

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE



BIANA PELISSARI GADANHOTO

CONTROLE BIOLÓGICO DE FUNGOS FITOPATOGÊNICOS POR
***PHYLLOSTICTA CITRICARPA* E SUA APLICAÇÃO PARA BIORREMEDIAÇÃO DE**
SOLOS CONTAMINADOS POR HERBICIDAS

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do Título de Mestre em Agricultura e Ambiente ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente do Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

ARARAS
2022

Pelissari Gadanhoto, Biana

Controle biológico de fungos fitopatogênicos por
Phyllosticta citricarpa e sua aplicação para
biorremediação de solos contaminados por herbicidas /
Biana Pelissari Gadanhoto -- 2022.
104f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Renato Nallin Montagnolli
Banca Examinadora: Renato Nallin Montagnolli,
Fernando Alves de Azevedo, Patrícia Andrea Monquero
Bibliografia

1. BIODEGRADAÇÃO. 2. AGROTÓXICOS. 3.
TRATAMENTO DE SEMENTES. I. Pelissari Gadanhoto,
Biana. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Biana Pelissari Gadanhoto, realizada em 02/08/2022.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Alves de Azevedo (IAC)

Profa. Dra. Patricia Andrea Monquero (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por me sustentar todos os dias e me capacitar para buscar meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli pela orientação, dedicação, ensinamentos e principalmente compreensão e suporte dado durante esse período.

Ao Programa de Pós-graduação em Agricultura e Ambiente, coordenação, corpo docente, funcionários e colegas de turma.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), onde desenvolvi este trabalho e a todos os integrantes que compartilharam a vivência comigo durante esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento desta pesquisa (código de financiamento 001).

As empresas Sumitomo Chemical do Brasil pelas cepas cedidas e Sipcam Nichino do Brasil pelas sementes cedidas para a realização desta pesquisa.

À minha família e amigos, por todo apoio, incentivo e compreensão para que eu trilhasse esse caminho

Resumo

A citricultura é um dos setores mais representativos do cenário agroindustrial brasileiro. Diante das doenças que mais acometem essa cultura, destaca-se a Mancha Preta dos Citros (MPC), cujo patógeno é o fungo *Phyllosticta citricarpa*. Esse patógeno provoca a exposição de lesões na casca, causando a diminuição na demanda de cítricos e seu comércio para mesa. Em casos mais severos acarreta a queda prematura, resultando em grandes perdas em volume de produção. O controle dessa praga exige aplicações recorrentes de fungicidas, além de outros agrotóxicos como os herbicidas, para controle das daninhas. Muitos desses químicos acarretam adversidades na qualidade ambiental de solo, ar, água e na biodiversidade. Neste cenário o controle biológico e a bioprospecção de processos naturais têm se destacado. O presente projeto explorou o potencial bioativo de *Phyllosticta citricarpa* para controle biológico e biorremediação de solos. Para isso foi analisada a atividade antifúngica de *Phyllosticta citricarpa* contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, por meio de cultivo pareado e difusão em disco com extrato bruto, onde foi possível determinar que a produção de metabólitos é um fator agente de inibição de crescimento ou de estruturas de resistência reprodutiva como no caso de *Sclerotinia sclerotiorum*. Os testes de germinação com tratamento de sementes apresentam resultados semelhantes aos fungicidas químicos comerciais para as culturas da Soja, Trigo, Sorgo e Feijão. Para o Milho o controle apresentou melhores resultados que o comercial. O processo de biodegradação das amostras contaminadas com os herbicidas utilizados na cultura dos citros, o Oxyfluorfem (pré-emergente) e o Flumioxazina (pré e pós-emergente) foram submetidos a método de análise de respirometria e colorimetria, onde observou-se que a biodegradação dos contaminantes pela ação dos microrganismos de solo e pela presença de *Phyllosticta citricarpa* gerou uma maior produção de CO₂ e consequente biodegradação, principalmente no ensaio do herbicida Oxyfluorfem (852,28 mg de CO₂), correlacionado ao ensaio de Velocidade de Crescimento, também apresentou um melhor desenvolvimento, mesmo que as características morfológicas do fungo tenham passado por processo de dismorfia. Os ensaios de descoloração reafirmam os resultados de biodegradação da respirometria, onde existe o processo pela comunidade microbiana do solo (12 e 15 horas), mas apresenta maiores valores de biodegradação quando somado ao inóculo de estudo (7 e 8 horas). Os organismos-testes apresentam efeitos sub-letais expostos aos contaminantes e quando submetidos a presença do extrato bruto o efeito de toxicidade é atenuado, reforçando a efetividade do extrato em minimizar os efeitos negativos dos herbicidas frente aos cenários ambientais.

Palavras-Chave: biodegradação, agrotóxicos, respirometria, antagonismo, tratamento de sementes

ABSTRACT

Citriculture is one of the most representative sectors of the Brazilian agro-industrial scenario. In view of the diseases that most affect this crop, the Citrus Black Spot (MPC) stands out, whose pathogen is the fungus *Phyllosticta citricarpa*. Essentially an exhibition of capacity in the bark, teasing demand from table trade. In more severe cases the drop in production, in large volume productions. Controlling this pest requires recurrent applications of fungicides, in addition to other pesticides such as herbicides, to control weeds. Many of these environmental chemicals bring adversity and quality of biodiversity. In this scenario, biological control and bioprospecting of natural processes have stood out. The present project explores the bioactive potential of *Phyllosticta citricarpa* for biological control and soil bioremediation. For this is an antifungal activity of *Phyllosticta citricarpa* against the phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides*, by means of culture and disc diffusion with crude extractor, where it was possible to determine that an agent of metabolite production is a factor of gross growth of or of cellular resistance structures as in the case of *Sclerotinia sclerotiorum*. Presentation tests with commercial seed treatment similar to chemical fungicides for Soybean, Wheat, Sorghum and Bean crops. For corn, the fungic control was of superior quality to the commercial one. The biodegradation process of contaminated samples with the herbicides used in citrus cultivation, Oxyfluorfem (pre-emergent) and Flumioxazina (pre- and post-emergent) were selected as the method of analysis of respirometry and colorimetry, where it was observed that the biodegradation of contaminants by the action of soil microorganisms and by the presence of *Phyllosticta citricarpa* generated a greater production of CO₂ and consequent biodegradation biodegradation, mainly in the test of the herbicide Oxyfluorfem (852.28 mg of CO₂), correlated to the growth velocity test , also showed a better development, even though the morphological characteristics of the fungus had gone through a dysmorphic process. The discoloration tests reaffirm the biodegradation results of the respirometry, where there is the process by the soil microbial community (12 and 15 hours), but present higher biodegradation values added to the study inoculum (7 and 8 hours). The test organisms present sub-lethal effects exposed to the contaminants and when subjected to the presence of the crude extract the toxicity effect is attenuated, reinforcing the effectiveness of the extract in minimizing the negative effects of herbicides in the face of environmental scenarios.

Key words: biodegradation, pesticides, respirometry, antagonism, seed treatment

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas de desenvolvimento.....	2
Figura 2. . Placa de <i>Phyllosticta citricarpa</i> em meio BDA	14
Figura 3. Cepas em meio PDA. A: <i>Sclerotinia sclerotium</i> , B: <i>Fusarium verticillioides</i> , C: <i>Rhizoctonia solani</i>	15
Figura 4. A: Extrato Bruto; B: Filtração à vácuo; C: Extrato.....	16
Figura 5. Microrganismos inoculados em meio BD utilizados no ensaio de Difusão em Disco.	18
Figura 6. Semente sendo inoculada no patógeno.	20
Figura 7. Bandejas vedadas com plástico preto em incubadora BOD.....	21
Figura 8. Escala de infecção de sementes.	21
Figura 9. <i>P. citricarpa</i> inoculado 3 dias antes de <i>R. solani</i>	23
Figura 10. <i>P. citricarpa</i> inocu	23
Figura 11. <i>P. citricarpa</i> inoculado 3 dias antes de <i>F. verticillioides</i>	23
Figura 12. <i>R. solani</i> inoculado 3 dias antes de <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 13. <i>S. sclerotiorum</i> inoculado 3 dias antes de <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 14. <i>F. verticillioides</i> inoculado 3 dias antes de <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 15. <i>R. solani</i> ao mesmo tempo que <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 16. <i>S. sclerotiorum</i> ao mesmo que <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 17. <i>F. verticillioides</i> inoculado ao mesmo tempo que <i>P. citricarpa</i>	24
Figura 18. Avaliação de crescimento de área de <i>Rhizoctonia solani</i>	26
Figura 19. Avaliação de crescimento de área de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	27
Figura 20. Boxplot <i>Fusarium verticillioides</i>	28
Figura 21. Ensaio de difusão em disco de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> ,; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida.....	29
Figura 22. Ensaio de difusão em disco de <i>Fusarium verticillioides</i> ; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida.....	29
Figura 23. Ensaio de difusão em disco de <i>Rhizoctonia solani</i> ; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida	29
Figura 24. <i>F. verticillioides</i> em milho, A: controle, B: Fungicida, C: Extrato.....	30
Figura 25. <i>R. solani</i> em Trigo A: controle, B: Fungicida, C: Extrato.....	31
Figura 26. <i>R. solani</i> em Sorgo A: controle, B: Extrato, C: Fungicida	31
Figura 27. <i>S. sclerotiorum</i> em Soja, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida.....	31

