

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

FERNANDA OLIVA PINTUCCI

Potencial da utilização do biochar de cana-de-açúcar na remediação de solos
contaminados por agrotóxicos: sorção, dessorção e efeitos na comunidade
bacteriana

São Carlos
2025

FERNANDA OLIVA PINTUCCI

Potencial da utilização do biochar de cana-de-açúcar na remediação de solos
contaminados por agrotóxicos: sorção, dessorção e efeitos na comunidade
bacteriana

Monografia apresentada ao Curso de
Engenharia Ambiental, da Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Engenheira Ambiental.

Orientador: Dr. Thandy Junio da Silva Pinto

São Carlos

2025

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

0659p Oliva Pintucci, Fernanda
 Potencial da utilização do biochar de
cana-de-açúcar na remediação de solos contaminados por
agrotóxicos: sorção, dessorção e efeitos na comunidade
bacteriana / Fernanda Oliva Pintucci; orientador Thandy
Junio da Silva Pinto. São Carlos, 2025.

Monografia (Graduação em Engenharia Ambiental) --
Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de
São Paulo, 2025.

1. Biochar. 2. Remediação. 3. Fipronil. 4. 2,4-D.
5. Contaminação ambiental. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato(a): **Fernanda Oliva Pintucci**

Data da Defesa: 24/10/2025

Comissão Julgadora:

Resultado:

Thandy Junio da Silva Pinto (Orientador(a))

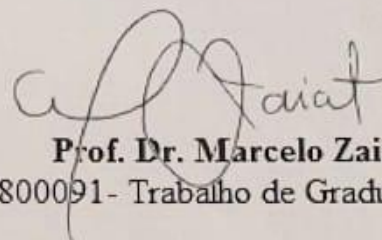
Aprovada

David Silva Alexandre

Aprovada

Mariana Amaral Dias

Aprovada



Prof. Dr. Marcelo Zaiat

Coordenador da Disciplina 1800091- Trabalho de Graduação

Ao meu pai, que me ensinou a calcular riscos e responsabilidades;

À minha mãe, que me ensinou a multiplicar sonhos;

Aos meus avós, que me ensinaram que o céu é o limite;

E aos meus irmãos e amigos, com quem divido memórias e conquistas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, aos meus pais, Samantha e Júlio César, por apoiarem com tanto carinho e confiança a decisão de me tornar Engenheira Ambiental. Com eles, aprendi a encarar responsabilidades, cultivando resiliência e paciência ao longo do caminho. Aos meus irmãos, Giovanni e Felipe, que desde a infância me ensinaram, com leveza e afeto, o verdadeiro significado de parceria e amor. Às minhas avós, Amazilde e Odanisa, que estiveram ao meu lado com amor incondicional durante toda essa jornada, oferecendo apoio nas mais diversas formas e ensinando, com gestos simples, o valor do cuidado. Ao meu avô, Lourival (*in memoriam*), que, mesmo ausente fisicamente, esteve comigo em cada momento, especialmente nos momentos de alegria – sua essência continuou viva em mim.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Thandy Junio da Silva Pinto, da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC), por acreditar no meu potencial e por sua orientação paciente e dedicada ao longo deste trabalho. Os aprendizados teóricos e práticos compartilhados ao longo de três anos foram essenciais para a minha formação profissional. Mais do que conhecimentos técnicos, me ensinou a cultivar paciência e a acreditar na possibilidade de voar alto. Agradeço, também, ao Professor Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, da Escola de Engenharia de São Carlos, por seu fundamental apoio, que tornou possível que minha pesquisa — assim como a de tantos(as) outros(as) alunos(as) — saísse do papel e contribuísse, de fato, para o avanço da ciência. Ao Laboratório de Ecotoxicologia e Ecologia Aplicada (LEEA), da USP, por ter sido um espaço de crescimento técnico e humano ao longo desses anos. Agradeço pelas conversas enriquecedoras, pelos aprendizados diários — dentro e fora do laboratório — e pela convivência com uma equipe muito acolhedora. À Professora Dra. Luciana Migliore, da *Università degli Studi di Roma Tor Vergata* (UNIROMA), e a toda a equipe do laboratório, pelo acolhimento em outro país e pelo compartilhamento de conhecimentos que enriqueceram significativamente esta pesquisa. Também sou grata ao Dr. Lucas Lopes Caldas, cuja companhia e incentivo foram essenciais durante meu intercâmbio: sua parceria tornou Roma ainda melhor.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo fomento à pesquisa por meio da concessão das bolsas de iniciação científica (Processos nº 2022/08941-8 e 2023/14498-2). Ao Laboratório de Química Ambiental (LQA) do Instituto de Química (IQ) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), coordenado pela Professora Dra. Cassiana Carolina Montagner, pela contribuição nas análises químicas realizadas neste trabalho.

À Sarita, minha irmã de alma e melhor amiga, que esteve presente em cada passo dessa jornada — dos momentos mais felizes aos mais desafiadores — com conselhos, apoio e torcida constante. Ao Douglas e à Júlia Leite, que caminham comigo desde a adolescência e tornaram essa trajetória mais leve, divertida e cheia de boas memórias.

Aqueles que caminharam comigo na jornada da Engenharia Ambiental, principalmente à Cecília, Yara, Maria Eduarda, Vinícius e Júlia Funicello, meu sincero agradecimento. Dividir frustrações e celebrar conquistas ao lado de pessoas tão especiais foi o que deu cor e sentido a essa caminhada. Mais do que colegas de curso, vocês se tornaram casa.

Por fim, agradeço a todos os professores do curso de Engenharia Ambiental da EESC-USP, que contribuíram para o meu crescimento acadêmico e profissional, e que seguem acreditando na ciência como instrumento de transformação. Estendo minha gratidão a todos aqueles que, de forma direta ou indireta, fizeram parte da minha trajetória - seja por uma conversa no dia a dia ou palavras de incentivo que, muitas vezes, chegaram na hora certa.

“Depois do medo, vem o mundo”
(Clarice Lispector, 1984)

RESUMO

PINTUCCI, F. O. **Potencial da utilização do biochar de cana-de-açúcar na remediação de solos contaminados por agrotóxicos:** sorção, dessorção e efeitos na comunidade bacteriana. 2025. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2025.

O uso intensivo de agrotóxicos no Brasil, como o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D, tem causado diversos impactos ambientais, incluindo a contaminação de solos e águas superficiais e subterrâneas, além da toxicidade para organismos não-alvo. Diante desse cenário, o *biochar* ou biocarvão, material carbonáceo obtido por pirólise, surge como uma alternativa promissora para mitigar esses efeitos adversos, atuando na sorção e retenção de contaminantes. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência do *biochar* na sorção e dessorção desses agrotóxicos, bem como seu potencial como barreira selante em solos contaminados e seu impacto sobre a microbiota do solo. Inicialmente, foram realizados ensaios de bancada para investigar a capacidade de sorção e dessorção do *biochar* frente ao fipronil e ao 2,4-D, utilizando diferentes concentrações dos contaminantes e proporções fixas de *biochar* (1/100 e 1/200). Os experimentos seguiram o método OECD 106 “Batch Equilibrium” e incluíram análises ecotoxicológicas com *Ceriodaphnia silvestrii* e *Eruca sativa* L., permitindo avaliar a toxicidade residual após o tratamento. Os resultados mostraram que o *biochar* foi eficaz na sorção de ambos os agrotóxicos, reduzindo sua toxicidade para organismos bioindicadores e promovendo melhores índices de germinação e crescimento vegetal, ainda que em concentrações mais elevadas os efeitos benéficos tenham sido menos expressivos. Em uma segunda etapa, foram montadas 18 unidades experimentais simulando colunas de solo para testar a eficácia do *biochar* como camada selante, prevenindo a percolação de contaminantes para camadas mais profundas e águas subterrâneas. Os tratamentos incluíram solo contaminado e não contaminado, com ou sem adição de *biochar*. A eficiência foi avaliada por meio de bioensaios com *Proisotoma minuta* em solo e com *C. silvestrii* e espécies vegetais (*Allium cepa* e *E. sativa* L.) na água percolada. Os resultados reforçaram o potencial do *biochar* em reter os contaminantes no solo e minimizar seus efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos e terrestres, demonstrando seu uso viável como ferramenta de remediação ambiental. Por fim, foi investigado o impacto do *biochar* na microbiota do solo, por meio da extração de DNA metagenômico e análise de sequenciamento de nova geração. Foram comparadas amostras de solo natural e solo com adição de 3% de *biochar*. Embora não tenham sido observadas diferenças significativas na diversidade global da comunidade bacteriana, notou-se a ausência

de algumas famílias em solos com *biochar* e o aumento de outras, indicando que o *biochar* pode influenciar seletivamente a composição microbiana edáfica. Em conjunto, os resultados deste estudo evidenciam que o biochar é uma ferramenta viável para a remediação de solos contaminados por agrotóxicos, contribuindo para a redução da toxicidade ambiental, proteção da biodiversidade e promoção de práticas agrícolas mais sustentáveis. Além disso, seu uso pode representar uma solução complementar para minimizar o risco de contaminação da água subterrânea, mantendo a integridade dos ecossistemas e estimulando o uso de tecnologias limpas e inovadoras no manejo agrícola.

Palavras-chave: Biochar. Remediação. Fipronil. 2,4-D. Contaminação ambiental.

ABSTRACT

PINTUCCI, F. O. **Potential of sugarcane biochar in the remediation of soils contaminated with pesticides:** sorption, desorption, and effects on the bacterial community. 2025. Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2024.

The intensive use of pesticides in Brazil, such as the insecticide fipronil and the herbicide 2,4-D, has caused numerous environmental impacts, including the contamination of soil and surface and groundwater, as well as toxicity to non-target organisms. In this context, biochar - a carbon-rich material obtained through pyrolysis—emerges as a promising alternative to mitigate these adverse effects by adsorbing and retaining contaminants. This study aimed to evaluate the efficiency of biochar in the sorption and desorption of these pesticides, as well as its potential as a sealing barrier in contaminated soils and its impact on soil microbiota. Initially, bench-scale tests were conducted to investigate the sorption and desorption capacity of biochar to fipronil and 2,4-D, using different contaminant concentrations and fixed proportions of biochar (1/100 and 1/200). The experiments followed the OECD 106 "Batch Equilibrium" method and included ecotoxicological analyses with *Ceriodaphnia silvestrii* and *Eruca sativa* L., allowing the assessment of residual toxicity after treatment. The results showed that biochar was effective in sorbing both pesticides, reducing their toxicity to *C. silvestrii* and promoting better germination and plant growth rates, although at higher concentrations, the beneficial effects were less pronounced. In a second phase, 18 experimental units simulating soil columns were assembled to test the efficacy of biochar as a sealing layer, preventing contaminant percolation into deeper layers and groundwater. The treatments included contaminated and uncontaminated soil, with or without the addition of biochar. Efficiency was evaluated through bioassays with *Proisotoma minuta* in soil and with *C. silvestrii* and plant species (*Allium cepa* and *E. sativa* L.) in the leachate water. The results reinforced biochar's potential to retain contaminants in the soil and minimize their toxic effects on aquatic and terrestrial organisms, demonstrating this feasible use as an environmental remediation tool. Finally, the impact of biochar on soil microbiota was investigated through metagenomic DNA extraction and next-generation sequencing analysis. Soil samples with and without 3% biochar addition were compared. Although no significant differences were observed in the overall bacterial community diversity, the absence of some bacterial families and the increase of others in biochar-amended soils indicated that biochar may selectively influence microbial composition. Taken together, the results of this study demonstrate that biochar is a viable tool for the remediation of pesticide-

contaminated soils, contributing to the reduction of environmental toxicity, protection of biodiversity, and promotion of more sustainable agricultural practices. Furthermore, its use may represent a complementary solution to minimize the risk of groundwater contamination, maintain ecosystem integrity, and encourage the use of clean and innovative technologies in agricultural management.

Keywords: Biochar. Remediation. Fipronil. 2,4-D. Environmental contamination.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental e da sequência metodológica adotada..... | 30 |
| Figura 2 - Representação esquemática dos testes de sorção e dessorção com o inseticida fipronil | 31 |
| Figura 3 - Representação esquemática dos testes de sorção e dessorção com o herbicida 2,4-D | 33 |
| Figura 4 - Desenho esquemático dos modelos da unidade experimental. Cada tratamento foi composto por três réplicas, totalizando 18 unidades | 34 |
| Figura 5 - Desenvolvimento das unidades experimentais, com destaque para (a) os tubos, o fundo usado para a retenção da água e a rede usada para a retenção do solo; (b) as unidades montadas sem a adição do solo (c) e após a adição e (d) as unidades dispostas para condicionamento do <i>biochar</i> | 35 |
| Figura 6 - Testes de toxicidade aguda com a espécie <i>C. silvestrii</i> . As imagens apresentam (a) a montagem do teste de toxicidade aguda com a espécie <i>C. silvestrii</i> e (b) o encerramento do teste | 37 |
| Figura 7 - Teste de germinação com a espécie <i>E. sativa</i> , com destaque para (a) a disposição das sementes sobre o papel filtro e adição das amostras (b) organização das réplicas e (c) encerramento do teste com contagem das sementes germinadas e marcação das extremidades | 38 |
| Figura 8 - Montagem do teste de toxicidade com as espécies <i>P. minuta</i> , <i>A. cepa</i> e <i>E. sativa</i> . As figuras retratam (a) as unidades do teste com a <i>P. minuta</i> ; (b) a pesagem do solo e (c) as unidades prontas com as devidas condições para germinação e crescimento | 39 |
| Figura 9 – Tratamentos preparados para análise: solo (controle) e solo com <i>biochar</i> | 41 |
| Figura 10 - (a) Quantificação do DNA após a extração, realizada com o equipamento Nanodrop Lite, (b) preparação do Master Mix para PCR, (c) execução da PCR para posterior purificação do DNA, e (d) utilização do equipamento Hoefer para análise dos resultados da PCR..... | 42 |
| Figura 11 - Percentual de organismos móveis da espécie <i>C. silvestrii</i> para o teste de sorção com 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a), 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b) e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. “S/ <i>biochar</i> ” representam os tratamentos mantendo apenas o inseticida, sem o <i>biochar</i> | 44 |
| Figura 12 - Percentual de organismos móveis da espécie <i>C. silvestrii</i> para o teste de dessorção com 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a), 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b) e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem <i>biochar</i> | 46 |

| | |
|---|----|
| Figura 13 - Percentual de germinação das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem biochar | 47 |
| Figura 14 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem <i>biochar</i> | 48 |
| Figura 15 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem biochar | 49 |
| Figura 16 - Percentual de germinação das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação..... | 50 |
| Figura 17 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação | 51 |
| Figura 18 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L ⁻¹ (a), 2 mg L ⁻¹ (b) e 4 mg L ⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação..... | 52 |
| Figura 19 - Taxa de germinação (percentual) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem <i>biochar</i> (letras maiúsculas) e com a camada selante de <i>biochar</i> (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de <i>biochar</i> | 59 |
| Figura 20 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem <i>biochar</i> (letras maiúsculas) e com a camada selante de <i>biochar</i> (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de <i>biochar</i> | 61 |
| Figura 21 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de <i>E. sativa</i> após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem <i>biochar</i> (letras maiúsculas) e com a camada selante de <i>biochar</i> (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de <i>biochar</i> | 62 |
| Figura 22 - Sobrevivência (%) da <i>P. minuta</i> após 28 dias de exposição ao solo oriundo dos experimentos com fipronil. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento em diferentes posições (superior ou fundo) | 63 |

| | |
|--|----|
| Figura 23 - Reprodução (%) da espécie <i>P. minuta</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas) ... | 64 |
| Figura 24 - Taxa de germinação (%) da espécie <i>E. sativa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas) | 66 |
| Figura 25 - Taxa de germinação (%) da espécie <i>A. cepa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas) | 67 |
| Figura 26 - Crescimento da parte aérea (cm) da espécie <i>A. cepa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento em diferentes posições (superior ou fundo)..... | 68 |
| Figura 27 - Crescimento da raiz (cm) da espécie <i>A. cepa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas) | 70 |
| Figura 28 - Biomassa fresca (g) da espécie <i>A. cepa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas) ... | 71 |
| Figura 29 - Biomassa seca (g) da espécie <i>A. cepa</i> . Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)..... | 72 |
| Figura 30 - Dendrograma de Bray–Curtis da comunidade bacteriana nos solos controle (C) e tratado com <i>biochar</i> (B) | 75 |
| Figura 31 - Abundância relativa das comunidades encontradas nos tratamentos Controle e <i>Biochar</i> | 79 |
| Figura 32 - Diferenças relativas entre famílias ou gêneros identificados no solo controle (C) e no solo tratado com <i>biochar</i> (B). (*) representa diferença significativa em relação ao controle | 80 |
| Figura 33 - Variação percentual (%) na abundância bacteriana no solo tratado com <i>biochar</i> (B) em relação ao solo controle (C). Valores positivos indicam aumento e negativos, redução no tratamento B em relação ao C..... | 80 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Condições utilizadas em estudos com a aplicação de <i>biochar</i> na remediação de matrizes contaminadas..... | 27 |
| Tabela 2 - Caracterização da amostra de <i>biochar</i> usada nos experimentos propostos..... | 30 |
| Tabela 3 - Caracterização do solo usado nos experimentos propostos..... | 31 |
| Tabela 4 - Parâmetros da água após teste de sorção com o contaminante fipronil | 45 |
| Tabela 5 - Parâmetros da água após teste de dessorção com o contaminante fipronil | 46 |
| Tabela 6 - Análise química das amostras de água, provenientes da simulação de chuva, com os valores ($\mu\text{g L}^{-1}$) de 2,4-D e fipronil | 54 |
| Tabela 7 - Análise química das amostras de solo no final do experimento após a simulação das três chuvas ,com os valores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 2,4-D e fipronil | 55 |
| Tabela 8 - Porcentagem média de organismos da espécie <i>C. silvestrii</i> que apresentaram mobilidade após exposição (48 h) a amostras de água percolada nas três chuvas | 56 |
| Tabela 9 - Parâmetros da água percolada da primeira chuva pelos tratamentos com fipronil .. | 57 |
| Tabela 10 - Parâmetros da água percolada da segunda chuva pelos tratamentos com fipronil .. | 57 |
| Tabela 11 - Parâmetros da água percolada da terceira chuva pelos tratamentos com fipronil .. | 58 |
| Tabela 12 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à sobrevivência da espécie <i>P. minuta</i> | 64 |
| Tabela 13 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à reprodução da espécie <i>P. minuta</i> | 65 |
| Tabela 14 - pH analisado nas triplicatas de solo | 65 |
| Tabela 15 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à germinação da espécie <i>E. sativa</i> | 66 |
| Tabela 16 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à germinação da espécie <i>A. cepa</i> .. | 67 |
| Tabela 17 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes ao crescimento da parte aérea da espécie <i>A. cepa</i> | 69 |
| Tabela 18 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à taxa de crescimento (cm) da raiz da espécie <i>A. cepa</i> | 70 |

| | |
|--|----|
| Tabela 19 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à biomassa fresca da espécie <i>A. cepa</i> | 71 |
| Tabela 20 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à biomassa seca da espécie <i>A. cepa</i> | 72 |
| Tabela 21 - Resultados obtidos após a extração de DNA do solo, onde 'C' representa o solo natural e 'B' representa o solo exposto ao <i>biochar</i> | 73 |
| Tabela 22 - Resultados obtidos após a purificação do DNA do solo, onde 'C' representa o solo natural e 'B' representa o solo exposto ao <i>biochar</i> | 73 |
| Tabela 23 - Teste estatístico PERMANOVA, com base em Bray–Curtis | 74 |
| Tabela 24 - Índices ecológicos aplicados à fauna bacteriana no solo controle (C) e tratado com <i>biochar</i> (B) | 76 |
| Tabela 25 - Média e valor de <i>p</i> aplicados à fauna bacteriana nos solos controle (C) e tratado com <i>biochar</i> (B) | 76 |
| Tabela 26 - Soma dos valores de indivíduos nas amostras. (f) representa famílias e (g), gêneros | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| Cd | Cádmio |
| cm | Centímetro |
| Cr | Cromo |
| CTC | Capacidade de Troca Catiônica |
| Cu | Cobre |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| EESC | Escola de Engenharia de São Carlos |
| FAO | Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura |
| FAOSTAT | Banco de Dados Estatístico da FAO |
| g | Grama |
| h | Hora |
| ha | Hectares |
| i.e. | Por exemplo |
| kg | Quilograma |
| Koc | Coefficiente de Sorção do Carbono Orgânico |
| L | Litro |
| mg | Miligramas |
| min | Minuto |
| ml | Mililitros |
| mm | Milímetro |
| mmol | Milimol |
| NBR | Norma Brasileira |
| Ni | Níquel |
| pH | Potencial Hidrogeniônico |
| Pb | Chumbo |
| ppb | Partes por bilhão |
| RNA | Ácido Ribonucleico |
| rpm | Rotação por minuto |
| S | Siemens |
| USP | Universidade de São Paulo |
| Zn | Zinco |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|-----|---------------------|
| °C | Graus Celsius |
| ® | Marca registrada |
| p | Métrica estadística |
| μ | Micro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 22 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1. Objetivos específicos | 24 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 3.1. <i>Biochar</i> | 25 |
| 3.2. Agrotóxicos | 28 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 29 |
| 4.1. Materiais e reagentes | 30 |
| 4.2. Sorção e dessorção | 31 |
| 4.2.1. Testes de sorção e dessorção para fipronil | 31 |
| 4.2.2. Testes de sorção e dessorção para 2,4-D | 33 |
| 4.3. Experimentos em coluna de solo | 34 |
| 4.3.1. Contaminação do solo e procedimentos experimentais | 35 |
| 4.3.2. Testes de toxicidade com a água percolada | 36 |
| 4.3.3. Testes de toxicidade com solo | 38 |
| 4.3.4. Análises químicas dos agrotóxicos | 39 |
| 4.4. Comunidade bacteriana | 40 |
| 4.4.1. Extração do DNA | 41 |
| 4.4.2. Sequenciamento Illumina de Marcadores Bacterianos | 42 |
| 4.5. ANÁLISE DE DADOS | 42 |
| 4.5.1. Sorção e dessorção | 42 |
| 4.5.2. Experimentos em coluna de solo | 43 |
| 4.5.3. Comunidades bacterianas | 43 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 44 |
| 5.1. Sorção e Dessorção | 44 |
| 5.1.1. Respostas para <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> | 44 |
| 5.1.2. Respostas para <i>Eruca sativa</i> | 47 |
| 5.2. Experimentos em coluna de solo | 53 |
| 5.2.1. Análise Química | 53 |
| 5.2.2. Testes de toxicidade com a água percolada | 55 |
| 5.2.2.1. <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> | 55 |
| 5.2.2.2. <i>Eruca sativa</i> | 59 |

| | | |
|------------|--|----|
| 5.2.3. | Testes de toxicidade com solo | 62 |
| 5.2.3.1. | <i>Proisotoma minuta</i> | 62 |
| 5.2.3.2. | Espécies vegetais | 65 |
| 5.2.3.2.1. | Germinação | 66 |
| 5.2.3.2.2. | Crescimento e Biomassa | 68 |
| 5.3. | Comunidade bacteriana | 72 |
| 5.3.1. | Extração e purificação do DNA..... | 72 |
| 5.3.2. | Sequenciamento Illumina de Marcadores Bacterianos..... | 74 |
| 5.3.3. | Análise dos grupos mais abundantes | 77 |
| 6. | CONCLUSÃO | 83 |

1. INTRODUÇÃO

A larga aplicação de agrotóxicos com níveis de toxicidade relevantes para a saúde humana e ecossistemas e o afrouxamento das leis ambientais para a agricultura no Brasil nos últimos anos são fatores chave para que compartimentos abióticos, como a água e o solo, sejam contaminados (Rêgo *et al.*, 2020). Na última década, o uso de agrotóxicos ultrapassou 4 milhões de toneladas por ano em todo o mundo (FAO, 2020) e afetou drasticamente a qualidade do solo, da água e do ar, causando impactos indesejáveis em organismos não-alvo, incluindo humanos (Khalid *et al.*, 2020; Rani *et al.*, 2021; Varjani *et al.*, 2019). Nos sistemas de cultivo, a contaminação por agrotóxicos pode afetar negativamente a qualidade do solo e a produção agrícola, comprometendo os serviços ecossistêmicos, a ciclagem de nutrientes, a atividade enzimática, a biota do solo e a biodiversidade (Liu *et al.*, 2018; Yu *et al.*, 2019).

O Brasil ocupou o primeiro lugar em consumo de agrotóxicos no mundo em 2022, consumindo quase o dobro do segundo lugar, ocupado pelos Estados Unidos da América (FAO, 2022). Dentre os ingredientes ativos liberados para o uso no país, destacam-se o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D. O fipronil é um inseticida neurotóxico pouco solúvel em água (2,4 mg L⁻¹ em pH 5 e 2,2 mg L⁻¹ em pH 9) (Manrique *et al.*, 2009) estável em temperatura ambiente, não volátil, que possui tempo de meia-vida no solo que pode alcançar de 111 a 350 dias, dependendo das condições testadas (Gunasekara, 2007). O 2,4-D é um herbicida sistêmico cujo mecanismo de ação é a inibição do crescimento de plantas dicotiledôneas, é muito solúvel em água (29,9 mg L⁻¹ em pH 5 e 43,1 mg L⁻¹ em pH 9) (ATSDR, 2020) e em solventes orgânicos, resultando na rápida penetração através de folhas e raízes, tornando-o mais eficaz (Islam *et al.*, 2018). Além disso, o 2,4-D possui tempo de meia vida de 10 a 50 dias e é encontrado geralmente em forma aniônica (Jote, 2019).

Nesse contexto, diversos projetos e pesquisas vêm sendo elaborados na tentativa de mitigar a problemática de contaminação ambiental por agrotóxicos e diminuir os riscos ambientais (Lima *et al.*, 2022). Desse modo, destaca-se o uso do *biochar* como um potencial substrato alternativo para a remediação de solos contaminados. Segundo Ogura *et al.* (2021), o *biochar* é um material econômico e ecológico utilizado para remediação de áreas contaminadas, por conta do seu alto potencial de sorção, contribuindo para a imobilização de contaminantes orgânicos e inorgânicos devido à sua grande estrutura de poros. Além disso, o *biochar* tem potencial para melhorar a fertilidade e qualidade do solo, e para aumentar a capacidade de troca de cátions, de retenção de água, do teor de nutrientes e proporciona aumento no pH (Seabra *et*

al., 2019). Outrossim, o *biochar* é altamente recalcitrante e, desse modo, os efeitos de sua aplicação podem ser prolongados por um longo período (Fellet *et al.*, 2011).

O *biochar* produzido a partir da palha de cana-de-açúcar se apresenta como uma boa alternativa para remediação de áreas contaminadas no Brasil. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2020), a palha da cana é um dos principais resíduos de biomassa lignocelulósica gerados nas usinas brasileiras de açúcar e etanol, estimando-se entre 10 e 20 toneladas de matéria seca por hectare, anualmente. Dessa forma, a utilização do *biochar* de palha de cana-de-açúcar se mostra um processo viável do ponto de vista econômico, devido à economia circular (convertendo resíduos em produtos de valor agregado), e ambiental, atribuindo uma destinação ecológica para esse subproduto.

Diversas espécies não-alvo sofrem os efeitos adversos do aumento da ocorrência de agrotóxicos no ambiente, tal como o inseticida fipronil e o herbicida 2,4-D (Pinto *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2022; Freitas *et al.*, 2022). Desse modo, técnicas de remediação e contenção dessas substâncias diminuem os riscos para organismos nativos presentes em ambientes terrestres e aquáticos adjacentes a áreas de agricultura convencional. Portanto, essas técnicas são fundamentais para reduzir os riscos para organismos nativos em ambientes terrestres e aquáticos adjacentes a áreas de agricultura convencional.

Nesse sentido, o presente trabalho utilizou algumas espécies como bioindicadores para avaliar a efetividade do *biochar* na retenção de agrotóxicos na coluna do solo, em conjunto com análises químicas convencionais. A espécie aquática *Ceriodaphnia silvestrii* é um microcrustáceo pertencente à superordem Cladocera reconhecidamente representativo das espécies de zooplâncton de água doce e amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos para a avaliação da qualidade da água (Silva *et al.*, 2022). As espécies terrestres utilizadas foram a *Proisotoma minuta* – artrópode do solo usado na avaliação de toxicidade de substâncias químicas ao redor do mundo (Larsen *et al.*, 2009) – *Allium Cepa* (cebola) – planta monocotiledônea pertencente à família Liliaceae, amplamente utilizada como bioindicador de poluição ambiental (Rodrigues *et al.*, 2015) - e *Eruca sativa* (rúcula) – planta dicotiledônea pertencente à família Brassicaceae, tem como característica o rápido desenvolvimento vegetativo e ciclo curto (Salles *et al.*, 2017) que, por esse motivo, também é largamente usada como bioindicadora em estudos ecotoxicológicos (Ogura *et al.*, 2022).

