,99364353
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	283,8	27,84134249	
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	296,4	24,63768116	
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	300,0	23,72234935	
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	301,8	23,26468345	
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	291,6	25,85812357	
A05/BP4	A05	padrão	Fosmete	296,4	24,63768116	
A05/BA1	A05	acícua	Testemunha	686,4	0,406268137	
A05/BA1	A05	acícua	Testemunha	676,8	1,799187464	26,92977365
A05/BA1	A05	acícua	Testemunha	714,0	-3,598374927	
A05/BA1	A05	acícua	Testemunha	704,4	-2,205455601	

A05/BA1	A05	acícula	Testemunha	690,0	-0,116076611	
A05/BA1	A05	acícula	Testemunha	663,6	3,714451538	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	528,0	23,38943703	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	492,0	28,6128845	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	518,4	24,78235636	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	506,4	26,52350551	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	481,2	30,17991875	
A05/BA1	A05	acícula	Fosmete	495,6	28,09053976	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	738,0	2,355120402	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	758,4	-0,344006351	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	760,8	-0,661550675	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	747,6	1,084943107	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	770,4	-1,93172797	
A05/BA3	A05	acícula	Testemunha	759,6	-0,502778513	29,10822969
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	528,0	30,14024874	
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	549,6	27,28234983	
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	574,8	23,94813443	
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	537,6	28,87007145	
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	520,8	31,09288171	
A05/BA3	A05	acícula	Fosmete	504,0	33,31569198	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	627,6	-2,365030175	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	598,2	2,430272386	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	637,2	-3,930843256	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	612,6	0,081552765	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	602,4	1,745229163	
A05/BA4	A05	acícula	Testemunha	600,6	2,038819116	20,04566955
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	507,0	17,30549666	
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	496,2	19,06703637	
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	478,8	21,90507258	
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	489,6	20,14353287	
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	483,0	21,22002936	
A05/BA4	A05	acícula	Fosmete	486,6	20,63284945	
A05/BA5	A05	acícula	Testemunha	226,8	18,88412017	
A05/BA5	A05	acícula	Testemunha	249,6	10,72961373	
A05/BA5	A05	acícula	Testemunha	319,2	-14,16309013	
A05/BA5	A05	acícula	Testemunha	250,8	10,30042918	
A05/BA5	A05	acícula	Testemunha	351,6	-25,75107296	-6,52360515
A05/BA5	A05	acícula	Fosmete	285,6	-2,145922747	
A05/BA5	A05	acícula	Fosmete	345,6	-23,60515021	
A05/BA5	A05	acícula	Fosmete	291,6	-4,291845494	
A05/BA5	A05	acícula	Fosmete	308,4	-10,30042918	
A05/BA5	A05	acícula	Fosmete	258,0	7,725321888	
A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	784,2	-0,78396093	11,59234032

A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	782,4	-0,552628197	
A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	769,2	1,143811849	
A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	789,6	-1,477959131	
A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	776,4	0,218480915	
A05/BA6	A05	acícula	Testemunha	766,8	1,452255494	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	697,8	10,32001028	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	667,8	14,17555584	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	668,4	14,09844493	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	681,6	12,40200488	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	701,4	9,857344814	
A05/BA6	A05	acícula	Fosmete	710,4	8,700681146	
A05/BH1	A05	húmus	Testemunha	584,4	-4,238013699	
A05/BH1	A05	húmus	Testemunha	543,6	3,039383562	
A05/BH1	A05	húmus	Testemunha	511,2	8,818493151	
A05/BH1	A05	húmus	Testemunha	547,2	2,397260274	
A05/BH1	A05	húmus	Testemunha	616,8	-10,01712329	
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	462,6	17,48715753	21,89283676
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	387,0	30,97174658	
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	450,0	19,73458904	
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	470,4	16,09589041	
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	469,8	16,20291096	
A05/BH1	A05	húmus	Fosmete	387,6	30,86472603	
A05/BH2	A05	húmus	Testemunha	514,8	17,0212766	
A05/BH2	A05	húmus	Testemunha	684,0	-10,25145068	
A05/BH2	A05	húmus	Testemunha	633,6	-2,127659574	
A05/BH2	A05	húmus	Testemunha	584,4	5,80270793	
A05/BH2	A05	húmus	Testemunha	685,2	-10,44487427	
A05/BH2	A05	húmus	Fosmete	360,0	41,9729207	27,85299807
A05/BH2	A05	húmus	Fosmete	489,6	21,08317215	
A05/BH2	A05	húmus	Fosmete	426,0	31,33462282	
A05/BH2	A05	húmus	Fosmete	458,4	26,11218569	
A05/BH2	A05	húmus	Fosmete	504,0	18,76208897	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	712,2	-1,236673774	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	716,4	-1,833688699	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	572,4	18,63539446	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	723,6	-2,857142857	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	753,6	-7,121535181	
A06/BP1	A06	padrão	Testemunha	742,8	-5,586353945	-2,481876333
A06/BP1	A06	padrão	Fosmete	732,0	-4,051172708	
A06/BP1	A06	padrão	Fosmete	723,6	-2,857142857	
A06/BP1	A06	padrão	Fosmete	717,6	-2,004264392	
A06/BP1	A06	padrão	Fosmete	705,6	-0,298507463	
A06/BP1	A06	padrão	Fosmete	726,0	-3,198294243	