Figura 28. R. solani em Soja, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida.....	32
Figura 29. S. sclerotiorum em Feijão, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida	32
Figura 30. F. verticillioides em milho.....	33
Figura 31. R. solani em Trigo	33
Figura 32. R. solani em Soja	34
Figura 33. S. solani em Soja.....	34
Figura 34. R. solani em Soja	34
Figura 35. R. solani em Sorgo	35
Figura 36. Imagem de Satélite do ponto de coleta das amostras de solo.	37
Figura 37. Esquema de um respirômetro de Bartha. A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco Erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm).	40
Figura 38. Titulometria semanal	42
Figura 39. Representação dos raios desenhados no fundo das placas de Petri e o raio inicial do inóculo.	45
Figura 40. Solução de DCPIP	47
Figura 41. Solo coletado em pomar de Citros e anterior ao processo de biodegradação.	48
Figura 42. Espectrofotômetro	49
Figura 53. Produção semanal de CO ₂ nos ensaios respirométricos.....	51
Figura 54. Produção acumulada de CO ₂ nos ensaios respirométricos.....	52
Figura 55. Gráficos de produção acumulada de Co ₂ nos ensaios respirométricos após 91 dias de experimento. 1: Controle, 2: Controle+Inóculo, 3: Herbicida Oxyfluorfem, 4: Herbicida Oxyfluorfem+Inóculo, 5: Herbicida Flumioxazina+Inóculo.....	55
Figura 43. P. citricarpa em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 1.	57
Figura 44. P. citricarpa em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 2.	57
Figura 45. P. citricarpa em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 3.	57
Figura 46. P. citricarpa em meio Ágar+Oxyfluorfem na Concentração 1.....	58
Figura 47. P. citricarpa em meio Ágar+Oxyfluorfem na Concentração 2.....	58
Figura 48. P. citricarpa em meio Ágar+ Oxyfluorfem na Concentração 3.....	58
Figura 49. P. citricarpa em meio BDA+ Oxyfluorfem na Concentração 1.	58

Figura 50. P. citricarpa em meio BDA+ Oxyfluorfem na Concentração 2.	58
Figura 51. P. citricarpa em meio BDA+ Oxyfluorfem na Concentração 3.	59
Figura 52. Gráfico de crescimento radial	60
Figura 56. 1: solo+DCPIP+ água; 2: solo+DCPIP+BH; 3: solo+DCPIP ,BH,Oxyfluorfem; 4: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina; 5: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem+Inóculo; 6: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo.	61
Figura 57. 1: solo+ DCPIP+água; 2: solo+DCPIP+BH; 3: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem	62
Figura 58. 4: solo+ DCPIP+BH+ Flumioxazina; 5: solo+DCPIP+BH+ Oxyfluorfem+ Inóculo; 6: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo.....	62
Figura 59. Tempo de descoloração total dos ensaios.	63
Figura 60. Gráfico de descoloração.....	64
Figura 61. Recipiente teste para ensaio de fuga.	67
Figura 62. Recipiente teste montado contendo as amostras de solo.	68
Figura 63. Minhocas selecionadas para o ensaio de fuga, recipientes-teste em incubadora BOD para manutenção de temperatura.	69
Figura 64. Placa de Petri com sementes de Lactuca sativa sob papel filtro.....	72
Figura 65. A: Minhoca antes do ensaio; B: Minhoca com processo de descoloração como efeito sub-letal do ensaio.	76
Figura 66. A: Ensaio de germinação em solo; B: Ensaio de germinação em papel filtro	77
Figura 67. Dados de titulação.....	89
Figura 68. Gráficos de produção de Co2 semanal	91
Figura 69. Outputs das análises estatísticas do R.....	94
Figura 70. Análises estatísticas.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de patógenos inoculados e seus hospedeiros.	20
Tabela 2. Teste estatístico	25
Tabela 3. Análise química do solo	38
Tabela 4. Ensaio de respirometria.....	41
Tabela 5. Meios de cultura utilizados no ensaio de Colorimetria	47
Tabela 6. Tratamentos utilizados no ensaio de colorimetria.	48
Tabela 8. Produção acumulada de Co ₂ nos ensaios respirométricos após 91 dias de experimento.....	53
Tabela 9. Valor máximo de produção de CO ₂ e o tempo previsto nos tratamentos realizados	54
Tabela 7. Velocidade de crescimento radial para <i>Phyllosticta citricarpa</i> nos meios Agar+Herbicida e PDA+Herbicida nas diferentes concentrações.	56
Tabela 10. Tratamentos utilizados no ensaio de fuga.....	68
Tabela 11. Tratamentos utilizados no ensaio de teste de contato com <i>Eisenia fetida</i>	71
Tabela 12. Tratamentos utilizados no ensaio de germinação.	72
Tabela 13. Tratamento utilizados no ensaio de germinação.....	73
Tabela 14. Peso e % de diferença de massa.....	74
Tabela 15. Quantidade de organismos por seção e % de fuga.	75
Tabela 16. Perda de massa de <i>Eisenia fetida</i> após teste de contato.....	75
Tabela 17. Raios dos ensaios de VCR	92
Tabela 18. Áreas de cultivo pareado.....	93
Tabela 19. Análises espectrofotométricas do ensaio de DCPIP	96
Tabela 20. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo controle.	96
Tabela 21. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Flumioxazina+extrato.	97
Tabela 22. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Extrato.....	97
Tabela 23. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Flumioxazina.	98

Tabela 24. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Oxyfluorfem.	98
Tabela 25. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Oxyfluorfem + Extrato.	99
Tabela 26. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo controle.	99
Tabela 27. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Flumioxazina.	100
Tabela 28. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Flumioxazina+ Extrato.	101
Tabela 29. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Extrato.	101
Tabela 30. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Oxyfluorfem+ extrato.	102
Tabela 31. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Oxyfluorfem.	102
Tabela 32. Peso Inicial e final no ensaio de Teste de contato	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD- Batata Dextrose

BDA – Batata Dextrose Agar

Bmax – Valor máximo de biodegradação previsto

Bmaxt – Tempo estimado para valor máximo de biodegradação

CN- Caldo Nutriente

BH- Bushnell Haas

DBO/BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCPIP – 2,6-diclorofenol-indofenol