Consoante as afirmações, o presente trabalho contribui no avanço dessas discussões ao analisar a viabilidade de aplicação do *biochar* na remediação de solos contaminados pelo inseticida fipronil e pelo herbicida 2,4-D, bem como investigar os processos de sorção e dessorção dessas substâncias. Ambos os compostos apresentam elevada toxicidade para

espécies terrestres e aquáticas, conforme evidenciado por diversos estudos (Pinto *et al.*, 2022; Triques *et al.*, 2021; Moreira *et al.*, 2020; Silva *et al.*, 2020). Além disso, buscou-se avaliar os padrões de composição e diversidade das comunidades bacterianas em solos tropicais submetidos à aplicação de *biochar*, investigando possíveis alterações ou efeitos tóxicos induzidos pelo material sobre os microrganismos edáficos, por meio de análises de expressão gênica. Nesse sentido, foram feitos estudos em diferentes níveis de ensaio de bancada, investigando a eficiência desse material carbonáceo (i) em adsorver e reduzir a toxicidade dos agrotóxicos em solução aquosa, (ii) avaliar a capacidade de retenção dos agrotóxicos em sistemas complexos de coluna de solo e (iii) investigar as implicações do uso desse material na biodiversidade bacteriana do solo, considerando sua importância na manutenção de serviços ecossistêmicos.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivo analisar a capacidade de remediação do *biochar*, produzido a partir da palha da cana-de-açúcar, atuando como uma camada selante em solos contaminados com os agrotóxicos fipronil e 2,4-D e, por meio de testes ecotoxicológicos, verificar a taxa de redução da toxicidade dessas, bem como sua eficiência nos processos de sorção e dessorção. Adicionalmente, a pesquisa buscou analisar os padrões de composição e diversidade das comunidades bacterianas em solos tropicais em resposta à aplicação do *biochar*.

2.1. Objetivos específicos

- I. Avaliar a capacidade do *biochar* em adsorver e reter agrotóxicos (fipronil e 2,4-D), por meio de testes de sorção e dessorção, utilizando *C. silvestrii* e *E. sativa* como bioindicadores de redução de toxicidade.
- II. Verificar a eficácia do *biochar* como barreira selante em colunas de solo, simulando eventos de chuva e analisando a retenção vertical dos agrotóxicos através da toxicidade da água percolada (*C. silvestrii* e *E. sativa*) e do solo (*P. minuta*, *A. cepa* e *E. sativa*).
- III. Comparar os efeitos ecotoxicológicos entre diferentes tratamentos nos modelos de coluna de solo, com base em análises químicas, biológicas e estatísticas, para avaliar a proteção de camadas profundas do solo e da água subterrânea.
- IV. Caracterizar as mudanças na comunidade bacteriana do solo após exposição ao *biochar*, utilizando sequenciamento do gene 16S rRNA e ferramentas de bioinformática (QIIME 2).

- V. Investigar possíveis efeitos tóxicos do *biochar* sobre microrganismos edáficos, por meio da análise da expressão gênica associada à toxicidade microbianas.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *Biochar*

O *biochar*, enriquecido com carbono e caracterizado por apresentar melhorias na produtividade (Kätterer *et al.*, 2022) e na sorção de poluentes (Liu *et al.*, 2023), resulta da decomposição térmica de biomassa ou material orgânico, incluindo resíduos da colheita, estrume animal, materiais e biossólidos. O processo de pirólise ocorre em altas temperaturas (entre 350 e 1200 °C) e em um ambiente limitado de oxigênio (Ogura *et al.*, 2021). Segundo Beesley *et al.* (2011) e Abbas *et al.* (2018), para aplicar o *biochar* é necessário verificar alguns aspectos importantes, como a área superficial, capacidade de troca iônica, sorção e microporosidade. Além disso, destacam-se os diferentes mecanismos envolvidos, como a precipitação, enchimento de poros, interação eletrostática e sorção. Ogura *et al.* (2021) também mencionam que há fatores críticos que determinam a eficiência de sorção do *biochar*, como a matéria-prima, temperatura de pirólise, pH da solução, dosagem de *biochar*, competição com íons coexistentes e outros contaminantes, o processo de envelhecimento e modificação/ativação.

A cultura de cana-de-açúcar vem crescendo fortemente no Brasil e em países como Índia, China e Tailândia (FAO, 2021). No Brasil, essa expansão é decorrente do aumento no consumo de etanol, associado ao elevado crescimento na demanda energética global nas últimas décadas, às políticas de estímulo ao uso do etanol como combustível e às regras de proporção obrigatória de mistura de etanol com a gasolina (Brasil, 2020). Nos últimos 50 anos (1970 a 2020), o Brasil apresentou um aumento de 79,8 para 757,1 milhões de toneladas por ano na produção de cana-de-açúcar, sendo atualmente o maior produtor mundial, seguido pela Índia e China (370,5 e 108,1 milhões de toneladas por ano, respectivamente) (FAOSTAT, 2022). Nunes (2009) afirma que existe um grande potencial de produção de cinzas a partir da queima da biomassa da cana para a produção de energia na indústria. Dessa forma, estudos que apontem soluções para o destino desse material são importantes, tais como a produção e aplicação do *biochar* para a remediação de solos.

Quanto à remediação por meio do *biochar*, a literatura tem apresentado dados satisfatórios com diferentes métodos de incorporação ao solo e água. Cuba *et al.* (2018) produziram *biochar* a partir de bagaço de cana-de-açúcar, feito a uma temperatura de 500° C,

para remoção de glifosato (0,1 g) em meio aquoso e concluíram que o uso dessa matéria prima para produção de carvão quimicamente ativado apresentou-se favorável para remoção desse agrotóxico nas condições estudadas.

Alexandre *et al.* (2023) também utilizou o *biochar* – produzido da palha da cana-de-açúcar – incorporado ao solo como alternativa de remediação para solos contaminados pelos agrotóxicos fipronil e 2,4-D, tanto individualmente como em mistura. Mediante experimentos em microcosmos conduzidos ao longo de 28 dias, a pesquisa avaliou o impacto do *biochar* nas populações da minhoca terrestre *Enchytraeus crypticus* e no crescimento da planta *E. sativa*. O *biochar* reduziu a toxicidade do fipronil, aumentando a reprodução de *E. crypticus* em 43% em comparação com o solo sem remediação. Nos solos contaminados com 2,4-D, os percentuais de germinação e o crescimento das plantas de *E. sativa* foram duas vezes maiores no tratamento remediado em comparação com aqueles não tratados. Dessa forma, os autores concluíram, também, que o *biochar* representa uma alternativa viável na redução da toxicidade de agrotóxicos por meio de incorporação no solo.

Azevedo (2016) avaliou os efeitos da adição do carvão de cana-de-açúcar sobre a persistência e adsorção/dessorção dos herbicidas clomazone e sulfentrazone em um argissolo condicionado com e sem carvão. A partir dos resultados, o autor concluiu que a adição de carvão ao solo diminuiu o tempo de meia-vida do clomazone de 139 dias para 86 dias, enquanto no ensaio com o sulfentrazone esse efeito não foi observado. Em outro experimento, a adsorção e a dessorção do clomazone em argissolo condicionado ou não com carvão de bagaço de cana-de-açúcar foram avaliadas em diferentes tempos de incubação. Com base nos resultados obtidos, o autor concluiu que, nos argissolos incubados com carvão, quanto maior o tempo de incubação, maior a capacidade de adsorção, com redução dessa capacidade após 120 dias.

Coeli *et al.* (2013) avaliaram a eficiência do *biochar* de cana-de-açúcar produzido pelo processo de pirólise rápida a 500 °C como material reativo. Para isso, foi feito um estudo de sorção competitiva com soluções polimetálicas (cadmio - Cd, cobre - Cu, cromo - Cr, níquel - Ni, chumbo - Pb e zinco - Zn), em uma faixa de concentrações de 0,1 a 0,5 mmol L⁻¹ em pH 4, 5, 6, 7 e 8. As análises de carbono orgânico total identificaram a retenção de 52% de carbono no processo de pirólise a 500 °C. Os autores concluíram que o *biochar* tem grande potencial como material adsorvente em uma barreira reativa permeável, em função dos grupos funcionais presentes, retendo boa parte dos metais, principalmente o Pb e o Cu em toda a faixa de pH testada.

A Tabela 1 apresenta as condições utilizadas nos estudos citados com a aplicação de *biochar*, de diferentes matérias-primas, na remediação de matrizes contaminadas.

Tabela 1 - Condições utilizadas em estudos com a aplicação de *biochar* na remediação de matrizes contaminadas

| Matéria prima | Matriz | Proporção | Tempo de pirólise | Substância | Autores |
|--------------------------|--------|--------------------------------|-------------------|----------------------|--------------------------------|
| Bagaço da cana de açúcar | Água | 0,1 g | 500 °C (1 h) | Glifosato | Cuba <i>et al.</i> (2018) |
| Palha da cana de açúcar | Solo | 3% w:w | 550 °C (1 h) | Fipronil e 2,4-D | Alexandre <i>et al.</i> (2023) |
| Bagaço da cana de açúcar | Solo | 5,0 g | 400 °C (6 h) | Clomazone | Azevedo (2016) |
| Bagaço da cana de açúcar | Água | 0,1 a 0,5 mmol L ⁻¹ | 500 °C (1 h) | Solução polimetálica | Coeli <i>et al.</i> (2013) |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Apesar das evidências apontarem para a eficiência do *biochar* na retenção de contaminantes e na remediação do solo, ainda existem dúvidas quanto à sua influência nas propriedades do solo, na biota existente e nos serviços ecológicos prestados. Substâncias tóxicas podem ser liberadas durante o processo de envelhecimento do *biochar*, e efeitos adversos podem se manifestar tanto de forma direta, por meio da liberação de substâncias nocivas, quanto de forma indireta, por alterações nas condições ambientais (Godlewska *et al.*, 2021). Nesse sentido, é necessário compreender sua influência sobre a biota edáfica na ausência de contaminantes.

O solo é composto por frações orgânicas e inorgânicas (rochas e minerais) e é habitado por inúmeras espécies, formando um ecossistema. Os microrganismos do solo, coletivamente chamados de microbiota, são representados por cinco grandes grupos: bactérias, fungos, actinomicetos, algas e protozoários. Essas comunidades estão intimamente ligadas às funções e serviços ecossistêmicos, incluindo o ciclo de nutrientes, a decomposição da matéria orgânica, a degradação de poluentes e a produtividade vegetal, desempenhando, portanto, um papel fundamental na manutenção da qualidade do solo (Fuhrman, 2009; Pan *et al.*, 2014; Delgado Baquerizo *et al.*, 2016; Graham *et al.*, 2016).

Embora as comunidades microbianas desempenhem um papel crucial nos ecossistemas terrestres, a compreensão de como a diversidade e a composição microbiana respondem aos sistemas agrícolas convencionais ainda é limitada. No entanto, avanços significativos foram feitos nos últimos anos, sobretudo, devido ao surgimento de tecnologias avançadas de sequenciamento genético de alta capacidade (Roesch *et al.*, 2007; Knight *et al.*, 2018). A aplicação dessas tecnologias em estudos de ecologia microbiana do solo, juntamente com ferramentas de bioinformática, permite uma caracterização detalhada da microbiota do solo, o que tem aumentado o interesse científico em compreender a complexidade da comunidade microbiana (Wagg *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2019).

3.2. Agrotóxicos

Considerando o potencial do *biochar* na remediação de solos e água, destaca-se o uso desse material para a retenção da contaminação ambiental pelos agrotóxicos fipronil – sexto inseticida mais utilizado no Brasil – e 2,4-D – segundo herbicida mais consumido no país (Pinto *et al.*, 2021). O 2,4-D é um inibidor de crescimento de plantas dicotiledôneas que foi introduzido no mercado em 1940, e o fipronil, pertencente ao grupo químico fenilpirazol, foi desenvolvido para bloquear canais de cloro regulados pelos receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA) em insetos, sendo introduzido como um substituto para inseticidas organoclorados e organofosforados (Pinto *et al.*, 2021).

Além da contaminação do solo e das águas superficiais e subterrâneas, os agrotóxicos presentes em tais matrizes podem provocar efeitos tóxicos aos organismos existentes. Gripp (2015) fez experimentos expondo girinos da espécie *Eupemphix nattereri* a concentrações (35,0; 120,0 e 180,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) conhecidas de fipronil e de seus produtos de degradação fipronil sulfona e fipronil sulfeto. Os autores verificaram que o fipronil provocou estresse oxidativo nos girinos, uma vez que foram observadas alterações na atividade enzimática da catalase e houve peroxidação lipídica após os experimentos, em todas as três concentrações estudadas. O fipronil sulfona também provocou estresse oxidativo nos organismos, pelo fato de ter aumentado o nível da peroxidação lipídica em duas das concentrações estudadas. Por outro lado, o fipronil sulfeto se mostrou o menos agressivo para os girinos estudados, uma vez que somente em sua maior concentração houve aumento da atividade das enzimas antioxidantes catalase e glicose 6-fosfato desidrogenase. Tais resultados apontam que, apesar de o fipronil se degradar ao longo do tempo no ambiente, os metabólitos gerados continuam apresentando riscos às espécies expostas.

Provase (2022) verificou a genotoxicidade do fipronil a duas concentrações estimadas em campo no cérebro de abelhas operárias da espécie *Bombus atratus*. Os resultados mostraram que os valores médios obtidos para índice e frequência de danos apresentaram diferenças notáveis entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Além disso, ao analisar o dano total, observou-se que a concentração de 3,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ induziu efeitos genotóxicos significativos ao cérebro dessas abelhas.

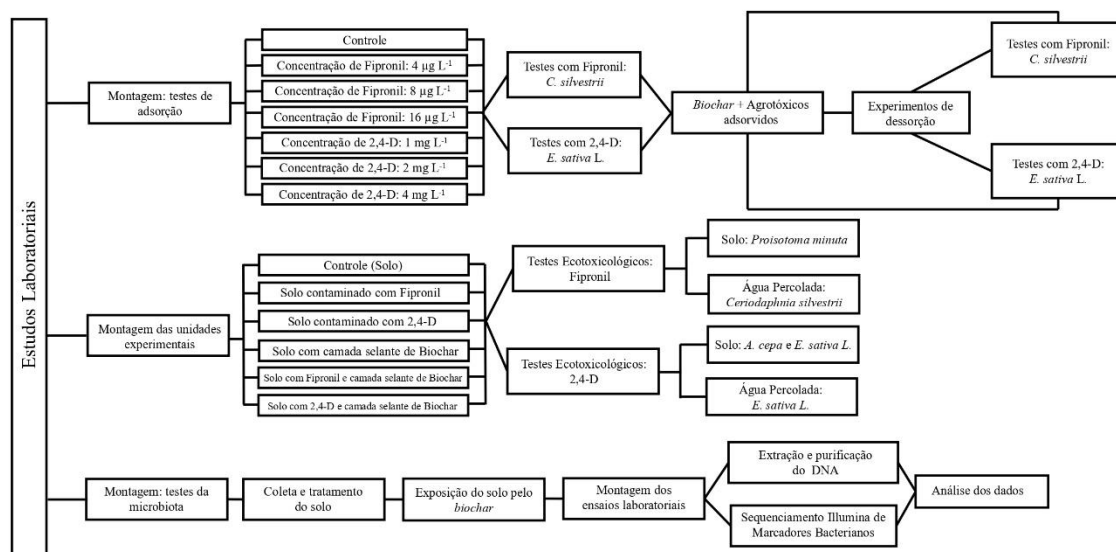
Moscardi *et al.* (2018) avaliaram a toxicidade do 2,4-D por meio da histopatologia e histoquímica do intestino médio e corpo gorduroso perivisceral do diplópode *Rhinocricus padbergi*. As principais alterações histológicas observadas no intestino médio para todas as concentrações avaliadas foram aumento na renovação epitelial e liberação de vesículas;

eventuais vacuolizações, presença de esferocristais, invasão do epitélio por células proliferativas e diminuição de grânulos citoplasmáticos nas células hepáticas. A análise histoquímica deste mesmo tecido mostrou uma depleção de proteínas nas células hepáticas, na concentração de campo, e aumento destas nos animais expostos à dose residual e ao dobro, assim como um aumento de polissacarídeos e leve depleção de cálcio para todos os tratamentos. Além disso, Pinto *et al.* (2022) verificaram que a exposição a esse herbicida alterou o conteúdo das reservas energéticas (carboidratos e lipídeos) e diminuiu as taxas de alimentação e crescimento populacional do anfípode aquático *Hyalella meinerti* após exposição a concentrações desse herbicida detectadas em corpos d'água no Brasil.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos realizados encontram-se sintetizados no fluxograma da Figura 1. O desenho experimental foi estruturado em três etapas complementares, abrangendo diferentes níveis de complexidade em ensaios de bancada. Inicialmente, foram conduzidos testes de sorção/dessorção em solução aquosa para avaliar a capacidade do *biochar* em reter os agrotóxicos e, conseqüentemente, reduzir sua toxicidade. Em seguida, foram elaboradas unidades experimentais com colunas de solo, a fim de simular condições mais próximas do ambiente natural e investigar a eficiência do *biochar* na retenção dos contaminantes em matrizes mais complexas. Por fim, realizaram-se análises da microbiota do solo, com o objetivo de compreender os efeitos do uso do *biochar* sobre a biodiversidade bacteriana, considerando sua relevância para a manutenção dos serviços ecossistêmicos. Todos os procedimentos metodológicos serão descritos nos itens subsequentes.

Figura 1 - Esquema ilustrativo do delineamento experimental e da sequência metodológica adotada.



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

4.1. Materiais e reagentes

Foram usadas formulações comerciais de fipronil e 2,4-D, buscando um maior realismo ecológico dos experimentos, uma vez que nos campos agrícolas os agrotóxicos são aplicados por meio de formulações. Para o inseticida, foi utilizada a formulação comercial Regent® 800 WG (BASF, Brasil), com 80% de ingrediente ativo (fipronil) e 20% de ingredientes inertes, conforme informações constantes na bula fornecida pelo fabricante. Para a contaminação dos tratamentos contendo 2,4-D, foi utilizada a formulação comercial DMA® 806BR (Dow AgroSciences, Brasil), com equivalente ácido do 2,4-D de 67,0% (670 g 2,4-D L⁻¹).

O *biochar* que foi utilizado advém da palha da cana-de-açúcar e foi cedido ao laboratório pelo professor Dr. Luis Alleoni, do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", campus Piracicaba (ESALQ/USP). Salienta-se que o processo de pirólise deste material foi feito a uma temperatura de 550° C em reator livre de oxigênio. A caracterização do *biochar* usado é sintetizada na Tabela 2 e os detalhes metodológicos para produção e caracterização do mesmo são apresentados em Soares *et al.* (2021).

Tabela 2 - Caracterização da amostra de *biochar* usada nos experimentos propostos

| Teor volátil (%) | Cinzas (%) | Carbono fixo (%) | pH | Total Nitrogênio (%) | Carbono total (%) | Área superficial (m ² g ⁻¹) |
|------------------|------------|------------------|-----|----------------------|-------------------|--|
| 46,0 | 10,3 | 41,3 | 9,3 | 0,7 | 52,7 | 223,4 |

Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2021).

Para a realização das montagens das unidades experimentais e dos experimentos voltados para a microbiota, foi feita a coleta do solo nas dependências da fazenda experimental da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), no município de Brotas (São Paulo). Esse solo já foi usado em estudos anteriores, sendo descrito que não há registro de contaminação prévia do mesmo (Triques *et al.*, 2021). O solo de estudo caracteriza-se por uma textura arenosa, baixo teor de matéria orgânica e pH, típico de solos de cerrado (Triques *et al.*, 2021). A caracterização é descrita na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização do solo usado nos experimentos propostos.

| Areia (%) | Argila (%) | Silte (%) | Matéria Orgânica (%) | pH | CTC (mmolc/dm ³) | Capacidade máx. de retenção de água (%) |
|-----------|------------|-----------|----------------------|-----|------------------------------|---|
| 89,8 | 8,2 | 2,0 | 2,5 | 4,3 | 37,8 | 26,83 |

Fonte: Adaptado de Triques *et al.* (2020).

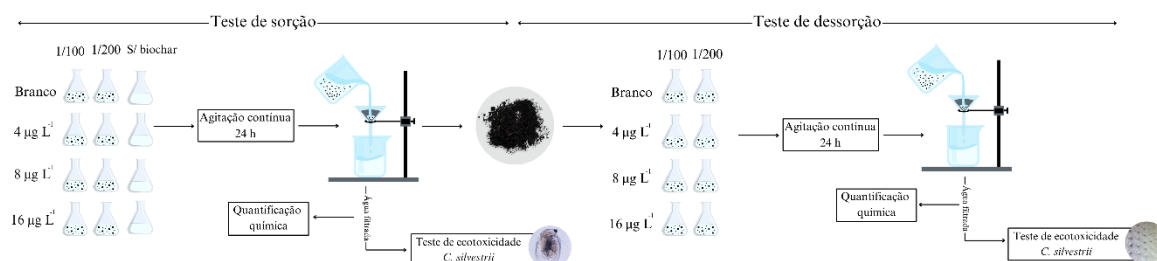
O solo foi coletado manualmente com o uso de uma enxada, até uma camada de 10 cm, em uma área de floresta, e a camada superficial (serrapilheira) foi removida. Em seguida, o solo foi peneirado (abertura de 2 mm) em campo, acondicionado em sacos plásticos e transportado até o laboratório. O solo peneirado (cerca de 80 kg) foi seco em estufa a 60 °C por 48 h para remoção da micro e mesofauna edáfica (defaunagem) e guardado em caixas herméticas, no Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos (EESC/USP), até a montagem das unidades experimentais.

4.2. Sorção e dessorção

4.2.1. Testes de sorção e dessorção para fipronil

Os testes de sorção e dessorção com o inseticida fipronil encontram-se sintetizados no fluxograma da Figura 2.

Figura 2 - Representação esquemática dos testes de sorção e dessorção com o inseticida fipronil



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Os ensaios de sorção foram realizados em Erlenmeyer de 300 mL, contendo 150 mL de solução teste em cada. Para o experimento, foram utilizadas três concentrações de fipronil (4, 8 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$), escolhidos com base nos resultados obtidos por Silva *et al.* (2020), para toxicidade aguda de fipronil para *C. silvestrii*. Para os experimentos de sorção, foram usadas duas proporções de *biochar*: 1/100 e 1/200, o que corresponde a 1,5 e 0,75 g, respectivamente, em 150 mL de solução teste, seguindo recomendações da OECD 106 “Batch Equilibrium” (2000), método padronizado para testar a sorção e dessorção de substâncias químicas no solo. Também foram realizados tratamentos contendo *biochar* sem fipronil (“C. Biochar (1/100)” e “C. Biochar (1/200)”) para garantir que essas proporções, sem a presença do inseticida, não causam toxicidade para a espécie bioindicadora. Conforme apresentado na Figura 2, foram utilizadas soluções com as duas proporções de *biochar*, e cada uma das três concentrações de fipronil foi combinada com cada uma dessas proporções de *biochar*. Além disso, foram preparados tratamentos contendo apenas o inseticida fipronil, sem a presença do *biochar* (“s/ biochar”), para atestar o nível de toxicidade de cada uma das concentrações e permitir verificar a redução dessa toxicidade após experimentos de sorção.

Seguindo a metodologia da norma citada, as soluções foram agitadas por 24 h no escuro (para evitar fotodegradação do fipronil), a aproximadamente 25 °C e com uma agitação de 170 rpm. Após a etapa de sorção, as soluções foram filtradas a vácuo (membrana de fibra de vidro GF/C 47 mm). O *biochar* retido na membrana foi seco a temperatura ambiente e preservado no escuro para experimentos de dessorção. A água filtrada (100 mL), contendo resíduos de agrotóxicos, foi utilizada em ensaios de ecotoxicidade aguda.

Para os experimentos de dessorção, o *biochar* com o agrotóxico adsorvido, oriundo dos experimentos de sorção descrito anteriormente, foi adicionado em Erlenmeyer de 300 mL seguindo as mesmas proporções do experimento de sorção, contendo 100 mL de água de cultivo, e foi submetido a agitação por 24 h no escuro, a 25 °C e com uma agitação de 170 rpm. Ao final do período, o material foi novamente filtrado e a água foi usada para avaliação da toxicidade após dessorção e o *biochar* retido foi descartado.

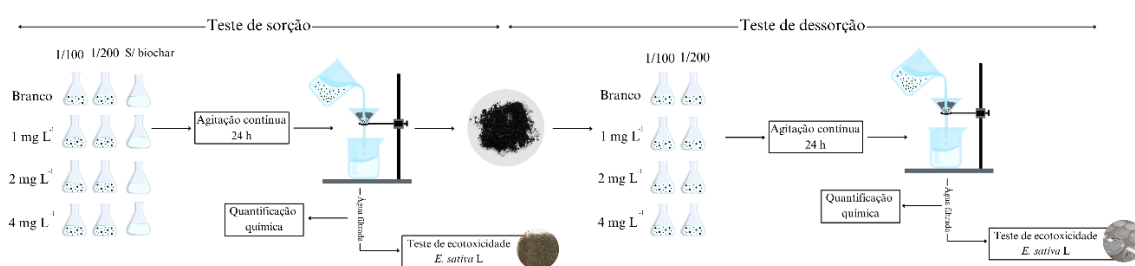
Testes de toxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii* foram conduzidos com base na NBR 12713 (2022). Ressalta-se que essa espécie foi selecionada devido sua alta sensibilidade já descrita ao inseticida (Silva *et al.*, 2020). Esses ensaios foram feitos em copos plásticos atóxicos de 50 mL, contendo 10 mL da solução teste (água advinda da filtragem a vácuo dos experimentos de sorção e dessorção), 5 neonatas e 4 réplicas por tratamento. Os testes foram mantidos a 25 °C, com 12 h:12 h (luz: escuro) de fotoperíodo, sem alimentação e teve duração de 48 h. No final do teste, o número de organismos móveis foi determinado. Adicionalmente,

um controle laboratorial foi utilizado, consistindo em apenas água de cultivo para atestar a saúde dos organismos. Os parâmetros pH (pHmetro micronal B374), oxigênio dissolvido (oxímetro YS155-25) e condutividade elétrica (condutivímetro Oriom 145) foram avaliados no início e no fim dos experimentos.

4.2.2. Testes de sorção e dessorção para 2,4-D

Os testes de sorção e dessorção com o herbicida 2,4-D encontram-se sintetizados no fluxograma da Figura 3.

Figura 3 - Representação esquemática dos testes de sorção e dessorção com o herbicida 2,4-D



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A montagem do teste de sorção e dessorção para o herbicida seguiram o mesmo modelo e condições que o do inseticida, conforme mencionado no item anterior. Entretanto, as concentrações utilizadas foram 1, 2 e 4 mg L⁻¹. Esses valores foram escolhidos com base nos resultados obtidos pela análise química e sensibilidade da espécie indicadora *E. sativa*, cujos resultados são descritos no presente trabalho. Conforme apresentado na Figura 3, foram utilizadas soluções com as duas proporções de *biochar*, e cada uma das concentrações de 2,4-D foi combinada com cada uma dessas proporções de *biochar*. Também foram feitos controles de *biochar* (“C. Biochar (1/100)” e “C. Biochar (1/200)”), para atestar que esse material não causa toxicidade para a espécie, e brancos de 2,4-D (“s/ biochar”), para verificar os efeitos do herbicida nas concentrações testadas.

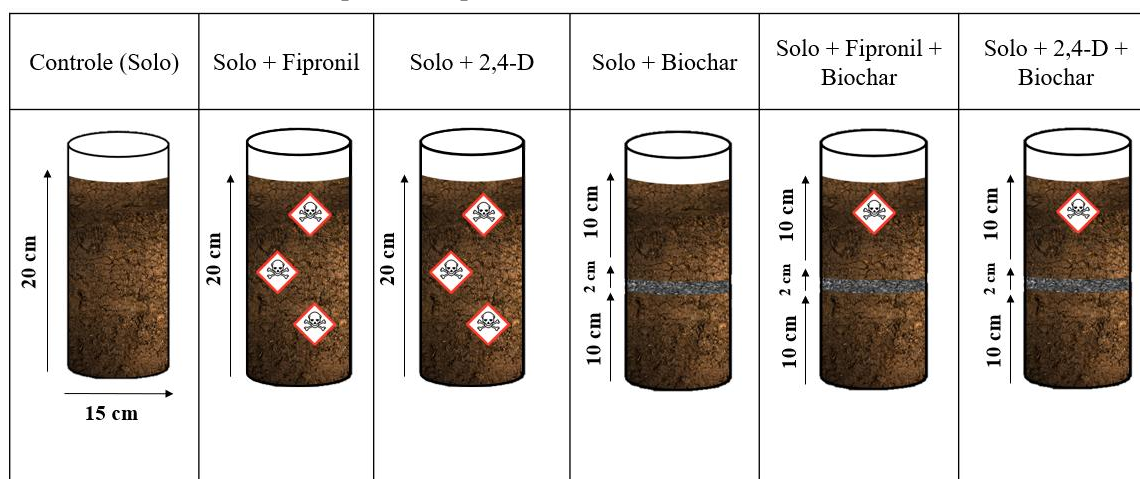
Para a espécie *E. sativa*, foram feitos experimentos de germinação e alongamento de raiz e parte aérea com base em Ogura *et al.* (2022). Os testes foram montados em placas de acrílico, utilizando filtro de papel esterilizado, 10 sementes de *E. sativa* (com potencial de germinação de 98%, segundo o fabricante, Feltrin®) e 3 réplicas para cada unidade. Em cada placa, foram adicionados 2,0 mL de água oriunda dos experimentos de sorção e dessorção, sendo os controles laboratoriais feitos com água destilada. Os testes foram mantidos no escuro por 96 h a 20 °C. No final dos experimentos, o número de sementes germinadas foi

quantificado, assim como o comprimento da parte aérea e da raiz para determinação do crescimento germinativo. Para determinação do comprimento, as plântulas foram alocadas em um papel, sendo feita marcação das extremidades de raiz e parte aérea para posterior medição manual.

