

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Thalia Silva Valério

Graduanda em Engenharia Agrônômica

ECOTOXICIDADE DE SOLOS COM TEBUTHIURON
ASSOCIADO A INOCULANTES MICROBIANOS E
CULTIVO DE MUCUNA-CINZA OU FEIJÃO-DE-PORCO

Dracena

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA (UNESP)
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
CAMPUS DE DRACENA

Thalia Silva Valério

Graduanda em Engenharia Agrônômica

ECOTOXICIDADE DE SOLOS COM TEBUTHIURON
ASSOCIADO A INOCULANTES MICROBIANOS E
CULTIVO DE MUCUNA-CINZA OU FEIJÃO-DE-PORCO

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado à Faculdade de Ciências
Agrárias e Tecnológicas – Unesp, Câmpus
de Dracena como parte das exigências
para conclusão do curso.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes

Dracena
2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Dracena



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E TECNOLÓGICAS
UNESP – CÂMPUS DE DRACENA

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Ecotoxicidade de solos com tebuthiuron associado a inoculantes microbianos e cultivo de mucuna-cinza ou feijão-de-porco

Modalidade: Atividades de pesquisa

Autora: Thalia Silva Valério

Orientador: Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes

Número de Créditos: 12

Data da aprovação e correção de acordo com as sugestões da Banca: 12/05/2023

Paulo Renato Matos
Lopes

Flávia Thomaz Verechia
Rodrigues

Carolina dos Santos
Batista Bonini

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thalia Silva Valério nascida em 10 de janeiro de 2001 na cidade de Junqueirópolis/SP. Ingressou no curso de graduação em Engenharia Agrônoma da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp, Câmpus de Dracena, em 2019. Foi membro do Centro de Estudos em Biometria Aplicada à Fitotecnia (CEBAF) de 2019 até 2020, e do Grupo de Ação em Impactos Ambientais (GAIA) de 2021 até o momento. Na Empresa Júnior GERUD (FCAT/Unesp), foi estagiária em 2019 e diretora técnica em 2020. Em 2022, ficou entre as finalistas do 4º Prêmio “Carolina Bori Ciência & Mulher”, organizado pela Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC). Realizou três anos de iniciação científica: 2020 sem bolsa, 2021/22 com bolsa PIBIC-CNPq, e 2022/23 com bolsa PIBIC Ações Afirmativas RT (em andamento). É coautora de um artigo científico publicado em periódico e também de 10 trabalhos em anais de eventos científicos, com destaque às apresentações como primeira autora no Congresso de Iniciação Científica da Unesp (2020 e 2022) e no Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento (2020). Além disso, participou de vários eventos científicos ao longo da graduação.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, sem Ele nada seria possível e aos meus pais Mauro e Geni Valério pois palavras não seriam o suficiente para agradecer tudo o que eles fizeram por mim.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo Edital PROPe Unesp 4/2022 – PIBIC.

À Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas (FCAT/UNESP), que me proporcionou desde o começo da minha graduação a minha jornada de crescimento pessoal e profissional, nas quais foram experiências únicas nesse período.

Ao meu orientador Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes, que no primeiro dia de aula, fez o convite para participar do GAIA e desde então sempre me impulsionou meus objetivos acadêmicos. Agradeço por partilhar seus conhecimentos e principalmente o seu exemplo, pois além das palavras me ensinou como um profissional deve-se portar, com paciência, respeito, bondade e organização. Sempre dizendo que é possível, só basta tentarmos, frases nas quais nunca esquecerei. Me sinto privilegiada por ter sua orientação e grata por ter sua presença na minha formação acadêmica!

Ao Grupo de Ação em Impactos Ambientais (GAIA) que sempre me auxiliou nos projetos e me ensinou o que é trabalho em equipe.

Aos técnicos de campo e de laboratório desde o começo de cada experimento e execução me auxiliaram em tudo o que eu precisei.

Ao Prof. Dr. Evandro Prado por me auxiliar na implementação do experimento.

Ao Victor Cruz que desde o começo do experimento me auxiliou com paciência e dedicação.

Aos meus amigos de sala que sempre estiveram presentes no meu cotidiano, em especial ao Marcos Freitas, Giulio Sellin, Nathalia Ribeiro e Maria Fernanda Gomes, por toda ajuda no experimento. Sou grato por todo apoio, momentos de perrengue e de risadas que passamos juntos.

À Profas. Dras. Carolina dos Santos Batista Bonini e Flávia Thomaz Verechia Rodrigues por toparem fazer parte desse momento tão especial na minha vida acadêmica.

Aos meus pais que sempre me apoiaram, e sempre acreditarem em mim, até quando eu mesma duvidava, seu suporte e fortalecimento são eternos na

minha vida, não tenho como descrever como vocês fazem meus dias mais felizes e completos.

À minha irmã Ana Paula Valério por ser minha melhor amiga sempre!

“Confie ao Senhor tudo o que você faz e seus planos serão bem-sucedidos.”
(PROVÉRBIOS 16:03).

RESUMO

O tebuthiuron é um herbicida muito utilizado no manejo da cultura da cana-de-açúcar e caracteriza-se por ser uma molécula de efeito residual prolongado e com alta solubilidade, o que pode gerar alto risco de contaminação do solo e da água, além de influenciar negativamente as culturas implantadas em sucessão nas áreas tratadas. Para combater esse problema, técnicas de biorremediação são excelentes alternativas de tratamento. Logo, esta pesquisa analisou a eficiência da fitorremediação e da bioaumentação na diminuição da toxidez do tebuthiuron no solo, mediante bioensaios de ecotoxicidade. O experimento inteiramente casualizado foi conduzido em casa de vegetação em esquema fatorial 2x3x3, considerando os seguintes fatores: dose de tebuthiuron (ausência e a dose recomendada); inoculantes microbianos (ausência, líquido e sólido); e espécies fitorremediadoras (ausência, *Canavalia ensiformis* e *Mucuna pruriens*). A indicação do efeito fitotóxico de cada tratamento para o organismo-teste *Lactuca sativa* (alface) foi realizada em cinco replicatas por meio do extrato aquoso (solubilizado). No tempo inicial, pode-se certificar que os tratamentos com a presença do tebuthiuron tiveram a germinação e o desenvolvimento da *L. sativa* prejudicados. Os comprimentos dos hipocótilos e das raízes do organismo-teste em todos os tratamentos foram influenciados negativamente no tempo final. Este resultado é causado pela presença persistente da molécula contaminante. Nos próximos tempos de avaliação (40 e 70 DAS), notou-se que as amostras de solo que mais se destacaram foram as que continham inoculante líquido, levantando a teoria que um solo rico em microrganismos possui maior capacidade metabólica e pelo inoculante líquido ser um potencializador de crescimento. Outro ponto positivo do inoculante líquido foi a associação com *M. pruriens*, que demonstrou superior desenvolvimento da germinação, por ser uma planta com potencial fitorremediador, isso pode ter ocorrido devido a sua maior capacidade de tolerar o herbicida.

Palavras-chave: biorremediação, ecotoxicologia, herbicida, microrganismos, pesticidas.

ABSTRACT

Tebuthiuron is an herbicide widely used in sugarcane crop management. It is characterized by being a molecule of prolonged residual effect and high solubility, which can generate a high risk of soil and water contamination, besides negatively influencing the crops planted in succession in the treated areas. Thus, bioremediation techniques can be used to mitigate this problem. Therefore, this research evaluated the efficiency of phytoremediation and bioaugmentation through ecotoxicity bioassays. The entirely randomized experiment was performed in a greenhouse using a 2x3x3 factorial scheme. The following factors were considered: tebuthiuron dose with 2 levels (absence and the recommended dose - 1.0T); microbial inoculant with 3 levels (absence, liquid and solid); and phytoremediator species with 3 levels (absence, *C. ensiformis* and *M. pruriens*). The phytotoxic effect of each treatment for *Lactuca sativa* was analyzed in five replicates through the aqueous extract (solubilized). At the initial time, it was observed that the treatments with tebuthiuron presented a harmed germination and development of *L. sativa*. The lengths of the hypocotyls and roots of seedlings in all soil samples was negatively influenced in the final time. At 40 and 70 days after sowing, it was noted that the treatments with less ecotoxicology potential were those containing liquid inoculant, raising the theory that a soil rich in microorganisms has a greater metabolic capacity and also because the liquid inoculant is a growth enhancer. Another positive point of the liquid inoculant was the association with *M. pruriens*, which showed superior germination development, as it is a plant with phytoremediation potential. This result may have occurred due to its greater ability to tolerate the herbicide.

Keywords: bioremediation, ecotoxicology, herbicide, microorganisms, pesticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Insumos utilizados: (A) Herbicida Combine® 500SC – tebuthiuron, e (B) inoculantes Microgreen® líquido e (C) sólido.....	24
Figura 2. Preparo do solo para o experimento.....	25
Figura 3. Aplicação do herbicida Combine® por meio de um pulverizador laboratorial...	27
Figura 4. Disposição dos tratamentos em delineamento inteiramente casualizado.....	27
Figura 5. Plantio das espécies vegetais: (A) sementes de mucuna-cinza e (B) feijão-de-porco; (C) semeadura das espécies vegetais (D) em destaque.....	28
Figura 6. Preparo do extrato aquoso (solubilizado) das amostras de solo: (A) coleta; (B) pesagem; (C) adição de água deionizada; (D) agitação; e (E) soluções prontas para incubação.....	30
Figura 7. Montagem do bioensaios de ecotoxicidade: (A) sementes de alface em placas de Petri; (B) adição do extrato aquoso das amostras de solo; (C) solução de sulfato de zinco a 0,05 M; (D) materiais utilizados em bancada; e (E) placas de Petri a serem incubadas.....	30
Figura 8. Avaliação do desenvolvimento das plântulas de <i>L. sativa</i> pelo alongamento da raiz e do hipocótilo em cm.	30
Figura 9. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de <i>L. sativa</i> nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo sem a presença de plantas nos tempos 0, 40 e 70 DAS.....	32
Figura 10. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de <i>L. sativa</i> nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo com a presença de mucuna-cinza nos tempos 0, 40 e 70 DAS.....	33
Figura 11. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de <i>L. sativa</i> nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo com a presença de feijão-de-porco nos tempos 0, 40 e 70 DAS.....	34
Figura 12. Variação do índice de germinação de <i>L. sativa</i> nos bioensaios de ecotoxicidade nas diferentes amostras de solo entre os tempos inicial (0 DAS) e final (70 DAS), em %.....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atributos químicos do solo na camada de 0-20 cm antes a instalação do experimento.....	24
Tabela 2. Delineamento experimental em esquema fatorial 2x3x3.....	26
Tabela 3. Análise de variância do índice de germinação de <i>L. sativa</i> nos bioensaios de ecotoxicidade nas diferentes amostras de solo nos tempos 0, 40 e 70 DAS.....	37

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Objetivo Geral	16
2.1 Objetivos Específicos.....	16
3. REVISÃO DE LITERATURA	17
3.1. Cana-de-açúcar	17
3.2. Herbicidas.....	18
3.3. Biorremediação.....	19
3.4. Fitorremediação.....	20
3.5. Bioaugmentação	21
3.6. Ecotoxicidade.....	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Pertencente à família *Poaceae*, a cana-de-açúcar está no grupo das gramíneas e representa uma das culturas mais importantes do agronegócio brasileiro. Recentemente, há uma procura maior na expansão do cultivo pela alta produção etanol, açúcar, biomassa e energia (STRAPAZZON, 2022).