DQO - Demanda Química de Oxigênio

LAMAM- Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular

O+E – Oxyfluorfem + Extrato

F+E – Flumioxazina + Extrato

pH - Potencial Hidrogênionico

RPM - Rotação por minuto

UFSCAR- Universidade Federal de São Carlos

VCR- Velocidade de Crescimento Radial

SUMÁRIO

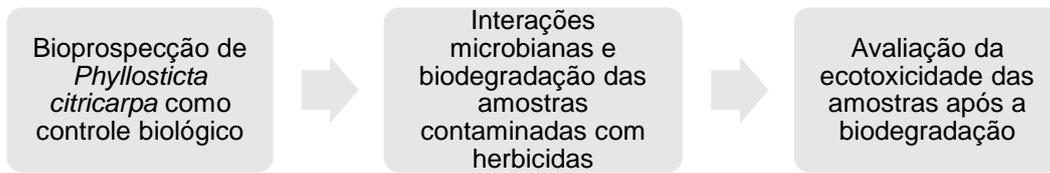
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Citricultura	3
2.1.2 Mancha Preta dos Citros	4
2.2 Controle Biológico e doenças fúngicas	5
2.2.1 Mofo Branco (<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>).....	7
2.2.2 Podridão de raízes (<i>Fusarium verticillioides</i>).....	7
2.2.3 Mela da Soja (<i>Rhizoctonia solani</i>).....	8
2.3 Biorremediação	8
2.4 Herbicidas.....	9
4.4.1 Herbicida Oxifluorfem.....	10
4.4.2 Herbicida Flumioxazina.....	11
3. OBJETIVOS.....	12
3.1 OBJETIVO GERAL.....	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
4. CAPÍTULO 1 – BIOPROSPECÇÃO DE <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i> PARA CONTROLE BIOLÓGICO	13
4.1 Introdução.....	13
4.2 Material e métodos.....	14
4.2.1 Microrganismos	14
4.2.2 Extrato Bruto	15
4.2.3 Cultivo Pareado.....	16
4.2.4 Difusão em disco	17
4.2.5 Tratamento de sementes.....	19
4.3 Resultados e Discussões	22
4.3.1 Cultivo pareado.....	22
4.3.2 Difusão em Disco.....	28
4.3.3 Tratamento de Sementes	30
5. CAPÍTULO 2 – BIODEGRADAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS PELOS HERBICIDAS OXYFLUORFEM E FLUMIOXAZINA	36
5.1 Introdução.....	36
5.2 Material e Métodos.....	37
5.2.1 Respirimetria.....	37

5.2.2 Velocidade de Crescimento Radial	45
5.2.3 Colorimetria	46
5.3 Resultados e Discussão	50
5.3.1 Respirometria	50
5.3.2 Velocidade de Crescimento Radial	56
5.3.3 Colorimetria	61
6. CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ORGANISMOS TESTES FRENTE A HERBICIDAS E EXTRATO <i>PHYLLOSTICTA CITRICARPA</i>	65
6.1 Introdução	65
6.2 Material e Métodos	67
6.2.1 Ecotoxicidade com <i>Eisenia fetida</i>	67
6.2.2 Teste de germinação com <i>Lactuca sativa</i>	71
6.3 Resultados e Discussão	74
6.3.1 Teste de fuga	74
6.3.2 Teste de contato	75
6.3.3 Teste de germinação	77
7. CONCLUSÃO GERAL	79
8. REFERÊNCIAS	80
9. APÊNDICES	89
9.1 Titulação	89
9.2 Produção de CO ₂ semanal	91
9.3 Dados de Velocidade de Crescimento Radial	92
9.4 Áreas de cultivo pareado	93
9.5 Dados de Cultivo pareado	94
9.6 Análises Espectrofotométricas do ensaio de colorimetria	96
9.7 Dados de teste de germinação de <i>Lactuca sativa</i>	96
9.8 Dados do ensaio de <i>Eisenia fétida</i>	104

1. INTRODUÇÃO GERAL

O interesse científico no controle biológico de alguns fitopatógenos tem sido estimulado pela crescente ciência dos efeitos nocivos que alguns agrotóxicos oferecem ao ambiente. As adversidades geradas na qualidade ambiental e na saúde humana vem sendo cada vez mais enfatizadas com a percepção dos consumidores sobre seus impactos (ARAÚJO e ORLANDA, 2014) afetam diretamente a estabilidade produtiva e seu uso contínuo e de forma desenfreada pode levar a aquisição de resistência por parte dos fitopatógenos e de plantas invasoras. Muitos agricultores acabam erroneamente aumentando a utilização em uma tentativa de maior controle. O que acaba agravando ainda mais os impactos ambientais e produtivos. Diante disso, existe um grande interesse em alternativas como o controle biológico de fitopatógenos e pragas, além de maneiras para mitigar os impactos diretos nos recursos naturais. Esta pesquisa de mestrado consiste em estudar o agente causador de uma das principais doenças que acometem a citricultura, como uma possível barreira ecológica fúngica, por meios alternativos, livres de fungicidas, combatendo outros fitopatógenos fúngicos de grande impacto para a agricultura, e simultaneamente a ação conjunta de *Phyllosticta citricarpa* na biorremediação de solos contaminados por herbicida grande demanda de aplicações. Sua metodologia está dividida em três capítulos conforme a Figura 1, a bioprospecção de *Phyllosticta citricarpa* como agente de controle biológico de patógenos que acometem as culturas da soja, milho, feijão, sorgo e trigo, as interações microbianas e a biodegradação das amostras contaminadas por herbicidas, e posteriormente a avaliação ecotoxicológica.

Figura 1. Etapas de desenvolvimento.



2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Citricultura

A citricultura é um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro. Apesar disso, pragas e doenças representam uma grande ameaça, sendo responsáveis por expressivas perdas em produção. Exposto este cenário, a Mancha Preta dos Citros (MPC) é conhecida como uma das principais doenças acometidas na cultura. Atualmente, estima-se que a doença esteja presente em praticamente todos os municípios produtores de citros do Brasil (SILVAPINHATI et al, 2009; GOES et al., 2000; LOPES, 2007).

No inventário de 2020/2021 foi possível dimensionar a contribuição ambiental do setor citrícola, por meio da quantificação de área preservada. A área total destinada a preservação de vegetação nativa totaliza 181.750 hectares. Já as áreas destinadas ao cultivo de citros nessas mesmas propriedades somam 459.058 hectares, de forma comparativa, há um hectare dedicado à preservação ambiental para cada 2,52 hectares destinados ao cultivo de citros. Esse patrimônio e consequente impacto positivo na cadeia produtiva agrícola, reforça o compromisso dos citricultores com a sustentabilidade ambiental (FUNDECITROS, 2020).

A citricultura brasileira apresenta significativa produtividade. A safra 2019/2020 obteve produtividade recorde, e um significativo acréscimo em relação anterior. O clima atuou de forma favorável para a floração e pegamento de frutos, e fatores estruturais como qualidade de tratamentos culturais, irrigação, controle da Clorose e do Huanglongbing (HLB). Após uma safra muito produtiva, a safra 2020/2021 apresentou uma redução de cerca de 100 milhões de caixas, contabilizando 288 milhões. Essa redução pode estar associada ao

fator de alternância de produção, onde um ano muito produtivo acaba por aumentar o consumo nutricional das plantas. Somado a isso, o clima também entra como um fator prejudicial, as temperaturas mais altas no fim do terceiro trimestre e início do quarto trimestre de 2019 prejudicaram a fixação de frutos recém-formados. No primeiro trimestre e início do segundo no ano de 2020, o volume de chuva apresentou índices baixos, o que provoca a redução de crescimento e conseqüente baixa no rendimento caixa peso para o produtor. Apesar de apresentar uma produção 12,5% menor em relação aos últimos 10 anos, os resultados desta safra foram alcançados apesar da situação atípica decorrente da pandemia de Covid-19.

2.1.2 Mancha Preta dos Citros

O estado de São Paulo é o maior representante do setor citrícola. Em relação ao histórico da doença, no Brasil, o primeiro relato em pomares cítricos ocorreu em 1980 no Estado do Rio de Janeiro, causando perdas consideráveis em mexerica. Já em 1992, a doença foi verificada em frutos de pomares localizados nos municípios de Mogi Guaçu, Mogi Mirim e Conchal (SILVAPINHATI et al, 2009). Nos anos subsequentes, a doença ampliou a sua distribuição geográfica de forma rápida estendendo-se para vários outros municípios da região de forma endêmica como a região citrícola de Limeira/SP. O agente causal da mancha preta dos citros apresenta duas fases de desenvolvimento, bem distintas: (i) a fase telemórfica, representada pelos ascósporos, descrito como *Guignardia citricarpa* por Kielly (1948a,b); e (ii) a fase anamórfica representada pelos conídios e conhecida como *Phyllosticta citricarpa* (VAN DER AA, 1973) . A primeira forma do fungo é formada em folhas caídas em decomposição, já a segunda, nas lesões dos frutos, em folhas aderidas à planta e especialmente em ramos secos. Os ascósporos carregados pelo vento são responsáveis pelas novas fontes de inóculo a curtas e longas distâncias enquanto os picnidiosporos espalham-se com a

água e aumentam o desenvolvimento da doença nas plantas (SILVA, 2014; KIELY, 1948; KOTZÉ, 1981, 1996; FEICHTENBERGUER e SPÓSITO, 2003; SPÓSITO et al., 2007; SILVA-PINHATI et al, 2009). Logo, os ascóporos são responsáveis pelo início da epidemia na planta e os conídios, de forma mais agressiva pelo desenvolvimento da mesma. Para o estado de São Paulo, os conídios são importantes na epidemiologia da doença dado ao reduzido número de variedades cultivadas e à sua elevada suscetibilidade, e ao clima favorável para o desenvolvimento da doença (SCALOPPI, 2010).