4.3. Experimentos em coluna de solo

Para os experimentos em coluna de solo, unidades experimentais foram montadas utilizando tubos de PVC, com 15 cm de diâmetro e 30 cm de altura. Foram feitos 6 tratamentos com 3 réplicas cada (18 unidades experimentais): (i) ‘Controle (Solo)’ que consiste numa camada de 20 cm de solo, já preparado conforme descrito acima; (ii) ‘Solo + Fipronil’ que foi preenchido com uma camada de 20 cm de solo e, posteriormente, contaminado com o inseticida fipronil; (iii) ‘Solo + 2,4-D’ que foi preparado como o item anterior, mas contaminado com o herbicida 2,4-D; (iv) ‘Solo + Biochar’, recebeu uma camada de 20 cm de solo não contaminado e uma camada intermediária de 2 cm de *biochar*; (v) ‘Solo + Fipronil + Biochar’ e (vi) ‘Solo + 2,4-D + Biochar’ foram preparados da mesma forma que o tratamento ‘Solo + Biochar’, mas foram contaminados, respectivamente, pelos agrotóxicos contendo fipronil e 2,4-D. A Figura 4 apresenta uma representação esquemática das unidades experimentais.

Figura 4 - Desenho esquemático dos modelos da unidade experimental. Cada tratamento foi composto por três réplicas, totalizando 18 unidades



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para a montagem das unidades experimentais, inicialmente, o solo foi umedecido com água destilada até 70% da sua capacidade de máxima retenção de água de 26% (Tabela 3) (NBR 11267, 2019) e colocado nos tubos, conforme demonstrado na Figura 4, incluindo as camadas intermediárias de *biochar* para os respectivos tratamentos. Cada camada de solo (superior e inferior) foi composta por cerca de 1,5 kg de solo úmido. Posteriormente, o *biochar* foi

condicionado no solo durante um período de 45 dias antes da aplicação dos agrotóxicos. Para isso, as estruturas foram tampadas, a fim de minimizar a evaporação da água e mantidas em sala climatizada a 25 °C com fotoperíodo de 12 h:12 h (claro:escuro). A umidade do solo foi controlada pela pesagem dos tubos e reposição da massa perdida com água destilada. A Figura 5 apresenta a etapa de montagem das estruturas e os modelos experimentais prontos. Ressalta-se que uma dupla camada de rede (45 µm) foi inserida no fundo das unidades e fixada com um anel de PVC para permitir a retenção do solo e coleta da água a ser percolada nas simulações de chuvas. Um reservatório de PVC foi inserido no fundo das unidades para retenção da água.

Figura 5 - Desenvolvimento das unidades experimentais, com destaque para (a) os tubos, o fundo usado para a retenção da água e a rede usada para a retenção do solo; (b) as unidades montadas sem a adição do solo (c) e após a adição e (d) as unidades dispostas para condicionamento do *biochar*



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

4.3.1. Contaminação do solo e procedimentos experimentais

Para a contaminação, a quantidade de agrotóxico que foi utilizada foi calculada com base nas recomendações das bulas do Regent® 800 WG e DMA® 806BR. Para os cálculos dos tratamentos contendo fipronil, foi utilizada a dosagem recomendada para a cana-de-açúcar, considerando um cenário de infestação pela broca-da-cana (*Diatraea saccharalis*) de 500 g de produto comercial (p.c.) por ha (i.e., 400 g de fipronil por ha). Para os cálculos dos tratamentos contendo 2,4-D, foi utilizada a dosagem recomendada para a cana-de-açúcar, considerando um cenário de infestação por *Ipomoea grandifolia* ou por *Euphorbia heterophylla* de 1,5 L p.c. por ha (i.e., 100,5 g de 2,4-D por ha). Os valores foram escolhidos considerando um pior cenário de aplicação (referente à maior dose de aplicação recomendada).

A quantidade de inseticida e de herbicida aplicada foi calculada considerando a área superficial dos tubos de PVC (0,018 m²), para um cenário de aplicação por pulverização. Para isso, foram preparadas soluções estoque de fipronil (2,4 mg L⁻¹) e 2,4-D (14,0 mg L⁻¹), diluindo

o produto comercial em água destilada. Assim, o herbicida e o inseticida foram aplicativos na superfície do solo, nos tratamentos ‘Solo + Fipronil’, ‘Solo + 2,4-D’, ‘Solo + Fipronil + Biochar’ e ‘Solo + 2,4-D + Biochar’. Já nos tratamentos ‘Controle (Solo)’ e ‘Solo + Biochar’ apenas água destilada foi aplicada no mesmo volume de calda utilizada nos tratamentos contaminados. Durante a contaminação de cada unidade experimental, as outras foram devidamente cobertas para evitar contaminação cruzada. Além disso, esse processo foi feito em ambiente aberto, com circulação de ar, com o uso de equipamentos de proteção individual. Posteriormente, as unidades experimentais foram mantidas em laboratório em condições controladas de temperatura (25 °C) e luz (12h:12h luz: escuro).

Após a contaminação, foi feita a simulação de 3 eventos de chuva: (i) no dia da contaminação, (ii) 4 dias após a contaminação e (iii) 7 dias após a contaminação. Os eventos de chuva simulados serviram para avaliar o possível carreamento (transporte vertical) do inseticida e do herbicida na coluna de solo e para verificar a capacidade da camada de *biochar* de reter o contaminante. Ressalta-se que a quantidade de água da chuva utilizada (350 mL) foi calculada considerando a média histórica dos últimos 15 anos de chuva no município de São Carlos e a área superficial dos tubos (0,018 m²). Para isso, os dados climáticos foram obtidos no banco de dados do Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos – CPTEC/INPE.

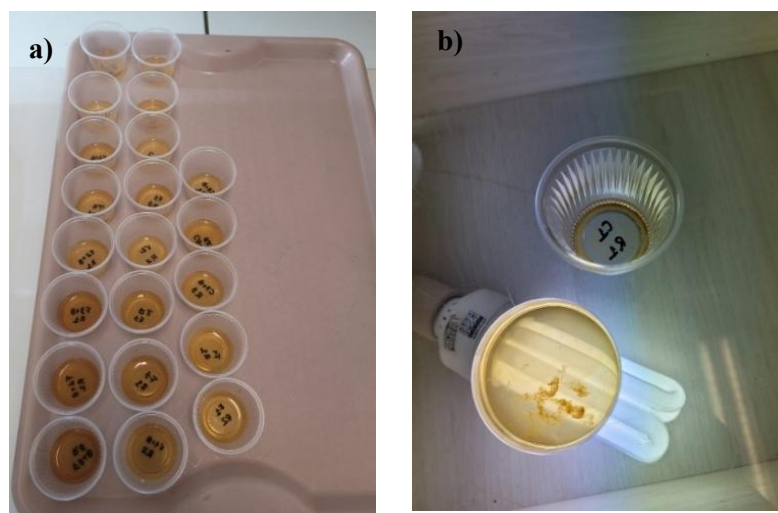
A água percolada pela coluna de solo foi coletada no fundo dos tubos e guardadas em garrafas plásticas atóxicas e mantidas a -20 °C para posteriores testes ecotoxicológicos com a espécie *C. silvestrii*, para fipronil, e de germinação com a espécie *E. sativa* simulando a irrigação com água contaminada por 2,4-D. O experimento foi finalizado após 10 dias da contaminação, quando o solo foi coletado para verificação da toxicidade. Para isso, a camada superficial (9,5 cm a partir da superfície) e a camada mais profunda (9,5 cm acima do fundo das unidades e 0,5 abaixo da camada de *biochar*) foram retiradas e preservadas a -20 °C em sacos plásticos atóxicos para testes ecotoxicológicos com as espécies terrestres *P. minuta*, para os tratamentos com fipronil, e *A. cepa* e *E. sativa* para os tratamentos com 2,4-D.

4.3.2. Testes de toxicidade com a água percolada

A fim de verificar a toxicidade da água percolada, foram realizados testes com *C. silvestrii* com as amostras provenientes do tratamento com fipronil e com *E. sativa* para amostras provenientes dos tratamentos com 2,4-D. Ressalta-se que foram realizados testes com ambas as espécies para amostras de água percolada proveniente dos tratamentos ‘Solo’ e ‘Solo + Biochar’, uma vez que foram usados como controles. Os testes foram feitos separadamente com as amostras de água provenientes das três simulações de chuva.

Os testes de toxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii* foram conduzidos com base na NBR 12713 (2022). Esses ensaios foram feitos em copos plásticos atóxicos de 50 mL, contendo 10 mL da solução teste (água percolada), 5 organismos neonatos e 3 réplicas por tratamento. Ressalta-se que os testes foram mantidos a 25 °C, com 12 h:12 h (luz: escuro) de fotoperíodo, sem alimentação e teve duração de 48 h. No final do teste, o número de organismos imóveis foi determinado. Um controle laboratorial foi utilizado, consistindo em apenas água de cultivo para atestar a saúde dos organismos. Os parâmetros pH (pHmetro micronal B374), oxigênio dissolvido (oxímetro YS155-25) e condutividade elétrica (condutivímetro Oriom 145) foram avaliados no início e no fim dos experimentos. A Figura 6 demonstra como o teste foi realizado.

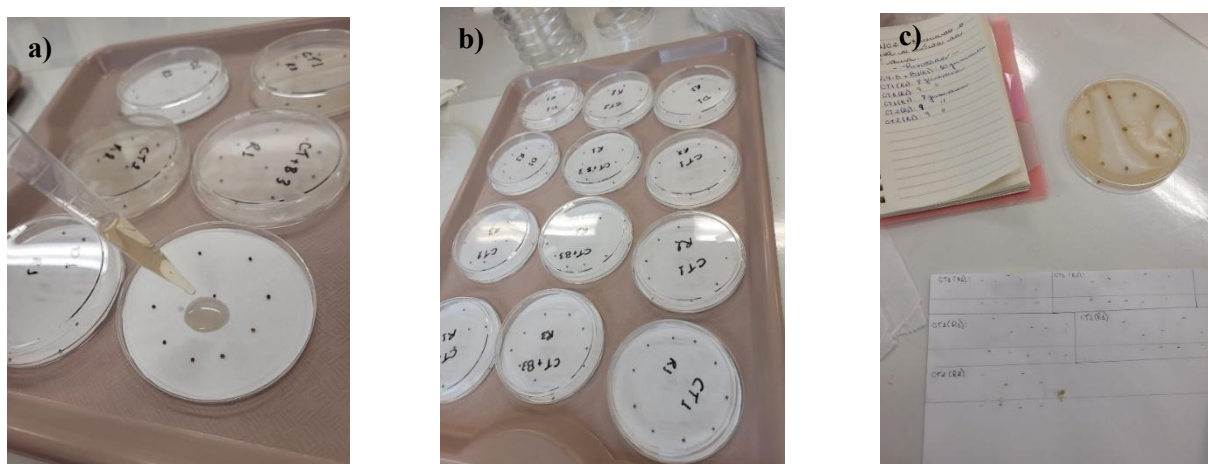
Figura 6 - Testes de toxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii*. As imagens apresentam (a) a montagem do teste de toxicidade aguda com a espécie *C. silvestrii* e (b) o encerramento do teste



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para a espécie *E. sativa* foram feitos experimentos de germinação e alongamento de raiz e parte aérea com base em Ogura *et al.* (2022). Os testes foram montados em placas de acrílico, utilizando filtro de papel esterilizado, 10 sementes de *E. sativa* (com potencial de germinação de 98%, segundo o fabricante, Feltrin®) e 3 réplicas para cada unidade. Em cada placa, foram adicionados 2,0 mL de água percolada, sendo os controles laboratoriais feitos com água destilada. Os testes foram mantidos no escuro por 96 h a 20 °C. No final dos experimentos, o número de sementes germinadas foi quantificado, assim como o comprimento da parte aérea e da raiz para determinação do crescimento germinativo. Para determinação do comprimento, as plântulas foram alocadas em um papel, sendo feita marcação das extremidades de raiz e parte aérea para posterior medição manual. Os procedimentos metodológicos são mostrados na Figura 7.

Figura 7 - Teste de germinação com a espécie *E. sativa*, com destaque para (a) a disposição das sementes sobre o papel filtro e adição das amostras (b) organização das réplicas e (c) encerramento do teste com contagem das sementes germinadas e marcação das extremidades



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

4.3.3. Testes de toxicidade com solo

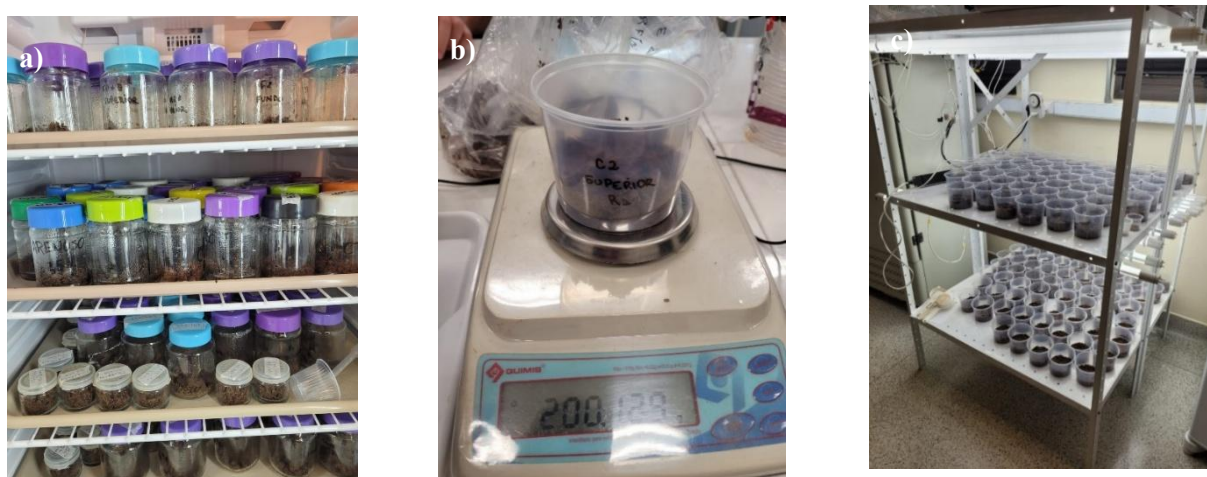
As amostras de solo coletadas na superfície e no fundo dos tubos ao final dos experimentos foram usadas para testes de toxicidade com a espécie *P. minuta*, considerando os tratamentos com fipronil, e as espécies *E. sativa* e *A. cepa*, para os tratamentos contaminados por 2,4-D. Da mesma forma que para a água percolada, para os tratamentos controle foram feitos testes com todas as espécies.

Os testes de toxicidade com a espécie *P. minuta* foram feitos de acordo com a adaptação da NBR 11267 (2019) em recipientes de vidro de 100 mL, contendo 30 g de solo cada. Foram feitas 3 réplicas por unidade experimental, totalizando 9 réplicas por tratamento, sendo adicionados 12 juvenis em cada (10 a 12 dias de vida). O teste foi mantido por 28 dias a 20 °C com fotoperíodo de 16 h:8 h (claro: escuro). A umidade do solo foi controlada semanalmente e o alimento (fermento biológico Fleischmann®) foi fornecido no início e após 14 dias. No final do experimento, o número de adultos vivos e de juvenis produzidos (reprodução) foi avaliado. No início e ao final do experimento, o pH do solo foi avaliado. A Figura 8 apresenta como o teste foi mantido.

Os testes de toxicidade com as espécies *A. cepa* e *E. sativa* foram feitos de acordo com a ISO 11269-2 (2012), considerando a germinação das sementes e o crescimento das plantas. Ressalta-se que os experimentos foram feitos com duas espécies, separadamente, uma vez que a norma recomenda o uso de espécies monocotiledôneas e dicotiledôneas. Para isso, foram utilizados recipientes de polietileno atóxico com diâmetro interno da parte superior de 95 mm,

contendo 200 g de solo cada. Foram realizadas três réplicas por tratamento, totalizando 12 tratamentos da porção superior das colunas e outros 12 tratamentos da porção inferior. Em cada uma das réplicas, foram plantadas dez sementes de cada espécie (cerca de 5 mm abaixo da superfície do solo) de forma homogênea ao longo da área do recipiente teste, que foram mantidas sob condições favoráveis ao crescimento das espécies-teste selecionadas, isto é, $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ com fotoperíodo de 12 h:12 h (claro: escuro) e intensidade de iluminação de aproximadamente 7.000 lux. Ademais, a umidade do solo foi controlada a cada 48h e o número de sementes germinadas foi determinado diariamente. O teste foi mantido por 21 dias, após a emergência de 50% das plântulas dos recipientes-controle. Ao final dos experimentos, foi determinada a emergência, comprimento da parte aérea e das raízes e biomassa (fresca e seca). A Figura 8 retrata como o teste foi feito.

Figura 8 - Montagem do teste de toxicidade com as espécies *P. minuta*, *A. cepa* e *E. sativa*. As figuras retratam (a) as unidades do teste com a *P. minuta*; (b) a pesagem do solo e (c) as unidades prontas com as devidas condições para germinação e crescimento



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

4.3.4. Análises químicas dos agrotóxicos

Para a confirmação da quantidade de agrotóxicos aplicada nas unidades experimentais, a concentração de fipronil e 2,4-D foi determinada em soluções-estoque preparadas antes da contaminação. Além disso, amostras compostas das três réplicas experimentais de cada tratamento - dado os custos associados às análises químicas - da água (10 mL) e do solo (10 g) foram separadas após a simulação de cada uma das chuvas, para a água, e ao final do experimento, para o solo. As amostras de água foram filtradas (microfiltro de fibra de vidro GF¹, diâmetro 47mm). Já as amostras de solo foram secas em condições ambientais (temperatura

ambiente) em sala fechada sem luz direta, peneiradas (malha de 1,0 mm). Após pré-tratamento, todas as amostras foram e imediatamente preservadas (-20 °C) no escuro para envio ao Laboratório de Química Ambiental (Instituto de Química – Unicamp) para quantificação química. Nas amostras de água, os agrotóxicos foram extraídos por Extração em Fase Sólida (colunas OASIS HLB EC-C18, 500 mg. 6 cc, Waters) (Montagner *et al.*, 2014). As amostras de solo (10 g) foram acidificadas (H_2SO_4 0,1 mol L⁻¹) e os agrotóxicos foram extraídos em 2 ciclos (10 min. cada) usando diclorometano (20 mL por ciclo). Em cada ciclo, as amostras foram mantidas em ultrassom (10 min) e a fase orgânica separada por centrifugação (4000 rpm por 10 min). A fase orgânica de cada ciclo, contendo os agrotóxicos, foi seca em fluxo de N₂ (22 °C), e depois ressuspensas com 1,5 mL de MeOH-H₂O (70:30, % v/v) contendo 50 µg L⁻¹ de 2,4-D (anel-¹³C₆) e fipronil (pirazol-¹³C₃, ciano-¹³C) usados como padrão interno. Assim, a solução foi filtrada (filtro de seringa PTFE hidrofóbico 0,22 µm) para análises posteriores (de Amarante *et al.*, 2003; Tetzner *et al.*, 2016).

Os agrotóxicos foram quantificados nos extratos de amostras de água e sedimento por cromatografia líquida (Agilent 1200) acoplada a um espectrômetro de massas (Agilent 6410B, Agilent Technologies - Santa Clara, EUA), conforme descrito por Goulart *et al.* (2020). A separação cromatográfica foi realizada usando uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 × 30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm, Agilent Technologies). Todas as medições foram realizadas em um modo de monitoramento de reação múltipla (MRM) com polaridade de íons negativos. Os limites de detecção e quantificação instrumentais foram, respectivamente, 0,5 e 1,0 µg L⁻¹ para 2,4-D e 0,01 e 0,05 µg L⁻¹ para fipronil.

4.4. Comunidade bacteriana

Com o mesmo solo descrito na seção 4.1., dois tratamentos foram preparados no laboratório: (i) solo natural (controle) e (ii) solo com 3% de *biochar*, em vasos plásticos (15 cm de diâmetro e 9 cm de profundidade), pesando 1 kg, contendo 0,5 kg de solo, conforme ilustrado na Figura 9. O *biochar* foi incorporado de forma uniforme ao solo (Alexandre *et al.*, 2023), e sua proporção foi escolhida com base nas recomendações de Ouyang *et al.* (2016) e Alexandre *et al.* (2023).

Figura 9 – Tratamentos preparados para análise: solo (controle) e solo com *biochar*



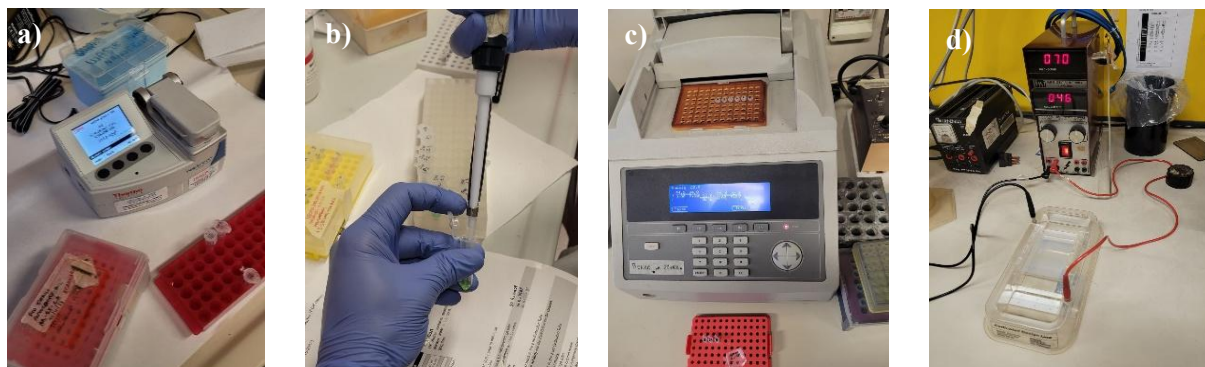
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

As unidades experimentais foram mantidas sob condições controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e regime de luz (12 h:12 h), simulando condições tropicais, durante 7 dias, com a umidade do solo mantida em 60% da capacidade de campo. A umidade foi verificada nos dias 0, 3 e 7 após o início do experimento. Ao final do experimento, o solo da área central da unidade experimental foi coletado — por representar as características originais do solo — e acondicionado em tubos Falcon de 50 mL. Posteriormente, as amostras foram refrigeradas (4 °C) e transportadas para o laboratório de Microbiologia da *Universidade de Roma Tor Vergata*, na Itália.

4.4.1. Extração do DNA

O DNA da comunidade bacteriana foi extraído de 0,25 g de cada amostra de solo, em triplicata, utilizando o kit MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante após uma diluição 5 vezes. Em seguida, o DNA extraído foi purificado utilizando o kit Gel/PCR DNA Fragments Kit (DF100, DF300, Geneaid, Taiwan), também conforme as instruções do fabricante. A concentração e a qualidade do DNA foram determinadas por espectrofotometria, fluorometria e eletroforese em gel de agarose a 1,2%. A Figura 10 ilustra as etapas realizadas no laboratório.

Figura 10 - (a) Quantificação do DNA após a extração, realizada com o equipamento Nanodrop Lite, (b) preparação do Master Mix para PCR, (c) execução da PCR para posterior purificação do DNA, e (d) utilização do equipamento Hoefer para análise dos resultados da PCR



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

4.4.2. Sequenciamento Illumina de Marcadores Bacterianos

O gene 16S rDNA foi amplificado por PCR com os primers Pro341F (5'-CCTACGGGNBGCASCAG-3') e Pro805R (5'-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3'), abrangendo a região V3-V4 do gene 16S rDNA, adequada para a identificação de bactérias e arqueias.

O DNA amplificado foi quantificado utilizando um espectrofotômetro de microvolume Nanodrop (Schmalenberger *et al.*, 2001; Bergmann *et al.*, 2011). Os *amplicons* foram obtidos por uma empresa especializada (Ecofin, Alemanha) e submetidos ao sequenciamento de nova geração (NGS) em uma plataforma Illumina MiSeq. A amplificação do rRNA da comunidade bacteriana e o processamento dos dados estão detalhados em Lourenço *et al.* (2018).

4.5. ANÁLISE DE DADOS

4.5.1. Sorção e dessorção

As comparações dos efeitos nas amostras de água foram feitas por ANOVA de duas vias, com teste posterior de Tukey. Para isso, a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene, através do software Jamovi (versão 2.3.21). Nas análises, os dois fatores usados foram (i) a concentração dos agrotóxicos, denominados aqui como “Agrotóxico” e (ii) a presença/ausência de *biochar*, denominado como “Biochar”. Todos os testes foram feitos com um intervalo de confiança de 95% sendo, portanto, consideradas diferenças estatisticamente significativas para valores de *p* menores que 0,05.

4.5.2. Experimentos em coluna de solo

A efetividade de retenção do contaminante pela camada selante de *biochar* foi avaliada comparando os efeitos ecotoxicológicos nas amostras de água e solo dos tratamentos remediados ('Solo + Fipronil + Biochar' e 'Solo + 2,4-D + Biochar') com os tratamentos controle ('Solo' e 'Solo + Biochar') e contaminados sem a camada selante ('Solo + Fipronil' e 'Solo + 2,4-D'). Além disso, para os testes ecotoxicológicos foi feita uma comparação entre a camada superior e inferior do solo, a fim de verificar se os agrotóxicos são carregados pela coluna de solo e a extensão desse transporte, além de verificar se eles podem chegar à água subterrânea. O tratamento possuindo apenas solo e *biochar* foi usado como controle para confirmar que a camada selante sozinha não causaria toxicidade para os organismos testados.

As comparações dos efeitos nas amostras de água foram feitas por ANOVA de duas vias, separadas em cada chuva, com teste posterior de Tukey. Para isso, a normalidade dos resíduos foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade de variâncias pelo teste de Levene, através do software Jamovi (versão 2.3.21). Nas análises, os dois fatores usados foram (i) a presença/ausência dos agrotóxicos, denominados aqui como Agrotóxicos e (ii) a presença/ausência de *biochar*, denominado como Biochar. Para as amostras de solo, foi usada ANOVA de três vias, sendo os fatores (i) a presença/ausência dos agrotóxicos, denominados aqui como Agrotóxicos, (ii) a presença/ausência de *biochar*, denominado como Biochar e (iii) a posição superior/inferior, denominados aqui como Posição. Todos os testes foram feitos com o mesmo nível de significância descrito anteriormente.

4.5.3. Comunidades bacterianas

Os parâmetros associados à possível toxicidade do *biochar* foram analisados por meio de bioinformática, utilizando o CINECA - o maior centro de computação da Itália, composto por universidades italianas, centros públicos nacionais de pesquisa, o Ministério da Universidade e Pesquisa e o Ministério da Educação. As sequências pareadas brutas obtidas foram analisadas utilizando o software *Quantitative Insights into Bacterial Ecology* (QIIME 2.10.76). As sequências pareadas brutas desmultiplexadas foram filtradas quanto à qualidade, verificadas quanto à presença de quimeras e pareadas para junção utilizando o plugin DADA2.

A identificação taxonômica das sequências do gene 16S rRNA foi realizada por meio de um classificador de Bayes ingênuo, treinado com o banco de dados SILVA 138 SSU (QUAST *et al.*, 2016). As Variantes de Sequência de Amplicon (ASVs) obtidas foram agrupadas em Unidades Taxonômicas Operacionais (OTUs) utilizando um limite de identidade

de 97%. Os dados brutos foram depositados no Repositório de Leitura de Sequência (SRA) da NCBI, BioProject HP10C6NBLU.

Para avaliar os efeitos do *biochar* na comunidade bacteriana do solo, foi realizado um teste PERMANOVA em uma matriz de distância de Bray-Curtis com dados de abundância de OTUs transformados por $\log(x + 1)$, a fim de mostrar a similaridade entre as amostras. Índices ecológicos (riqueza, abundância, diversidade de Shannon, equitatividade, dominância e equitabilidade) foram obtidos no software Past (versão 4.10). A diversidade alfa (número de espécies em termos de riqueza, ou seja, diversidade de composição) foi avaliada pelo índice de Shannon-Wiener. Diferenças nos índices ecológicos entre os solos com *biochar* e os solos controle foram avaliadas por meio do teste t de Student pareado. Para isso, a normalidade dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk, e a homogeneidade das variâncias foi verificada pelo teste de Levene. A análise foi realizada no software Jamovi (versão 2.3.21).

Além disso, o conjunto de dados foi reduzido em 13 sequências que apresentaram abundância superior a 2% do total de indivíduos. As diferenças na abundância desses grupos selecionados também foram avaliadas por teste t pareado. Posteriormente, os valores foram organizados em gráficos e tabelas e comparados com dados da literatura. Ao final das análises, foi possível observar alterações (positivas ou negativas) na composição e diversidade bacteriana na presença do *biochar* em comparação ao solo controle.

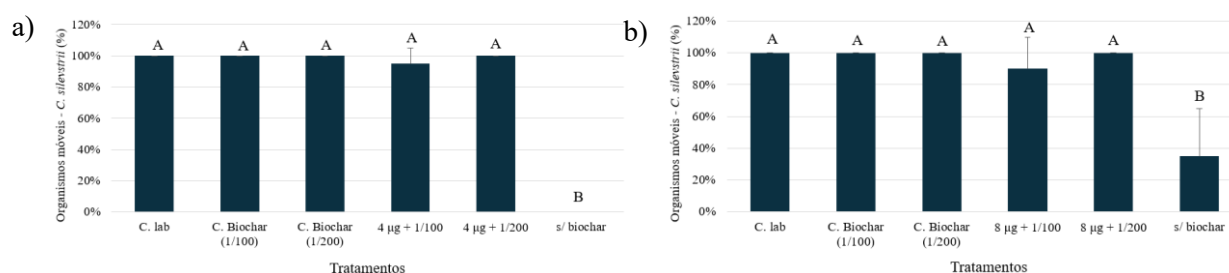
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

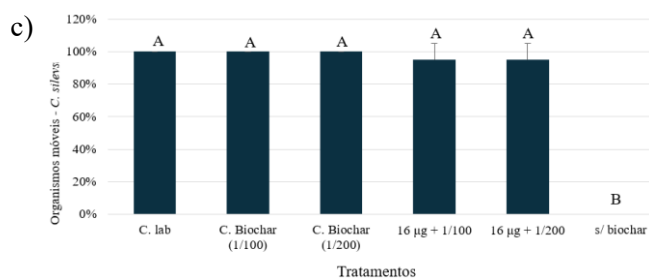
5.1. Sorção e Dessorção

5.1.1. Respostas para *Ceriodaphnia silvestrii*

Os testes com *C. silvestrii* foram conduzidos com água oriunda dos experimentos de sorção e dessorção, sendo os controles laboratoriais feitos com água preparada para cultivo. A Figura 11 apresenta a porcentagem de indivíduos vivos da espécie para o teste de sorção.