Neste sentido, é necessária a preocupação com múltiplos fatores ao visar altas produtividades em grandes áreas. Dentre estes estão as plantas invasoras que podem competir por água, luz solar, nutrientes e outros recursos, interferindo negativamente na produtividade da cultura (BERGMANN, 2019).

Para controlar esse tipo de dano na lavoura, encontram-se os herbicidas sendo o tebuthiuron um dos mais relevantes aplicado na lavoura canavieira no país (BRASIL, 2020). De ação pré-emergente, esta molécula tem uma alta toxicidade ambiental (BRASIL, 2020) e é caracterizada pela alta solubilidade em água e persistência no solo e em águas superficiais. Devido às suas propriedades e por ter uma boa eficiência no controle de plantas daninhas, o tebuthiuron é considerado um dos principais contaminantes na lavoura, visto que ele tem uma meia vida de 15 meses (RODRIGUES E ALMEIDA, 2011) e já foi evidenciado em outros estudos resíduos do herbicida após 24 meses ou mais depois de sua aplicação (IBAMA, 2019).

Neste contexto, técnicas de biorremediação que visam tratar a área edáfica ou hídrica podem ser aplicadas para remover estes pesticidas do ambiente (CORIOLANO; MORAIS FILHO, 2016). Um desses métodos é a fitorremediação, na qual se utiliza espécies vegetais com potencial de redução da concentração de moléculas contaminantes (SILVA *et al.*, 2019). Outra importante técnica de biorremediação para o tratamento de áreas contaminadas é a bioaumentação. Nela, microrganismos específicos são inoculados na área para incrementar a microbiota do ambiente com o intuito de acelerar o processo de degradação de contaminantes (DE MATOS; ZAGONEL, 2021).

Associados às técnicas de biorremediação, os bioensaios de ecotoxicidade são ferramentas fundamentais para avaliação da eficiência da estratégia de tratamento adotada. A ecotoxicologia é uma parte da toxicologia que analisa os segmentos tóxicos em resposta ao comportamento das moléculas naturais ou sintéticas nos biossistemas, o que pode afetar em embates na fauna

e flora (FERREIRA *et al.*, 2021). As diversas ações consequentes dos contaminantes sobre os seres vivos são analisados através desses testes, que qualificam os danos sobre organismos-teste da substância em avaliação (CARDOSO; ALVES, 2013).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar o potencial ecotoxicológico de solos contendo o herbicida tebuthiuron associados ou não com feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), mucuna-cinza (*Mucuna pruriens*) e inoculantes microbianos.

2.1 Objetivos Específicos

- Monitorar o efeito da presença do tebuthiuron no solo sobre sementes de *Lactuca sativa* como organismo-teste a partir de diferentes tratamentos;
- Verificar a capacidade de fitorremediação do solo com tebuthiuron, com as plantas de interesse agrônomo (*C. ensiformis* e *M. pruriens*);
- Analisar a associação de plantas com inoculantes microbianos líquido e sólido de forma isolada ou na presença do herbicida tebuthiuron quanto à ecotoxicidade do solo.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar faz parte da família *Poaceae* e do gênero *Saccharum*, caracterizada como uma gramínea semiperene provinda do sudeste da Ásia (SILVA; SILVA, 2012). Resultante de sua alta eficiência na conversão de energia solar em energia química, além de se caracterizar como uma fonte renovável, atualmente essa cultura vem se expandindo em produção (DEFANTE *et al.*, 2018).

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar na escala mundial e o estado de São Paulo é responsável por 50% da área de plantio nacional (IEA, 2019). A safra 2022/23 ultrapassou 610 mil toneladas (CONAB, 2023) e toda essa produção é designada a indústria para a produção de açúcar e etanol, sendo o açúcar comercializado para o mercado nacional e internacional, enquanto, o etanol é produzido como biocombustível somente para o território brasileiro (GARCIA, 2019).

Neste sentido, houve um considerável aumento no consumo e na produção do setor sucroenergético, tal âmbito que se caracteriza por sua habilidade de produzir energia limpa em larga escala (MANNARELLI FILHO *et al.*, 2021), devido ao estímulo do mercado mundial por causa da aplicação em fontes renováveis com baixa demanda de carbono e maior procura por fontes de energia renováveis (CALDARELLI, 2018). Ademais, destacam-se dois pontos importantes: o primeiro é a criação de empregos ligados direta ou indiretamente na produção sucroenergética e também o lado negativo que é o grande uso de recursos naturais e a formação de resíduos agroindustriais (UNICA, 2019).

Nesse cenário, o Brasil garante uma alta produtividade pelas características edafoclimáticas. Entretanto, tais fatores ambientais causam favorecimento de um grande número de plantas daninhas e essa diversidade de espécies afeta diretamente na produtividade (NASCIMENTO, 2016). Para controlar esse grande problema no manejo da cultura canavieira que pode causar uma perda de até 30% na produtividade (LORENZI, 2014), o uso de pesticidas agrícolas é utilizado nesta lavoura principalmente para métodos de controle químico (MARQUES, 2019).

3.2. Herbicidas

O surgimento de formas de vidas inconvenientes e prejudiciais aflige grandemente a capacidade das lavouras, como por exemplo ervas daninhas e insetos. Consequentemente, o uso de pesticidas de diferentes classes químicas se tornou essencial para as produções agrícolas (COUTINHO *et al.*, 2005).

No período de 2000 a 2016, a aplicação e o consumo de pesticidas no Brasil tiveram um considerável aumento na demanda. No ano de 2000, o consumo de pesticidas foi de 162.461,96 toneladas de ingrediente ativo e com um desdobramento de 300%, 2016 resultou-se com 541.861,09 toneladas (IBAMA, 2019).

De acordo com o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal, a cultura soja é a líder no ranking de uso de pesticidas e a cultura canaveira está em segundo lugar. O seu uso na produção de cana-de-açúcar representa 60% herbicidas e 15% inseticidas (SINDIVEG, 2017).

Os herbicidas são substâncias que interferem na germinação ou no crescimento de algumas plantas. O desempenho e a seleção desse controle estão ligados à maneira em que acontece os processos de transformação, transporte, absorção e adsorção (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2008). Dentre os pesticidas mais utilizados na cultura da cana-de-açúcar, evidenciam-se a hexazinona, o diuron, a ametrina e o tebuthiuron (BRASIL, 2020).

Intitulado quimicamente 1-(5-tert-butil-1,3,4-tiadiazol-2-il)-1,3-dimetilureia (AGROFIT, 2019), o tebuthiuron pertence ao grupo das ureias substituídas, sendo seletivo e de ação sistêmica (BRASIL, 2020). Também expressa alta solubilidade em água e grande persistência devido sua meia-vida longa e de baixa adsorção às partículas do solo e matéria orgânica. Além disso, o seu potencial de impacto no solo e nas águas superficiais ou subterrâneas pode ser mais agressivo se for aplicado diversas vezes sem o devido e apropriado manejo (FRANCO-BERNARDES *et al.*, 2014).

Para a maioria dos pesticidas utilizados na agricultura, o solo é o seu destino final e essas substâncias podem persistir nesta matriz ou ser conduzidas entre seu perfil. Seus resíduos e a quantidade absorvida pelas plantas são fatores determinantes para a mobilidade das moléculas do herbicida no ambiente (SILVA JR. *et al.*, 2018).

Em preocupação a este impacto negativo dos pesticidas aplicados na lavoura canavieira, o tebuthiuron é classificado como perigoso ao meio ambiente (Classe III), sendo extremamente tóxico para algas e persistente na matriz ambiental (IBAMA, 2009).

3.3. Biorremediação

Com a intenção de atenuar as decorrências adversas das substâncias aplicadas em solos na lavoura, a procura por meios alternativos de tratamentos vêm sendo o propósito de novas pesquisas (STELIGA, KLUK, 2020), como a biorremediação (FASANELLA; CARDOSO, 2016).

De acordo com Quintella *et al.* (2019), a biorremediação é um método de remediação biológica que vem sendo utilizada para suavizar ou subtrair as consequências do uso de moléculas contaminantes. Dentre as suas diferentes técnicas, estão a fitorremediação, a bioaugmentação e a bioestimulação, além de outras (SANTOS *et al.*, 2021).

O processo de biorremediação constitui-se no uso de organismos que tem a competência de alterar ou desintegrar certos poluentes. Essa técnica pode ser feita através do uso dos contaminantes como substrato por determinados seres vivos, tornando-os em compostos não reativos (FASANELLA; CARDOSO, 2016). Além do grupo dos microrganismos, que são essenciais para esse método, atualmente, certas plantas, principalmente as leguminosas também estão sendo empregadas como responsáveis na descontaminação de áreas contaminadas (FRANCISCO; QUEIROZ, 2018).

As metodologias da biorremediação são divididas em tratamentos *in situ* e *ex situ*, sendo realizada, respectivamente, no mesmo local da contaminação e viável economicamente ou fora do lugar da contaminação (ANDRADE *et al.*, 2010). As duas maneiras objetivam a mineralização dos contaminantes com a sua conversão em produtos com pouca ou nenhuma toxicidade. Em síntese, certos organismos como fungos, bactérias e plantas podem metabolizar ou indisponibilizar os compostos poluentes (ANDRADE *et al.*, 2010).