A mancha preta ocorre em todas as variedades de laranjas doces, limões verdadeiros, tangerinas e seus híbridos. Não há sintomas na lima ácida Tahiti. As variedades de maturação tardia podem apresentar maior severidade de sintomas, bem como queda de frutos mais acentuada (FUNDECITRUS, 2000) O controle da doença baseia-se na eliminação das fontes de inóculos. Consiste basicamente no emprego de fungicidas, devido ao longo período de susceptibilidade dos frutos, no mínimo por 24 semanas, e a demanda de inúmeras pulverizações (BALDASSARI et al, 2007). Entretanto Scaloppi (2014) ressalta que é importante o manejo de vegetação em ruas de plantio, com a utilização de roçadeiras ecológicas e aplicação de herbicidas, o que somado às inúmeras pulverizações de fungicidas, eleva significativamente o custo de produção e a quantidade de químicos utilizadas para o manejo da doença.

2.2 Controle Biológico e doenças fúngicas

Alguns microrganismos endofíticos, especialmente os habitantes de plantas medicinais ou de áreas naturais com grande biodiversidade, têm sido explorados pelo seu efeito protetor ao hospedeiro e pelo potencial biotecnológico na síntese de substâncias para uso na agricultura, medicina e indústria. É possível obter estas substâncias em laboratório por processo fermentativo, e elas podem conter ativos

antimicrobianos muito úteis no controle alternativo de doenças que acometem as produções agrícolas (SILVA, 2014). O potencial antagônico dos fungos foi evidenciado em trabalhos científicos de legado, como Chaumont et al. (1982), que evidenciaram extratos de 67 espécies que provocaram antagonismo. Ainda segundo Badalyan et al. (2002) os fungos possuem diferentes mecanismos de sobrevivência e proliferação, como ataque físico e produção de metabólitos biologicamente ativos, como compostos antibióticos.

As doenças fúngicas geram grandes prejuízos na agricultura, em alguns casos dependendo do grau de severidade da doença as perdas podem atingir 100% da cultura. As perdas ocasionadas por fungos incidem tanto na redução da produção como na perda de qualidade do produto. O uso de produtos alternativos é pouco utilizado, sendo limitado aos modelos de produção agroecológica e agricultura familiar. Com a tendência da população em se preocupar com a procedência dos alimentos e sua forma de produção devido ao uso incorreto e abusivo de produtos agroquímicos, os produtos alternativos podem ser utilizados assegurando a produtividade agrícola, acompanhada da conservação dos solos, água e da preservação da saúde humana (LAURETT et. al; 2016).

Em termos gerais, controle biológico é uma alternativa ao uso de agrotóxicos químicos e pode ser definido como um inibidor de danos em decorrência de outros microrganismos ou pragas. Segundo Parra *et. al* (2002) é um fenômeno que consiste na regulação por inimigos, os quais são chamados de agentes de mortalidade biótica. Os agentes de controle biológico podem ser classificados como Macroorganismos, que são insetos parasitóides, ácaros predadores e etc e os Microrganismos como os fungos, bactérias, vírus, nematóides e protozoários. Em controle de doenças É muito usual o controle de forma antagônica a fitopatógenos por meio de microrganismos endofíticos,

com o interesse científico no controle biológico de fitopatógenos estimulados pelo conhecimento das adversidades geradas pelo uso de agrotóxicos. Entretanto Suryanarayanan et al. (2009) revela que das espécies conhecidas de microrganismos poucas foram testadas quanto a produção de metabólitos bioativos para controle, o que abre uma premissa de explorar fitopatogênicos não agentes em determinadas culturas como uma forma antagônica de controle.

2.2.1 Mofo Branco (*Sclerotinia sclerotiorum*)

O mofo branco causado pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* é a segunda doença mais importante na cultura da soja, cuja perda no rendimento de grãos pode chegar a 100%. Possui capacidade de infectar mais de 408 espécies de plantas, dentre monocotiledôneas e dicotiledôneas, de importância econômica como soja, feijão, batata, tomate, ervilha, alface, chicória, repolho, couve-flor e cenoura (CRATO, 2013).

Sua principal estrutura de sobrevivência entre uma safra e outra é o escleródio, formado por uma massa de hifas com parede externa rica em melanina, que confere resistência às condições adversas do solo tornando-os viáveis durante anos mesmo na ausência de plantas hospedeiras. A infecção ocorre com a germinação eruptiva do escleródio no solo e caso haja disponibilidade de nutrientes o escleródio pode germinar diretamente com um novo crescimento micelial, a germinação micelogênica, se estiverem limitados, o escleródio pode germinar um corpo de frutificação especializado que libera numerosos esporos, a germinação carpogênica (GOMES, 2005).

2.2.2 Podridão de raízes (*Fusarium verticillioides*)

Dentre os fitopatógenos que acometem a cultura do milho se destaca o *Fusarium verticillioides* que ocasiona podridão radicular. É uma espécie capaz de produzir micotoxinas (JUNIOR et. al, 2013). É relatado como patógeno somente a cultura do

milho, mas de ocorrência muito frequente em sementes e grãos, ocasionando grandes perdas de produção e altos custos com agrotóxicos e tratamento de sementes. Podem sobreviver no solo por meio de estruturas de resistência e ainda em estruturas internas das sementes como o embrião. Por isso além dos tratamentos é necessária a diagnose preventiva (RAMOS et, al; 2014).

2.2.3 Mela da Soja (*Rhizoctonia solani*)

Rhizoctonia solani é um dos patógenos mais importantes que afetam a cultura da soja no Brasil. Causa a queima das folhas e a mela em soja, para qual as medidas de controle e prevenção são importantes antes do estabelecimento da doença, como o tratamento de sementes com fungicidas. É um microrganismo que sobrevive no solo e sua infecção da doença está relacionado a fase telemórfica ou sexual do fungo (BASSETO et. al, 2007).

2.3 Biorremediação

Biorremediação tem como uma das definições a busca por monitorar e aplicar as propriedades biodegradativas dos microrganismos frente aos poluentes ambientais. A adaptação da população microbiana a uma variedade de compostos químicos no ambiente, é a mensuração da sensibilidade ou insensibilidade de produtos tóxicos. No caso dos agrotóxicos é uma indução da aplicação prévia do mesmo composto e é explicada pela adaptação da comunidade microbiana (ARAUJO, 2002). A degradação de agrotóxicos é conhecida como a transformação destes produtos em outros compostos menos tóxicos, CO₂ e água. Esta degradação no solo pode ser realizada por via química ou biológica, ou a combinação das duas, entretanto a degradação microbiana é a via mais importante. Os microrganismos têm um papel fundamental no

comportamento dos agrotóxicos no ambiente, pois possuem a capacidade de metabolizar estes compostos, através de suas enzimas, e transformá-los em energia e nutrientes para a sua sobrevivência. (ARAÚJO, 2002). A aplicação de alguns processos de biorremediação envolvendo microrganismos, é um campo de pesquisa crescente e de grande potencial, visto as adversidades geradas pelos contaminantes. Os poluentes orgânicos segundo Carmo et al. (2013) não são de fácil remoção e degradação. De maneira geral os processos biológicos são os menos dispendiosos, entretanto requerem a presença de organismos com o potencial de biotransformação e com condições especiais para que ocorra a degradação.