Figura 11 - Percentual de organismos móveis da espécie *C. silvestrii* para o teste de sorção com $4 \mu\text{g L}^{-1}$ (a), $8 \mu\text{g L}^{-1}$ (b) e $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos. “S/ biochar” representam os tratamentos mantendo apenas o inseticida, sem o *biochar*





Fonte: Elaborado pela autora (2025)

De forma geral, todos os gráficos apresentaram comportamentos similares, indicando que não houve diferença significativa entre os controles e os tratamentos contendo *biochar*, com e sem fipronil ($p > 0,05$). Em contrapartida, no tratamento contaminado sem a presença de *biochar* (“s/ *biochar*”) foram detectadas diferenças em relação aos demais tratamentos ($p < 0,05$). Assim, os resultados indicaram que, nos tratamentos com *biochar* (proporções 1/100 e 1/200), o percentual de organismos móveis se manteve similar aos controles, indicando que o *biochar* sorveu o fipronil, removendo a toxicidade após tratamento. Na Tabela 4 verifica-se os parâmetros da água após teste de sorção com o fipronil, demonstrando semelhança entre os valores.

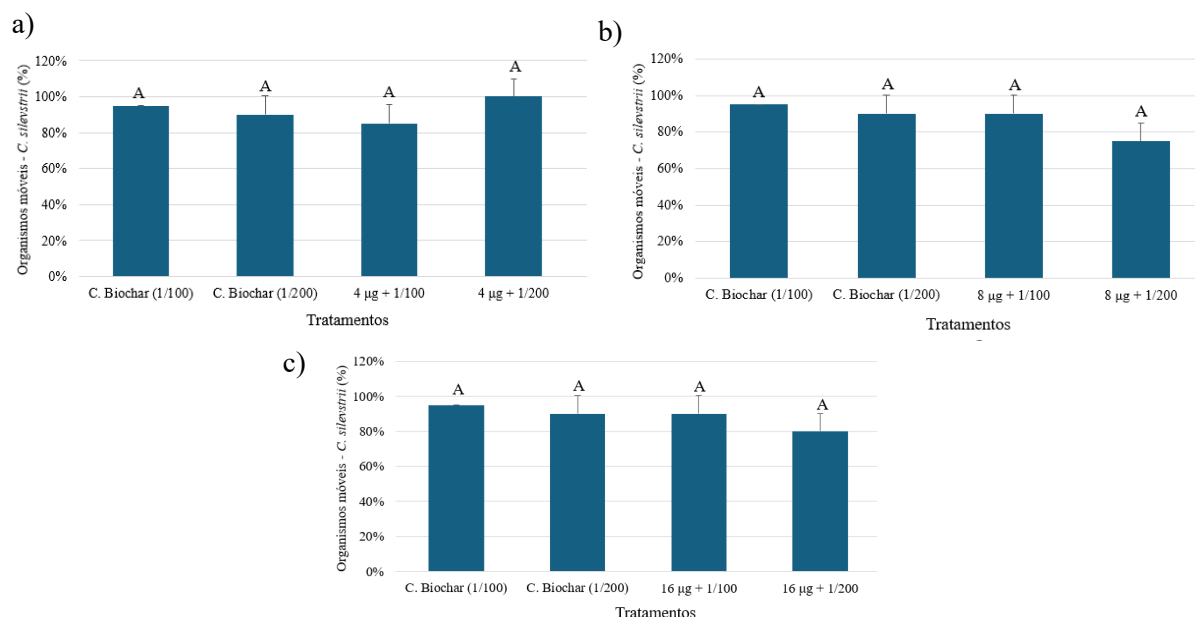
Tabela 4 - Parâmetros da água após teste de sorção com o contaminante fipronil

| Amostra | pH | Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹) | Condutividade elétrica (µS) |
|---------------------------|------|---|-----------------------------|
| C. lab | 7,67 | 7 | 213 |
| C. Biochar (1/100) | 7,71 | 6,76 | 280 |
| C. Biochar (1/200) | 7,41 | 6,94 | 259 |
| 4 µg + 1/100 | 7,39 | 6,87 | 268 |
| 4 µg + 1/200 | 7,33 | 6,73 | 258 |
| 4 µg - s/ <i>biochar</i> | 7,09 | 6,96 | 228 |
| 8 µg + 1/100 | 7,18 | 6,91 | 267 |
| 8 µg + 1/200 | 6,98 | 6,87 | 236 |
| 8 µg - s/ <i>biochar</i> | 6,98 | 7,06 | 230 |
| 16 µg + 1/100 | 6,94 | 6,93 | 251 |
| 16 µg + 1/200 | 6,88 | 6,98 | 258 |
| 16 µg - s/ <i>biochar</i> | 6,82 | 7,05 | 250 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A Figura 12 apresenta a porcentagem de organismos móveis para o teste de dessorção. Observou-se que o percentual de indivíduos móveis tende a diminuir com o aumento da concentração do composto. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$), indicando que o fipronil, que foi previamente adsorvido pelo *biochar*, não foi liberado de volta para a água em níveis suficientes para causar toxicidade para a espécie.

Figura 12 - Percentual de organismos móveis da espécie *C. silvestrii* para o teste de dessorção com 4 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a), 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ (b) e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem *biochar*



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para uma análise mais aprofundada, tem-se a Tabela 5 que apresenta os parâmetros da água após teste de dessorção com o fipronil, demonstrando similaridade entre os valores de pH, oxigênio dissolvido e condutividade elétrica quando comparados à amostra de laboratório.

Tabela 5 - Parâmetros da água após teste de dessorção com o contaminante fipronil

| Amostra | pH | Oxigênio dissolvido (mg L^{-1}) | Condutividade elétrica ($\mu\text{S cm}^{-1}$) |
|-------------------------------------|------|--|--|
| C. lab | 7,12 | 6,98 | 169 |
| C. Biochar (1/100) | 7,07 | 6,86 | 188 |
| C. Biochar (1/200) | 7,04 | 6,86 | 182 |
| 4 $\mu\text{g} + 1/100$ | 7,01 | 6,86 | 180 |
| 4 $\mu\text{g} + 1/200$ | 6,89 | 6,87 | 174 |
| 4 $\mu\text{g} - \text{s/ biochar}$ | 6,88 | 6,81 | 193 |
| 8 $\mu\text{g} + 1/100$ | 6,74 | 6,81 | 176 |
| 8 $\mu\text{g} + 1/200$ | 6,73 | 6,78 | 183 |
| 8 $\mu\text{g} - \text{s/ biochar}$ | 6,66 | 6,74 | 175 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Em resumo, nos tratamentos com *biochar* observou-se que o percentual de organismos móveis da espécie *C. silvestrii* se manteve alta em todas as concentrações de fipronil (4, 8 e 16 $\mu\text{g L}^{-1}$), remediadas com o *biochar*, indicando que ele foi eficaz na sorção do fipronil, reduzindo sua concentração na solução aquosa e, consequentemente, sua toxicidade para a espécie

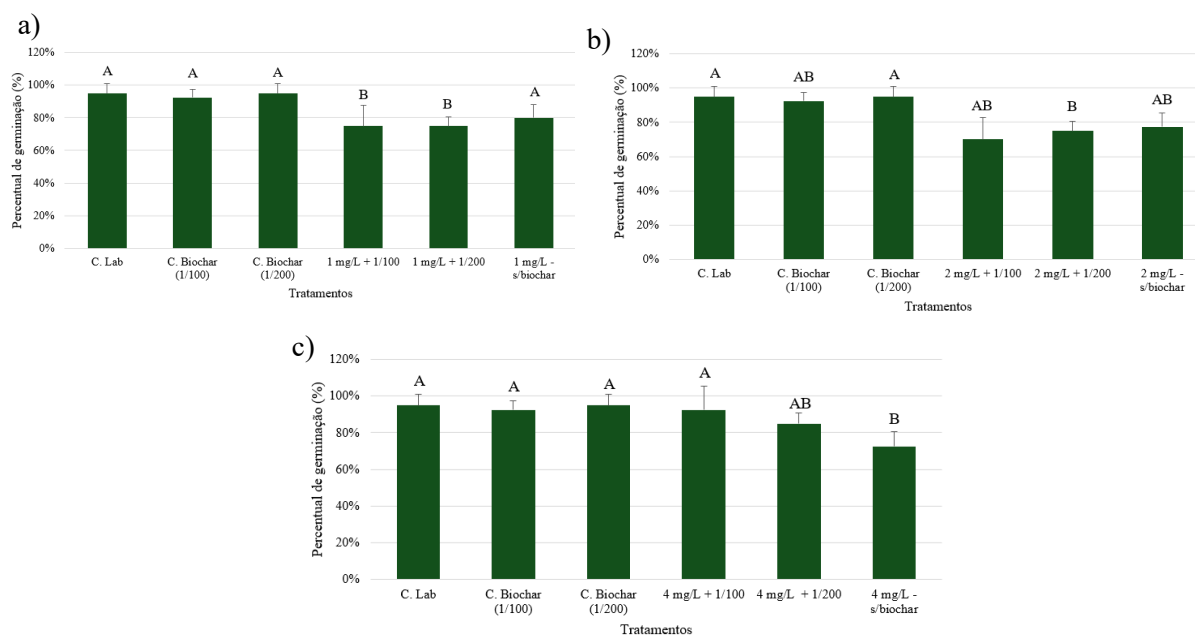
estudada. Por outro lado, no processo de dessorção, a análise de ANOVA de duas vias revelou que a interação entre o *biochar* e o agrotóxico não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$), demonstrando que não houve uma liberação relevante do fipronil adsorvido, mantendo a mobilidade da espécie *C. silvestrii* relativamente estável nas diferentes concentrações testadas.

Tais fatos podem estar relacionados à alta afinidade do fipronil com o carbono orgânico ($K_{oc} = 427$ a 1248) e, portanto, maior tendência em ficar aderido ao carbono orgânico do solo, da água e, no caso em específico da presente pesquisa, no biochar, pois ele tende a se ligar a esses componentes, em vez de se mover livremente na água ou no solo (Gunasekara, 2007). Além disso, ele possui uma menor solubilidade em água ($1,9 \text{ mg L}^{-1}$ a 20°C , pH 5) (Mize *et al.*, 2008; Ying & Kookana, 2001). Portanto, o *biochar* sorveu o fipronil de maneira eficaz, sem sinais relevantes de dessorção, o que reforça sua eficácia como uma ferramenta para reduzir a disponibilidade do agrotóxico no ambiente, considerando agrotóxicos com alta afinidade pelo carbono orgânico (altos valores de K_{oc}).

5.1.2. Respostas para *Eruca sativa*

Os testes com *E. sativa* foram conduzidos com água oriunda dos experimentos de sorção e dessorção, sendo os controles laboratoriais feitos com água destilada. A Figura 13 apresenta a germinação das sementes após a exposição à água do teste de sorção.

Figura 13 - Percentual de germinação das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L^{-1} (a), 2 mg L^{-1} (b) e 4 mg L^{-1} (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem *biochar*

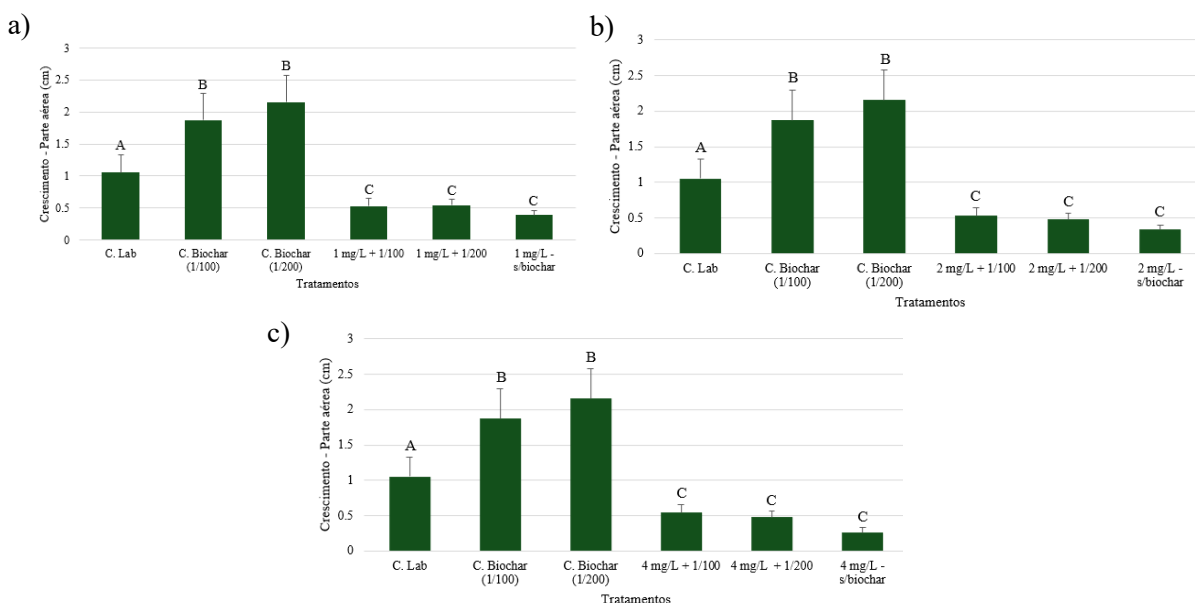


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Observando a Figura 13, verificou-se que para 1 mg L^{-1} , os controles e tratamentos com *biochar* nas proporções 1/100 e 1/200 (“C. biochar (1/100)” e “C. biochar (1/200)”) apresentaram percentuais de germinação superiores, variando de 90% a 100%. Em contrapartida, tratamentos contaminados com 2 mg L^{-1} e *biochar* (“ $2 \text{ mg L}^{-1} + 1/100$ ” e “ $2 \text{ mg L}^{-1} + 1/200$ ”) tiveram percentuais significativamente menores ($p < 0,05$). Para 4 mg L^{-1} , os percentuais de germinação variaram de 70% a 100%, com melhores resultados nos controles (“C. biochar (1/100)” e “C. biochar (1/200)”). Os tratamentos com maiores concentrações e *biochar* apresentaram percentuais em torno de 80%, enquanto sem *biochar* foram as menores, com cerca de 70%. A partir da análise dos dados, verificou-se que a presença de *biochar* melhorou o percentual de germinação, e concentrações mais altas de contaminantes sem o *biochar* reduziram a germinação.

A Figura 14 apresenta o crescimento da parte aérea da *E. sativa* após a exposição à água oriunda do experimento de sorção.

Figura 14 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L^{-1} (a), 2 mg L^{-1} (b) e 4 mg L^{-1} (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem *biochar*



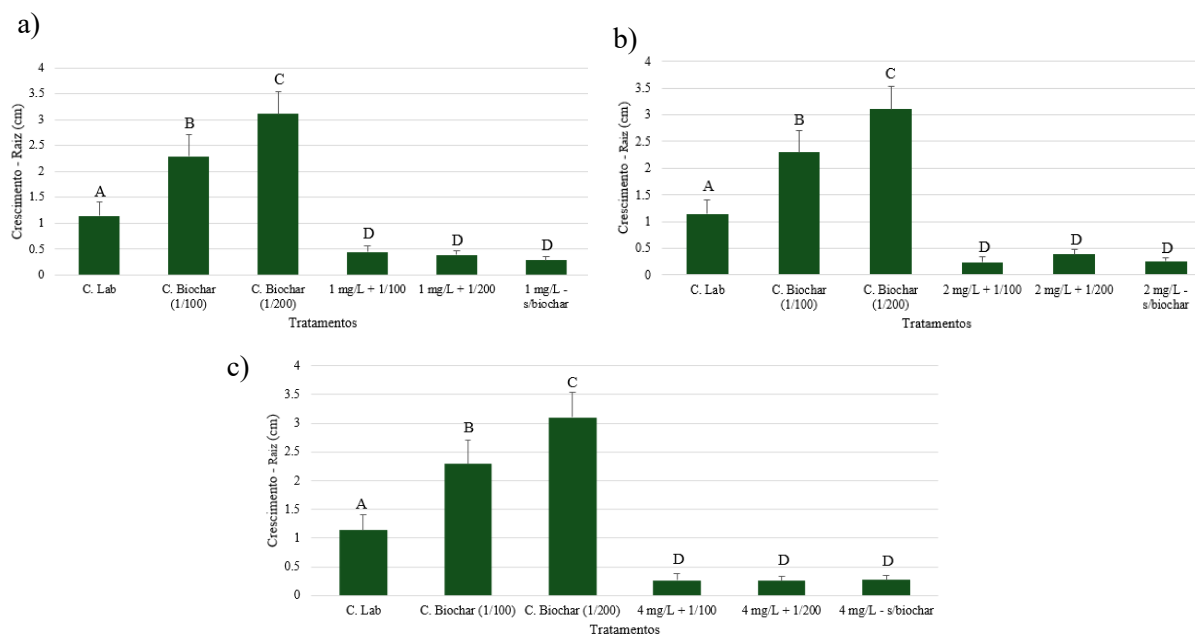
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Após análise da Figura 14, verificou-se que para todas as concentrações (1 , 2 e 4 mg L^{-1}), o controle laboratorial e o tratamento com *biochar* na ausência de agrotóxicos na proporção 1/100 (“C. Lab” e “C. Biochar (1/100)”) resultaram em crescimento de cerca de 1,0 e 1,5 cm, enquanto o tratamento com *biochar* na proporção 1/200 (“C. Biochar (1/200)”) apresentou o maior crescimento, aproximadamente 2,0 cm. Os tratamentos contaminados

mostraram crescimento significativamente menor, cerca de 0,5 cm. Esses resultados indicam que a adição de *biochar* melhorou significativamente o crescimento da parte aérea das sementes de *E. sativa*, para os tratamentos que não estavam contaminados, mas não foi capaz de adorver efetivamente o agrotóxico, uma vez que os níveis de toxicidade foram semelhantes para a condição do agrotóxico sem remediação (“s/ *biochar*”). Os tratamentos contaminados e que continham *biochar* demonstraram crescimento ligeiramente maior, mas não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

A Figura 15 apresenta o crescimento da raiz das sementes de *E. sativa* após exposição a diferentes concentrações de contaminantes (1, 2 e 4 mg L⁻¹) com ou sem *biochar*.

Figura 15 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de sorção com 1 mg L⁻¹ (a), 2 mg L⁻¹ (b) e 4 mg L⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem *biochar*



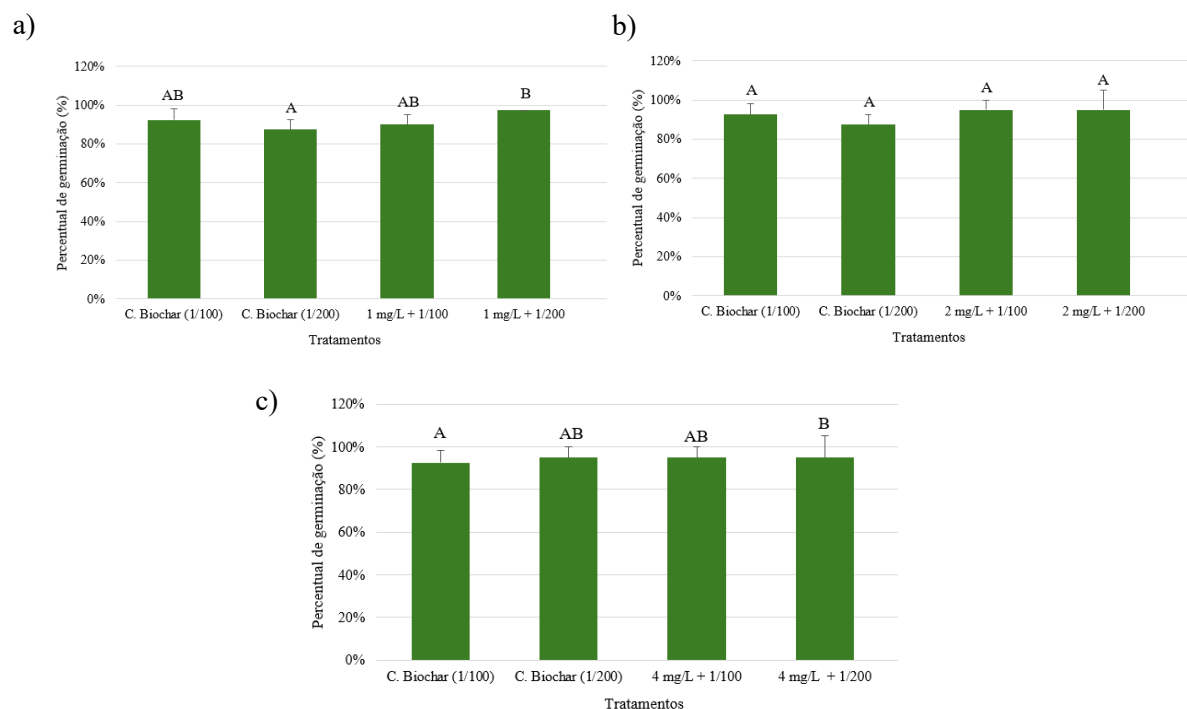
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Observando a Figura 15, verificou-se que todas as concentrações (1, 2 e 4 mg L⁻¹) apresentaram comportamento semelhantes, em que o controle laboratorial (“C. Lab”) cresceu aproximadamente 1,5 cm, o *biochar* (1/100) resultou em cerca de 2,0 cm, e o *biochar* (1/200) teve o maior crescimento, cerca de 2,5 cm. Tratamentos contaminados tiveram um crescimento de cerca de 0,5 cm. A adição de *biochar*, seguindo a tendência das respostas no crescimento da parte aérea, não foi suficiente para diminuir sua a toxicidade do 2,4-D para a espécie. Tais resultados demonstram que o crescimento da parte aérea e raiz são parâmetros mais sensíveis para indicar os níveis de toxicidade do 2,4-D, em comparação à germinação, e indicam que a

concentração de 2,4-D em solução permaneceu em níveis equiparáveis, em termos de toxicidade, à condição sem adição do *biochar*.

A Figura 16 apresenta o percentual de germinação das sementes da espécie *E. sativa* após a exposição à água do teste de dessorção.

Figura 16 - Percentual de germinação das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L⁻¹ (a), 2 mg L⁻¹ (b) e 4 mg L⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação

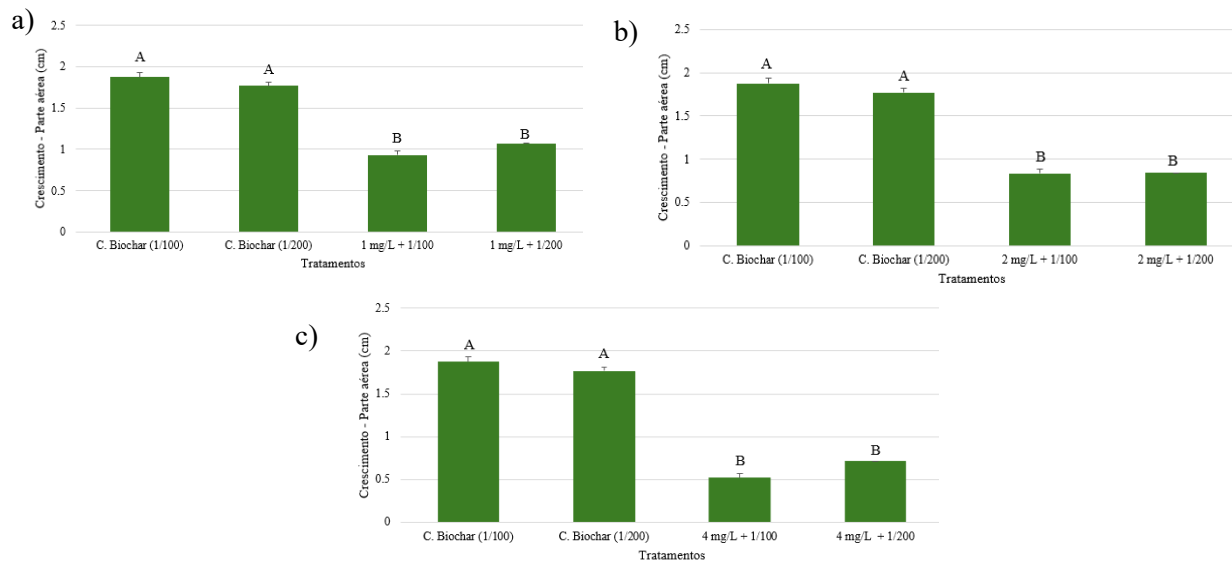


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da análise da Figura 16, tem-se que para 1 mg L⁻¹, “C. Biochar (1/100)” e “C. Biochar (1/200)” tiveram quase 100% de germinação, enquanto “1 mg L⁻¹ + 1/100” e “1 mg L⁻¹ + 1/200” apresentaram percentuais ligeiramente menores, cerca de 90% a 95%. Em 2 mg L⁻¹, todos os tratamentos mantiveram os percentuais de germinação entre 90% e 100%. Em 4 mg L⁻¹, “C. Biochar (1/100)” e “C. Biochar (1/200)” também tiveram cerca de 100% de germinação, enquanto “4 mg L⁻¹ + 1/100” e “4 mg L⁻¹ + 1/200” apresentaram percentuais um pouco menores, entre 90% e 95%. Os resultados sugerem que, mesmo após a contaminação, o *biochar* manteve altas percentuais de germinação, indicando que não houve liberação do contaminante em níveis que possam causar efeitos na germinação. No entanto, ressalta-se, como discutido para os experimentos de sorção, que a germinação é um parâmetro menos sensível para indicar a contaminação por 2,4-D nas concentrações testadas.

A Figura 17 apresenta o crescimento da parte aérea (cm) da *E. sativa* após a exposição à água do teste de dessorção. Observou-se que, em todas as concentrações testadas, os tratamentos com *biochar* nas duas proporções (1/100 e 1/200) resultaram em um crescimento significativamente maior das sementes em comparação com os tratamentos contaminados. Nos tratamentos com 1 mg L⁻¹, os crescimentos médios foram de aproximadamente 2,3 cm e 2,2 cm para as diluições 1/100 e 1/200 de *biochar*, respectivamente, enquanto os tratamentos contaminados resultaram em crescimentos de 1,2 cm e 1,0 cm. Um padrão similar foi observado nas concentrações de 2 mg L⁻¹ e 4 mg L⁻¹, com os tratamentos sem contaminação apresentando crescimentos maiores do que os tratamentos contaminados.

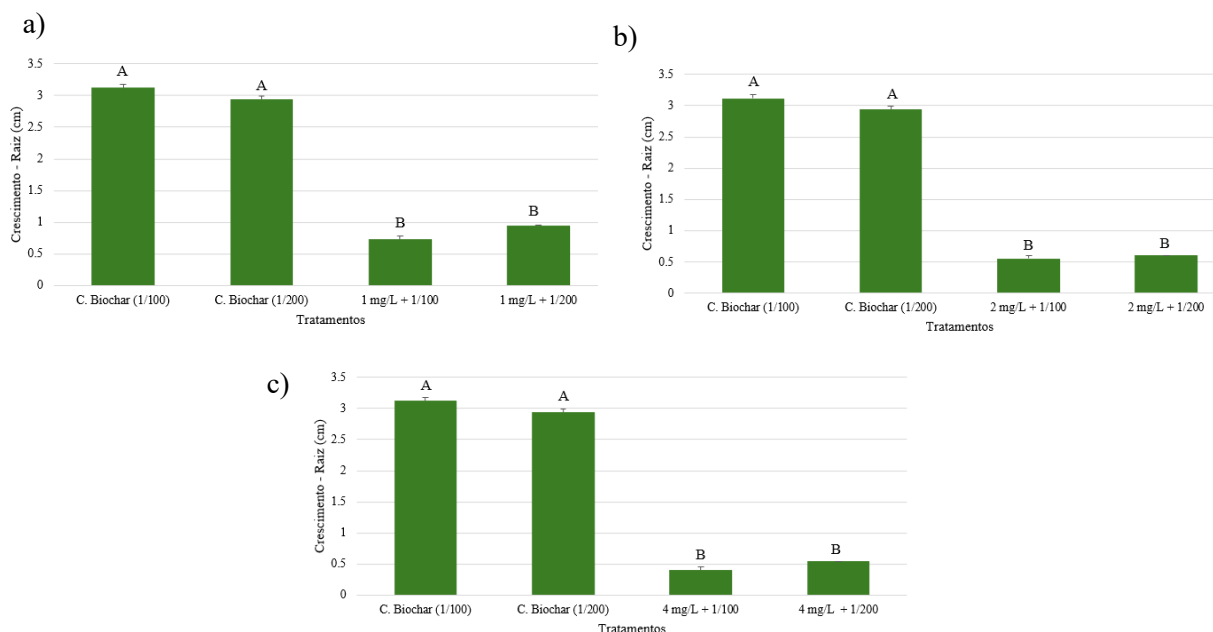
Figura 17 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L⁻¹ (a), 2 mg L⁻¹ (b) e 4 mg L⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Por fim, a Figura 18 apresenta o crescimento da raiz da *E. sativa* após a exposição à água oriunda do experimento de dessorção.