A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	218,4	-1,628664495	
A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	218,4	-1,628664495	
A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	214,2	0,325732899	
A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	214,2	0,325732899	
A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	216,0	-0,511865984	
A06/BP3	A06	padrão	Testemunha	208,2	3,117729176	12,49883667
A06/BP3	A06	padrão	Fosmete	189,0	12,05211726	
A06/BP3	A06	padrão	Fosmete	196,2	8,701721731	
A06/BP3	A06	padrão	Fosmete	192,0	10,65611913	
A06/BP3	A06	padrão	Fosmete	184,2	14,28571429	
A06/BP3	A06	padrão	Fosmete	178,8	16,79851094	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	185,4	3,134796238	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	186,6	2,507836991	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	185,4	3,134796238	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	186,0	2,821316614	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	195,0	-1,880877743	
A06/BA1	A06	acícua	Testemunha	210,0	-9,717868339	21,107628
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	149,4	21,94357367	
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	149,4	21,94357367	
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	151,8	20,68965517	
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	151,8	20,68965517	
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	150,6	21,31661442	
A06/BA1	A06	acícua	Fosmete	153,0	20,06269592	
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1116,0	-0,170541244	
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1125,6	-1,032223319	
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1133,4	-1,732340005	
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1121,4	-0,655237411	
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1097,4	1,498967777	21,46575711
A06/BA2	A06	acícua	Testemunha	1090,8	2,091374203	
A06/BA2	A06	acícua	Fosmete	835,2	25,03365946	
A06/BA2	A06	acícua	Fosmete	923,4	17,11695539	
A06/BA2	A06	acícua	Fosmete	871,2	21,80235167	
A06/BA2	A06	acícua	Fosmete	870,0	21,91006193	
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	531,6	-3,484524041	
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	524,4	-2,082927779	
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	519,6	-1,148530271	
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	495,0	3,640256959	
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	512,4	0,253065992	24,11913568
A06/BA3	A06	acícua	Testemunha	499,2	2,82265914	
A06/BA3	A06	acícua	Fosmete	414,0	19,40821491	
A06/BA3	A06	acícua	Fosmete	398,4	22,44500681	
A06/BA3	A06	acícua	Fosmete	391,2	23,84660308	
A06/BA3	A06	acícua	Fosmete	384,0	25,24819934	