Os fungos apresentam uma série de características que os tornam interessantes para aplicação em sistemas de biorremediação. São elas: capacidade de crescer sob as condições de estresse ambiental; seu modo de crescimento, induzido quimiostaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, por meio do alongamento e ramificação das hifas, que permitem a colonização de grandes áreas e o sistema de biodegradação fúngico, realizado por enzimas extracelulares. Dessa forma, o contato superficial com o contaminante é otimizado, aumentando sua biodisponibilidade e sua biodegradação (BARBOSA et al.,2013; CHANDER et al., 2004). Colla (2008) avaliou a velocidade de crescimento radial de colônias de alguns fungos em solo contaminado com herbicidas triazínicos e observou a habilidade de fungos como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* em crescerem em meios contaminados, evidenciando a utilização em estudos de biorremediação através do uso de técnicas de bioaugmentação e bioestimulação.

2.4 Herbicidas

Herbicidas são utilizados em plantas daninhas agrícolas e são fundamentais para assegurar a estabilidade produtiva. Nas pulverizações eles podem aderir ao ar,

solo, água e plantas, e eventualmente se tornar móveis. A maior região de contato é p solo, onde sofre influência de fatores ambientais, como degradação, adsorção e mobilidade (CHEY et al., 2021). Entender o comportamento de degradação e sorção é muito relevante para o controle das plantas invasoras, e toxicidade na cultura. Sua persistência não aumenta somente o controle das plantas daninhas, mas também o risco potencial de se tornarem contaminantes para ar, água e solo.

O grupo dos inibidores da Protox, a protox presente no cloroplasto catalisa a reação de conversão do protoporfirigonênio IX em protoporfirina IX. No entanto, não é a inibição da síntese de clorofilas que causa a morte da planta (CARVALHO, 2013). Com a inibição da PROTOX, o protoporfirinogênio IX acumulado no cloroplasto é transportado ao citoplasma, onde é convertido em protoporfirina IX através de oxidação pela PROTOX. A protoporfirina IX, sintetizada no citoplasma, reage com oxigênio, em presença de luz, formando oxigênio singleto. Esse composto, extremamente oxidante, inicia o processo de peroxidação de lipídeos da plasmalema, causando destruição da membrana e perda da sua função, levando a planta à morte (CARVALHO, 2013). Os herbicidas inibidores de PROTOX, usados no Brasil, podem ser divididos em quatro grupos químicos: Difeniléteres, Fenilftalimidas, Oxadiazóis e Triazolinonas.

4.4.1 Herbicida Oxifluorfem

Pertencente ao grupo químico de Difeniléteres, o oxyfluorfen apresenta caráter ácido fraco ou não-iônico e é aplicado em pré-emergência e apresenta maior adsorção ao solo (CARVALHO, 2013). O herbicida Oxyfluorfem se degrada por ação de fotólise, por evaporação e vias microbianas. Também é notado que alguns microrganismos de solo, como fixadores de nitrogênio que participam da decomposição de celulose,

amidos e proteínas não são suscetíveis a ele nas doses recomendadas, sua meia vida é de 36 a 46 dias. (PEREIRA, 1987).

4.4.2 Herbicida Flumioxazina

A Flumioxazina se enquadra no grupo dos inibidores das fenilftalomidas, que são herbicidas não-ionizáveis, pouco solúveis em água e com baixa persistência no solo, porém dentro deste grupo Flumioxazin é mais persistente no solo.

Flumioxazina é uma molécula registrada para uso em condições de pré e pós emergência, no controle de plantas daninhas de folhas larga. Por ser utilizado em pré-emergência, é fundamental que se conheça sua atividade no solo. O conhecimento dos processos de sorção e lixiviação dos herbicidas no solo permite a recomendação de doses diferenciadas por tipo de solo e, conseqüentemente, o controle mais eficiente das plantas daninhas. A flumioxazina é adsorvido pelos colóides do solo, com lixiviação reduzida. Em razão de se caracterizar como uma molécula não dissociável, o pH do solo pouco afeta seu comportamento. (JAREMTCHUK et. al; 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Utilizar o fungo *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da doença da Mancha Preta do Citros, como agente de biodegradação dos poluentes orgânicos gerados pelo setor agrícola, como os herbicidas comerciais Oxyfluorfem e Flumioxazina, combinado à bioprospecção de interações ecológicas microbianas para controle biológico de outros fitopatógenos: *Fusarium verticillioides*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Estabelecer o controle biológico por meio de relações antagônicas entre fungos fitopatogênicos;
- 2) Analisar as interações microbianas e o potencial biorremediador de *Phyllosticta citricarpa* em ambientes contaminados por herbicidas;
- 3) Determinar como herbicidas afetam as amostras ambientais testadas por meio o monitoramento da atividade microbiana;
- 4) Verificar a ecotoxicidade dos produtos da biodegradação e a viabilidade de bioindicadores sensíveis

4. CAPÍTULO 1 – BIOPROSPECÇÃO DE *PHYLLOSTICTA CITRICARPA* PARA CONTROLE BIOLÓGICO

4.1 Introdução

As adversidades advindas do uso indiscriminado dos agrotóxicos, tais como a contaminação ambiental, dos alimentos e da saúde humana, o aparecimento de populações resistentes de patógenos e a diminuição de populações de organismos benéficos ou não-alvos, tem aumentado o interesse em se desenvolver métodos de controle de doenças alternativos e menos impactantes aos ecossistemas onde a agricultura está inserida (SHIOMI et al., 2017).

Diante o exposto a utilização de microrganismos que estão inseridos no cenário agrícola se destacam como potenciais fontes para bioprospecção com fins de controle biológico e remediador de contaminantes. Como fonte importante para produção de metabólitos bioativos, a produção dessas substâncias está diretamente relacionada aos meios de cultivo que podem ser associados as fontes de carbono disponíveis, bem como reações metabólicas.

Fungos já são conhecidos por seu crescimento associado a utilização de contaminantes como fonte de carbono, por isso explorar esse potencial bioativo pode ter resultados promissores, quando associados a condições de natureza comum que estimulem essas características.

Neste capítulo, é abordado o desenvolvimento do extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa*, cuja expectativa é de controle fungicida à doenças fúngicas que ocorrem em cereais e posterior utilização como biorremediador de agrotóxicos.

4.2 Material e métodos

4.2.1 Microrganismos

Os procedimentos experimentais para fins de obtenção de resultados foram realizados no Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus de Araras. A cepa de *Phyllosticta citricarpa* foi cedida pelo Centro de Citricultura Sylvio Moreira- Instituto Agrônômico (IAC), Figura 2.

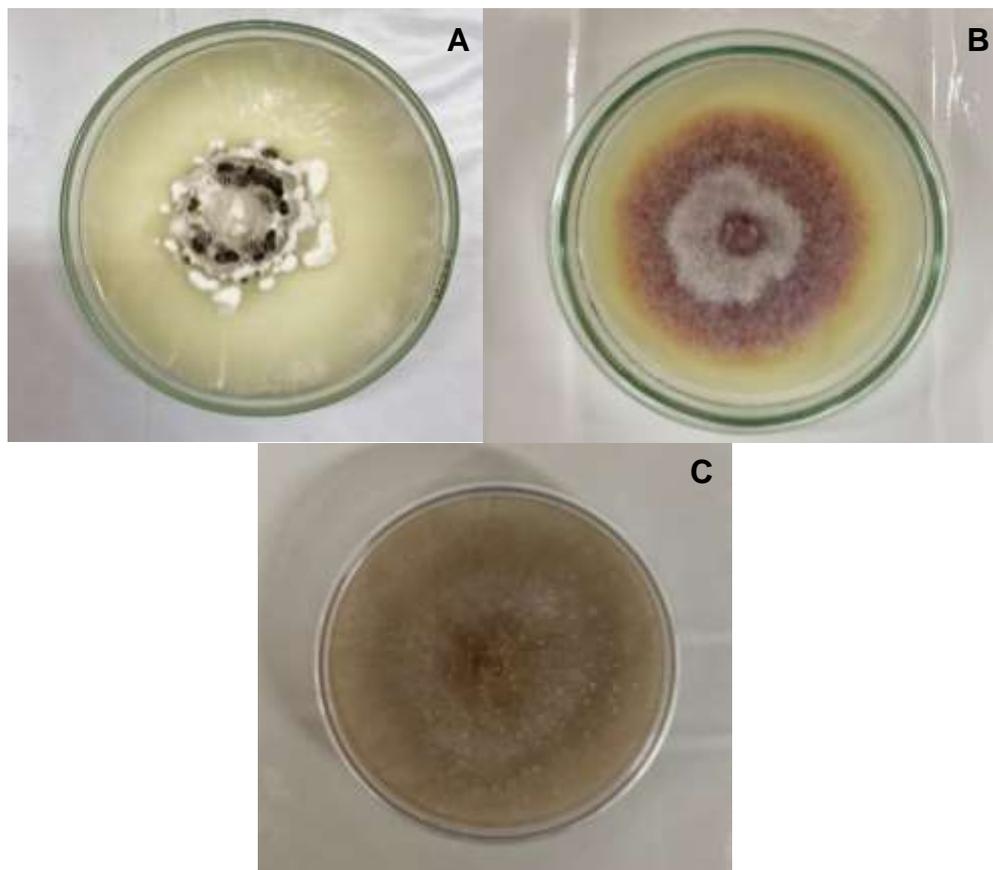
Figura 2. . Placa de *Phyllosticta citricarpa* em meio BDA