Figura 18 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água do teste de dessorção com 1 mg L⁻¹ (a), 2 mg L⁻¹ (b) e 4 mg L⁻¹ (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos com e sem contaminação



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Para todas as concentrações testadas (1, 2 e 4 mg L⁻¹), o crescimento das raízes foi de aproximadamente 3,3 cm e 3,0 cm com *biochar* (“C. Biochar (1/100)” e “C. Biochar (1/200)”), enquanto os tratamentos contaminados e que continham *biochar* resultaram em crescimentos por volta de 1,0 cm e 0,8 cm. Esses resultados indicaram que o *biochar* liberou parte do herbicida que foi adsorvido, reduzindo o crescimento das raízes de *E. sativa*. Os parâmetros ANOVA de duas vias referentes ao crescimento da raiz da *E. sativa* para teste de dessorção indicam diferenças estatisticamente significativas quanto a interação entre *biochar* e agrotóxico ($p > 0,5$). Conforme visto anteriormente, o herbicida, que foi adsorvido em quantidades reduzidas pelo *biochar*, foi liberado para a solução aquosa, sendo suficiente para causar toxicidade e reduzir o crescimento da raiz da espécie testada.

De forma geral, os percentuais de germinação e o crescimento da parte aérea e radicular foram superiores nos tratamentos controles com *biochar*, em comparação com os tratamentos contaminados. No entanto, a eficácia do *biochar* na sorção dos contaminantes foi limitada, como evidenciado pelos menores índices de crescimento observados em todas as concentrações de contaminantes (1, 2 e 4 mg L⁻¹). A análise estatística confirmou que a interação entre *biochar* e contaminantes afeta significativamente o crescimento radicular e da parte aérea da planta, sendo o efeito do agrotóxico predominantemente negativo.

Por outro lado, constatou-se que a baixa concentração de 2,4-D adsorvida pelo *biochar* foi suficiente para causar toxicidade por dessorção. Esse fato pode estar relacionado à baixa afinidade do 2,4-D com o carbono orgânico ($K_{oc} = 20$ a 280), além de possuir uma alta solubilidade em água ($23,2 \text{ g L}^{-1}$ a 22°C , pH 7), o qual aumenta seu potencial de transporte a ambientes aquáticos e diminuição de sua interação com o *biochar* (Barriuso *et al.* 1992; Boivin *et al.*, 2005; Dequattro; Karasov, 2016). Além disso, os resultados mostram que a presença de *biochar* não prejudicou o crescimento das plantas e, em alguns casos, promoveu melhorias nas medidas de crescimento. Em suma, o *biochar* revelou-se um fator positivo para o crescimento das sementes de *E. sativa* em condições não contaminadas.

5.2. Experimentos em coluna de solo

5.2.1. Análise Química

A quantificação química dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D nas amostras de água e solo foi feita de modo a confirmar a quantidade de agrotóxicos aplicada nas unidades experimentais, assim como, verificar a retenção desses contaminantes pela camada selante de *biochar*. Nas soluções-estoque, a concentração de fipronil foi $0,856 \text{ mg L}^{-1}$ e 2,4-D $15,6 \text{ mg L}^{-1}$, relativo à concentração prevista de $2,4 \text{ mg L}^{-1}$ e 14 mg L^{-1} , respectivamente (Tabela 6). Nesse sentido, verificou-se que a concentração de 2,4-D, ao início dos experimentos, foi superior à esperada, diferentemente do fipronil, que apresentou valores abaixo do previsto (2,8 vezes menor). Destaca-se que estudos realizados com tais agrotóxicos (Pinto *et al.*, 2023) também já apresentaram divergências durante a análise química usando as mesmas formulações e lotes que o presente estudo, atribuindo esses resultados a divergências na composição das formulações, entretanto os resultados continuaram satisfatórios.

Tabela 6 - Análise química das amostras de água, provenientes da simulação de chuva, com os valores ($\mu\text{g L}^{-1}$) de 2,4-D e fipronil

| Chuva | Conteúdo | 2,4-D ($\mu\text{g L}^{-1}$) | Fipronil ($\mu\text{g L}^{-1}$) |
|-------|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | Controle com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Controle sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | 2,4-D com <i>biochar</i> | 8,8 | <LQ |
| | 2,4-D sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| 2 | Controle com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Controle sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | 2,4-D com <i>biochar</i> | 381,1 | <LQ |
| | 2,4-D sem <i>biochar</i> | 835,4 | <LQ |
| 3 | Controle com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Controle sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | 2,4-D com <i>biochar</i> | 717,4 | <LQ |
| | 2,4-D sem <i>biochar</i> | 3345,5 | <LQ |

Legenda: <LQ = Abaixo do limite de quantificação ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para fipronil e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para 2,4-D).

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Com tais valores, observou-se o gradativo aumento da concentração do 2,4-D na água, sobretudo na terceira chuva e nas amostras que não continham a camada selante de *biochar*, quando comparado ao fipronil, que esteve presente no solo e não foi detectado nas amostras de água (Tabela 6 e Tabela 7). Esse fato pode estar relacionado à baixa afinidade do 2,4-D com as partículas orgânicas do solo, além da sua baixa sorção demonstrada no tópico anterior, o qual aumenta seu potencial de transporte a ambientes aquáticos (Barriuso *et al.* 1992; Boivin *et al.*, 2005; Dequattro; Karasov, 2016). Por outro lado, o fipronil tem alta afinidade com a matéria orgânica e, portanto, maior tendência em ficar aderido ao solo e a camada selante de *biochar*, além de uma menor solubilidade em água (Mize *et al.*, 2008; Ying; Kookana, 2001).

Além disso, verificou-se a influência da camada selante de *biochar*, principalmente nas amostras contaminadas com 2,4-D, devido à retenção do agrotóxico e à diminuição da concentração – 4 vezes menor na terceira chuva ($717,4 \mu\text{g L}^{-1}$) - do 2,4-D em comparação com as amostras que não continham a camada selante. Como o herbicida não foi detectado no solo, infere-se que o material carbonáceo adsorveu o 2,4-D, provocando as diminuições apontadas. A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos após o fim do experimento.

Tabela 7 - Análise química das amostras de solo no final do experimento após a simulação das três chuvas ,com os valores ($\mu\text{g kg}^{-1}$) de 2,4-D e fipronil

| Posição | Conteúdo | 2,4-D ($\mu\text{g kg}^{-1}$) | Fipronil ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|------------|-----------------------------|---------------------------------|------------------------------------|
| Superfície | Controle sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Controle com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil sem <i>biochar</i> | <LQ | 359,6 |
| | Fipronil com <i>biochar</i> | <LQ | 712,8 |
| | 2,4-D com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | 2,4-D sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| Fundo | Controle sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Controle com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | Fipronil sem <i>biochar</i> | <LQ | 2,2 |
| | Fipronil com <i>biochar</i> | <LQ | 1,5 |
| | 2,4-D com <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |
| | 2,4-D sem <i>biochar</i> | <LQ | <LQ |

*Legenda: <LQ = Abaixo do limite de quantificação ($0,05 \mu\text{g L}^{-1}$ para fipronil e $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ para 2,4-D).

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Analisando a Tabela 7, verificou-se maior concentração de fipronil ($712,8 \mu\text{g kg}^{-1}$) na superfície do solo que continha a camada selante de *biochar*, em comparação a amostra de solo sem a camada ($359,6 \mu\text{g kg}^{-1}$). Ao fundo da amostra de solo, constatou-se a menor presença do agrotóxico na amostra que continha a camada selante de *biochar* ($1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$). Desse modo, pode-se verificar a influência da camada e sua capacidade de sorção dos agrotóxicos e remediação do solo.

5.2.2. Testes de toxicidade com a água percolada

5.2.2.1. *Ceriodaphnia silvestrii*

Os testes com *C. silvestrii* foram conduzidos com as amostras de água percolada pelos tratamentos com fipronil, entretanto as amostras foram tóxicas para a espécie mesmo na água percolada pelo solo controle e o teste não foi validado. A Tabela 8 contém a porcentagem de mobilidade média da espécie nas três chuvas simuladas.

Tabela 8 - Porcentagem média de organismos da espécie *C. silvestrii* que apresentaram mobilidade após exposição (48 h) a amostras de água percolada nas três chuvas

| Chuva | Amostra | Taxa de sobrevivência (%) |
|-------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | Controle – Laboratório | 100,0 ± 0 |
| | Controle | 0,0 ± 0 |
| | Controle + <i>biochar</i> | 60,0 ± 31,6 |
| | Fipronil | 26,7 ± 40 |
| | Fipronil + <i>biochar</i> | 57,7 ± 44,1 |
| 2 | Controle – Laboratório | 100,0 ± 0 |
| | Controle | 4,4 ± 8,8 |
| | Controle + <i>biochar</i> | 66,7 ± 31,6 |
| | Fipronil | 66,7 ± 17,3 |
| | Fipronil + <i>biochar</i> | 84,4 ± 19,4 |
| 3 | Controle – Laboratório | 100,0 ± 0 |
| | Controle | 82,2 ± 21,1 |
| | Controle + <i>biochar</i> | 80,0 ± 26,5 |
| | Fipronil | 51,1 ± 38,9 |
| | Fipronil + <i>biochar</i> | 75,5 ± 27,9 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Apesar do cultivo ter sido considerado saudável (“Controle – Laboratório”), as amostras “Controle” permaneceram tóxicas para a espécie, sobretudo nas chuvas 1 e 2, com taxa de sobrevivência igual a 4,4%. Tais resultados foram associados à composição natural do solo estudado. Entretanto, pode-se constatar uma melhora na taxa de sobrevivência em todas as amostras que continham a camada selante de *biochar* (“Controle + Biochar” e “Fipronil + Biochar”), principalmente nas chuvas 2 e 3, quando comparadas às amostras sem a camada (“Controle” e “Fipronil”). Para uma análise mais aprofundada, tem-se a (Tabela 9, Tabela 10, Tabela 11) que demonstram os parâmetros da água da primeira, segunda e terceira chuvas.

Tabela 9 - Parâmetros da água percolada da primeira chuva pelos tratamentos com fipronil

| Amostra | Réplica | pH | Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹) | Condutividade Elétrica (μS cm ⁻¹) |
|---------------------------|---------|------|--|--|
| Controle – Laboratório | - | 7,48 | 6,15 | 248 |
| Controle | 1 | 5,29 | 4,97 | 521 |
| | 2 | 4,93 | 5,92 | 832 |
| | 3 | 4,96 | 5,85 | 898 |
| Controle + <i>biochar</i> | 1 | 7,15 | 2,25 | 831 |
| | 2 | 5,18 | 5,11 | 521 |
| | 3 | 7,26 | 4,75 | 557 |
| Fipronil | 1 | 5,18 | 6,02 | 741 |
| | 2 | 7,12 | 4,68 | 377 |
| | 3 | 5,05 | 5,95 | 637 |
| Fipronil + <i>biochar</i> | 1 | 7,29 | 4,24 | 545 |
| | 2 | 7,28 | 4,29 | 506 |
| | 3 | 6,42 | 2,52 | 746 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 10 - Parâmetros da água percolada da segunda chuva pelos tratamentos com fipronil

| Amostra | Réplica | pH | Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹) | Condutividade Elétrica (μS cm ⁻¹) |
|---------------------------|---------|------|--|--|
| Controle – Laboratório | - | 7,49 | 6,42 | 192 |
| Controle | 1 | 7,22 | 4,15 | 568 |
| | 2 | 6,09 | 5,08 | 588 |
| | 3 | 6,33 | 5,32 | 408 |
| Controle + <i>biochar</i> | 1 | 7,46 | 5,37 | 346 |
| | 2 | 5,69 | 5,86 | 341 |
| | 3 | 7,04 | 5,79 | 293 |
| Fipronil | 1 | 7,27 | 5,23 | 442 |
| | 2 | 7,19 | 5,43 | 295 |
| | 3 | 7,11 | 5,44 | 275 |
| Fipronil + <i>biochar</i> | 1 | 6,83 | 5,42 | 384 |
| | 2 | 6,98 | 5,63 | 386 |
| | 3 | 6,71 | 5,88 | 421 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 11 - Parâmetros da água percolada da terceira chuva pelos tratamentos com fipronil

| Amostra | Réplica | pH | Oxigênio Dissolvido (mg L ⁻¹) | Condutividade Elétrica (μS cm ⁻¹) |
|---------------------------|---------|------|--|--|
| Controle – Laboratório | - | 7,52 | 6,86 | 174 |
| Controle | 1 | 7,32 | 4,65 | 437 |
| | 2 | 7,32 | 4,13 | 508 |
| | 3 | 7,28 | 2,31 | 489 |
| Controle + <i>biochar</i> | 1 | 7,60 | 5,48 | 335 |
| | 2 | 5,45 | 6,02 | 272 |
| | 3 | 7,05 | 5,72 | 289 |
| Fipronil | 1 | 7,53 | 5,83 | 364 |
| | 2 | 7,23 | 6,13 | 253 |
| | 3 | 7,06 | 6,29 | 225 |
| Fipronil + <i>biochar</i> | 1 | 7,39 | 5,78 | 343 |
| | 2 | 7,36 | 5,89 | 325 |
| | 3 | 7,42 | 4,81 | 350 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Observando os parâmetros da primeira chuva, verificou-se um baixo pH (valores próximos de 5) e alta condutividade elétrica (em torno de 800 μS cm⁻¹) do tratamento “Controle”, cujas amostras foram consideradas tóxicas, quando comparado aos tratamentos que possuem a camada selante de *biochar* (“Controle + Biochar” e “Fipronil + Biochar”), que mostraram pH próximo de 7 e condutividade elétrica em torno de 300 μS cm⁻¹. Dessa forma, é possível indicar que houve uma melhoria do pH da água, próximo à condição da água de cultivo, além de uma redução da carga iônica da água percolada. Estudos realizados em mesocosmos construídos na fazenda experimental onde o solo foi coletado (APTA, Brotas), que receberam uma camada de sedimento consistindo no mesmo solo (Freitas *et al.*, 2023), verificaram a alta taxa de concentração de metais, principalmente o alumínio, característico de solos de Cerrado, além de níquel, zinco e cobre, oriundos do sedimento e água de escoamento. A solubilidade e a mobilidade do alumínio pela água são influenciados pelo pH, especialmente em formas monoméricas e inorgânicas, com o aumento da disponibilidade (solubilidade) em menores valores de pH (Fakhraei e Driscoll, 2015). Portanto, a ecotoxicidade observada pode ser atribuída à composição química natural do solo, que pode ter favorecido a dissolução de metais na água, principalmente o alumínio, além de outros íons.

Quanto à segunda chuva, pode-se verificar uma melhora nos parâmetros e estabilização dos valores de pH (próximos de 7) e da condutividade elétrica (em torno de 500 μS cm⁻¹), em comparação com a primeira chuva, sobretudo nos tratamentos que continham a camada selante de *biochar*. Quanto à análise química, as concentrações de fipronil, para a segunda chuva,

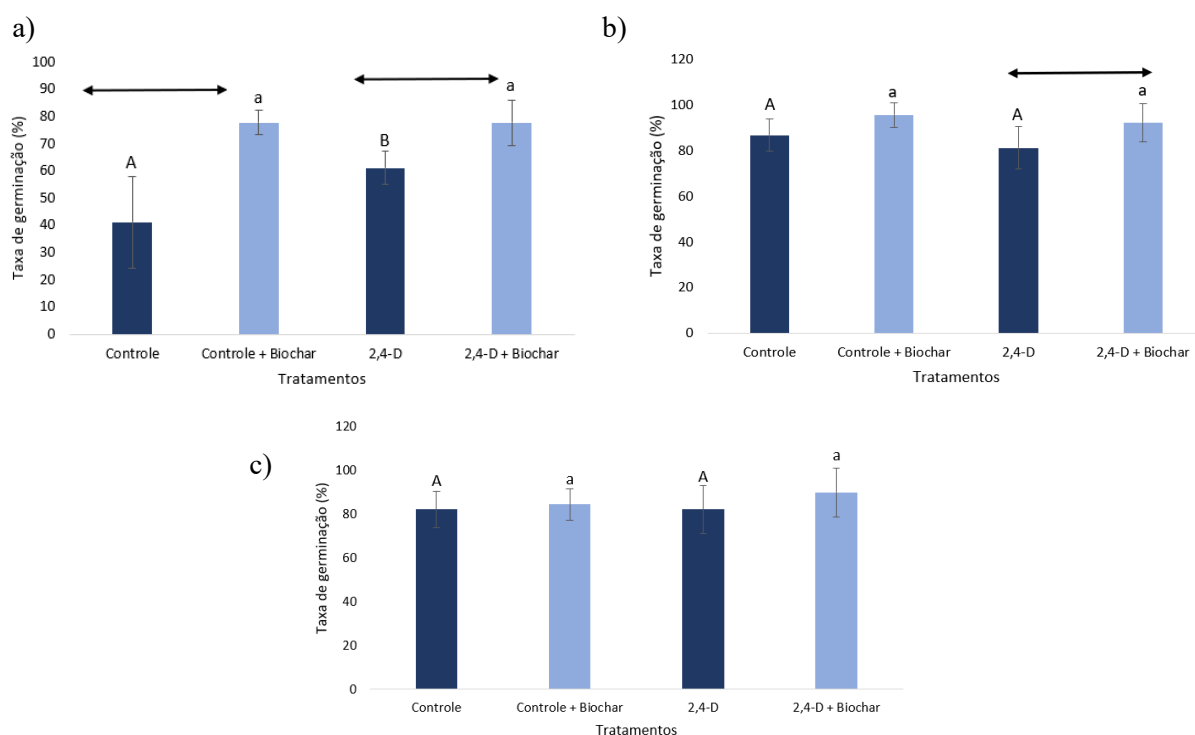
estavam abaixo do LQ ($< 0,05 \mu\text{g L}^{-1}$), portanto a toxicidade observada pode ser atribuída, ainda, à lixiviação de compostos do solo.

Ao final da terceira chuva, o pH do “Controle” estabilizou-se e permaneceu próximo de 7. Entretanto, a sobrevivência dos organismos continuou sendo afetada, apesar de haver um aumento substancial em comparação às chuvas anteriores. A condutividade elétrica e o oxigênio dissolvido dos tratamentos que continham a camada selante (“Controle + Biochar” e “Fipronil + Biochar”) também se estabilizaram e não tiveram alterações em relação à segunda chuva. Destaca-se que outras espécies de Cladocera (*Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia*), as quais também estavam disponíveis no laboratório, foram testadas, mas as amostras permaneceram tóxicas. Portanto, não foi possível dar continuidade aos experimentos.

5.2.2.2. *Eruca sativa*

Para a espécie *E. sativa* foram feitos experimentos de germinação e alongamento de raiz e parte aérea, referentes às chuvas 1, 2 e 3. A Figura 19 apresenta a taxa de germinação das sementes após a exposição à água das chuvas.

Figura 19 - Taxa de germinação (percentual) das sementes de *E. sativa* após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem *biochar* (letras maiúsculas) e com a camada selante de *biochar* (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de *biochar*

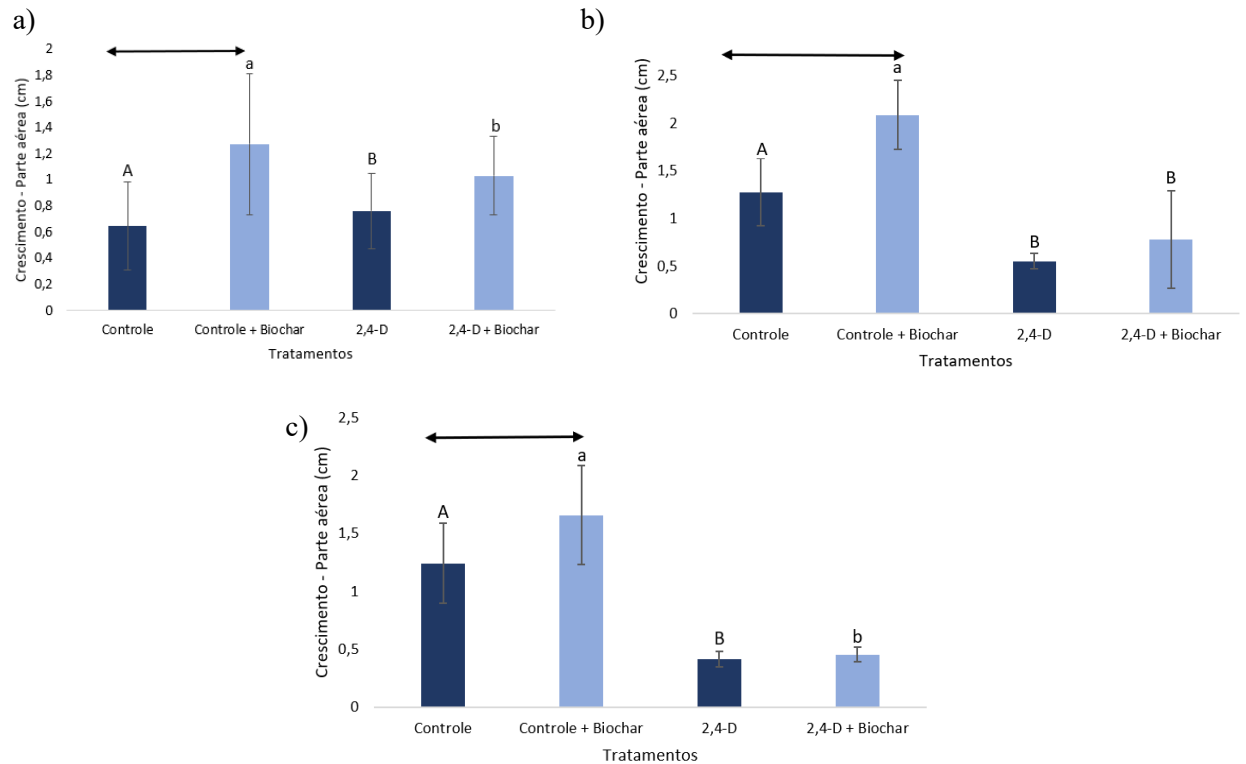


Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da análise dos gráficos, verifica-se uma diferença na taxa de germinação para as chuvas 1 e 2 entre os tratamentos ‘2,4-D’ e ‘2,4-D + Biochar’ ($p < 0,05$), isto é, o *biochar* aumentou a taxa de germinação das sementes expostas a água da chuva contaminada por 2,4-D em comparação ao mesmo tratamento sem a camada selante de *biochar*. Além disso, foram observadas diferenças entre os tratamentos ‘Controle’ e ‘Controle + Biochar’ ($p < 0,05$) na chuva 1, demonstrando melhoria nas propriedades da água que propiciam um maior crescimento das plantas irrigadas com água percolada pela camada selante de *biochar*. Aumentos no pH da água da chuva 1 no ‘Controle + Biochar’ (6,5) foram observados em relação ao ‘Controle’ (5,1) como observado na Tabela 9. Quanto à taxa de germinação da chuva 3, não foram detectadas diferenças entre nenhum dos tratamentos ($p > 0,05$).

A Figura 20 apresenta o crescimento da parte aérea da *E. sativa* após a exposição à água das 3 chuvas. Todos os gráficos demonstraram diferenças entre os tratamentos ‘Controle’ e ‘Controle + Biochar’ ($p < 0,05$), indicando melhoria nas propriedades da água em comparação ao tratamento sem a camada selante de *biochar*. Além disso, o crescimento da parte aérea nos tratamentos com 2,4-D foi menor que os controles, indicando toxicidade do herbicida para a espécie. Embora não tenha sido estatisticamente significativo ($p > 0,05$), o tratamento ‘2,4-D + Biochar’, nas chuvas 1 e 2, apresentou crescimento ligeiramente maior da parte aérea. Conforme confirmado pelas análises químicas (Tabela 6), houve uma redução na quantidade de agrotóxicos nesse grupo em relação ao mesmo tratamento sem o *biochar* na chuva 2. Para a chuva 1, mesmo que o 2,4-D tenha sido quantificado apenas no ‘2,4-D + Biochar’, as melhorias nas condições da água percolada propiciaram um aumento no crescimento das plantas, como visto para o controle.

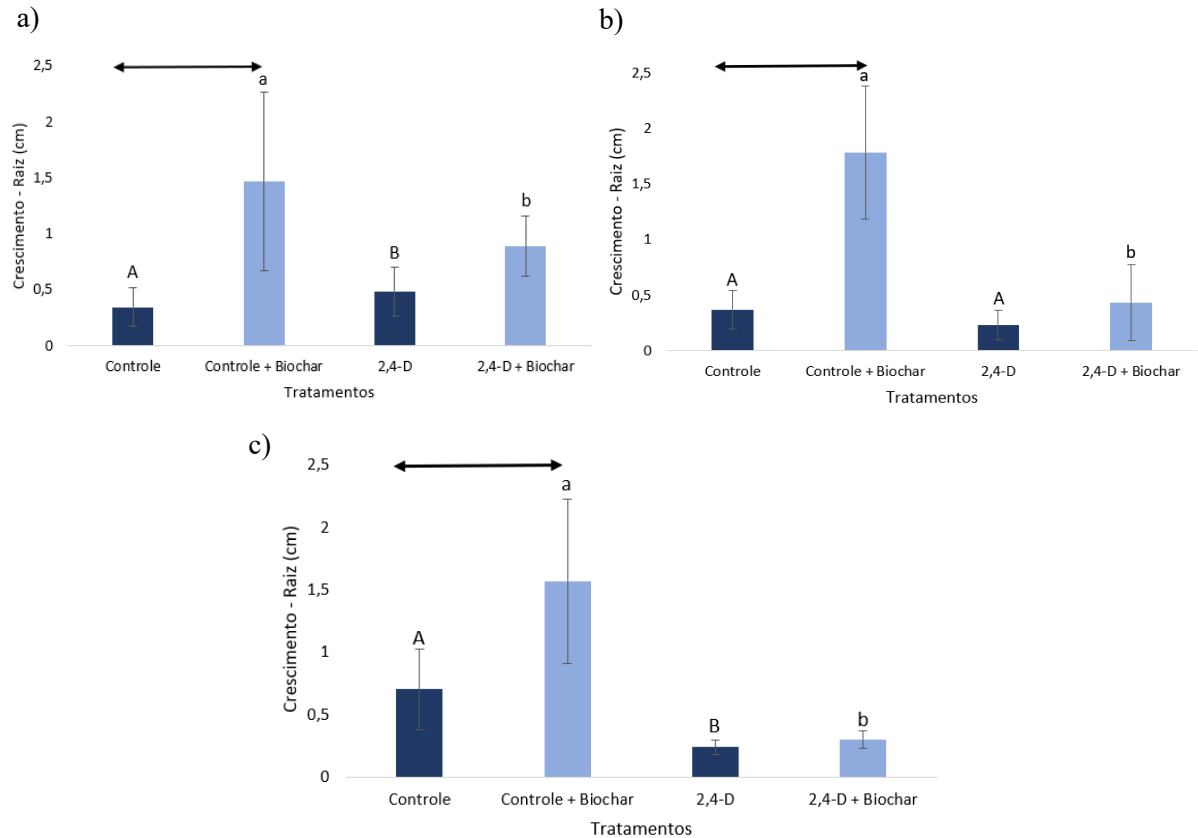
Figura 20 - Crescimento da parte aérea (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem *biochar* (letras maiúsculas) e com a camada selante de *biochar* (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de *biochar*



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A Figura 21 mostra o crescimento da raiz da *E. sativa* após a exposição à água das 3 chuvas. Todos os gráficos demonstraram diferenças entre os tratamentos ‘Controle’ e ‘Controle + Biochar’ ($p < 0,05$), os quais indicaram que o *biochar* contribuiu para o crescimento das raízes, de forma semelhante ao observado para o alongamento da parte aérea. Embora não tenham sido detectadas diferenças ($p > 0,05$), o tratamento ‘2,4-D + Biochar’, nas chuvas 1 e 2, apresentou crescimento ligeiramente maior da raiz.

Figura 21 - Crescimento da raiz (cm) das sementes de *E. sativa* após exposição à água da chuva 1 (a), chuva 2 (b) e chuva 3 (c). Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos sem *biochar* (letras maiúsculas) e com a camada selante de *biochar* (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento (controle ou 2,4-D) para as duas condições de tratamento de *biochar*



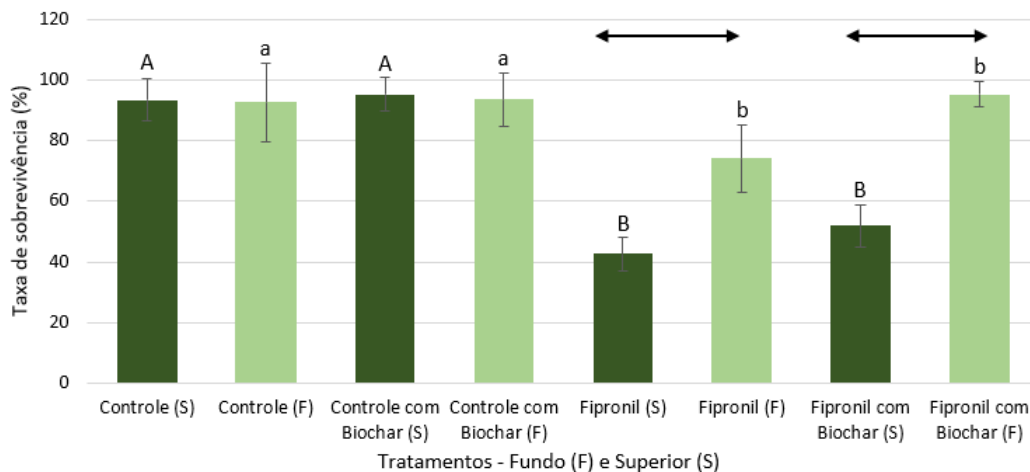
Fonte: Elaborado pela autora (2025)

5.2.3. Testes de toxicidade com solo

5.2.3.1. *Proisotoma minuta*

Para a espécie *P. minuta*, foram feitos experimentos de sobrevivência e reprodução, utilizando as amostras de solo coletadas na superfície e no fundo dos simuladores, considerando os tratamentos com fipronil, com duração de 28 dias. A Figura 22 apresenta a taxa de sobrevivência da espécie ao final do experimento.