A utilização desses organismos na degradação de substâncias orgânicas é bastante aplicada especialmente na remediação de hidrocarbonetos de petróleo (SANTOS *et al.*, 2021). No que se refere aos pesticidas, Demichelli *et al.* (2020) descobriram efeitos positivos no isolamento de microrganismos com

capacidade de degradação do herbicida glifosato em solos do sul do território nacional.

Ademais, o cultivo de certas espécies vegetais no solo contaminado é capaz de impulsionar o desenvolvimento microbiano e despertar a degradação de substâncias poluentes, como os resíduos de pesticidas agrícolas, pelo funcionamento da microbiota encarregada de (co)metabolizá-los (MELO *et al.*, 2017).

3.4. Fitorremediação

O conceito de fitorremediação resume-se na utilização de espécies vegetais que apresentam aptidão de absorver substâncias de elevada toxicidade e, por estratégias agrícolas adequadas, permitem atenuar, diminuir ou limitar os contaminantes a teores inofensivos por meio de procedimentos que portam a competência de reabilitar a matriz ambiental (SOUZA *et al.*, 2011).

Com finalidade de conseguir bons resultados na fitorremediação, é preciso fazer o uso de plantas que apresentam propriedades que proporcionam boa habilidade de assimilação como possuir uma raiz acentuada, rápido crescimento e desenvolvimento. No entanto, é fundamental evidenciar a indispensabilidade de compreender a interatividade das espécies vegetais com o elemento contaminador. Esta metodologia contém inúmeros meios para otimizar a despoluição de ambientes a partir da interação com plantas que portam formas e fisiologias diferentes, desde a remoção, imobilização ou transformação dos contaminantes (COUTINHO *et al.*, 2015).

Nesse sentido, no trabalho de Ferreira *et al.* (2021) foi analisada a potencialidade fitorremediadora de quatro plantas: milheto (*Pennisetum typhoides*), mucuna-cinza (*Mucuna pruriens* L. DC.), feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e feijão-guandu (*Cajanus cajan*), e concluiu-se que o milheto exibiu maior crescimento vegetal, menor índice de mortalidade e melhor comportamento quando relacionado ao tebutiuron com a vinhaça. Apesar disso, o solo cultivado a mucuna-cinza foi o melhor para o crescimento da espécie bioindicadora *Crotalaria juncea*. Além disso, por não fazer parte da família da cultura da cana-de-açúcar, a mucuna-cinza é mais recomendada com mais benefícios pela fixação de nitrogênio e pelo fato de correr o risco de propagar o ciclo de algumas pragas, insetos e doenças. Consequentemente, esse é o

motivo da utilização desta planta (*Mucuna pruriens* L. DC.) no atual trabalho. A outra planta utilizada no experimento também já foi comprovada como altamente capaz para a fitorremediação do tebuthiuron (PIRES *et al.*, 2008).

3.5. Bioaugmentação

O processo de bioaugmentação promove a adição de microrganismos no ambiente contaminando para otimizar o tratamento biológico da área (SZAJA, 2018), favorecendo o processamento da biorremediação. Com o intuito de melhorar o desempenho da degradação de substâncias contaminantes no solo, a bioaugmentação é uma estratégia muito positiva (PALÁCIO *et al.*, 2012).

Este método pode ser realizado através da inoculação de microrganismos isolados ou em consórcio, cuja mistura de espécies microbianas torna-se mais parecidos com a realidade do ambiente (TYAGI *et al.*, 2011).

Comparando com outros métodos de biorremediação, a bioaugmentação possui vários benefícios. No momento em que um grupo microbiano é introduzido, sua atividade metabólica já está apta a iniciar o tratamento da área, já no processo de bioestimulação possui um período de latência fisiológica dos microrganismos depois da introdução de nutrientes (ALISI *et al.*, 2009).

Segundo Jerônimo *et al.* (2012), a bioaugmentação vem sendo aplicada desde os anos 1960 nos Estados Unidos. Em território brasileiro, o processo teve maior demanda a partir dos anos 1990 com a introdução de empresas de aditivos bioquímicos para esse uso.

Trabalhos na literatura comprovaram que a técnica da bioaugmentação, em geral, pode provocar uma perturbação no meio, e assim consequentemente ocorre um incremento da atividade microbiana (KARAS *et al.*, 2016; DE MATOS; ZAGONEL, 2021; ALMEIDA, 2022).

Em relação ao emprego desta técnica em solos com herbicidas, Chen *et al.* (2021) evidenciaram recentemente que o efeito positivo da bioaugmentação no processo de degradação da atrazina com consequente redução da toxicidade do solo para o desenvolvimento do trigo.

3.6. Ecotoxicidade

Estudos sobre a ecotoxicologia analisam os efeitos tóxicos de compostos poluentes ao ambiente frente aos efeitos diretos e indiretos sobre seres vivos. Deste modo, organismos-testes são usados em ensaios laboratoriais para

definição da toxicidade de amostras ambientais. Sua metodologia fundamenta-se em expor certo organismo às condições de contaminação e avaliar os seus possíveis efeitos agudos e/ou crônicos (MAGALHÃES; FERRÃO FILHO, 2008).

Para ajudar na análise de indicação do efeito de compostos contaminantes associados aos organismos-testes, são empregados os bioensaios de ecotoxicidade. Assim, mudanças comportamentais, fisiológicas ou até morte podem ser identificadas a depender do tipo químico da substância, do tempo de exposição, da concentração, da periodicidade da exposição, do organismo-teste e da fase do ciclo de vida que ele se encontra (LIMA, 2017).

Para se definir um bioindicador nestes ensaios, é necessário conhecer sua facilidade de manejo, seu ciclo de vida, sua sensibilidade, e o seu custo de otimização (SILVA *et al.*, 2012). Ácaros, anelídeos, colêmbolos, diplópodos, isópodos e vegetais são exemplos de organismos capazes de serem utilizados como organismos-teste nestes bioensaios ecotoxicológicos (ZORTÉA *et al.*, 2017).

No trabalho de Gonçalves *et al.* (2016), a espécie *Lactuca sativa* (alface) foi escolhida como bioindicadora por se caracterizar com bons aspectos fisiológicos e grande vulnerabilidade em relação à contaminação a pesticidas. No experimento de Faria *et al.* (2019), foram efetuados testes ecotoxicológicos também utilizando sementes de *L. sativa*, associando diferentes doses de tebuthiuron e vinhaça depois do processo de atenuação natural.

Em áreas com o uso frequente de insumos químicos pela necessidade de manejo das culturas, faz-se necessária à sua recuperação. Como já argumentado anteriormente, o estudo da ecotoxicologia pode evidenciar o potencial das técnicas de biorremediação em solos contaminados. Considerando que o uso do herbicida tebuthiuron no cultivo da cana-de-açúcar é essencial para o controle de plantas daninhas, deve-se notar seu efeito tóxico que ele oferece ao meio.

Dessa forma, o uso de plantas com potencial fitorremediador e a implementação de inoculantes microbianos podem ajudar na recuperação do meio. E, para efetuar uma avaliação mais precisa, torna-se necessária a realização de ensaios ecotoxicológicos para conhecer os impactos ocasionadas por esta contaminação e os efeitos após realizada a biorremediação. Porém, poucos trabalhos foram encontrados na literatura que utilizam as técnicas de

bioaumentação e fitorremediação associadas, com a análise ecotoxicológica do solo durante este tratamento biológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista - FCAT/Unesp, câmpus de Dracena. A cidade está localizada nas coordenadas 21°28'57" S e 51°31'58" W com altitude média de 400 m. O clima da região é do tipo Aw (tropical úmido), classificado segundo Köppen (1948), com temperatura local média de 22, 1°C e precipitação anual média de 1.200 mm, obtidos a partir da estação meteorológica de Dracena EMA/FCAT.

O solo do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (SANTOS *et al.*, 2018) com textura arenosa foi coletado na FCAT/Unesp em até 0,20m de profundidade. Salienta-se que a área de coleta é uma pastagem degradada sem relatos de aplicação de pesticidas nos anos anteriores. Encaminhadas até ao laboratório para secagem, as amostras foram peneiradas em malha de 0,20 m e acondicionadas em recipiente de plástico fechado, sendo uma parte encaminhada para análise química (Tabela 1).

Tabela 1. Atributos químicos do solo na camada de 0,20 m.

pH CaCl ₂	M.O. g.dm ⁻³	P mg.dm ⁻³	S mg.dm ⁻³	K	Ca	Mg	Al ³⁺ mmolc.dm ⁻³	H+Al	SB	CTC	V %
4,0	4	1	7	0,3	6	2	13	25	5,5	30,5	18

O herbicida tebuthiuron, foi obtido em estabelecimento comercial na pelo produto comercial Combine® 500SC - Dow AgroSciences Industrial Ltda. (Figura 1A). Já os dois inoculantes microbianos foram oferecidos pela empresa Microgreen®, sendo indicados para restauração da microbiota em solos agrícolas: inoculante líquido (InL) com maior quantidade bacteriana, e inoculante sólido (InS) com maior riqueza de espécies fúngicas (Figuras 1B e 1C).



Figura 1. Insumos utilizados: (A) Herbicida Combine® 500SC – tebuthiuron, e (B) inoculantes Microgreen® líquido e (C) sólido. (Fonte: Própria autora)

De acordo com o potencial de remediar o solo com pesticidas e também sua capacidade de melhora na qualidade do solo (FERREIRA *et al.*, 2021), foram escolhidas as espécies vegetais, que são usadas também como adubo verde na rotação de cultura com a cana-de-açúcar: feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e mucuna-cinza (*Mucuna pruriens* L. DC.). Além disso, utilizou-se *Crotalaria juncea* que se caracteriza como espécie sentinela do espectro de ação do tebuthiuron. Todas as espécies vegetais foram adquiridas da empresa agrícola Sementes Piraí®.