Fonte: Autoria própria

As cepas utilizadas nos ensaios e apresentadas na Figura 3, *Sclerotinia sclerotium* e *Rhizoctonia solani* foram cedidos pela empresa Sumitomo Chemical – Estação experimental de Mogi-Mirim e a cepa *Fusarium verticillioides* pertencente ao Lamam (UFSCar).

Figura 3. Cepas em meio PDA. A: *Sclerotinia sclerotium*, B: *Fusarium verticillioides*, C: *Rhizoctonia solani*.

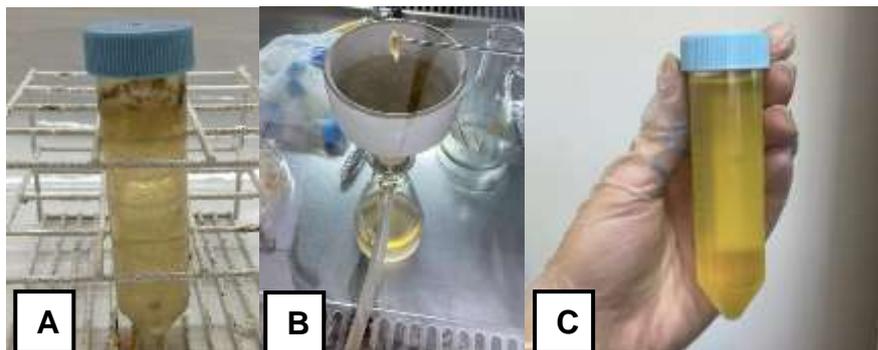


Fonte: Autoria própria

4.2.2 Extrato Bruto

Para obtenção do extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa* foi utilizado a metodologia adaptada de Elias (2015). O microrganismo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 250mL em meio BD (Batata Dextrose) e incubado sob agitação em Shaker durante 7 dias a 30°C. Após seu crescimento, o micélio foi separado do meio por centrifugação, e o sobrenadante submetido a filtração a vácuo em Kitassato (Figura 4):

Figura 4. A: Extrato Bruto; B: Filtração à vácuo; C: Extrato



Fonte: Autoria própria

4.2.3 Cultivo Pareado

Foram selecionados isolados das doenças fúngicas mais relevantes para a agricultura e não patogênicos a citros, a fim de realizar o teste de antagonismo em cultivo pareado em placas. São eles: *Sclerotinia sclerotiorum* (Mofo-branco), *Rhizoctonia solani* (Podridão-radicular) e *Fusarium verticillioides* (Podridão de raízes).

Os microrganismos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura BDA (Batata Dextrose Agar) e discos de micélio de 5 mm em lado oposto a *Phyllosticta citricarpa*. Segundo Jung (2012) os fitopatógenos devem ser inoculados na placa 3 dias antes do fungo de estudo, entretanto para esse trabalho também foi analisada a relação com o tempo de inoculação e sua vantagem competitiva. Foram inoculadas placas com *Phyllosticta citricarpa* 7 dias antes do fitopatógeno, placas inoculadas ao mesmo tempo que o fitopatógeno e placas onde os fitopatógenos foram inoculados 7 dias antes do mesmo. Para grupo controle apenas cilindros de micélios de forma individual foram em meio PDA de forma lateral. As placas foram vedadas com filme plástico PVC e mantidas em BOD a 28°C durante 14 dias. O delineamento experimental foi inteiramente casualizado e todos os ensaios foram realizados com três repetições.

4.2.3.1 Cálculo de Área

A porcentagem de inibição de crescimento dos fitopatógenos foi realizada de forma a estimar a diferença entre a média de crescimento do fitopatógeno e a média de crescimento de *Phyllosticta citricarpa* (EDGINTON et al., 1971; JUNG, 2012). Os valores de área foram calculados ao final do período do experimento pelo software AutoCAD e seus valores passaram por teste de normalidade de dados, e posteriormente pelo teste de Kruskal-Wallis e ANOVA.

4.2.4 Difusão em disco

A verificação da inibição de crescimento micelial “*in vitro*” dos fitopatógenos selecionados aos compostos presentes no extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa*. A natureza metodológica tem caráter quantitativo e expressa as porcentagens de inibição (ELIAS, 2015).

4.2.4.1 Preparo dos microrganismos

O extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa* foi preparado conforme o item 4.2.3.1 deste trabalho. Para preparo dos inóculos utilizados nos ensaios de difusão em disco, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Fusarium verticillioides* foram inoculados 3 cilindros de micélio de 5 mm de diâmetro em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio Batata Dextrose (BD) e mantidos em incubadora Shaker Solab com agitação de 100 rpm a 28°C durante 7 dias, como Figura 5. Transcorrido o período de incubação, os mesmos foram armazenados em tubos Falcon em geladeira.

Figura 5. Microrganismos inoculados em meio BD utilizados no ensaio de Difusão em Disco.



Fonte: Autoria própria

4.2.4.2 Montagem dos ensaios

Este ensaio consistiu-se em discos de papel filtro de tamanho de 5 mm de diâmetro esterilizados em autoclave e embebidos em extrato bruto, obtido conforme o item 5.1.1 deste trabalho, sobre o meio de cultura sólido com o inóculo de cada fitopatógeno escolhido para análise conforme a metodologia de disco-difusão. Primeiramente foram inoculados 1 mL de microrganismo com pipeta autoclavada e espalhados com alça de Drigalski. Os controles consistem em uma placa com disco embebido em água destilada estéril com os respectivos. Como controle positivo para comparação dos parâmetros foi utilizado o fungicida comercial Nativo® da Bayer, cuja composição tem como ingrediente ativo Trifloxistrobina e Tebuconazol. É um fungicida mesostêmico e sistêmico dos grupos químicos estrobilurina e triazol. É recomendado para controle dos fitopatógenos utilizados neste estudo, como *Rhizoctonia solani* e *Fusarium*. Foi utilizada a concentração de aplicação em campo de 2,5mL/L diluída em água destilada. Foi verificado a presença ou não de halos, que é evidência direta de controle do extrato bruto perante os fitopatógenos.

4.2.5 Tratamento de sementes

Este ensaio tem como objetivo a simulação do Extrato de *Phyllosticta citricarpa* como tratamento de sementes semelhante a ativos comerciais como o Fipronil. Para fungicidas comerciais de semente a aplicação é feita diretamente nas sementes pré-plantio. A concentração de calda varia de acordo com a molécula e pode ser realizada de forma industrial e pelo produtor, a metodologia *On farm*, onde é colocada as sementes sem tratamento em betoneira juntamente com o tratamento de sementes e as mesmas são homogeneizadas antes do plantio mecanizado. Meyer et. al (2019) também buscou desenvolver uma metodologia que se assemelha-se ao tratamento de sementes convencional, entretanto as sementes foram tratadas e inoculadas e posteriormente depositadas em Placas de Petri contendo meio BDA para verificação de crescimento micelial dos patógenos.

Para este estudo foram selecionadas sementes das principais culturas alvo dos microrganismos estudados nesta pesquisa, como Soja, Milho, Trigo, Feijão e Sorgo. As sementes todas sem tratamento, foram cedidas pela empresa Sipcam Nichino Brasil.