Figura 22 - Sobrevivência (%) da *P. minuta* após 28 dias de exposição ao solo oriundo dos experimentos com fipronil. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento em diferentes posições (superior ou fundo)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da observação do gráfico e comparação com os valores obtidos, verificou-se diferenças entre os tratamentos “Fipronil” na região superficial e ao fundo ($p < 0,05$), demonstrando maior sobrevivência dos organismos expostos ao solo da parte inferior do tratamento. Além disso, observou-se diferenças entre os tratamentos “Fipronil com Biochar” na parte superior e inferior ($p < 0,05$), também apresentando maior sobrevivência para as amostras de fundo do tratamento. Conforme confirmado pelas análises químicas, houve uma maior retenção desse agrotóxico na superfície do solo (Tabela 7). Pode-se inferir que houve influência da camada selante de *biochar*, devido a melhorias observadas na taxa de sobrevivência da espécie em estudo, caracterizada pelo aumento da sobrevivência nas amostras de fundo do tratamento “Fipronil com Biochar” (concentração de $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ de fipronil) em relação ao tratamento “Fipronil” ($2,2 \mu\text{g kg}^{-1}$), apesar de não estatisticamente significativa. Quanto aos tratamentos “Controle” e “Controle com Biochar”, em ambas as posições, não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$), indicando que a posição das amostras de solo (superfície e fundo), assim como a presença da camada de *biochar*, não influenciam na toxicidade aos organismos.

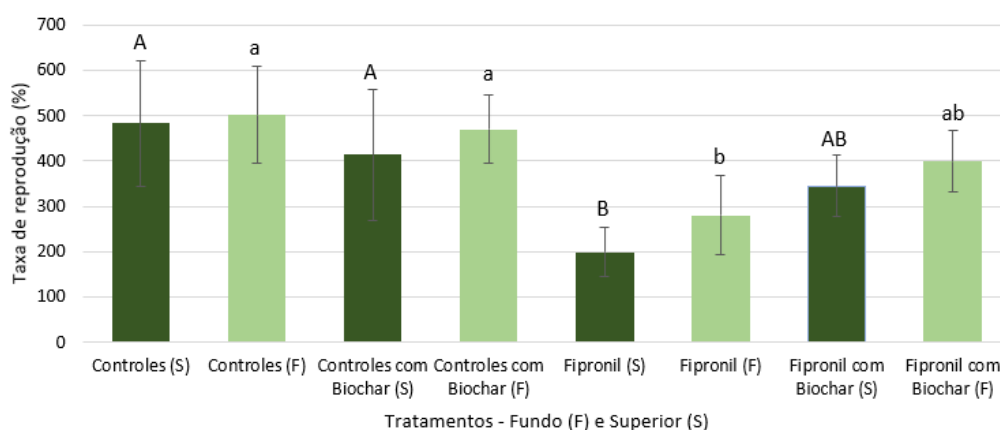
A Tabela 12 demonstra, de forma sintetizada, os resultados da ANOVA de três vias referentes à sobrevivência da espécie *P. minuta*. Com tais valores, é possível confirmar que a posição e presença do inseticida e do *biochar* influenciam a sobrevivência da espécie. Além disso, houve uma interação entre os parâmetros agrotóxicos e posição, isto é, a região onde o solo foi coletado (superfície/fundo) influenciou a toxicidade do fipronil.

Tabela 12 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à sobrevivência da espécie *P. minuta*

| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|------------------------|-------------------|----|----------------|--------|--------|
| Posição | 80,22 | 1 | 80,22 | 23,456 | <0,001 |
| <i>biochar</i> | 16,06 | 1 | 16,06 | 4,694 | 0,034 |
| Agrotóxico | 193,39 | 1 | 193,39 | 56,544 | <0,001 |
| Bio + Agro | 10,89 | 1 | 10,89 | 3,184 | 0,079 |
| Posic + Agro | 93,39 | 1 | 93,39 | 27,306 | <0,001 |
| Posic + <i>biochar</i> | 2,72 | 1 | 2,72 | 0,796 | 0,376 |
| Posic + Bio + Agro | 3,56 | 1 | 3,56 | 1,040 | 0,312 |
| Resíduos | 218,89 | 64 | 3,42 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quanto a quantidade de juvenis produzidos, tem-se a Figura 23, que demonstra a reprodução da espécie *P. minuta*.

Figura 23 - Reprodução (%) da espécie *P. minuta*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da análise do gráfico, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) quanto à mudança de posição (superfície ou fundo) dos tratamentos, confirmada pelo parâmetro posição na ANOVA de três vias. Entretanto observou-se consideráveis diferenças na presença da camada selante de *biochar*, sobretudo nos tratamentos que possuem agrotóxicos, confirmadas pela interação significativa entre os parâmetros *biochar* e agrotóxico (Tabela 13). Dessa forma, é possível indicar que os tratamentos que receberam a camada de *biochar* tiveram maior reprodução, independentemente da posição de coleta das amostras de solo. No entanto, devido à variabilidade das réplicas, essas diferenças não foram evidenciadas pelo teste posterior Tukey, conforme apresentado na Tabela 13.

Tabela 13 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à reprodução da espécie *P. minuta*

| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|----------|--------|
| Agrotóxico | 471259 | 1 | 471259 | 28,40062 | <0.001 |
| <i>biochar</i> | 30546 | 1 | 30546 | 1,84085 | 0,180 |
| Posição | 50192 | 1 | 50192 | 3,02482 | 0,087 |
| Agro + Bio | 152812 | 1 | 152812 | 9,20931 | 0,003 |
| Agro + Posic | 4095 | 1 | 4095 | 0,24679 | 0,621 |
| Bio + Posic | 159 | 1 | 159 | 0,00958 | 0,922 |
| Agro + Bio + Posic | 4851 | 1 | 4851 | 0,29236 | 0,591 |
| Resíduos | 1,06e+6 | 64 | 16593 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Além disso, o pH do solo foi analisado em laboratório, a fim de obter uma análise mais crítica da sobrevivência e reprodução da *P. minuta*. Observando a Tabela 14, foi possível inferir que o pH permaneceu menor mesmo com a presença da camada selante de *biochar*, em que se esperava um aumento, conforme descrito por SEABRA *et al.* (2019). Logo, presume-se que a diminuição da reprodução ou sobrevivência da espécie em estudo não foi influenciada por esse parâmetro.

Tabela 14 - pH analisado nas triplicatas de solo

| Posição | Amostra | 1 | 2 | 3 |
|------------|---------------------------|------|------|------|
| Superfície | Controle | 4,58 | 4,68 | 4,63 |
| | Controle + <i>biochar</i> | 4,44 | 4,38 | 4,68 |
| | Fipronil | 4,72 | 4,59 | 4,62 |
| | Fipronil + <i>biochar</i> | 4,42 | 4,45 | 4,48 |
| Fundo | Controle | 4,62 | 4,67 | 4,74 |
| | Controle + <i>biochar</i> | 4,78 | 4,64 | 4,77 |
| | Fipronil | 4,64 | 4,54 | 4,62 |
| | Fipronil + <i>biochar</i> | 4,77 | 4,82 | 4,74 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

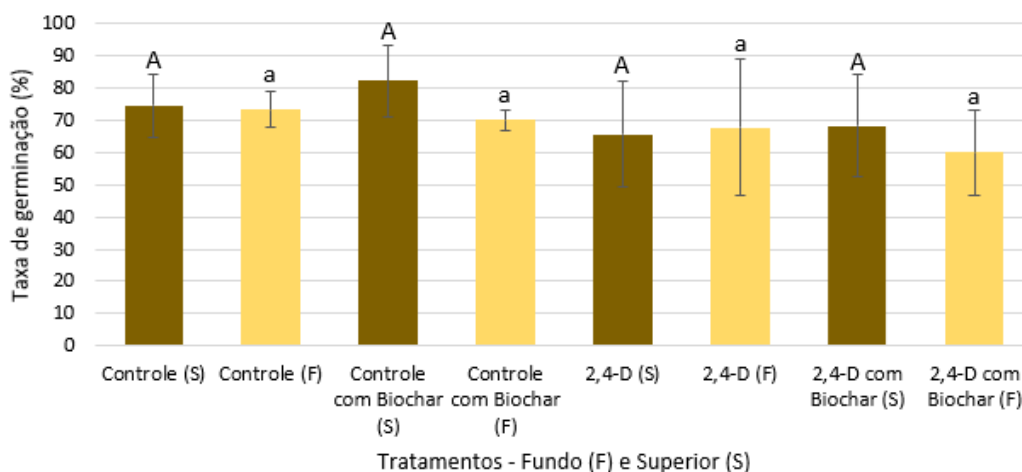
5.2.3.2. Espécies vegetais

Para os testes de toxicidade com as espécies *A. cepa* e *E. sativa*, considerou-se a germinação das sementes e o crescimento das plantas, nos tratamentos controle e com 2,4-D. Ao final dos experimentos, foi determinada a emergência, comprimento da parte aérea e das raízes e biomassa (fresca e seca).

5.2.3.2.1. Germinação

A Figura 24 retrata a taxa de germinação da espécie *E. sativa* após exposição as amostras de solo provenientes dos tratamentos contaminados pelo herbicida.

Figura 24 - Taxa de germinação (%) da espécie *E. sativa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Observando o gráfico e seus valores correspondentes, assim como os parâmetros gerais da análise de variância, verificou-se que não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) em nenhum tratamento (Figura 24, Tabela 15). Ou seja, a posição, a camada selante de *biochar* e presença de agrotóxicos não influenciaram na germinação de *E. sativa*.

Tabela 15 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à germinação da espécie *E. sativa*

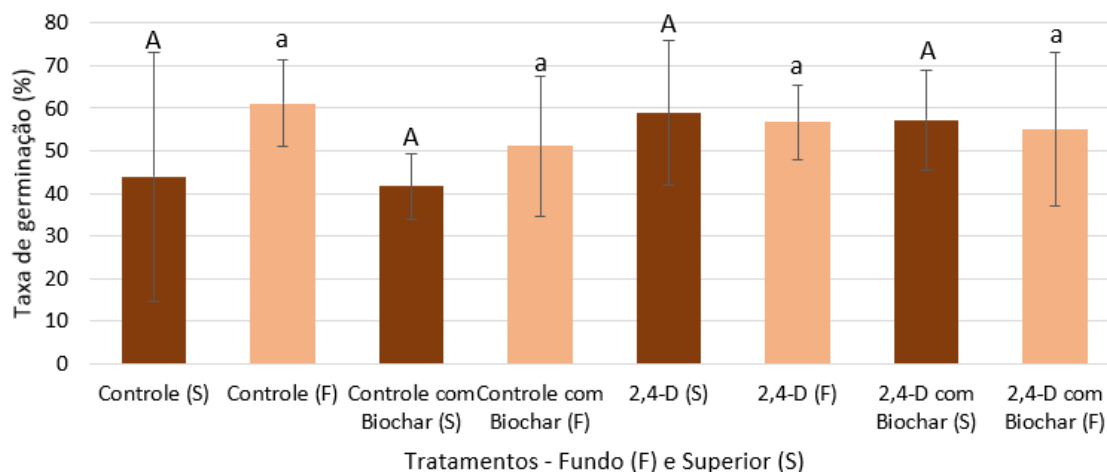
| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|---------|-------|
| Agrotóxico | 12,05556 | 1 | 12,05556 | 3,76504 | 0,057 |
| <i>biochar</i> | 0,03098 | 1 | 0,03098 | 0,00967 | 0,922 |
| Posição | 3,62545 | 1 | 3,62545 | 1,13226 | 0,292 |
| Agro + Bio | 0,31362 | 1 | 0,31362 | 0,09795 | 0,755 |
| Agro + Posic | 0,38940 | 1 | 0,38940 | 0,12161 | 0,729 |
| Bio + Posic | 4,52867 | 1 | 4,52867 | 1,41434 | 0,239 |
| Agro + Bio + Posic | 0,00230 | 1 | 0,00230 | 7,20e-4 | 0,979 |
| Resíduos | 185,71429 | 58 | 3,20197 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A Figura 25 retrata a germinação da espécie *A. cepa*. Observando o gráfico e seus valores correspondentes, assim como a germinação da espécie *E. sativa*, não houve diferenças

estatisticamente significantes ($p > 0,05$) em nenhum tratamento. Ou seja, a posição, camada selante de *biochar* e presença de agrotóxicos também não influenciaram na germinação da *E. sativa* (Tabela 16).

Figura 25 - Taxa de germinação (%) da espécie *A. cepa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 16 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à germinação da espécie *A. cepa*

| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|---------|-------|
| Agrotóxico | 7,5132 | 1 | 7,5132 | 1,95757 | 0,167 |
| Biochar | 3,6622 | 1 | 3,6622 | 0,95419 | 0,33 |
| Posição | 4,2461 | 1 | 4,2461 | 1,10632 | 0,298 |
| Agro + Bio | 1,9263 | 1 | 1,9263 | 0,50190 | 0,482 |
| Agro + Posic | 4,9073 | 1 | 4,9073 | 1,27860 | 0,263 |
| Bio + Posic | 0,0251 | 1 | 0,0251 | 1,27860 | 0,936 |
| Agro + Bio + Posic | 0,7567 | 1 | 0,7567 | 0,19715 | 0,659 |
| Resíduos | 207,2540 | 54 | 3,8380 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

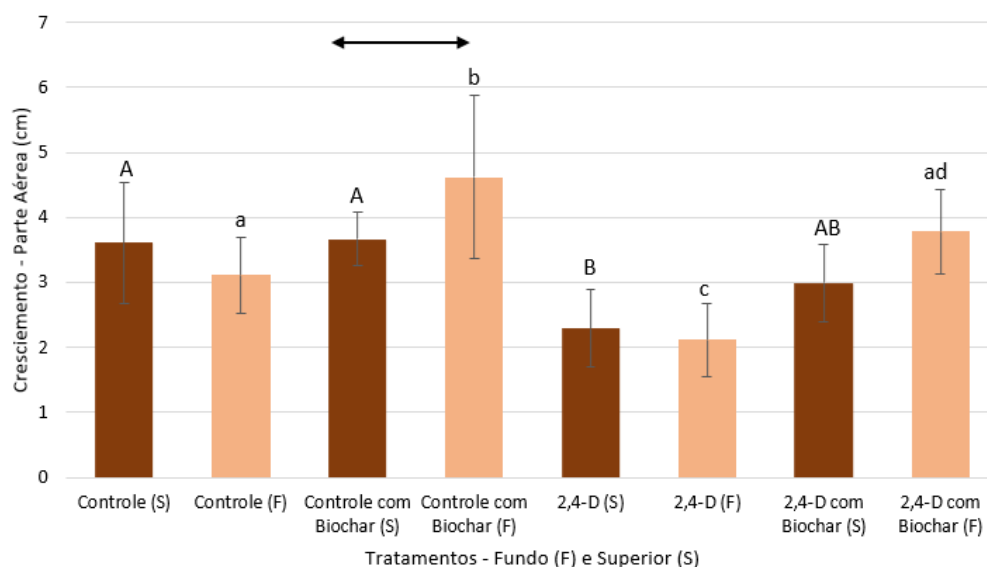
Como os níveis de 2,4-D foram reduzidos, ou seja, abaixo do LQ ($< 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), a ausência de efeito pode estar atribuída a baixa concentração ou ausência do herbicida, visto que Triques *et al.* (2021) fizeram testes com a espécie *A. cepa* e, quando expostas ao 2,4-D, essa apresentou efeitos severos. De acordo com Song (2014), embora as espécies de monocotiledôneas sejam, geralmente, resistentes a herbicidas auxínicos, elas são afetadas pelo 2,4-D em estágios de desenvolvimento, como a rápida divisão celular, por exemplo, perfilhamento, ou durante condições de crescimento rápido, que são típicos de germinação e estágios iniciais de crescimento. Em baixas concentrações, o crescimento das células vegetais

é estimulado e a dormência das sementes pode ser quebrada, dada a interação do herbicida com hormônios endógenos (por exemplo, etileno, ácido giberélico e auxinas). No entanto, esse tipo de efeito não foi observado no presente estudo.

5.2.3.2.2. Crescimento e Biomassa

A Figura 26 apresenta somente o crescimento da parte aérea da espécie *A. cepa*, visto que a *E. sativa* não sobreviveu durante o experimento nos solos tratados com 2,4-D, inviabilizando a avaliação dos efeitos ecotoxicológicos. Portanto, o crescimento da espécie não será analisada. Destaca-se que o teste foi mantido por 21 dias, após 50% das plântulas dos recipientes-controle terem emergido, para determinação do crescimento.

Figura 26 - Crescimento da parte aérea (cm) da espécie *A. cepa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas). Setas sobre as barras indicam diferenças dentro do mesmo tratamento em diferentes posições (superior ou fundo)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A Tabela 17 demonstra os parâmetros obtidos a partir da ANOVA de três vias, para análise do crescimento (cm) da parte aérea da espécie *A. cepa*.

Tabela 17 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes ao crescimento da parte aérea da espécie *A.*

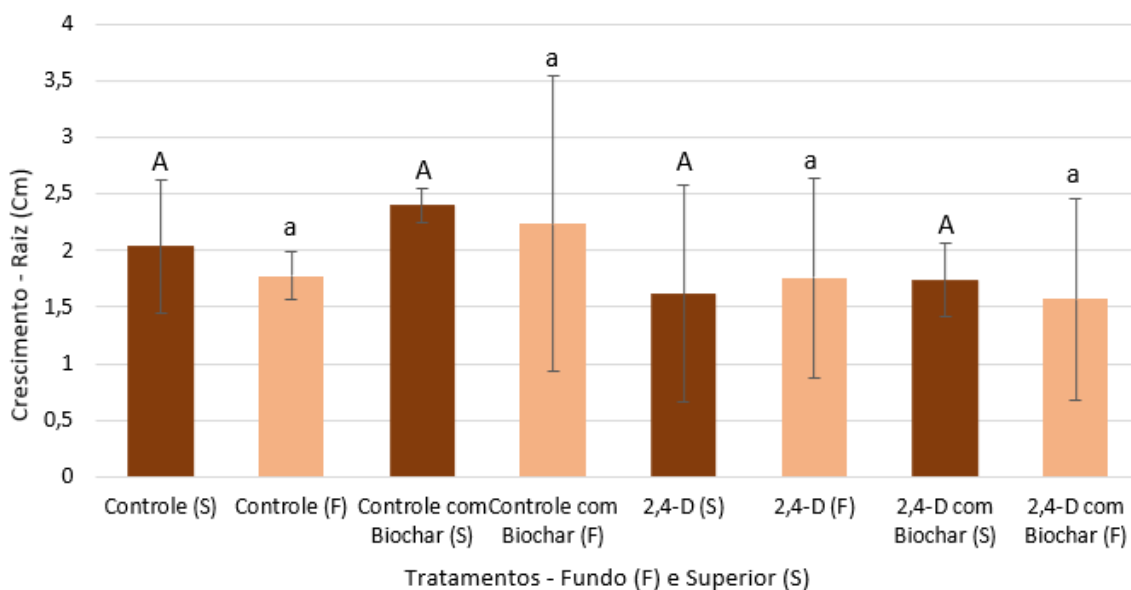
| | <i>cepa</i> | | | | |
|--------------------|-------------------|----|----------------|--------|--------|
| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
| Agrotóxico | 21,807 | 1 | 21,807 | 20,162 | <0,001 |
| Biochar | 17,372 | 1 | 17,372 | 16,061 | <0,001 |
| Posição | 4,525 | 1 | 4,525 | 4,184 | 0,046 |
| Agro + Bio | 0,119 | 1 | 0,119 | 0,110 | 0,741 |
| Agro + Posic | 0,435 | 1 | 0,435 | 0,402 | 0,529 |
| Bio + Posic | 7,956 | 1 | 7,956 | 7,356 | 0,009 |
| Agro + Bio + Posic | 0,441 | 1 | 0,441 | 0,408 | 0,526 |
| Resíduos | 58,405 | 54 | 1,082 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da análise do gráfico e dos valores encontrados na Tabela 17, verificou-se diferenças quanto à presença de agrotóxico, da camada selante de *biochar* e a influência da posição (superfície ou fundo). Isto é, os tratamentos “Controle com biochar (S)” e “Controle com biochar (F)” demonstraram diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$), sendo que o segundo apresentou maior crescimento da parte aérea. Outrossim, a presença do *biochar* nos tratamentos com 2,4-D (2,4-D com Biochar (F)) também apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação ao mesmo tratamento sem o *biochar* (2,4-D (F)), demonstrando eficiência de retenção do agrotóxico diminuindo os efeitos para as plantas cultivadas no solo proveniente do fundo do tratamento. Ressalta-se que mesmo que a concentração de agrotóxico no solo fosse inferior aos limites analíticos de quantificação, essas diferenças foram evidenciadas nos ensaios ecotoxicológicos, apontando alta sensibilidade da espécie ao herbicida. Esses resultados demonstram a importância da associação entre as análises químicas e ecotoxicológicas.

Já a Figura 27 apresenta o crescimento da raiz da espécie *A. cepa*, assim como a Tabela 18 apresenta os resultados a análise de variância para esse parâmetro.

Figura 27 - Crescimento da raiz (cm) da espécie *A. cepa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 18 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à taxa de crescimento (cm) da raiz da espécie *A. cepa*

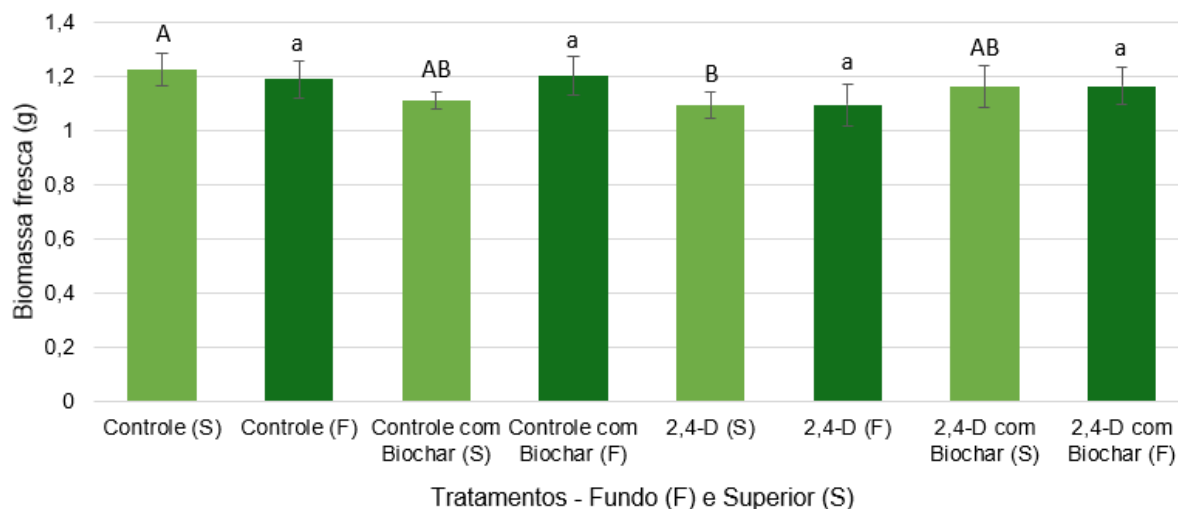
| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|---------|-------|
| Agrotóxico | 5,86017 | 1 | 5,86017 | 6,14579 | 0,016 |
| Biochar | 0,63179 | 1 | 0,63179 | 0,66258 | 0,419 |
| Posição | 0,02058 | 1 | 0,02058 | 0,02158 | 0,884 |
| Agro + Bio | 0,73453 | 1 | 0,73453 | 0,77033 | 0,384 |
| Agro + Posic | 0,00173 | 1 | 0,00173 | 0,00181 | 0,966 |
| Bio + Posic | 0,01024 | 1 | 0,01024 | 0,01074 | 0,918 |
| Agro + Bio + Posic | 0,18575 | 1 | 0,18575 | 0,19480 | 0,661 |
| Resíduos | 51,49042 | 54 | 0,95353 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Quanto ao crescimento da raiz da espécie *A. cepa*, observou-se diferenças ($p < 0,05$) somente na presença de agrotóxicos. Ou seja, a presença do 2,4-D inibiu o crescimento da raiz da espécie *A. cepa*, quando comparado aos tratamentos que não entraram em contato com o agrotóxico, apesar do teste posterior de Tukey não apontar essas diferenças (Figura 27).

A Figura 28 apresenta a biomassa fresca da espécie *A. cepa*, assim como a Tabela 19 apresenta os resultados a análise de variância para esse parâmetro.

Figura 28 - Biomassa fresca (g) da espécie *A. cepa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 19 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à biomassa fresca da espécie *A. cepa*

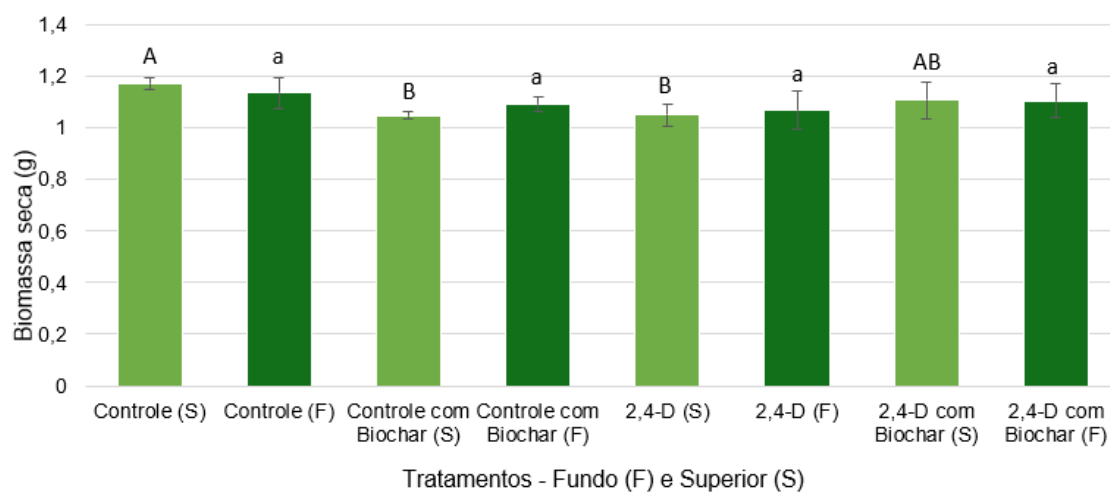
| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|-------|-------|
| Agrotóxico | 0,03010 | 1 | 0,03010 | 6,334 | 0,015 |
| Biochar | 0,00388 | 1 | 0,00388 | 0,816 | 0,370 |
| Posição | 0,00741 | 1 | 0,00741 | 1,560 | 0,214 |
| Agro + Bio | 0,04750 | 1 | 0,04750 | 9,996 | 0,003 |
| Agro + Posic | 0,00298 | 1 | 0,00298 | 0,628 | 0,432 |
| Bio + Posic | 0,01298 | 1 | 0,01298 | 2,732 | 0,105 |
| Agro + Bio + Posic | 0,00854 | 1 | 0,00854 | 1,798 | 0,186 |
| Resíduos | 0,24233 | 51 | 0,00475 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Com a análise dos dados, verifica-se a influência da presença do agrotóxico e do *biochar* na biomassa fresca, isto é, a presença do 2,4-D diminuiu a biomassa fresca da espécie *A. cepa*, quando comparado aos tratamentos que não entraram em contato com o agrotóxico, apesar de estar abaixo do LQ ($1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), como demonstrado na análise química (Tabela 7). Quanto a posição, não houve diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) nas amostras que estavam ao fundo ou na região superior.

A Figura 29 apresenta a biomassa seca da espécie *A. cepa*, assim como a Tabela 20 apresenta os resultados a análise de variância para esse parâmetro.

Figura 29 - Biomassa seca (g) da espécie *A. cepa*. Letras diferentes indicam diferenças entre os tratamentos da parte superior (letras maiúsculas) e da parte inferior (letras minúsculas)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 20 - Parâmetros da ANOVA de três vias referentes à biomassa seca da espécie *A. cepa*

| | Soma de Quadrados | gl | Quadrado médio | F | p |
|--------------------|-------------------|----|----------------|---------|--------|
| Agrotóxico | 0,00918 | 1 | 0,00918 | 3,1556 | 0,082 |
| Biochar | 0,00254 | 1 | 0,00254 | 0,8738 | 0,354 |
| Posição | 0,00128 | 1 | 0,00128 | 0,4410 | 0,510 |
| Agro + Bio | 0,05290 | 1 | 0,05290 | 18,1901 | <0,001 |
| Agro + Posic | 1,03e-4 | 1 | 1,03e-4 | 0,0353 | 0,852 |
| Bio + Posic | 0,00174 | 1 | 0,00174 | 0,5966 | 0,443 |
| Agro + Bio + Posic | 0,00594 | 1 | 0,00594 | 2,0418 | 0,159 |
| Resíduos | 0,14832 | 51 | 0,00291 | - | - |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A partir da análise dos dados, é possível confirmar uma interação entre a presença do agrotóxico e da camada selante de *biochar*, isto é, a presença camada selante de *biochar* influenciou a toxicidade do 2,4-D, que pode ter melhorado as condições de crescimento.

5.3. Comunidade bacteriana

5.3.1. Extração e purificação do DNA

Os resultados da extração de DNA realizada de acordo com o manual do fabricante são apresentados na Tabela 21.