O delineamento foi inteiramente casualizado (DIC) no esquema fatorial triplo 2x3x3 de acordo com os seguintes fatores: dose de tebuthiuron com 2 níveis (ausência e a dose recomendada – 1,0T); inoculante microbiano com 3 níveis (ausência, InL e InS); e espécie vegetal com 3 níveis (ausência, *C. ensiformis* e *M. pruriens*). Portanto, avaliaram-se 18 tratamentos com sete réplicas cada, conforme descrito na Tabela 2.

Com base na bula do produto comercial Combine® 500SC foi aplicado o herbicida tebuthiuron (1,0T), especificado para solos arenosos. Também, foi feita a incorporação dos inoculantes de acordo com a descrição do fabricante - Microgreen®.

Anteriormente à instalação do experimento, o solo foi peneirado e destorroado e, conforme com a análise química (Tabela 1), foi realizada a correção da acidez e da fertilidade por meio da incorporação de calcário (PRNT 90%), superfosfato simples e cloreto de potássio (Figura 2).



Figura 2. Preparo do solo para o experimento: (A) destorroamento; (B) calcário previamente pesado em laboratório; e (C) correção de acidez e fertilidade. (Fonte: Própria autora).

Tabela 2. Delineamento experimental em esquema fatorial 2x3x3

Tratamentos	Tebuthiuron (T)	Inoculante	Espécie vegetal
T1	-	-	-
T2	-	-	MC
T3	-	-	FP
T4	-	InL	-
T5	-	InL	MC
T6	-	InL	FP
T7	-	InS	-
T8	-	InS	MC
T9	-	InS	FP
T10	T	-	-
T11	T	-	MC
T12	T	-	FP
T13	T	InL	-
T14	T	InL	MC
T15	T	InL	FP
T16	T	InS	-
T17	T	InS	MC
T18	T	InS	FP

Legenda: T – dose comercial de tebuthiuron; InL – inoculante líquido; e InS – inoculante sólido.

Em seguida, os inoculantes foram incorporados em seus respectivos tratamentos (Tabela 2): sólido, na proporção de 0,01 g para cada kg de solo; e líquido, com a diluição de 5,0 mL do produto em 10 L de água. Após três dias, foi realizada a pulverização do herbicida Combine® (Figura 3). Este procedimento foi realizado por meio de um pulverizador laboratorial equipado com seis pontas de jato plano XR 11002 na pressão de 2 bar (vazão de 0,65 L min⁻¹) e espaçadas em 0,5 m. Sendo assim, a aplicação do produto ocorreu-se na velocidade de 5 km h⁻¹ mantidas a uma altura de 0,75 m em relação ao topo dos vasos proporcionando um volume de aplicação de 156 L ha⁻¹.

Posteriormente ao preparo das amostras de solo, o experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação a partir de 120 vasos de 4 L (Figura 4).



Figura 3. Aplicação do herbicida Combine® por meio de um pulverizador laboratorial. (Fonte: Própria autora).



Figura 4. Disposição dos tratamentos em delineamento inteiramente casualizado. (Fonte: Própria autora).

Foi realizado o teste de verificação da viabilidade e dormência das sementes, antes de ocorrer a semeadura. A verificação foi feita conforme o manual técnico de RAS - Regras de Análise de Sementes (MAPA, 2009). Observou-se que não foi preciso realizar a quebra de dormência das sementes. Logo, após sete dias da aplicação do herbicida, realizou a semeadura de três sementes de feijão-de-porco e mucuna cinza por vaso, demonstrada pela Figura 5.

O desenvolvimento das plantas foi conduzido até o florescimento, que é aproximadamente 70 dias após a semeadura (70 DAS). Em seguida, quando foi retirado as plantas fitorremediadoras, foi realizada a semeadura da espécie sentinela (*C. juncea*) que também permaneceu por mais 70 dias de desenvolvimento nas unidades experimentais. Salienta-se que a irrigação dos vasos foi feita diariamente a fim de manter a umidade do solo na faixa de 60% a 80% da capacidade de campo.

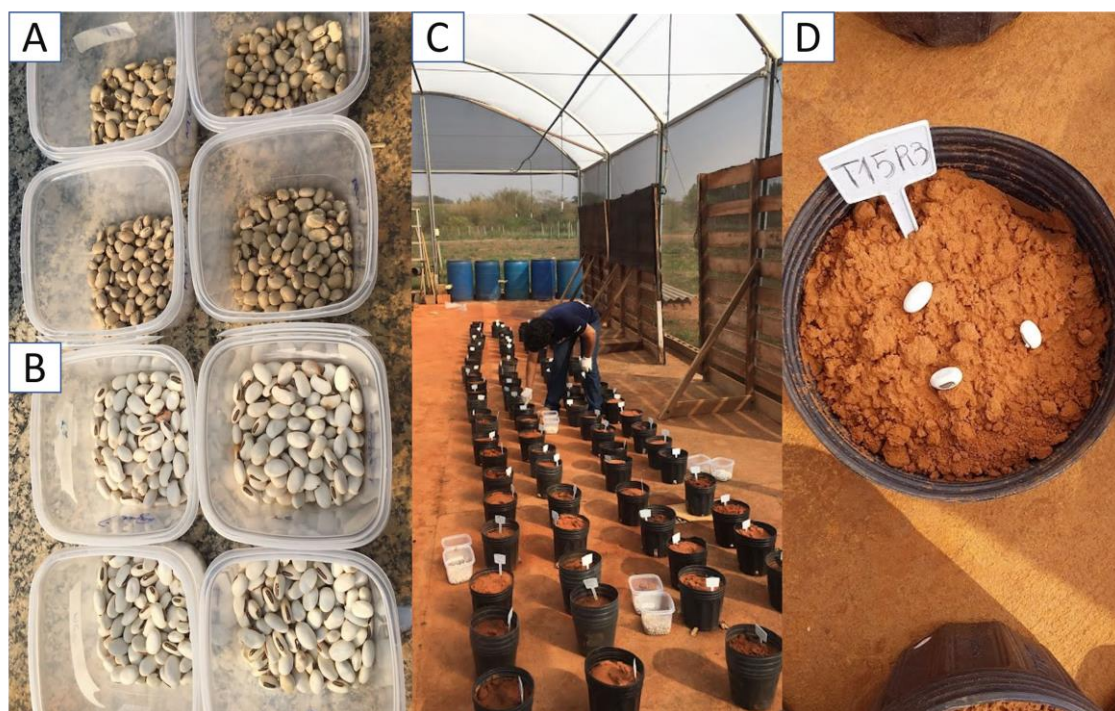


Figura 5. Plantio das espécies vegetais: (A) sementes de mucuna-cinza e (B) feijão-de-porco; (C) semeadura das espécies vegetais (D) em destaque. (Fonte: Própria autora).

Os bioensaios foram preparados a fim de monitorar o potencial ecotoxicológico de cada tratamento no decorrer do período experimental. A avaliação ecotoxicológica das amostras de solo foi realizada utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*) como organismo-teste, em diferentes tempos de acordo com DAS: T0 (inicial), T40 e T70 (final).

A indicação do efeito fitotóxico de cada tratamento para *Lactuca sativa* foi feita em cinco replicatas através do extrato aquoso (solubilizado), conforme a NBR 10.006 (ABNT, 2004). A metodologia constitui-se na dissolução de 25 g da amostra de solo em 100 mL de água deionizada em frascos *Erlenmeyer*. Em seguida, esses frascos foram lacrados com filme PVC, agitados por cinco minutos a 120 rpm e incubados a 20 ± 2 °C por sete dias ao abrigo da luz, de acordo com a Figura 6.

O método dos bioensaios de ecotoxicidade com sementes de *L. sativa* foi feito de acordo com Sobrero e Ronco (2004). Dessa forma, os testes foram preparados em placas de Petri com papel filtro, contendo 2,0 mL do solubilizado e 10 sementes de alface. Em seguida, as placas foram envolvidas com filme PVC para evitar a perda de umidade e incubadas a 20 ± 2 °C por 120 h ao abrigo da luz. Controles positivo (CP) e negativo (CN) foram preparados utilizando sulfato de zinco a 0,05 M e água deionizada, respectivamente, para testar a sensibilidade das sementes (Figura 7).

De acordo com o experimento de ecotoxicidade, analisou-se: a germinação das sementes, o alongamento da raiz e do hipocótilo ($\geq 0,1$ mm) (Figura 8) e o índice de germinação (GI - *Germination Index*) que combina a germinação de sementes (%G) e alongamento da raiz (%R) relativos ao CN. O GI é utilizado para avaliar a toxicidade das amostras de solo no organismo-teste, conforme a Equação 1 (LABOURIAU; AGUDO, 1987):

$$GI = ((\%G) \times (\%R)) / 100 \quad \text{[Equação 1]}$$

Toda análise estatística foi realizada por meio de rotinas a serem desenvolvidas no Software livre R (R CORE TEAM, 2021) e Excel, utilizando ANOVA a 5% e o teste de comparação de médias Tukey a 5%.

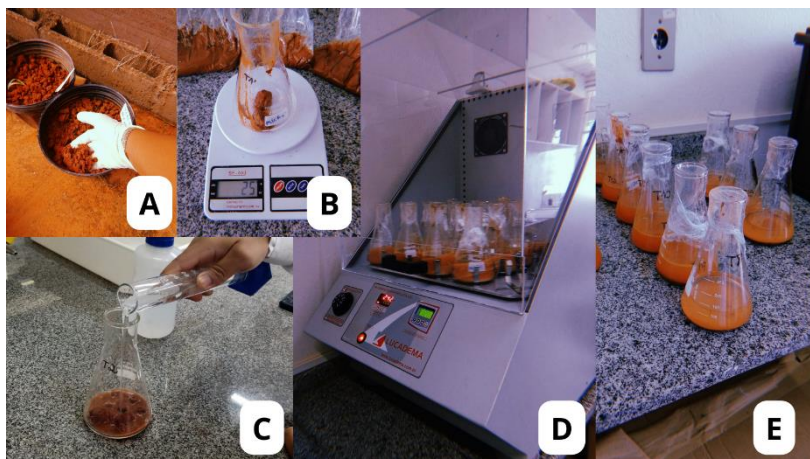


Figura 6. Preparo do extrato aquoso (solubilizado) das amostras de solo: (A) coleta; (B) pesagem; (C) adição de água deionizada; (D) agitação; e (E) soluções prontas para incubação. (Fonte: Própria autora).