4.2.5.1 Montagem dos ensaios

O ensaio foi montado com discos de Papel Filtro de 10 centímetros de diâmetro esterilizados em Autoclave e posicionados em Placas de Petri de vidro. Cada cultura teve seu ensaio dividido em três grupos, o Controle foi embebido com 1,5 mL de água destilada conforme a RAS- Regras para Análises de Sementes (2019), o Controle positivo com 1,5 mL de solução do fungicida comercial Difeconazol de nome comercial Score da Syngenta, e o grupo contendo 1,5mL de extrato de *Phylosticta citricarpa*. Para a simulação de contaminação dos patógenos, as sementes foram embebidas em meio BDA contendo os microrganismos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium verticillioides* e

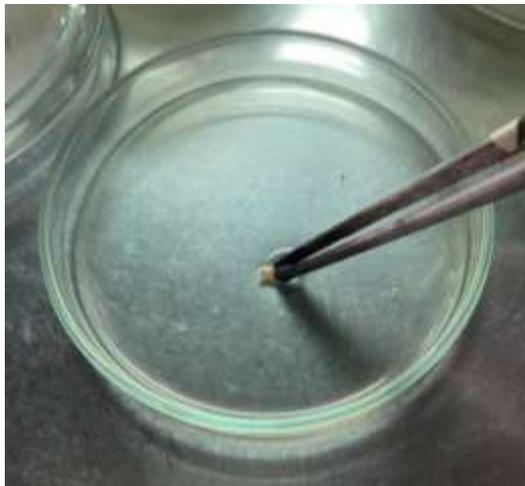
Sclerotinia sclerotiorum conforme preparo do item 4.2.4.1 do Capítulo 01 desta pesquisa. A relação de inoculação patógeno – hospedeiro está apresentada na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1. Relação de patógenos inoculados e seus hospedeiros.

<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Fusarium verticillioides</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>
Soja (<i>Glycine max</i>)	Milho (<i>Zea mays</i>)	Soja (<i>Glycine max</i>)
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)		Feijão (<i>Phaseolus vulgaris</i>)
Trigo (<i>Triticum</i>)		

Em ambiente estéril os patógenos em meio líquido foram despejados em placa de Petri autoclavada e com pinça estéril a sementes foram embebidas e assim contaminadas conforme a Figura 6.

Figura 6. Semente sendo inoculada no patógeno.



Fonte: Autoria própria

Em cada placa foram posicionadas cinco sementes, e cada ensaio foi realizado em cinco repetições. As placas foram tampadas e colocadas em bandejas envoltas por saco plástico preto para evitar a entrada de luz e incubadas em BOD durante 5 dias à 23°C conforme a Figura 7.

Figura 7. Bandejas vedadas com plástico preto em incubadora BOD.

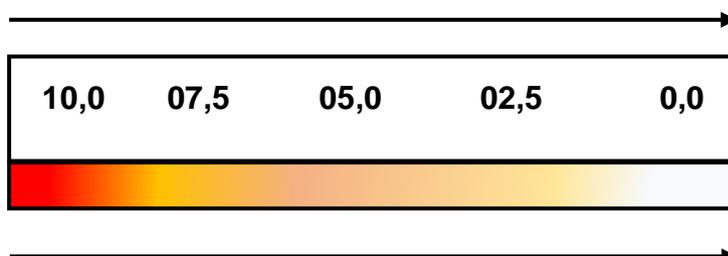


Fonte: Autoria própria

4.2.5.2 Análise qualitativa e escala de contaminação

Para verificação de eficiência de controle foi determinada uma escala qualitativa a fim de mensurar a proporção de crescimento micelial dos patógenos sobre as sementes conforme o esquema abaixo, onde 10 é contaminação integral da semente sem germinação, e 0 é semente sadia e desenvolvida (Figura 8).

Figura 8. Escala de infecção de sementes.



Fonte: Autoria própria

4.3 Resultados e Discussões

4.3.1 Cultivo pareado

A análise de área (Apêndice 10.3) do crescimento das colônias após os 14 dias transcorridos demonstrou que *Phyllosticta citricarpa* interfere no crescimento dos fitopatógenos em tempo e intensidade proporcionais. Com exceção de *Rhizoctonia solani* que teve todos os grupos de tempo de inoculação com área superior a *P. citricarpa*, *Sclerotinia sclerotiorum* apresentou inibição em todos os ensaios e *Fusarium verticillioides* quando inoculado posteriormente. Jung (2012) observou que a inibição em cultivo pareado ocorre por fatores variados, como a produção de metabólitos voláteis, liberação de metabólitos no meio de cultura e competição por nutrientes e espaço. As Figuras de 9 a 17 mostram como o teste antagônico pode sofrer alterações em competição conforme a ordem e dias de inoculação. Isso se dá por todos os microrganismos deste estudo apresentarem um crescimento rápido.

O fungo *Sclerotinia sclerotiorum* quando inoculado anteriormente a *Phyllosticta citricarpa* possui germinação carpogênica de escleródios, enquanto os grupos onde foi inoculado ao mesmo tempo e posteriormente só tiveram germinação miceliogênica. A formação de escleródios é influenciada diretamente por fatores ambientais, em condições favoráveis, o fungo desenvolve seu micélio branco e posteriores as estruturas de escleródios emergem (CRATO, 2013), o que indica que *Phyllosticta citricarpa* interfere no crescimento micelial e no estabelecimento dessas estruturas, que são a forma de sobrevivência mais longa do fungo.

Figura 9. *P. citricarpa* inoculado 3 dias antes de *R. solani*.

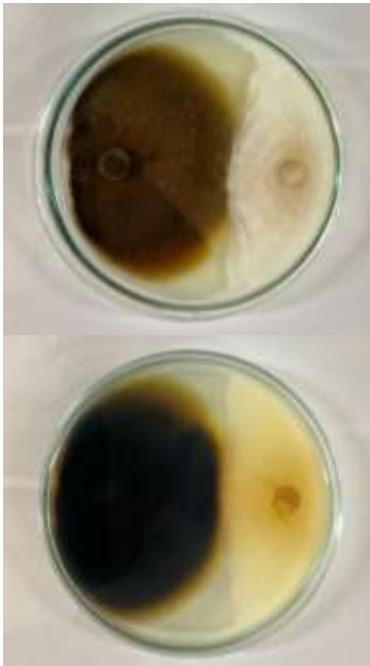


Figura 10. *P. citricarpa* inoculado 3 dias antes de *S.sclerotiorum*



Figura 11. *P. citricarpa* inoculado 3 dias antes de *F.verticillioides*.



Fonte: Autoria própria

Figura 12. *R. solani* inoculado 3 dias antes de *P. citricarpa*.



Figura 13. *S. sclerotiorum* inoculado 3 dias antes de *P. citricarpa*.



Figura 14. *F. verticillioides* inoculado 3 dias antes de *P. citricarpa*.



Fonte: Autoria própria

Figura 15. *R. solani* ao mesmo tempo que *P. citricarpa*



Figura 16. *S. sclerotiorum* ao mesmo tempo que *P. citricarpa*

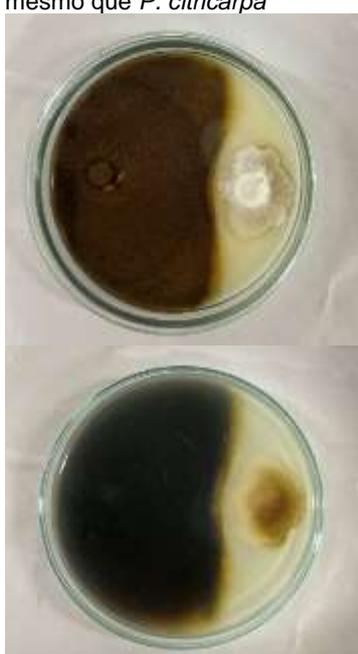
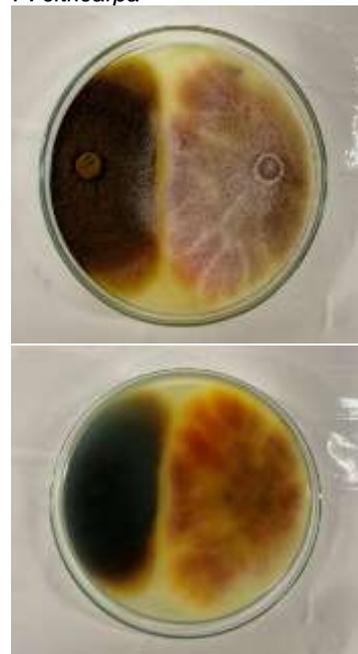