Tabela 21 - Resultados obtidos após a extração de DNA do solo, onde 'C' representa o solo natural e 'B' representa o solo exposto ao *biochar*

| Amostras | DNA (ng μL^{-1}) | A260/A280 |
|----------|------------------------------|-----------|
| C1 | 247,2 | 1,88 |
| C2 | 246,9 | 1,37 |
| C3 | 282,3 | 1,39 |
| B1 | 206,2 | 1,88 |
| B2 | 237,5 | 1,36 |
| B3 | 272,4 | 1,40 |

C = Controle; B = Solo exposto ao *biochar*.

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Após a purificação do DNA, realizada de acordo com o manual do fabricante, os resultados são apresentados na Tabela 22, que também inclui a relação entre as absorbâncias em 260 nm e 280 nm (A260/A280) – uma medida da pureza do DNA. A purificação do DNA do solo é fundamental em estudos microbiológicos e genéticos, pois remove contaminantes e impurezas que podem afetar a qualidade e a precisão das análises. Além disso, aumenta a sensibilidade dos métodos de detecção ao reduzir a interferência de substâncias indesejadas presentes no solo. No entanto, processos extensivos de purificação do DNA geralmente resultam em menor rendimento de recuperação, degradação e danos ao DNA (Lim *et al.*, 2017).

Tabela 22 - Resultados obtidos após a purificação do DNA do solo, onde 'C' representa o solo natural e 'B' representa o solo exposto ao *biochar*

| Amostras | DNA (ng μL^{-1}) | A260/A280 |
|----------|------------------------------|-----------|
| C1 | 19,8 | 1,88 |
| C2 | 14,3 | 1,59 |
| C3 | 16,2 | 1,80 |
| B1 | 20,9 | 1,74 |
| B2 | 14,9 | 1,65 |
| B3 | 17,8 | 1,78 |

C = Controle; B = Solo exposto ao *biochar*.

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Com base na análise das Tabela 21 e Tabela 22, as amostras controle apresentam concentrações médias de DNA de $16,8 \pm 2,8$ ng μL^{-1} , enquanto as amostras tratadas com *biochar* apresentam concentrações médias de DNA ligeiramente maiores, em torno de $17,9 \pm 0,3$ ng μL^{-1} . Dessa forma, foi observada uma semelhança entre os valores dos tratamentos "Controle" e "Biochar" quanto à quantidade de DNA do solo, mesmo após a purificação, indicando que o solo apresentou riqueza na diversidade microbiana. Em relação à pureza do DNA, todas as

amostras apresentam valores de A260/A280 próximos de 1,8, o que é considerado ideal e sugere boa pureza do material purificado (Kheyrodin *et al.*, 2012).

5.3.2. Sequenciamento Illumina de Marcadores Bacterianos

Após o recebimento dos resultados de sequenciamento e a aplicação de ferramentas de bioinformática, foram identificados 234 grupos (Anexo 1). Para as análises estatísticas com todos esses dados – como explicado anteriormente – foi realizado o teste PERMANOVA em uma matriz de distância de Bray–Curtis, com os dados de abundância dos OTUs transformados por $\log(x + 1)$, para exibir a similaridade entre as amostras, conforme apresentado na Tabela 23. Assim, com um valor de p de 0,3953, não há diferença significativa entre os grupos amostrais com base na dissimilaridade de Bray–Curtis.

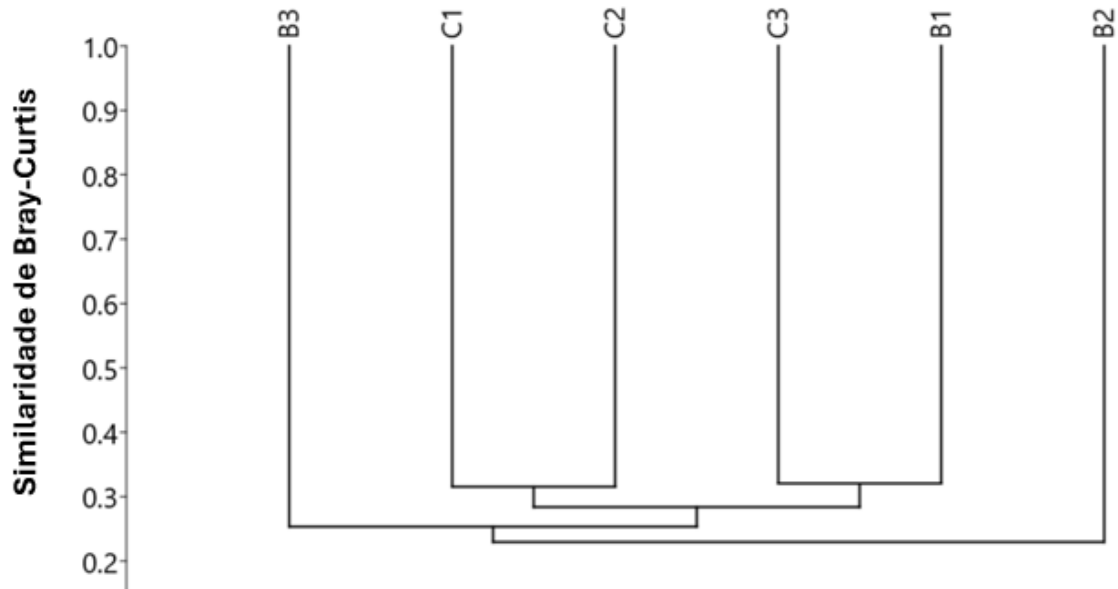
Tabela 23 - Teste estatístico PERMANOVA, com base em Bray–Curtis

| Permanova (com base em Bray-Curtis) | |
|--|--------|
| Número de permutações (N) | 9999 |
| Soma total dos quadrados | 1,366 |
| Soma dos quadrados dentro dos grupos | 1,086 |
| F | 1,032 |
| p | 0,3953 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

A Figura 30 apresenta o dendrograma de similaridade de Bray–Curtis, reforçando a conclusão estatística de similaridade da comunidade bacteriana entre o solo não tratado e o tratado com *biochar*.

Figura 30 - Dendrograma de Bray–Curtis da comunidade bacteriana nos solos controle (C) e tratado com *biochar* (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Os índices ecológicos aplicados à composição da comunidade estão apresentados na Tabela 24, enquanto a média dos valores na Tabela 25. A "Riqueza" indica o número de diferentes grupos em cada tratamento, podendo incluir família, gênero ou espécie, conforme o refinamento taxonômico permitido pela análise estatística. A coluna "Indivíduos" indica o número total de organismos contabilizados em cada grupo de tratamento: observa-se uma diferença de 20% no número de indivíduos encontrados no tratamento "Controle" em comparação ao solo exposto ao *biochar*. A coluna "Dominância" mede a abundância relativa das espécies mais comuns em relação às outras, sendo que valores menores indicam menor dominância. O índice "Diversidade de Shannon" combina riqueza e uniformidade das espécies. A coluna "Uniformidade (H/S)" indica o quão uniformemente os indivíduos estão distribuídos entre as diferentes espécies, calculado como a razão entre o índice de Shannon e a riqueza. Ambos os grupos apresentam valores de uniformidade em torno de 0,08. A coluna "Equitabilidade" reflete o quão equitativamente as espécies estão distribuídas em termos de abundância e riqueza.

Tabela 24 - Índices ecológicos aplicados à fauna bacteriana no solo controle (C) e tratado com *biochar* (B)

| Tratamentos | C1 | C2 | C3 | B1 | B2 | B3 |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Riqueza | 68 | 78 | 67 | 70 | 59 | 65 |
| Número de Indivíduos | 9878 | 10282 | 9157 | 8079 | 7151 | 8031 |
| Dominância | 0,022 | 0,018 | 0,024 | 0,020 | 0,024 | 0,023 |
| Diversidade de Shannon (H) | 3,990 | 4,166 | 3,939 | 4,035 | 3,875 | 3,915 |
| Uniformidade (H/S) | 0,795 | 0,826 | 0,766 | 0,807 | 0,817 | 0,771 |
| Equitabilidade | 0,946 | 0,956 | 0,937 | 0,949 | 0,950 | 0,938 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Tabela 25 - Média e valor de *p* aplicados à fauna bacteriana nos solos controle (C) e tratado com *biochar* (B)

| Tratamentos | Média (C) | Média (B) | Valor de <i>p</i> |
|----------------------------|-------------|-------------|-------------------|
| Riqueza | 71 ± 6 | 64 ± 5 | 0,20 |
| Número de Indivíduos | 9772 ± 569 | 7753 ± 522 | 0,01 |
| Dominância | 0,02 ± 0,00 | 0,02 ± 0,00 | 0,66 |
| Diversidade de Shannon (H) | 4,0 ± 0,1 | 3,94 ± 0,08 | 0,34 |
| Uniformidade (H/S) | 0,08 ± 0,03 | 0,08 ± 0,02 | 0,91 |
| Equitabilidade | 0,95 ± 0,01 | 0,95 ± 0,01 | 0,93 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

De modo geral, as variações na riqueza e diversidade de espécies entre os grupos de solo controle e tratado com *biochar* não foram estatisticamente significativas ($p > 0,05$), sendo que o grupo controle apresentou valores ligeiramente superiores na maioria dos parâmetros. Ambos os grupos demonstraram diversidade e uniformidade relativamente altas, indicando uma estrutura de comunidade microbiana equilibrada. Por outro lado, foram detectadas diferenças na abundância total, com uma redução no número de indivíduos no solo tratado com *biochar* em comparação ao solo controle ($p < 0,05$).

A ausência de mudanças significativas na estrutura geral da comunidade, mesmo após a aplicação de *biochar*, levanta questões relevantes sobre o papel da microbiota do solo — especialmente das bactérias — nos ecossistemas agrícolas. As bactérias desempenham um papel fundamental na biota do solo devido à sua abundância e aos diversos serviços essenciais que prestam, como a decomposição da matéria orgânica, fixação de nitrogênio atmosférico, ciclagem de nutrientes e contribuição para a estabilidade do solo por meio da formação de

agregados, como descrito por Fuhrman (2009) e Pan *et al.* (2014). A observação de que o *biochar* não induziu alterações significativas na composição da comunidade bacteriana do solo pode indicar um aspecto benéfico de sua aplicação, especialmente na remediação de solos agrícolas, onde a fertilidade e a produtividade do solo são primordiais.

Além disso, o uso de *biochar* na remediação do solo pode se beneficiar de sua capacidade de servir como uma fonte estável de carbono para os microrganismos do solo, fornecendo um habitat propício para o crescimento e atividade microbiana (LAL, 2016). Assim, a observação de que o *biochar* não induziu mudanças significativas na estrutura geral da comunidade do solo destaca seu potencial como uma emenda sustentável para a remediação agrícola. Ao preservar a integridade da microbiota do solo, especialmente as bactérias, a aplicação de *biochar* pode melhorar a saúde e a produtividade do solo, ao mesmo tempo em que mitiga a degradação ambiental.

5.3.3. Análise dos grupos mais abundantes

Conforme mostrado anteriormente, foram identificados 234 grupos a partir da análise da comunidade bacteriana nos dois solos. Além da análise geral da comunidade, apresentada no tópico anterior, foram filtrados os grupos com composição superior a 2% da abundância total, os quais serão analisados com mais profundidade neste tópico. A Tabela 26 apresenta a soma dos valores de indivíduos dos grupos mais abundantes (prevalentes) nas amostras, reduzidos a 13 grupos.

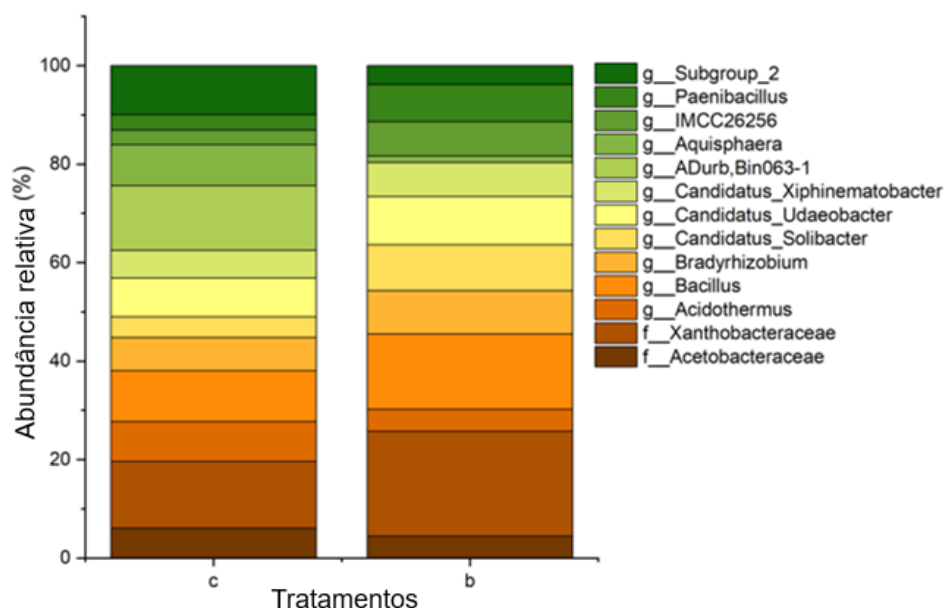
Tabela 26 - Soma dos valores de indivíduos nas amostras. (f) representa famílias e (g), gêneros

| Grupos | C1 | C2 | C3 | B1 | B2 | B3 |
|---------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| f__Acetobacteraceae | 142 | 165 | 290 | 358 | 0 | 0 |
| f__Xanthobacteraceae | 342 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Acidothermus | 272 | 387 | 139 | 85 | 0 | 268 |
| g__Bacillus | 394 | 260 | 357 | 350 | 76 | 759 |
| g__Bradyrhizobium | 244 | 187 | 222 | 204 | 305 | 180 |
| g__Candidatus_Solibacter | 0 | 321 | 90 | 494 | 0 | 227 |
| g__Candidatus_Udaeobacter | 172 | 288 | 316 | 346 | 323 | 97 |
| g__Candidatus_Xiphinematobacter | 184 | 297 | 76 | 310 | 221 | 0 |
| g__ADurb,Bin063-1 | 336 | 453 | 496 | 0 | 0 | 0 |
| g__Aquisphaera | 510 | 313 | 0 | 0 | 0 | 109 |
| g__IMCC26256 | 294 | 0 | 0 | 289 | 249 | 0 |
| g__Paenibacillus | 0 | 243 | 60 | 226 | 52 | 311 |
| g__Subgroup_2 | 428 | 0 | 553 | 140 | 156 | 0 |

Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Foi desenvolvido um gráfico de barras estratificado, apresentado na Figura 31, a fim de melhorar a visualização e organização dos dados. Dessa forma, é possível identificar quais desses grupos mais abundantes apresentam diferenças significativas entre os tratamentos e se há uma tendência geral de aumento ou diminuição da abundância relativa de determinadas espécies no solo exposto ao *biochar* em comparação ao solo natural.

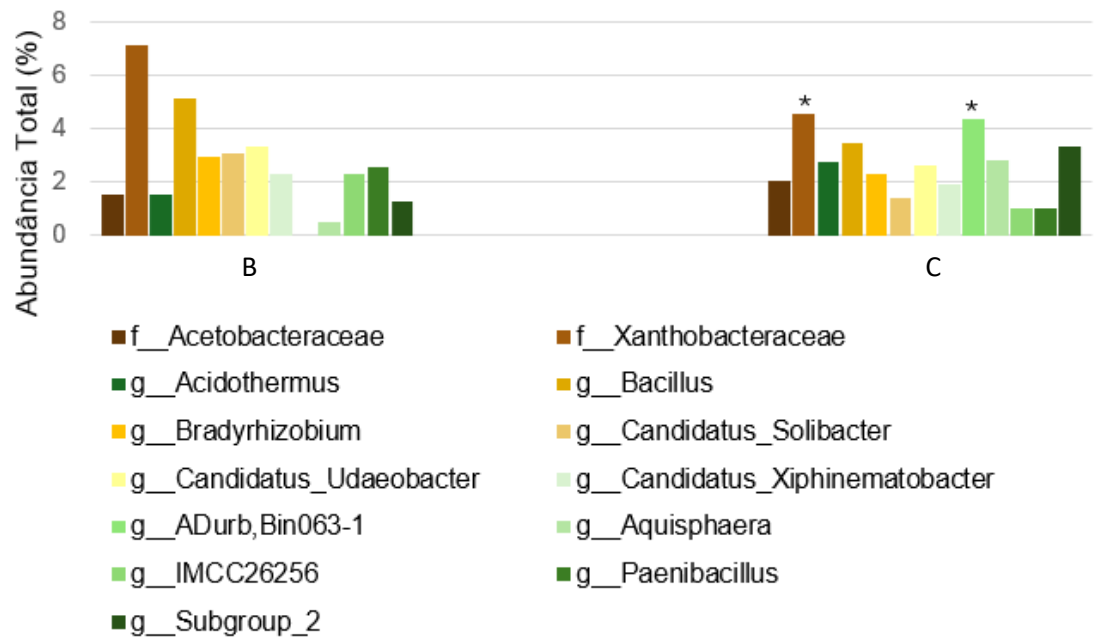
Figura 31 - Abundância relativa das comunidades encontradas nos tratamentos Controle e *Biochar*



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

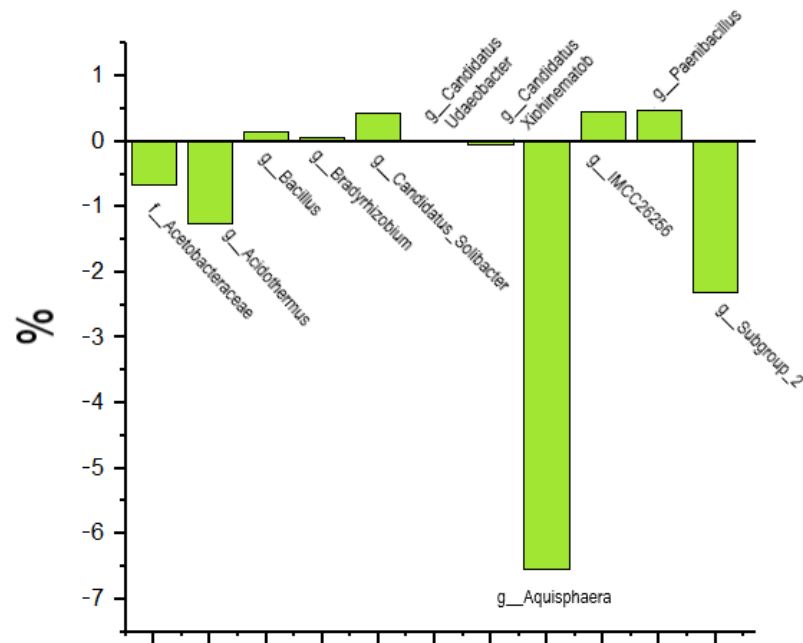
A partir da análise do gráfico, observam-se poucas diferenças entre as espécies presentes nos tratamentos, o que é reforçado pelo teste de dissimilaridade de Bray-Curtis ($p > 0,05$). No entanto, um grupo se destaca por estar presente apenas no solo controle: *g__ADurb,Bin063-1*. A análise estatística da abundância total desse grupo revela diferenças significativas ($p < 0,05$, Figura 32). Como *g__ADurb,Bin063-1* foi identificado apenas no solo controle, seu dado de variação foi excluído do gráfico para melhorar a visualização. Destacam-se ainda os grupos *f__Acetobacteraceae* e *g__Subgroup_2*, com valores de p próximos a 0,05 ($p = 0,084$ e $p = 0,087$, respectivamente), indicando uma tendência de redução desses grupos após a aplicação de *biochar*, como observado na Figura 33, que mostra o percentual de aumento/diminuição da abundância no solo tratado com *biochar* em comparação ao controle. Para os demais grupos, não foram observadas variações significativas entre os tratamentos, com diferenças inferiores a 1,5% (Figura 33).

Figura 32 - Diferenças relativas entre famílias ou gêneros identificados no solo controle (C) e no solo tratado com *biochar* (B). (*) representa diferença significativa em relação ao controle



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Figura 33 - Variação percentual (%) na abundância bacteriana no solo tratado com *biochar* (B) em relação ao solo controle (C). Valores positivos indicam aumento e negativos, redução no tratamento B em relação ao C



Fonte: Elaborado pela autora (2025)

Dessa forma, é possível analisar os grupos que apresentaram comportamentos divergentes entre as unidades:

- **ADurb,Bin063-1**

Essa espécie pertence à família *Pedospaeraceae*, conhecida por relações simbióticas com plantas, auxiliando na fixação de nitrogênio atmosférico e fornecendo nutrientes às plantas hospedeiras. Essas bactérias foram originalmente descobertas em solos, mas também estão presentes em ambientes relacionados à água. São geralmente aeróbias e gram-negativas, apresentando formas diversas como cocos e bacilos. Metabolicamente, muitas são heterotróficas, obtendo carbono orgânico de fontes externas (Yuan *et al.*, 2022).

Além dessas espécies, outras duas se destacam por apresentarem valores de *p* próximos a 0,05 e estarem presentes em menor quantidade também no tratamento com *biochar*:

- **Acetobacteraceae**

A família *Acetobacteraceae* é composta por bactérias aeróbias gram-negativas, conhecidas por realizarem oxidação incompleta de açúcares e álcoois, produzindo ácidos orgânicos como produto final do metabolismo. Utilizam oxigênio molecular para oxidar álcoois como etanol, produzindo ácidos como o acético. A família é bastante diversa e inclui gêneros como *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* e *Komagataeibacter* (Reis e Teixeira, 2015).

- **Subgroup_2**

Este subgrupo contém bactérias da família *Acidobacteriaceae*, um dos grupos bacterianos dominantes em solos. Elas desempenham papéis importantes no ciclo de nutrientes e na decomposição da matéria orgânica. Muitas espécies são heterotróficas aeróbias, oxidando compostos orgânicos e exigindo oxigênio para crescer. Contribuem para a fertilidade do solo e a saúde das plantas, degradando moléculas orgânicas complexas e participando na decomposição de resíduos vegetais, o que contribui para a renovação da matéria orgânica do solo (Foesel *et al.*, 2016).

Após a caracterização dessas bactérias, foi possível discutir as razões para a ausência de algumas espécies no tratamento com *biochar* em comparação ao controle. Primeiramente, pode-se levantar a hipótese de que as condições criadas pela presença do *biochar* não são adequadas para o crescimento ou sobrevivência de algumas espécies como *Pedospaeraceae*. Além disso, sabe-se que o *biochar* pode alterar o pH do solo, a umidade e a disponibilidade de nutrientes (Ogura *et al.*, 2021), impactando indiretamente a sobrevivência ou atividade dessas bactérias.

Adicionalmente, a menor presença das espécies *Acetobacteraceae* e *Acidobacteriaceae* nas amostras com *biochar*, em comparação ao solo natural, pode estar relacionada à não promoção de sua atividade metabólica, fornecendo condições desfavoráveis para suas funções específicas no solo. A modificação do microambiente por meio da alteração do pH e da disponibilidade de nutrientes pode ter criado um ambiente pouco propício para seu crescimento.

6. CONCLUSÃO

Em suma, os experimentos realizados ao longo deste trabalho demonstraram o potencial do *biochar* como uma solução ambiental eficiente e de baixo custo para a mitigação dos impactos causados por agrotóxicos em solos contaminados. Os ensaios de sorção e dessorção revelaram que o *biochar* apresenta elevada capacidade de retenção para compostos como o fipronil — agrotóxico de baixa solubilidade em água e alta afinidade por carbono orgânico — quando comparado ao 2,4-D, que possui menor afinidade. Esse comportamento destaca a importância de considerar as características individuais dos contaminantes ao selecionar estratégias de remediação.

Além disso, a aplicação do *biochar* na forma de camada selante foi eficaz na melhora das propriedades da água percolada e do solo, favorecendo o crescimento de espécies vegetais como *E. sativa* e *A. cepa* e animal como *P. minuta*. Foram observados aumentos na taxa de germinação, no crescimento da parte aérea e radicular, bem como na sobrevivência e reprodução dessas espécies, evidenciando o papel do *biochar* na recuperação de áreas degradadas.

Do ponto de vista microbiológico, a análise da comunidade bacteriana nos diferentes tratamentos mostrou que, apesar da redução na abundância total no solo tratado com *biochar*, não houve diferenças estatisticamente significativas na diversidade de espécies. No entanto, a ausência de determinados grupos bacterianos, como *Pedospaeraceae* no solo tratado sugere que o *biochar* pode alterar seletivamente o ambiente microbiano, o que merece atenção em estudos futuros.

Dessa forma, os resultados obtidos reforçam o uso do *biochar* como uma alternativa sustentável para a remediação de solos contaminados, contribuindo tanto para a redução da contaminação por agrotóxicos quanto para a manutenção do equilíbrio ecológico do solo. Essa abordagem está alinhada com os princípios da economia circular e das tecnologias limpas, promovendo uma agricultura mais sustentável.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Z. *et al.* A critical review of mechanisms involved in the adsorption of organic and inorganic contaminants through biochar. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 11, n. 16, p. 1-23, 2018.
- ABNT. **ABNT BR ISO 11269-2**. Qualidade do solo - Determinação dos efeitos de poluentes na flora terrestre Parte 2: Efeitos do solo contaminado na emergência e no crescimento inicial de vegetais superiores. 2012.
- ABNT. **ABNT NBR 12713**. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera), 2022.
- ABNT. **ABNT NBR ISO 11267**. Qualidade do solo - Inibição da reprodução de Collembola (*Folsomia candida*) por poluentes do solo, 2019.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR)**. *Toxicological Profile for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid (2,4-D)*. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, July 2020.
- AHMAD M. *et al.* Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. **Chemosphere** 99:19–33.2 014.
- ALEXANDRE, D. S. *et al.* Biochar from Sugarcane Straw Reduces the Toxicity of Soils Contaminated with 2, 4-D, and Fipronil, Isolated and in a Mixture, on Multispecies Microcosms. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 234, n. 10, p. 1-16, 2023.
- AMARANTE JR, O.P. *et al.*, 2003. Determination of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and its major transformation product in soil samples by liquid chromatographic analysis. **Talanta** **60**, 115–121.
- AZEVEDO, M. M. **Persistência e sorção/dessorção de herbicidas em solo condicionado com carvão de cana-de-açúcar**. 2016. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016.
- BANDEIRA, F. O. *et al.* Chronic effects of clothianidin to non-target soil invertebrates: Ecological risk assessment using the species sensitivity distribution (SSD) approach. **Journal of Hazardous Materials**, v. 419, p. 126491, 2021.
- BARRIUSO E. *et al.* 1992. Sorption of atrazine, terbutryn and 2,4-D herbicides in two Brazilian Oxisols. **Geoderma** 53:155–167.
- BEESELEY, L. *et al.* A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. **Environmental pollution**, v. 159, n. 12, p. 3269-3282, 2011.
- BERGMANN, G. T. *et al.* The under-recognized dominance of Verrucomicrobia in soil bacterial communities. *Soil Biology and Biochemistry*, 43:1450-1455, 2011.
- BOIVIN, A. *et al.* 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. **Environmental pollution**, v. 138, n. 1, p. 92-99, 2005.

BRASIL. Medida provisória no 1.569-9, de 11 de dezembro de 1997. Estabelece multa em operações de importação, e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**: seção 1, Brasília, DF, p. 29514, 14 dez. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório produtos formulados**. Disponível em: SITE. Acesso em: 12 jun. 2023.

CASSAL, V. B. *et al.* Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. **Revista Eletrônica Em Gestão, Educação E Tecnologia Ambiental**, 18(1), 437–445, 2014.

CHELINHO, S. *et al.* Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 31: 437-445, 2012.

COELI BARBOSA, P. R. *et al.* Uso do biochar de bagaço de cana na remoção de metais pesados de água sob diferentes condições de pH's. *Águas Subterrâneas*, 2013.

CUBA, R. M. F. *et al.* Produção de biochar a partir de bagaço de cana-de-açúcar para remoção de glifosato (formulação comercial) em meio aquoso. In: **CONGRESSO SUL-AMERICANO DE RESÍDUOS SÓLIDOS E SUSTENTABILIDADE**, 2018, Gramado. *Anais [...]*. Gramado: [s.n.], 2018.

DELGADO-BAQUERIZO, M. *et al.* Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. *Nature Communications*, 7:10541, 2016.

DEQUATTRO Z.A., KARASOV W.H. 2016. Impacts of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid aquatic herbicide formulations. **Environ Toxicol Chem** 35:1478–1488.

DESANTIS, T. Z. *et al.* 2006. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Env. Microbiol.* 72, 5069–5072. Available at: <<https://doi.org/10.1128/AEM.03006-05>>

DWIVEDI, S., DEY, S. Review on biochar as an adsorbent material for removal of dyes from waterbodies. *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 20, 9335–9350 (2023).

FAKHRAEI, H., DRISCOLL, C.T., 2015. Proton and aluminum binding properties of organic acids in surface waters of the northeastern U.S. **Environ. Sci. Technol.** 49, 2939–2947.

FANG, J. *et al.* Hydrochars derived from plant biomass under various conditions: Characterization and potential applications and impacts. **Chemical Engineering Journal**, v. 267, p. 253-259, 2015.

FAO. **Perspectivas agrícolas 2015-2024**. [S. l.]: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 2015.

FAOSTAT. **Countries by commodity**. [Incluir ano]. Disponível em: https://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 6 mar 2023.

FELLET, G. *et al.* Application of biochar on mine tailings: effects and perspectives for land reclamation. **Chemosphere**, v. 83, n. 9, p. 1262-1267, 2011.

FJELLBERG, A. (2007) The Collembola of Fennoscandia and Denmark. Part II: Entomobryomorpha and Symphypleona. *Fauna Entomologica Scandinavia* 42, p. 264

FJELLBERG, A. The Collembola of Fennoscandia and Denmark. Part I: Poduromorpha. *Fauna Entomologica Scandinavia* 35, p. 184. 1998.