A06/BA3	A06	acícula	Fosmete	383,4	25,36499903	
A06/BA3	A06	acícula	Fosmete	367,8	28,40179093	
A06/BA4	A06	acícula	Testemunha	223,2	-3,047091413	
A06/BA4	A06	acícula	Testemunha	213,6	1,385041551	
A06/BA4	A06	acícula	Testemunha	221,4	-2,216066482	
A06/BA4	A06	acícula	Testemunha	217,8	-0,55401662	
A06/BA4	A06	acícula	Testemunha	207,0	4,432132964	7,645429363
A06/BA4	A06	acícula	Fosmete	200,4	7,479224377	
A06/BA4	A06	acícula	Fosmete	197,4	8,864265928	
A06/BA4	A06	acícula	Fosmete	199,8	7,756232687	
A06/BA4	A06	acícula	Fosmete	194,4	10,24930748	
A06/BA4	A06	acícula	Fosmete	208,2	3,878116343	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	728,4	-2,360876897	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	759,6	-6,745362563	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	692,4	2,698145025	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	743,4	-4,468802698	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	666,6	6,323777403	
A06/BA5	A06	acícula	Testemunha	679,2	4,55311973	1,753794266
A06/BA5	A06	acícula	Fosmete	664,2	6,661045531	
A06/BA5	A06	acícula	Fosmete	717,0	-0,758853288	
A06/BA5	A06	acícula	Fosmete	739,8	-3,962900506	
A06/BA5	A06	acícula	Fosmete	649,8	8,6846543	
A06/BA5	A06	acícula	Fosmete	724,8	-1,854974705	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	754,8	-6,881903144	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	742,2	-5,097706032	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	690,0	2,293967715	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	679,2	3,823279524	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	718,8	-1,784197111	
A06/BH3	A06	húmus	Testemunha	652,2	7,646559048	30,67119796
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	494,4	29,99150382	
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	476,4	32,54035684	
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	460,8	34,74936279	
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	506,4	28,29226848	
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	506,4	28,29226848	
A06/BH3	A06	húmus	Fosmete	493,2	30,16142736	
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	422,4	-7,235338919	
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	397,2	-0,837776085	
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	372,0	5,559786748	
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	385,2	2,208682407	12,6681899
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	376,2	4,493526276	
A90/BP1	A90	padrão	Testemunha	410,4	-4,188880427	
A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	336,0	14,69916222	
A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	344,4	12,56664128	

A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	345,6	12,26199543	
A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	342,6	13,02361005	
A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	346,2	12,10967251	
A90/BP1	A90	padrão	Fosmete	349,2	11,34805788	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1212,0	0,320750062	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1155,0	5,008635579	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1244,4	-2,343942758	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1204,8	0,912904022	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1281,6	-5,403404885	
A90/BP2	A90	padrão	Testemunha	1197,6	1,505057982	36,82046221
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	760,8	37,42906489	
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	753,6	38,02121885	
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	759,6	37,52775722	
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	756,0	37,8238342	
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	820,8	32,49444856	
A90/BP2	A90	padrão	Fosmete	758,4	37,62644954	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	882,0	-0,765451845	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	854,4	2,38775277	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	852,0	2,661944476	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	897,0	-2,479150006	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	891,6	-1,862218668	
A90/BP3	A90	padrão	Testemunha	874,8	0,057123272	24,31166457
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	664,2	24,11744545	
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	656,4	25,00856849	
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	693,6	20,75859705	
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	639,6	26,92791043	
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	682,8	21,99245973	
A90/BP3	A90	padrão	Fosmete	638,4	27,06500628	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1222,8	-2,20661986	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1183,8	1,053159478	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1198,2	-0,150451354	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1178,4	1,504513541	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1188,0	0,702106319	
A90/BH1	A90	húmus	Testemunha	1207,2	-0,902708124	13,75794049
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1028,4	14,04212638	
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1053,6	11,93580742	
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1021,2	14,6439318	
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1038,0	13,23971916	
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1027,2	14,14242728	
A90/BH1	A90	húmus	Fosmete	1022,4	14,54363089	
A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	275,4	-4,120982987	
A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	265,8	-0,491493384	25,55765595
A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	271,2	-2,533081285	

A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	278,4	-5,255198488
A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	262,2	0,869565217
A90/BH3	A90	húmus	Testemunha	234,0	11,53119093
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	196,8	25,59546314
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	193,8	26,72967864
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	187,2	29,22495274
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	190,8	27,86389414
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	201,6	23,78071834
A90/BH3	A90	húmus	Fosmete	211,2	20,15122873

As informações de “Época” e “Biomistura” podem ser observadas no nome de cada isolado fúngico.

Fonte: O autor (2019).