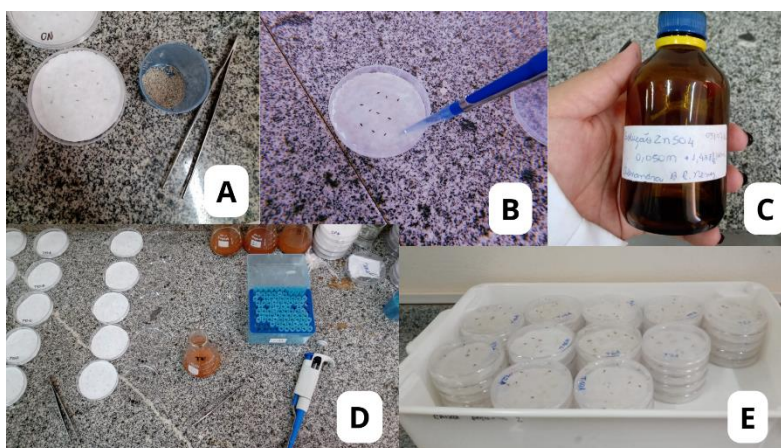


Figura 7. Montagem do bioensaios de ecotoxicidade: (A) sementes de alfaca; (B) adição do extrato aquoso; (C) solução de sulfato de zinco; (D) materiais utilizados; e (E) placas de Petri a serem incubadas. (Fonte: Própria autora).

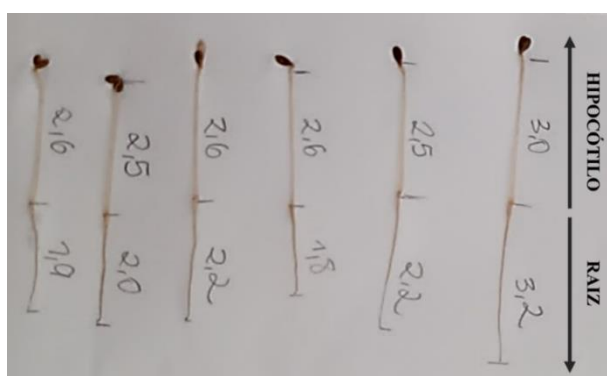


Figura 8. Avaliação do desenvolvimento das plântulas de *L. sativa* pelo alongamento da raiz e do hipocótilo em cm. (Fonte: Própria autora).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos bioensaios de ecotoxicidade com as amostras de solo contendo o herbicida tebuthiuron e os inoculantes microbianos estão dispostos a seguir referente aos três tempos de análise – 0, 40 e 70 dias após a semeadura (DAS) para *Mucuna pruriens* e *Canavalia ensiformis*.

Na Figura 9 estão representados os comprimentos dos hipocótilos e das raízes das plântulas de *L. sativa* nas amostras de solo sem a cultivo de *M. pruriens* e *C. ensiformis*. Em sequência, seguem os mesmos resultados a partir da presença de mucuna-cinza e feijão-de-porco, respectivamente, nas Figuras 10 e 11.

A análise de variância e o teste de comparação de médias do índice de germinação (IG) de *L. sativa* nas diferentes amostras de solo estão dispostos na Tabela 3 (0, 40 e 70 DAS).

Já na Figura 12 está apresentada a variação do IG nos bioensaios de ecotoxicidade de acordo com o período experimental. Esses resultados derivaram-se da Equação 2 abaixo:

$$V_i(\%) = \frac{(IG_{final} - IG_{inicial})}{IG_{inicial}} \times 100 \quad \text{[Equação 2]}$$

em que:

V_i indica a variação do índice de germinação em porcentagem;

IG_{final} refere-se ao índice de germinação final após 70 DAS; e

$IG_{inicial}$ refere-se ao índice de germinação inicial em 0 DAS.

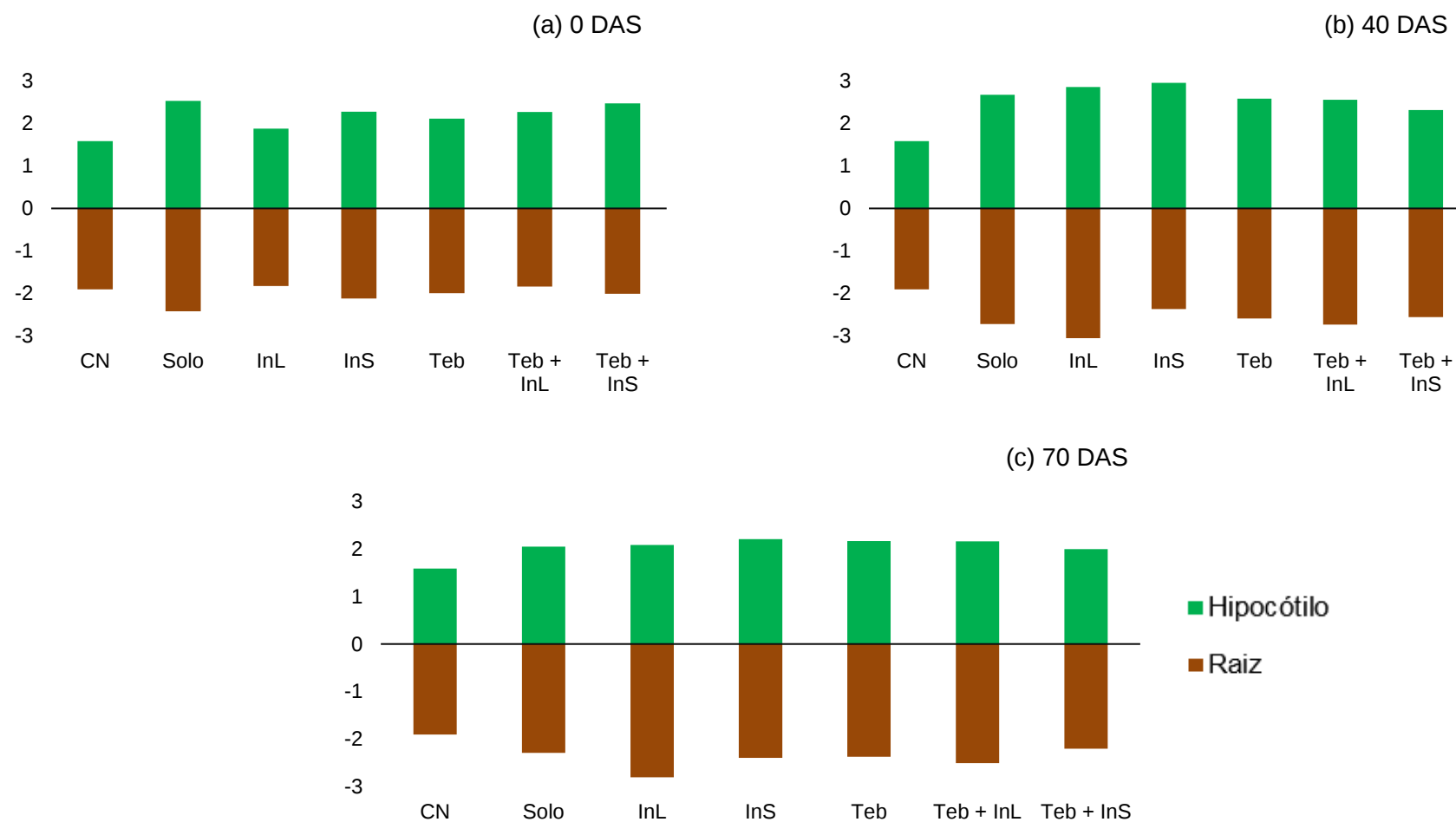


Figura 9. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de *L. sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo sem a presença de plantas nos tempos 0, 40 e 70 DAS. (Fonte: Própria autora).

Legenda = CN: Controle Negativo; InL: Inoculante Líquido; InS: Inoculante Sólido; Teb: Tebuthiuron.

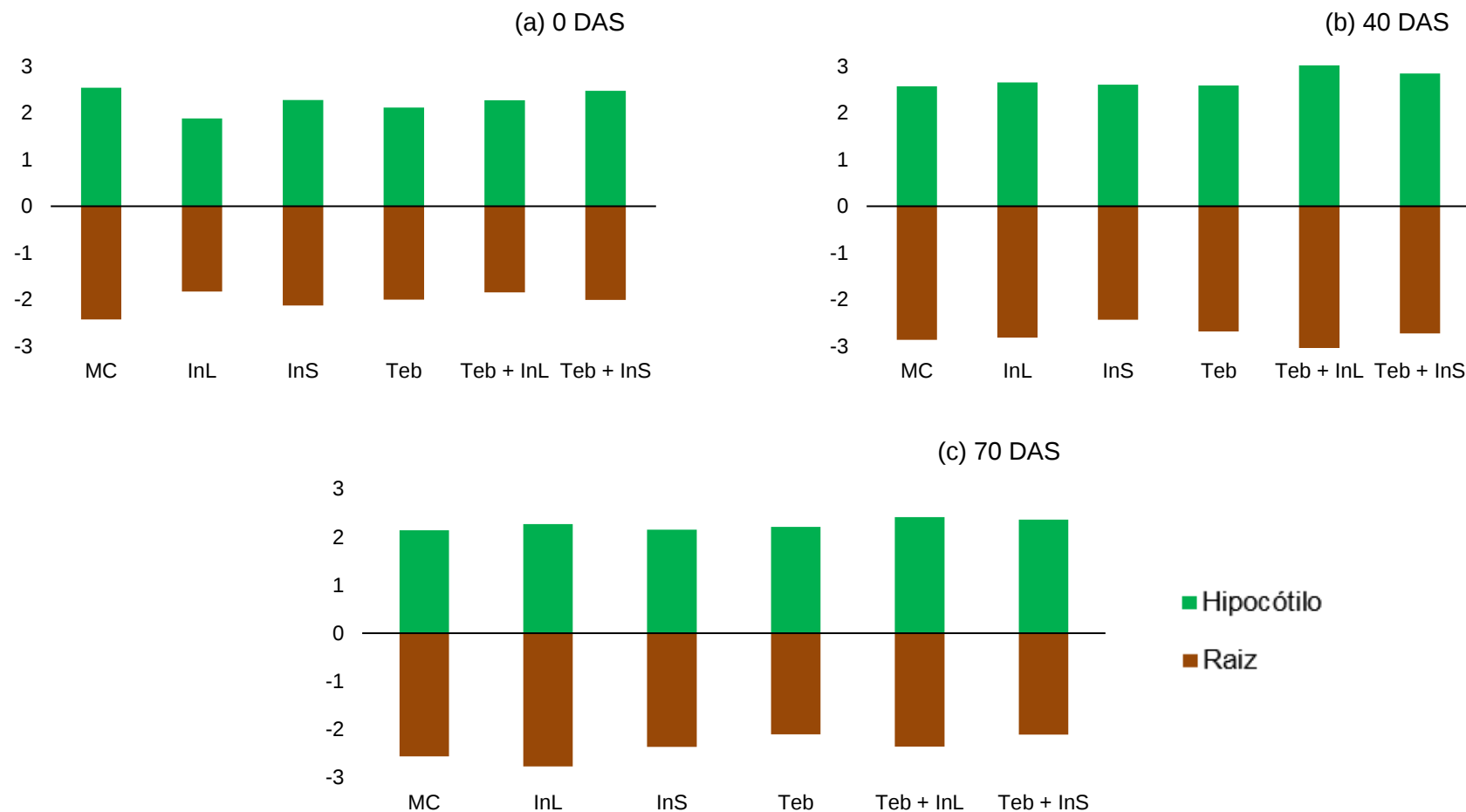


Figura 10. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de *L. sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo com a presença de mucuna-cinza nos tempos 0, 40 e 70 DAS. (Fonte: Própria autora).