FOESEL, B. U. *et al.* *Occallatibacter riparius* gen. nov., sp. nov. and *Occallatibacter savannae* sp. nov., acidobacteria isolated from Namibian soils, and emended description of the family Acidobacteriaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 219-229, 2016.

FREITAS, I. B. F. *et al.* Soil management effects of extensive pastures, intensive pastures and sugarcane crops on the availability of metals and nutrients in freshwater: A realistic mesocosm approach. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 350, p. 108473, 2023.

FREITAS, J. S. *et al.* Realistic exposure to fipronil, 2,4-D, vinasse and their mixtures impair larval amphibian physiology. **Environmental Pollution**. 2022.

FUHRMAN, J. A. Microbial community structure and its functional implications. **Nature**, 459, 193, 2009.

GODLEWSKA, P., *et al.* 2021. THE DARK SIDE OF BLACK GOLD: Ecotoxicological aspects of biochar and biochar-amended soils. *Journal of Hazardous Materials* 403, 123833.

GOULART, B. V. *et al.* Matrix effect challenges to quantify 2,4-D and fipronil in aquatic systems. **Environ Monit Assess**, 2020.

GRAHAM, E. B. *et al.* Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? *Frontiers in Microbiology*: 7, 2016.

GRIPP, H. S. **Efeitos bioquímicos de contaminação em girinos de *Eupemphix nattereri* expostos a solos contendo o agrotóxico fipronil e seus produtos de degradação.** 2015. Dissertação (Mestrado em Química – Química Ambiental).

GUNASEKARA, A. S. *et al.* Environmental fate and toxicology of fipronil, 2007.

HÅGVAR, S. & KJØNDAL, B.R. Succession, diversity and feeding-habits of microarthropods in decomposing birch leaves. *Pedobiologia* 22, 385–408. 1981.

HEATMAPPER: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res.* Available at: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkw419> epub ahead of print> Accessed on April 20, 2024.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção de Cana-de-açúcar, 2020.

INYANG, M. *et al.* Biochar from anaerobically digested sugarcane bagasse. **Bioresource technology**, v. 101, n. 22, p. 8868-8872, 2010.

INYANG, M. *et al.* Removal of heavy metals from aqueous solution by biochars derived from anaerobically digested biomass. **Bioresource technology**, v. 110, p. 50-56, 2012.

ISLAM, F. *et al.* Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on human and ecosystems. *Environment International*, 2018.

JOTE, C. A. A review of 2, 4-D environmental fate, persistence and toxicity effects on living organisms. **Organic and Medicinal Chemistry International Journal**, v. 9, p. 22-32, 2019.

KHALID, S. *et al.* A critical review of different factors governing the fate of pesticides in soil under biochar application. **Science of the Total Environment**, v. 711, p. 134645, 2020.

KHEYRODIN, H. *et al.* DNA purification and isolation of genomic DNA from bacterial species by plasmid purification system. **African Journal of Agricultural Research**, v. 7, n. 3, p. 433-442, 2012.

KNIGHT, R. *et al.* Best practices for analyzing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*: 16, 410-422, 2018.

LAL, R. Soil health and carbon management. **Food and Energy Security**, v. 5, n. 4, p. 212-222, 2016.

LARSEN, T. *et al.* Nutrient allocations and metabolism in two collembolans with contrasting reproduction and growth strategies. *Functional Ecology*, 2009.

LIM, H. J. *et al.* Necessity of purification during bacterial DNA extraction with environmental soils. **Environmental health and toxicology**, v. 32, 2017.

LIMA, J. Z. *et al.* Biochar-pesticides interactions: An overview and applications of wood feedstock for atrazine contamination. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, p. 108192, 2022.

LIU, Y. *et al.* An investigation of the effect of particle size on the flow behavior of pulverized coal. **Procedia Engineering**, v. 102, p. 698-713, 2015.

LOURENÇO, K. S. *et al.* Resilience of the resident soil microbiome to organic and inorganic amendment disturbances and temporary bacterial invasion. *Microbiome* 6, 2018.

MANRIQUE, G. *et al.* Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático. Jaboticabal, 2009.

MIZE S.V. *et al.* 2008. Influence of fipronil compounds and rice-cultivation land-use intensity on macroinvertebrate communities in streams of southwestern Louisiana, USA. *Environ Pollut* 152:491–503.

MONTAGNER, C. C. *et al.* Trace analysis of pesticides and an assessment of their occurrence in surface and drinking waters from the State of São Paulo (Brazil). **Analytical Methods**, v. 6, n. 17, p. 6668-6677, 2014.

MOREIRA, R. A. *et al.* Life History Traits Response to Effects of Fish Predation (Kairomones), Fipronil and 2,4 D on Neotropical Cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2020.

MOSCARDI, A. L. *et al.* Avaliação da toxicidade do 2,4-D por meio da histopatologia e histoquímica do intestino médio e corpo gorduroso de *Rhinocricus padbergi* (diplópodo). *Brazilian Applied Science Review*, 2018.

MUÑOZ, *et al.* Use of biochar as a soil amendment: a brief review. **Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences**, v. 32, n. SPECIAL ISSUE N° 1, p. 37-47, 2016.

NUNES, I. H. S. **Estudo das características físicas e químicas da cinza do bagaço de cana-de-açúcar para uso na construção**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Urbana) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2009.

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. *Ecotoxicology*, 21: 1063-1071, 2012.

NURSITA, A. I.; SINGH, B.; LEES, E. The effects of cadmium, copper, lead, and zinc on the growth and reproduction of *Proisotoma minuta* Tullberg (Collembola). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 60, n. 3, p. 306-314, 2005.

OECD. **Test No. 106: Adsorption – Desorption Using a Batch Equilibrium Method**. Paris: OECD Publishing, 2000.

OGURA, A. P. *et al.* A review of pesticides sorption in biochar from maize, rice, and wheat residues: Current status and challenges for soil application. **Journal of Environmental Management**, v. 300, p. 113753, 2021.

OGURA, A. P. *et al.* Irrigation with Water Contaminated by Sugarcane Pesticides and Vinasse Can Inhibit Seed Germination and Crops Initial Growth. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2022.

OGURA, A. P. *et al.* Phytotoxicity of 2,4-D and fipronil mixtures to three green manure species. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 1–11. 2023.

OUYANG, W., *et al.* Optimization of typical diffuse herbicide pollution control by soil amendment configurations under four levels of rainfall intensities. *Journal of Environmental Management*, 175, 1–8. 2016.

PAN, Y. *et al.* Impact of long-term N, P, K and NPK fertilization on the composition and potential functions of the bacterial community in grassland soil. *FEMS Microbiology Ecology*: 90, 195–205, 2014.

PIGNATI, W. A. *et al.* Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva, Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), 2017.

PIGNATI, W. A. *et al.* **Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde**. 2017. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) – Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal de Mato Grosso, 2017.

PINHEIRO, A., Silva, M.R.D., Kraisch, R. Presença de pesticidas em águas superficiais e subterrâneas na bacia do Itajaí, SC. REGA - Revista de Gestão de Água da América Latina 7, 17–26. 2010

PINTO, T. J. S. *et al.* Chronic environmentally relevant levels of pesticides disrupt energy reserves, feeding rates, and life-cycle responses in the amphipod *Hyaella meinerti*. *Aquatic Toxicology*, 2022.

PINTO, T. J. S. *et al.* Functional responses of *Hyaella meinerti* after exposure to environmentally realistic concentrations of 2,4-D, fipronil, and vinasse (individually and in mixture). *Aquatic Toxicology*. 2021.

PINTO, T. J. S. *et al.* Responses of *Chironomus sancticaroli* to the simulation of environmental contamination by sugarcane management practices: water and sediment toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 857, p. 159643, 2023.

PINTO, T. J. S. *et al.* Toxicity of fipronil and 2,4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod *Hyaella meinerti*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2021

PROVASE, M. **Análise genotóxica do fipronil® no cérebro de abelhas da espécie *Bombus atratus* (Hymenoptera, bombini)**. 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental). Sorocaba, 2022.

QUAST, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: Improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* 2016, 41, D590–D596.

RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. **Journal of cleaner production**, v. 283, p. 124657, 2021.

REGO, H. P. *et al.* **Estudo da remoção de metamidofós de água por sorção em biochar**. 2020. Trabalho acadêmico.

REIS, V. M.; TEIXEIRA, K. R. dos S. Nitrogen fixing bacteria in the family Acetobacteraceae and their role in agriculture. **Journal of basic microbiology**, v. 55, n. 8, p. 931-949, 2015.

RIBEIRO, H. *et al.* **Queimadas de cana-de-açúcar no Brasil: efeitos à saúde respiratória**. [S. l.: s. n.], 2008. CNPq; bolsa de produtividade em pesquisa.

RIGOTTO, R. M. *et al.* Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 1360-1362, 2014.

RODRIGUES, D. D. *et al.* Padronização da técnica do *Allium cepa* para pesquisa de danos mutagênicos em infusão de planta na cidade de Guaraí. *Electronic Journal of Pharmacy*, vol. XII, 2015.

ROESCH, L. F. W. *et al.* Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME Journal*, 1:283-290, 2007.

SALLES, J. S. *et al.* Resposta da rúcula à adubação orgânica com diferentes compostos orgânicos. **Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS**, v. 4, n. 2, p. 35-40, abr./jun. 2017.

SCHMALENBERGER, A. *et al.* Effect of primers hybridizing to different evolutionarily conserved regions of the small-subunit rRNA gene in PCR based microbial community analyses and genetic profiling. *Applied and Environmental Microbiology*, 67: 3557-3563, 2001.

SEABRA, G. *et al.* **TERRA: Habitats Urbanos e Rurais**. Barlavento, 2019. 1.896 p.

SILVA, L. C. M. *et al.* Acute and chronic toxicity of 2,4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Ecotoxicology*, 2020.

SILVA, L. C. M. *et al.* Lethal and sublethal toxicity of pesticides and vinasse used in sugarcane cultivation to *Ceriodaphnia silvestrii* (Crustacea: Cladocera). *Aquatic Toxicology*, 2022.

SOARES, M. B. *et al.* How does the *biochar* of sugarcane straw pyrolysis temperature change arsenic and lead availabilities and the activity of the microorganisms in a contaminated sediment? *Sediment Management*, 2021.

SOARES, M. B. *et al.* Temporal changes in arsenic and lead pools in a contaminated sediment amended with *biochar* pyrolyzed at different temperatures. *Chemosphere*, 2022.

SONG, Y. Insight into the mode of action of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) as an herbicide. *Journal of integrative plant biology*, v. 56, n. 2, p. 106-113, 2014.

SOUSA, A. A. T. C. de. **Biochar de lodo de esgoto: efeitos no solo e na planta no cultivo de rabanete**. 2015. Trabalho acadêmico.

SUN, Y. *et al.* Effects of feedstock type, production method, and pyrolysis temperature on biochar and hydrochar properties. **Chemical engineering journal**, v. 240, p. 574-578, 2014.

TANG, Fiona HM *et al.* Risk of pesticide pollution at the global scale. **Nature geoscience**, v. 14, n. 4, p. 206-210, 2021.

TETZNER, N.F. *et al.* 2016. On-line solid phase extraction-ultra high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a powerful technique for the determination of sulfonamide residues in soils. *J. Chromatogr. A* 1452, 89–97.

TINA, J. K. **Impacto de inseticidas sobre o comportamento de colêmbolos *Folsomia candida* (collembola)**. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso.

TRIQUES, M. C. *et al.* Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2, 4-D on plants and soil organisms. *Ecotoxicology and environmental safety*, 2021.

USEPA. Ecological Effects Test Guidelines, OPPTS 850.4200, Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test. EPA 712-C-96-154. p. 7170, 1996.

VARJANI, S. *et al.* Developments in biochar application for pesticide remediation: current knowledge and future research directions. **Journal of environmental management**, v. 232, p. 505-513, 2019.

WAGG, C. *et al.* Fungal-bacterial diversity and microbiome complexity predict ecosystem functioning. *Nature Communications*, 10:4841, 2019.

WANG, H. *et al.* Removal of Pb (II), Cu (II), and Cd (II) from aqueous solutions by biochar derived from KMnO₄ treated hickory wood. **Bioresource Technology**, v. 197, p. 356-362, 2015.

WIGGINS, E.A. & CURL, E.A. (1979) Interactions of Collembola and microflora of cotton rhizosphere. *Phytopathology* 69, 244–249.

YAN, Y. *et al.* Environmental filtering: A case of bacterial community assembly in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 136, 2019.

YING G.G., KOOKANA R.S. 2001. Sorption of fipronil and its metabolites on soils from South Australia. *J. Environ Sci Health B* 36:545–558

YU, H. *et al.* Biochar amendment improves crop production in problem soils: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 232, p. 8-21, 2019.

YUAN, Q. *et al.* Phytoremediation of cadmium-contaminated sediment using *Hydrilla verticillata* and *Elodea canadensis* harbor two same keystone rhizobacteria *Pedospaeraceae* and *Parasegetibacter*. **Chemosphere**, v. 286, p. 131648, 2022.

ANEXO

Anexo 1 - Abundância (número de indivíduos) da comunidade bacteriana identificada no solo controle (C) e no solo tratado com biochar (B). (f) representa a família, (g) o gênero, (p) o filo e (o) a ordem.

| Família/Gênero/Filo/Ordem/Nome das espécies | Tratamentos | | | | | |
|---|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | B1 | B2 | B3 | C1 | C2 | C3 |
| g__Candidatus_Udaeobacter | 53 | 0 | 0 | 75 | 43 | 47 |
| g__MB-A2-108; | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0 |
| f__Comamonadaceae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 379 |
| f__Acidobacteriaceae_(Subgroup_1); | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 0 |
| g__mle1-7; | 0 | 0 | 0 | 0 | 138 | 0 |
| g__Bacillus | 0 | 0 | 127 | 0 | 0 | 0 |
| o__Bacillales | 0 | 0 | 0 | 0 | 160 | 0 |
| g__Paenibacillus | 40 | 52 | 0 | 0 | 62 | 60 |
| o__Gaiellales; | 0 | 275 | 0 | 0 | 146 | 0 |
| f__Xanthobacteraceae | 130 | 198 | 237 | 194 | 109 | 0 |
| g__Acidothermus | 0 | 0 | 80 | 0 | 167 | 0 |
| g__Acidothermus; | 85 | 0 | 188 | 172 | 220 | 139 |
| f__Xanthobacteraceae | 0 | 148 | 0 | 0 | 169 | 0 |
| g__HSB_OF53-F07; | 0 | 0 | 0 | 56 | 0 | 0 |
| g__MB-A2-108; | 0 | 0 | 0 | 49 | 0 | 0 |
| f__Xanthobacteraceae | 203 | 161 | 186 | 215 | 140 | 225 |
| g__Acidothermus | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 0 |
| g__Labilithrix; | 0 | 0 | 0 | 71 | 0 | 0 |
| p__Acidobacteriota | 0 | 0 | 0 | 145 | 0 | 0 |
| p__Desulfobacterota; | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 135 |
| g__Edaphobacter | 197 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Bacteroides; | 29 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Ktedonobacter | 0 | 0 | 0 | 58 | 0 | 0 |
| g__Ktedonobacter | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| g__Kribbella | 0 | 86 | 96 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__Bacillus | 171 | 0 | 327 | 230 | 0 | 177 |
| g__Obscuribacteraceae; | 0 | 39 | 31 | 0 | 0 | 0 |
| g__Chthoniobacter | 0 | 0 | 0 | 0 | 76 | 0 |
| o__Planctomycetales; | 0 | 136 | 0 | 96 | 113 | 0 |
| o__Acidobacteriales; | 0 | 0 | 0 | 57 | 62 | 0 |
| g__Edaphobacter; | 0 | 0 | 204 | 0 | 149 | 0 |
| g__MB-A2-108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 | 0 |
| g__KI89A_clade | 0 | 36 | 0 | 0 | 44 | 0 |
| o__Elsterales; | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 0 |
| o__Vicinamibacterales; | 53 | 0 | 0 | 0 | 43 | 0 |
| g__JG30-KF-AS9; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 |
| g__Subgroup_11; | 13 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__JG30-KF-CM45 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 |
| g__Lachnospiraceae_NK4A136_group | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__SBR1031; | 0 | 27 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Gemmataceae; | 141 | 131 | 0 | 0 | 128 | 155 |
| g__Gemmata | 0 | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 |
| g__Ktedonobacter | 40 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__JGI_0001001-H03 | 0 | 0 | 29 | 0 | 0 | 0 |
| g__Lineage_Ila; | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Micromonospora | 60 | 0 | 0 | 102 | 0 | 97 |
| g__KF-JG30-B3; | 0 | 0 | 0 | 0 | 56 | 0 |
| g__Acidibacter | 0 | 0 | 0 | 0 | 202 | 0 |
| g__Clostridium; | 0 | 0 | 54 | 0 | 0 | 0 |
| o__Vicinamibacterales; | 0 | 0 | 79 | 0 | 0 | 0 |
| g__Chthonomonadales; | 0 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 |
| g__Ktedonobacter; | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Gemmataceae | 26 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| c__Planctomycetes; | 0 | 0 | 0 | 11 | 0 | 30 |
| f__Gemmataceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 103 |

| | | | | | | |
|---------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__KD4-96; | 112 | 0 | 0 | 0 | 0 | 116 |
| g__JG30-KF-AS9; | 0 | 0 | 0 | 63 | 0 | 0 |
| g__SM2D12; | 0 | 0 | 0 | 22 | 0 | 0 |
| o__Acidobacteriales; | 0 | 0 | 0 | 243 | 0 | 0 |
| g__Candidatus_Udaeobacter | 136 | 102 | 75 | 25 | 147 | 172 |
| g__Haliangium | 0 | 129 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Rhodanobacter | 143 | 0 | 137 | 0 | 0 | 0 |
| p__Armatimonadota; | 0 | 71 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Pedosphaeraceae | 0 | 68 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Phaselicystis; | 0 | 0 | 0 | 0 | 121 | 121 |
| o__Acidobacteriales; | 0 | 0 | 0 | 195 | 291 | 0 |
| g__Iamia | 0 | 0 | 289 | 0 | 272 | 0 |
| o__Acidobacteriales; | 0 | 0 | 0 | 62 | 0 | 0 |
| g__Mucilaginibacter | 0 | 0 | 59 | 0 | 0 | 0 |
| g__ADurb,Bin063-1 | 0 | 0 | 0 | 336 | 453 | 496 |
| g__Bryobacter | 0 | 0 | 45 | 0 | 0 | 0 |
| g__Candidatus_Udaeobacter | 157 | 0 | 0 | 72 | 45 | 0 |
| g__Streptomyces | 0 | 0 | 0 | 0 | 114 | 0 |
| o__Elsterales; | 0 | 0 | 0 | 0 | 118 | 0 |
| o__Acidobacteriales; | 0 | 84 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales | 122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales; | 0 | 139 | 0 | 0 | 0 | 132 |
| g__Gaiella; | 0 | 0 | 171 | 0 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales; | 219 | 0 | 276 | 0 | 0 | 466 |
| f__Xanthobacteraceae | 123 | 152 | 121 | 113 | 114 | 57 |
| g__KD3-10 | 0 | 0 | 35 | 0 | 0 | 0 |
| f__Myxococcaceae | 0 | 0 | 0 | 0 | 201 | 0 |
| f__Gemmatimonadaceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 |
| g__Zavarzinella; | 0 | 0 | 0 | 156 | 0 | 0 |
| f__Gemmataceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 | 0 |

| | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| f__Pedosphaeraceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 87 | 57 |
| g__Candidatus_Xiphinematobacter; | 89 | 0 | 0 | 0 | 58 | 76 |
| g__Subgroup_2 | 48 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__JG30-KF-AS9; | 0 | 0 | 145 | 0 | 0 | 184 |
| f__Microscillaceae; | 0 | 116 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__11-24; | 0 | 19 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales; | 259 | 168 | 383 | 0 | 0 | 0 |
| g__Candidatus_Xiphinematobacter; | 142 | 221 | 0 | 184 | 239 | 0 |
| g__Sphingomonas | 0 | 113 | 0 | 0 | 46 | 0 |
| g__A21b | 64 | 64 | 0 | 72 | 74 | 65 |
| g__Streptococcus | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| g__Filimonas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 18 |
| f__Xanthobacteraceae; | 14 | 106 | 52 | 150 | 163 | 105 |
| g__Mucilaginibacter | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 48 |
| g__JG30-KF-CM45 | 0 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__MBNT15 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 | 0 |
| c__Planctomycetes; | 71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Pirellula; | 136 | 133 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Gemmata | 0 | 0 | 60 | 69 | 67 | 0 |
| g__Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia | 0 | 0 | 0 | 182 | 0 | 0 |
| c__Alphaproteobacteria; | 0 | 0 | 0 | 0 | 111 | 118 |
| g__IMCC26256 | 0 | 0 | 0 | 294 | 0 | 0 |
| g__Dongia | 0 | 0 | 0 | 0 | 25 | 0 |
| g__Bradyrhizobium | 107 | 140 | 35 | 126 | 65 | 87 |
| g__Ruminococcus | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Caldilineaceae; | 0 | 14 | 0 | 0 | 0 | 14 |
| p__Desulfobacterota; | 0 | 139 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| c__Polyangia | 0 | 159 | 0 | 165 | 0 | 0 |
| g__env,OPS_17; | 0 | 0 | 11 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__BIRii41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66 | 81 |
| f__Acetobacteraceae | 358 | 0 | 0 | 142 | 165 | 290 |
| g__Luedemannella; | 0 | 0 | 187 | 174 | 0 | 0 |
| f__Vicinamibacteraceae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 289 |
| g__Tumebacillus | 0 | 0 | 0 | 0 | 37 | 0 |
| f__Roseiflexaceae; | 0 | 55 | 0 | 50 | 0 | 62 |
| f__Gemmataceae; | 0 | 194 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales; | 0 | 357 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Parafilimonas; | 104 | 0 | 0 | 0 | 114 | 0 |
| g__Reyranella; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 223 |
| g__Escherichia-Shigella | 0 | 38 | 15 | 0 | 0 | 0 |
| g__Phenylobacterium | 0 | 78 | 0 | 90 | 81 | 0 |
| g__Acetobacteraceae; | 207 | 225 | 0 | 0 | 234 | 0 |
| g__Gemmata; | 0 | 0 | 198 | 0 | 0 | 0 |
| f__Methylobacteriaceae | 96 | 0 | 0 | 151 | 180 | 0 |
| g__Aquisphaera | 0 | 0 | 0 | 510 | 0 | 0 |
| g__C0119; | 0 | 0 | 0 | 59 | 0 | 0 |
| g__Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia | 0 | 59 | 0 | 133 | 0 | 0 |
| g__Acidipila-Silvibacterium | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 | 0 |
| g__A4b; | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| g__Conexibacter | 254 | 0 | 0 | 155 | 0 | 0 |
| o__Gaiellales | 0 | 0 | 0 | 0 | 260 | 0 |
| f__Chitinophagaceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 39 |
| o__Gaiellales; | 0 | 0 | 0 | 0 | 128 | 166 |
| g__TK10; | 0 | 0 | 0 | 379 | 0 | 0 |
| g__Edaphobaculum; | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 |
| g__Subgroup_2; | 92 | 156 | 0 | 0 | 0 | 183 |
| g__Candidatus_Xiphinematobacter; | 79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Sphingomonas | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 340 |

| | | | | | | |
|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__Acidibacter; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 154 |
| o__Polyangiales | 0 | 57 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Comamonadaceae | 0 | 191 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__67-14; | 0 | 0 | 0 | 114 | 0 | 0 |
| o__Vicinamibacterales; | 0 | 0 | 0 | 0 | 176 | 0 |
| g__Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia | 0 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 |
| f__Gemmataceae; | 0 | 53 | 0 | 0 | 71 | 0 |
| o__Gaiellales; | 0 | 0 | 0 | 0 | 42 | 0 |
| g__Paraclostridium | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 17 |
| g__env,OPS_17 | 0 | 17 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Aquisphaera | 0 | 0 | 109 | 0 | 0 | 0 |
| f__Xanthobacteraceae; | 0 | 0 | 169 | 207 | 0 | 0 |
| g__KD4-96; | 213 | 0 | 267 | 131 | 0 | 0 |
| o__Acidobacteriales | 126 | 0 | 0 | 151 | 0 | 0 |
| g__Haliangium; | 0 | 0 | 0 | 78 | 0 | 0 |
| o__Vicinamibacterales; | 0 | 211 | 0 | 379 | 273 | 0 |
| g__Kitasatospora | 151 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Adhaeribacter | 21 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Terriglobus | 0 | 58 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__mle1-7; | 73 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia | 0 | 0 | 278 | 0 | 0 | 0 |
| f__Gemmataceae; | 0 | 0 | 40 | 0 | 0 | 0 |
| g__Streptomyces | 0 | 0 | 190 | 0 | 46 | 0 |
| g__Jatrophihabitans | 0 | 0 | 0 | 137 | 0 | 0 |
| g__Fimbriiglobus; | 30 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Micromonosporaceae | 172 | 0 | 80 | 264 | 0 | 220 |
| g__Rickettsiella | 0 | 0 | 106 | 0 | 0 | 0 |
| g__Rokubacterales; | 100 | 0 | 0 | 0 | 247 | 99 |
| f__Acidobacteriaceae_(Subgroup_1) | 0 | 148 | 0 | 0 | 0 | 165 |

| | | | | | | |
|--------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__Paenibacillus | 102 | 0 | 0 | 0 | 181 | 0 |
| g__Candidatus_Solibacter | 288 | 0 | 227 | 0 | 0 | 0 |
| g__67-14; | 0 | 184 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__67-14; | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Vicinamibacteraceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 197 |
| g__0319-6G20 | 0 | 0 | 0 | 21 | 0 | 0 |
| g__Acidibacter; | 137 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| f__Vicinamibacteraceae | 0 | 0 | 98 | 0 | 121 | 0 |
| g__Nocardioidea | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 41 |
| g__IMCC26256 | 0 | 249 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__mle1-7; | 0 | 0 | 78 | 60 | 0 | 0 |
| g__Subgroup_17; | 0 | 0 | 0 | 59 | 41 | 0 |
| g__IMCC26256; | 289 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Hamadaea | 0 | 0 | 118 | 0 | 147 | 0 |
| g__TK10; | 0 | 0 | 0 | 15 | 17 | 0 |
| g__bacteriap25 | 122 | 0 | 88 | 0 | 104 | 78 |
| g__RB41 | 116 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Subgroup_2; | 0 | 0 | 0 | 428 | 0 | 0 |
| f__Steroidobacteraceae | 151 | 0 | 0 | 172 | 237 | 0 |
| g__Tumebacillus; | 41 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Singulisphaera; | 0 | 0 | 218 | 0 | 0 | 0 |
| g__Aquisphaera | 0 | 0 | 0 | 0 | 313 | 0 |
| g__Subgroup_7; | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 136 |
| g__Bacillus | 0 | 0 | 136 | 0 | 0 | 0 |
| g__Reyranella; | 160 | 0 | 98 | 0 | 135 | 184 |
| g__Streptomyces | 95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Bradyrhizobium | 97 | 165 | 145 | 118 | 122 | 135 |
| f__Microscillaceae | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 96 |
| g__S085; | 115 | 0 | 0 | 0 | 0 | 91 |
| g__Cupriavidus | 0 | 42 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| g__TK10; | 0 | 0 | 0 | 157 | 129 | 281 |
| g__Bryobacter; | 55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 46 |
| g__Labrys; | 0 | 107 | 0 | 0 | 0 | 99 |
| g__Nocardioides | 0 | 0 | 89 | 0 | 0 | 0 |
| g__Paenibacillus | 84 | 0 | 184 | 0 | 0 | 0 |
| g__Bacillus | 0 | 0 | 129 | 0 | 174 | 144 |
| g__Faecalibacterium | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Actinoallomurus | 0 | 0 | 0 | 87 | 0 | 0 |
| g__Edaphobaculum; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 68 |
| f__Chitinophagaceae; | 0 | 72 | 0 | 0 | 0 | 51 |
| g__Flaviumibacter | 0 | 0 | 47 | 0 | 0 | 0 |
| f__Chitinophagaceae | 0 | 0 | 0 | 58 | 0 | 0 |
| f__Gemmatimonadaceae | 62 | 67 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| c__Alphaproteobacteria; | 0 | 0 | 0 | 103 | 104 | 93 |
| g__KD3-10 | 0 | 52 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__CCD24; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 73 |
| f__Comamonadaceae | 0 | 0 | 0 | 342 | 0 | 0 |
| g__Pedomicrobium | 0 | 226 | 275 | 0 | 0 | 369 |
| f__Xanthobacteraceae; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 80 |
| o__Acidobacteriales | 0 | 0 | 214 | 0 | 250 | 0 |
| o__Acidobacteriales | 206 | 0 | 0 | 0 | 321 | 90 |
| g__Subgroup_2; | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 370 |
| f__Xanthobacteraceae; | 0 | 323 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| o__Vicinamibacterales; | 0 | 0 | 0 | 213 | 0 | 0 |
| g__Bacillus | 179 | 76 | 40 | 164 | 86 | 36 |
| o__Vicinamibacterales; | 0 | 0 | 242 | 0 | 251 | 0 |
| g__Streptomyces | 0 | 0 | 0 | 293 | 0 | 0 |
| g__Paenibacillus | 0 | 0 | 127 | 0 | 0 | 0 |
| g__Mycobacterium | 270 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Clostridium_sensu_stricto_1; | 0 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | |
|---------------------------|----|-----|----|---|----|----|
| g__Hamadaea; | 61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| g__Candidatus_Udaeobacter | 0 | 221 | 22 | 0 | 53 | 97 |