Legenda = InL: Inoculante Líquido; InS: Inoculante Sólido; Teb: Tebuthiuron.

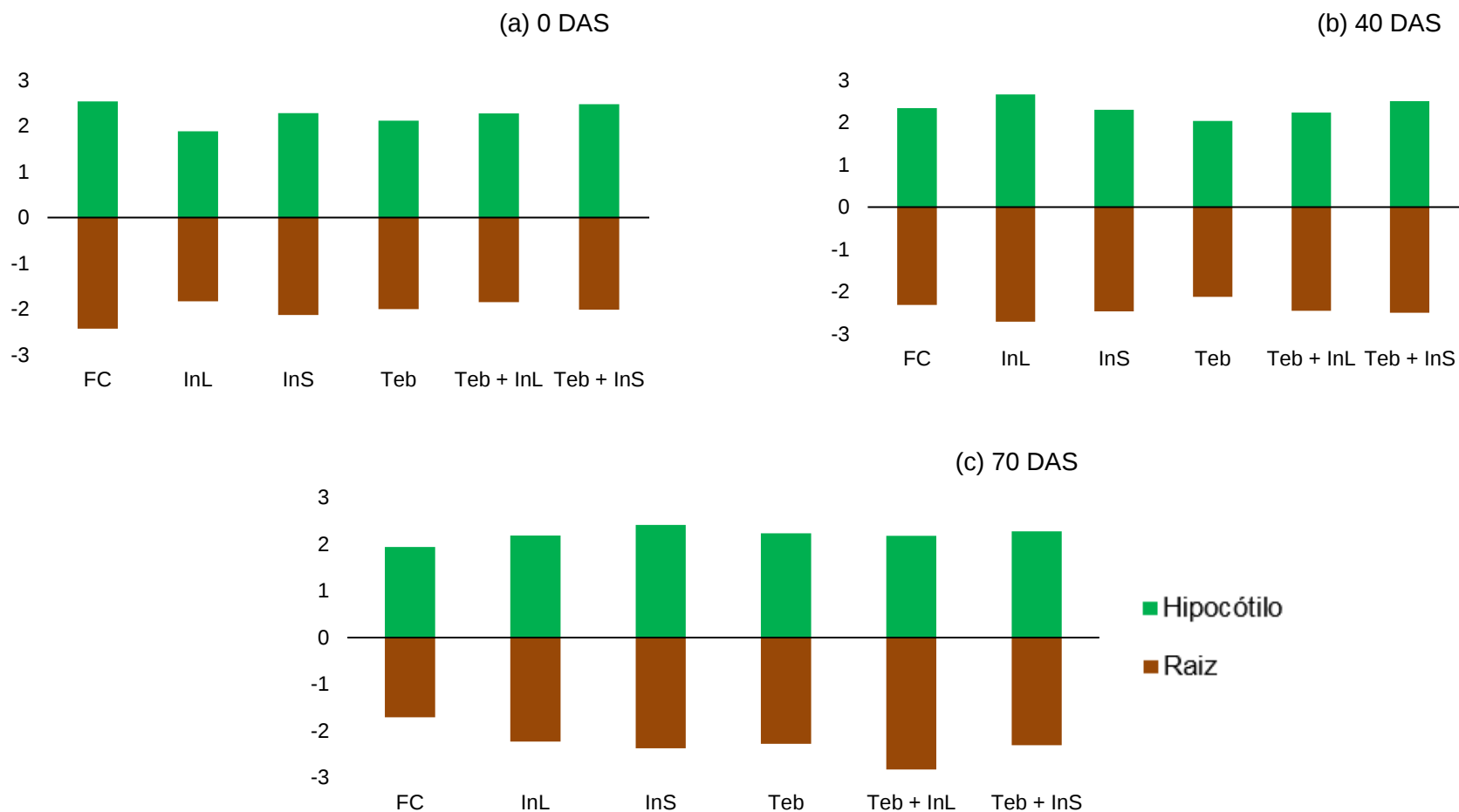


Figura 11. Comprimento do hipocótilo e raiz (cm) de *L. sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade nas amostras de solo com a presença de feijão-de-porco nos tempos 0, 40 e 70 DAS. (Fonte: Própria autora).

Legenda = InL: Inoculante Líquido; InS: Inoculante Sólido; Teb: Tebuthiuron.

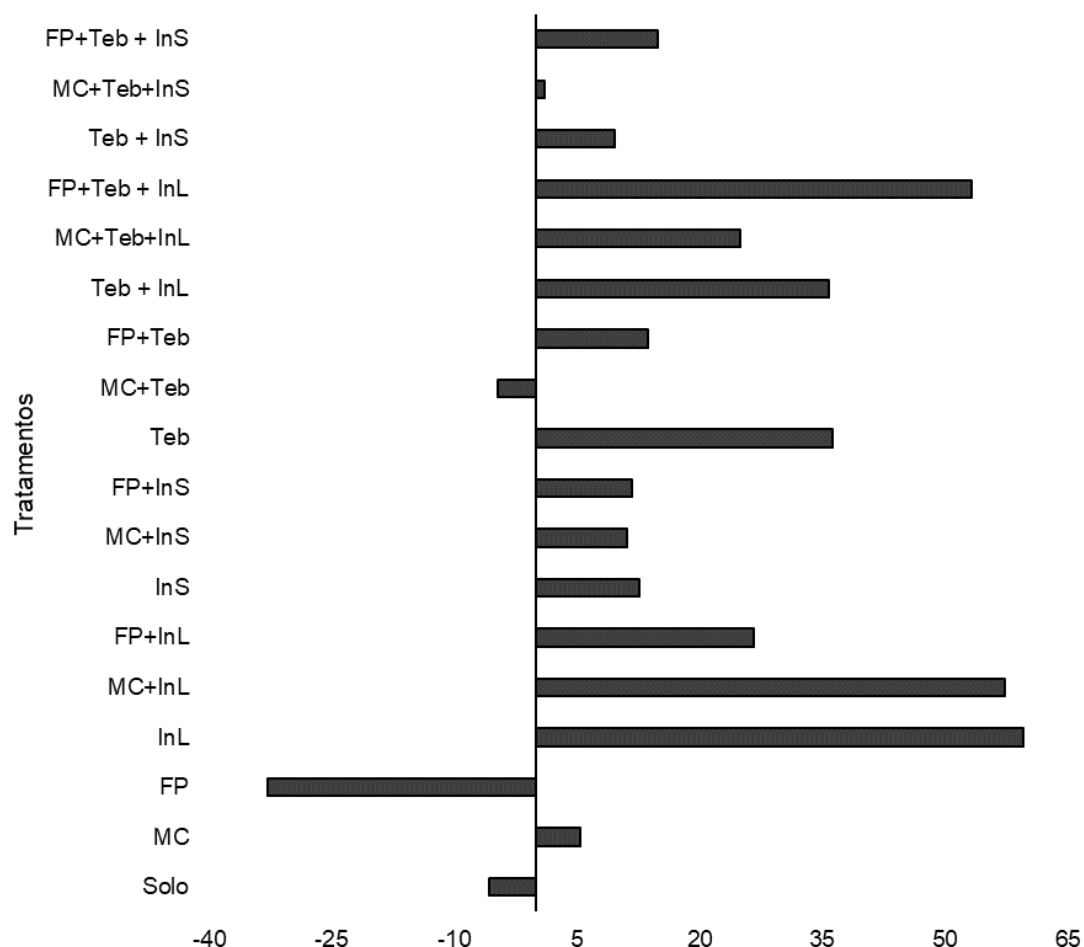


Figura 12. Variação do índice de germinação de *L. sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade nas diferentes amostras de solo entre os tempos inicial (0 DAS) e final (70 DAS), em %. (Fonte: Própria autora).

Legenda = CN: Controle Negativo; MC: Mucuna-cinza; FP: Feijão-de-porco; InL: Inoculante Líquido; InS: Inoculante Sólido; Teb: Tebuthiuron.

Seja pela decorrência da molécula original ou compostos intermediários da degradação do herbicida, em 70 DAS ocorreu um aumento na ecotoxicidade nas amostras de solo com tebuthiuron (Figura 9). Ferreira *et al.* (2021) também notaram que o desenvolvimento do organismo-teste obteve um bom desempenho em ensaios semelhantes e que a biodegradação de tebuthiuron teve um impacto positivo na germinação e o crescimento primário das plântulas de *L. sativa*. Logo, se a ecotoxicidade aumentou, este resultado pode ser indícios da presença desta molécula e/ou de seus compostos gerados pela sua degradação.

Avaliando outros fatores, os tratamentos com aplicação de inoculante líquido demonstraram diminuição da ecotoxicidade (Figura 10). Destaca-se também as amostras de solo em atenuação natural nos tempos iniciais, cujo índice de germinação foi superior. Conforme Sarapirom *et al.* (2022), este maior valor pode ter acontecido por duas razões: disponibilidade de fonte de carbono emancipado pelo herbicida e potencial de adaptação da microbiota indígena. Neste sentido, quando acontece a aplicação de um herbicida no solo, há um intervalo de tempo em que pode ocorrer a seleção de microrganismos pelo enriquecimento do meio com uma fonte de carbono assimilável à microbiota capaz de degradar esta molécula (PIRES *et al.*, 2005).

Ainda na Figura 10, o solo cultivado com *M. pruriens* demonstrou menor toxicidade nos bioensaios provavelmente devido a capacidade da planta em tolerar tebuthiuron. Assim, em associação com o inoculante líquido, a amostra de solo com o herbicida pode ter gerado um efeito ainda mais positivo na diminuição do seu potencial ecotoxicológico.

Além disso, foi avaliada a variação do índice de germinação de *L. sativa* nas diferentes amostras de solo entre o tempo inicial e após 70 DAS (Figura 12). Observando estes resultados, nota-se que os bioensaios de ecotoxicidade foram eficientes ferramentas de análise, pois o potencial da semente germinar em condição de estresse foi uma evidência de seu grau de tolerância a contaminantes, uma vez que a germinação é uma fase fisiológica grandemente influenciada por compostos tóxicos presentes no solo, corroborando com PERALTA *et al.*, 2001; RAIMONDO *et al.*, 2020?.

Na Figura 12, a redução do índice de germinação da amostra testemunha (Solo) possivelmente aconteceu por fatores alheios a contaminação com tebuthiuron, como por exemplo a redução da fertilidade pela lixiviação de nutrientes ocasionada pela irrigação durante o período.

Em relação à análise de variância do índice de germinação apresentado na Tabela 3. No tempo inicial (0 DAS), os tratamentos sem tebuthiuron obtiveram menor ecotoxicidade devido à molécula do herbicida ser considerada tóxica. Porém, no final do experimento (70 DAS) é possível observar o aumento no índice de germinação de *L. sativa*, demonstrando que as ações fitorremediadoras podem demorar um tempo para começar e permitem a redução do potencial ecotoxicológico do tebuthiuron no solo. Este resultado está

de acordo com Ferreira *et al.* (2021), cujo estudo também revelou que a presença isolada do herbicida no solo proporcionou maior toxicidade para a *L. sativa* no início e houve a redução deste parâmetro no decorrer dos dias de avaliação.

Tabela 3. Análise de variância do índice de germinação de *L. sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade nas diferentes amostras de solo nos tempos 0, 40 e 70 DAS.

Tratamentos	0 DAS		40 DAS		70 DAS	
CP	0,00	d	0,00	d	0,00	d
CN	1,00	c	1,00	c	1,00	bc
Controle	1,33	a	1,45	ab	1,25	abc
MC			1,56	ab	1,40	ab
FP			1,17	bc	0,89	c
InL	0,96	c	1,72	a	1,53	a
InL + MC			1,54	ab	1,51	a
InL + FP			1,45	ab	1,22	abc
InS	1,16	b	1,30	abc	1,31	abc
InS + MC			1,33	abc	1,29	abc
InS + FP			1,34	abc	1,30	abc
Teb	1,07	bc	1,37	abc	1,46	ab
Teb + MC			1,46	ab	1,10	bc
Teb + FP			1,16	bc	1,22	abc
Teb + InL	1,00	c	1,49	ab	1,37	abc
Teb + InL + MC			1,67	a	1,26	abc
Teb + InL + FP			1,34	abc	1,54	a
Teb + InS	1,10	bc	1,34	abc	1,20	abc
Teb + InS + MC			1,49	ab	1,10	bc
Teb + InS + FP			1,36	abc	1,26	abc

Legenda = CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo; MC: Mucuna-cinza; FP: Feijão-de-porco; InL: Inoculante Líquido; InS: Inoculante Sólido; Teb: Tebuthiuron. As letras minúsculas representam as diferenças estatísticas entre linhas e letras iguais não tem diferença estatística. Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Além disso, foi possível observar que a aplicação de inoculante líquido no solo promoveu menores potenciais ecotoxicológicos nas amostras de solo após 40 e 70 DAS (Tabela 3), o que concorda com o resultado que Lara-Moreno *et al.* (2022). Estes autores analisaram a eficiência da bioaugmentação com bactérias após a aplicação do herbicida trifluralina e seus resultados demonstraram uma toxicidade aguda inicialmente no solo, cujo potencial de toxicidade reduziu conforme o tempo do tratamento. Segundo Villaverde *et al.* (2018), solos agrícolas, quando demonstram grande diversidade na comunidade microbiana, permitem um maior potencial metabólico e, conseqüentemente, menor ecotoxicidade.

6. CONCLUSÕES

No tempo inicial, as amostras de solo sem tebuthiuron reportaram menor ecotoxicidade. Entretanto, a presença deste herbicida prejudicou o desenvolvimento do organismo-teste (*L. sativa*) nos bioensaios.

Após 40 e 70 DAS, as amostras com menor potencial ecotoxicológico foram aquelas que continham inoculante líquido, relevando que a sua aplicação possuiu impacto positivo no tratamento biológico do solo com tebuthiuron, entretanto, a aplicação do inoculante sólido não demonstrou resultados positivos para os bioensaios de ecotoxicidade.

Finalmente, a associação entre o inoculante líquido com o cultivo de *Mucuna pruriens* resultou em excelentes resultados na diminuição do potencial ecotoxicológico das amostras de solo com o herbicida tebuthiuron.

7. REFERÊNCIAS

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos**. NBR 10006. Rio de Janeiro. ABNT, 2004.

AGROFIT - PROVENTIS LIFESCIENCE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS Ltda. Bula_AGROFIT_Combine 500 SC_2019_12; Registrado no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA sob nº 718701.

ALISI, C.; MUSELLA, R.; TASSO, F.; UBALDI, C.; MANZO, S.; CREMISINI, C.; SPROCATI, A. R. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. **Science of the Total Environment**, n.407, p.3024–3032, 2009.

ALMEIDA, F. F. **Biorremediação anaeróbia de sedimento de manguezal contaminado por fenantreno**. 2022. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

BERGMANN, G. E. Impacts of pesticide pollution on soil microbial communities, ecosystem function and human health. **Reference Module In Earth Systems and Environmental Sciences**, p.1-12, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11269-2>.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxico Fitosanitário**. 2020. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 16 maio 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxico Fitossanitário**. 2020. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22 de ago. 2020.

CALDARELLI, C. E.; PERDIGÃO, C. A agroindústria canavieira e seus impactos socioeconômicos na Região Centro-sul do Brasil. **Revista Brasileira de Estudos Regionais e Urbanos**, v. 12, n. 1, p. 35-50, 2018.

CARDOSO, E. J. B. N.; ALVES, P. R. Soil ecotoxicology. In: GHOSIA, B. (org.). **Ecotoxicology**. InTech, 2013. p. 27-50. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/ecotoxicology/soil-ecotoxicology>. Acesso em: 17 maio. 2022.

CHEN, S.; LI, Y.; FAN, Z.; LIU, F.; LIU, H.; WANG, L.; WU, H. Soil bacterial community dynamics following bioaugmentation with *Paenarthrobacter* sp. W11 in atrazine-contaminated soil. **Chemosphere**, p. 130976, 2021.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**, v. 3, p. 9-34, 2008.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. ACOMPANHAMENTO DA SAFRA BRASILEIRA. COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO, v. 8, Safra 2022/23, n.2 – Segundo levantamento, 2023.

CORIOLO, A. C. F.; MORAIS FILHO, M. C. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **Holos**, v. 7, p.133-133, 12 nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2016.4278>.

COUTINHO C. F. B.; TANIMOTO S. T.; GALLI A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; DO AMARAAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 15, 2005.

COUTINHO, P. W. R.; CADORIN, D. A.; NORETO, L. M.; GONÇALVES JR, A. C. Alternativas de remediação e descontaminação de solos–biorremediação fitorremediação. **Nucleus**, v. 12, n. 1, p. 59-68, 2015.

DE MATOS, G. P.; ZAGONEL, J. T. TRATAMENTO AERÓBIO DE ESGOTO EMPREGANDO A TÉCNICA DE BIOAUMENTAÇÃO: Tratamento aeróbio de esgoto por bioaumentação. **Revista Acta Ambiental Catarinense**, v. 18, n. 1, p. 105-115, 2021.

DE MELLO, Antônio José Plácido. **Fitorremediação em Solos Contaminados com Herbicidas**. Editora Appris, 2021.

DEMICHELI, F. N. **Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (N-(fosfonometil)glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras do Sul, PR**. Dissertação

(Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável), Universidade Federal da Fronteira Sul, 2016.

FARIA, M. A.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D.; FERREIRA, L. C.; VIANA, R. S.; PRADO, E. P.; BONINI, C. S. B.; TOMAZ, R. S. Vinasse and tebuthiuron application to sugarcane soil and its effects on bacterial community and ecotoxicity after natural attenuation. **International Journal of Development Research**, v. 9, p. 28898-28904, 2019.

FASANELLA, C. C.; CARDOSO, E. J. B. N. **Biorremediação**. In: ANDREOTE F. D.; CARDOSO E. J. B. N. (Org.). Microbiologia do Solo. 2ed. Piracicaba: ESALQ, v. 1, p. 197-210, 2016.

FERREIRA, L. C.; MOREIRA, B. R. A.; MONTAGNOLLI, R. N.; PRADO, E. P.; VIANA, R. S.; TOMAZ, R. S.; CRUZ, J. M.; BIDOIA, E. D.; FRIAS, Y. A.; LOPES, P. R. M. Green manure species for phytoremediation of soil with tebuthiuron and vinasse. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 613642, 2021.

FRANCISCO, W. C.; QUEIROZ, T. M. Biorremediação. **Nucleus**, v. 15, n. 1, 2018.

FRANCO-BERNARDES, M. F.; MASCHIO, L. R.; AZEREDO-OLIVEIRA, M. T. V.; ALMEIDA, E. A. Biochemical and genotoxic effects of a commercial formulation of the herbicide tebuthiuron in *Oreochromis niloticus* of different sizes. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 9, n. 1, p. 59-67, 2014.

GARCIA, Fernando Henrique Silva. **Alterações fisiológicas na cana-de-açúcar causadas pela colonização por Leifsonia xyli subsp. xyli**. 2019. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GONÇALVES, V. D.; COELHO, M. F. B.; CAMILI, E. C. Bioensaios em sementes de *Lactuca sativa* L. com extrato de folhas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Revista Internacional de Ciências**, v. 6, n. 2, p. 160-170, 2016.

HERNANDEZ-VALENCIA, I.; MAGER, D. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. **Biagro**, v.3, n.15, p. 149-155, 2003.

IBAMA - Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins**. Brasília: IBAMA, p. 180, 2019.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins. Brasília-DF: IBAMA, p.180, 2009. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/sophia/cnia/livros/ManualparaRequerimentodeAvaliacaoAmbiental.pdf>>. Acesso em: 15 ago. 2020.

IBAMA – INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**. 2019. Disponível em: <https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 09 ago. 2021.

IEA - Instituto de Economia Agrícola. **Cana-de-açúcar: produção e processamento em 2019**. 2019. Disponível em: <http://www.iesa.gov.br/ftpiea/AIA/AIA-14-2020.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2019.

JERÔNIMO, C. E. M.; FERNANDES, H. G.; MELO, H. N. S.; SOUSA, J. F. Bioaugmentação para degradação de efluentes do processamento da castanha de caju - Bioaccumulation effluent degradation for the processing of cashew nuts. **HOLOS**, v. 28, n. 3, p. 47, 2012.

KARAS, P. A.; PERRUCHON, C.; KARANASIOS, E.; PAPADOPOULOU, E. S.; MANTHOU, E.; SITRA, S.; EHALIOTIS, C.; KARPOUZAS, D. G. Integrated biodepuration of pesticide-contaminated wastewaters from the fruit-packaging industry using biobeds: bioaugmentation, risk assessment and optimized management. **Journal of hazardous materials**, v. 320, p. 635-644, 2016.

KÖPPEN, W. **Climatologia**: conunestudio de los climas de latierra. México: Fondo de Cultura Econômica, p. 479, 1948.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 37-56, 1987.

LARA-MORENO, A.; MORILLO, E.; MERCHÁN, F.; MADRID, F.; VILLAVARDE, J. Bioremediation of a trifluralin contaminated soil using bioaugmentation with novel isolated bacterial strains and cyclodextrin. **Science of The Total Environment**, v. 840, p. 156695, 2022.

LIMA, R. M. **Avaliação da radiação UVC, processos UV/H₂O₂ e Foto-fenton na degradação do agrotóxico clorpirifós com acompanhamento da ecotoxicidade**. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental),

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2017.

LORENZI, H. **Manual de identificação e controle de plantas daninhas:** plantio direto e convencional. 7 ed. Nova Odessa: Ed. Plantarum. 384 p. 2014.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2008.

MANNARELLI FILHO, T.; DONADON, F. A. B.; PIGATTO, G. A. S.; QUEIRÓZ T. R.; BAPTISTA R. D. Responsabilidade social, sustentabilidade e inovação no setor sucroenergético brasileiro: Tendências e perspectivas. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 4, p. e32610414317-e32610414317, 2021.

MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento). Regras para análise de sementes. 1ª edição. Brasília: Mapa/ACS, 2009.

MARQUES, L. Colheita da cana crua e os ataques de cigarrinha-da-raiz. **AGRO BAYER BRASIL**, São Paulo: [s.n.], 2019. Disponível em: <https://www.agro.bayer.com.br/noticias/news-bucket/2019/01/03/18/22/colheita-canacrua>. Acesso em: 02 maio 2019.

MELO, C. A. D.; SOUZA, W. M. D.; CARVALHO, F. P. D.; MASSENSINI, A. M.; SILVA, A. A. D.; FERREIRA, L. R.; COSTA, M. D. Microbial activity of soil with sulfentrazone associated with phytoremediator species and inoculation with a bacterial consortium. **Bragantia**, v. 75 n. 2, p. 300-310. 2017.

PALÁCIO, S. M.; RICHTER, L. M.; ZENATTI, D. C.; TOMIMITSU, T. A. B.; NOGUEIRA, D. A. Degradação de resíduos orgânicos provenientes da suinocultura empregando o processo de bioaugmentação. **Engevista**, v. 14, n. 2, 2012.

PERALTA, J.; GARDEA-TORRESDEY, J.; TIEMANN, K.; GOMEZ, E.; ARTEAGA, S.; RASCON, E.; PARSONS, J. 2001. Uptake and effects of five heavy metals on seed germination and plant growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** 66 (6), 727–734. <https://doi.org/10.1007/s00128-001-0069-z>.

PIRES, F. R.; OLIVEIRA PROCÓPIO, S. D.; BARBOSA DOS SANTOS, J.; SOUZA, C. M. D.; AND DIAS, R. R. (2008). Phytoremediation evaluation of tebuthiuron using *Crotalaria juncea* as an indicator plant (Avaliação da fitorremediação de tebuthiuron utilizando *Crotalaria juncea* como planta

indicadora). **Rev. Ciênc. Agron.** 39, 245–250.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; CECOM, P. R.; SANTOS, J. B.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebutiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 627-634, 2005.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M. T.; LIMA, L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of environmental management**, v. 241, p. 156-166, 2019.

QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M. T.; LIMA, L. C. P. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of environmental management**, v. 241, p. 156-166, 2019.

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Disponível em: <https://www.R-project.org/>.

RAIMONDO, E. E.; SAEZ, J. M.; APARICIO, J. D.; FUENTES, M. S.; BENIMELI, C. S. Bioremediation of lindane-contaminated soils by combining of bioaugmentation and biostimulation: Effective scaling-up from microcosms to mesocosms. **Journal of Environmental Management**, v. 276, p. 111309, 2020.

RODRIGUES, M. N.; ALMEIDA, F. S. Tebutiuron e Hexazinona. In: (Ed.). **GUIA de herbicidas**. Londrina: IAPAR. p. 102-697, 2011.

SANTOS, A. S.; MORENO, T. F., CAVALCANTE, L. C. V.; AMORIM, E. L. C.; COELHO D. G. Estudo do processo de biorremediação em solos impactados por derramamento de petróleo. **Diversitas Journal**, v. 6, n. 1, p. 823-835, 2021.

SANTOS, H. G.; JOCOMINE, P. K. T.; ANJOS, L. H. C.; OLIVEIRA, V. A.; LUMBREARAS, J. F.; COELHO, M. R.; ALMEIDA, J. A.; FILHO, J. C. A.; OLIVEIRA, J. B.; CUNHA, T. J. F. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 5.ed. rev. ampli. Rio de Janeiro: Embrapa. 531 p., 2018.

SARAPIROM, P.; WIRIYAAMPAIWONG, P.; RUEANGSAN, K.; PLANGKLANG, P.; TEERAKUN, M. The combination technique of bioaugmentation and phytoremediation on the degradation of paraquat in contaminated soil. **Asia-**

Pacific Journal of Science and Technology, v. 27, Issue: 03. Article ID.: APST-27-03-12, 2022.

SILVA JR., A. C.; GONÇALVES, C. G.; QUEIROZ, J. R. G.; MARTINS, D. Evaluation of leaching potential of tebuthiuron using bioindicator plants. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-9, 2018.

SILVA, A. F.; CRUZ, C.; NETO, A. N.; PITELLI, R. A. Ecotoxicidade de herbicidas para a macrófita aquática (*Azolla caroliniana*). **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 541-546, 2012.

SILVA, S. D. A. Introdução e Importância Econômica da Cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul. In: SILVA, S. D. A.; MONTERO, C. R. S.; SANTOS, R. C.; NAVA, D. NASCIMENTO E.; GOMES, C. B.; ALMEIDA, I. R. (Ed.). **Sistema de produção de cana-de-açúcar no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2016. 247 p. (Embrapa Clima Temperado. Sistemas de produção, 23.).

SILVA, T.; HANSTED, F.; TONELLO, P. S.; GOVEIA, D. Fitorremediação de solos contaminados com metais: Panorama atual e perspectivas de uso de espécies florestais. **Revista Virtual de Química**, v. 11, n. 1, p. 18-34, 2019.

SINDIVEG - Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Vegetal. **Sobre Defensivos**. 2018. Disponível em: <https://sindiveg.org.br/sobre-defensivos>. Acesso em: 09 ago. 2021.

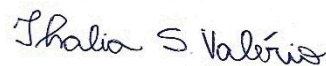
SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: MORALES, G. C. (ed). **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: standerización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. Mexico: IMTA, p. 71-79, 2004.

SOUZA, L. A. D.; ANDRADE, S. A. L. D.; SOUZA, S. C. R. D.; SCHIAVINATO, M. A. Tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 35, n. 3, p. 1441-1451, 2011.

STELIGA, T.; KLUK, D. Application of *Festuca arundinacea* in phytoremediation of soils contaminated with Pb, Ni, Cd and petroleum hydrocarbons. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 194, p. 110409, 2020.

- STRAPAZZON, A. **Silagem de cana-de-açúcar: revisão de literatura**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade Federal da Fronteira Sul, Realeza, 2022.
- SZAJA, A; LAGÓD, G; JAROMIN-GLÉN, K; MONTUSIEWICZ, A. The effect of bioaugmentation with archaea on the oxygen uptake rate in a sequencing batch reactor. **Water**, v. 10, n. 5, p. 1-11, 2018.
- TYAGI, M.; FONSECA, M. M. R.; CARVALHO, C. C. C. R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, n. 2, p. 231-241, 2011.
- UNICA - União da agroindústria canavieira de São Paulo. 2019. Disponível em <https://www.unica.com.br>. Acesso em 09 de ago. 2021.
- VILLAYERDE, J.; RUBIO-BELLIDO, M.; MERCHAN, F.; MORILLO, E. Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. **Journal of Environmental Management**, London, v. 188, p. 379-386, 2018.
- ZORTÉA, T.; SEGAT, J. C.; MACCARI, A. P.; SOUSA, J. P.; SILVA, A. S.; BARETTA, D. Toxicity of four veterinary pharmaceuticals on the survival and reproduction of *Folsomia candida* in tropical soils. **Chemosphere**, v. 173, p. 460-465, 2017.

Dracena, 27 de junho de 2023.



Thalia Silva Valério
(aluna)



Paulo Renato Matos Lopes
(orientador)