Figura 17. *F. verticillioides* inoculado ao mesmo tempo que *P. citricarpa*



Fonte: Autoria própria

4.3.1.2 Análise estatística

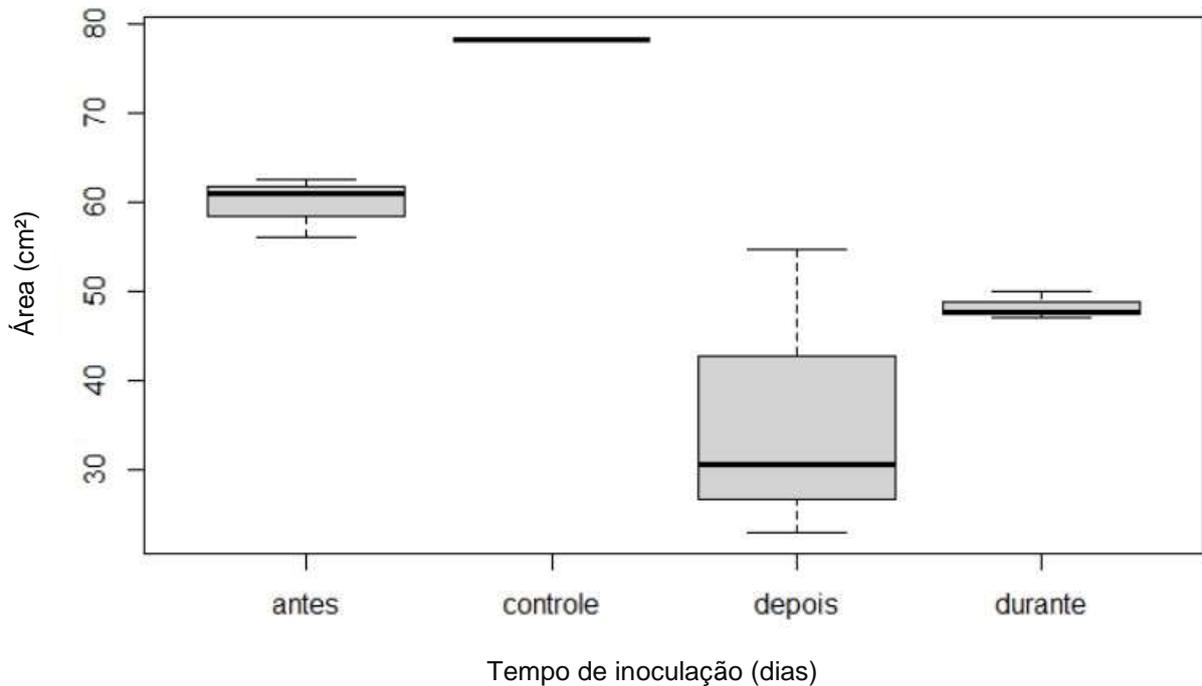
Para avaliar a diferença do crescimento de *Rhizoctonia* inoculado antes, ao mesmo tempo ou depois de *Phyllosticta citricarpa* primeiramente foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, considerando como hipótese nula que os erros têm distribuição normal e como hipótese alternativa que não possuem uma distribuição normal. Com o p-valor de $0,01954 < 0,05$, então com 95% de confiança há evidências para rejeitarmos a hipótese de normalidade dos dados, portanto não há como usar ANOVA. Adotou-se Kruskal-Wallis como um teste não paramétrico, onde a hipótese nula era de que não existe diferença entre os grupos e a hipótese alternativa onde pelo menos um grupo se difere em relação ao tempo de inoculação. Foi obtido p-valor de $0,023 < 0,05$, portanto há evidências de que existe diferença de crescimento em relação ao tempo de inoculação. Para identificar qual dos grupos se diferem foi realizado o teste de Nemenyi, que é um teste de comparação múltipla aplicado após a aplicação de teste não paramétrico com três ou mais fatores, conforme a Tabela 2, onde os pares que possuem valor inferiores a 0,05 é onde temos diferença entre casos, é possível observar que o grupo controle e onde o microrganismo é inoculado posteriormente se diferem entre si.

Tabela 2. Teste estatístico

	Antes	Controle	Depois
Controle	0.738	-	-
Depois	0,324	0,033	-
Durante	0,525	0,081	0,987

Na Figura 18 é possível observar que a variação de crescimento é maior quando inoculado depois, visto que o crescimento nos outros dois grupos de *Rhizoctonia solani* é mais significativo.

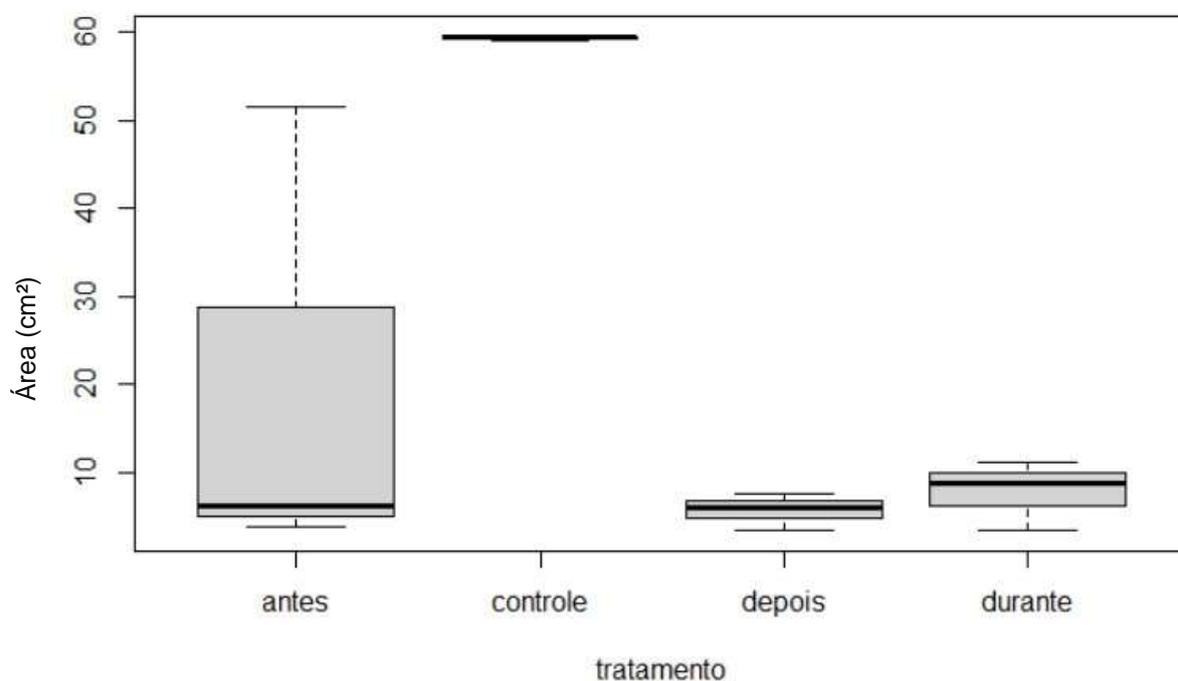
Figura 18. Avaliação de crescimento de área de *Rhizoctonia solani*



Fonte: Autoria própria

Para *Sclerotinia sclerotiorum* foi feito o teste de normalidade de Shapiro- Wilk, onde a hipótese nula era de distribuição normal dos erros e a hipótese alternativa não possuir distribuição normal. Com o p-valor de $0,005751 < 0,05$ há evidências de rejeitar a hipótese nula e por isso adotar um teste não paramétrico para verificar se existe diferença entre os grupos. Realizado o teste de Kruskal-Wallis, a hipótese nula de que não existe diferença entre os tratamentos e a alternativa de que pelo menos um grupo diferiu. O p-valor de $0,086 > 0,05$ não notamos diferença entre as medidas de área de acordo com o tempo de inoculação. Porém na Figura 19 é possível notar que o grupo onde *Sclerotinia* foi inoculada antes teve uma amplitude de variância maior, porém todas as médias não se diferem entre si.

Figura 19. Avaliação de crescimento de área de *Sclerotinia sclerotiorum*

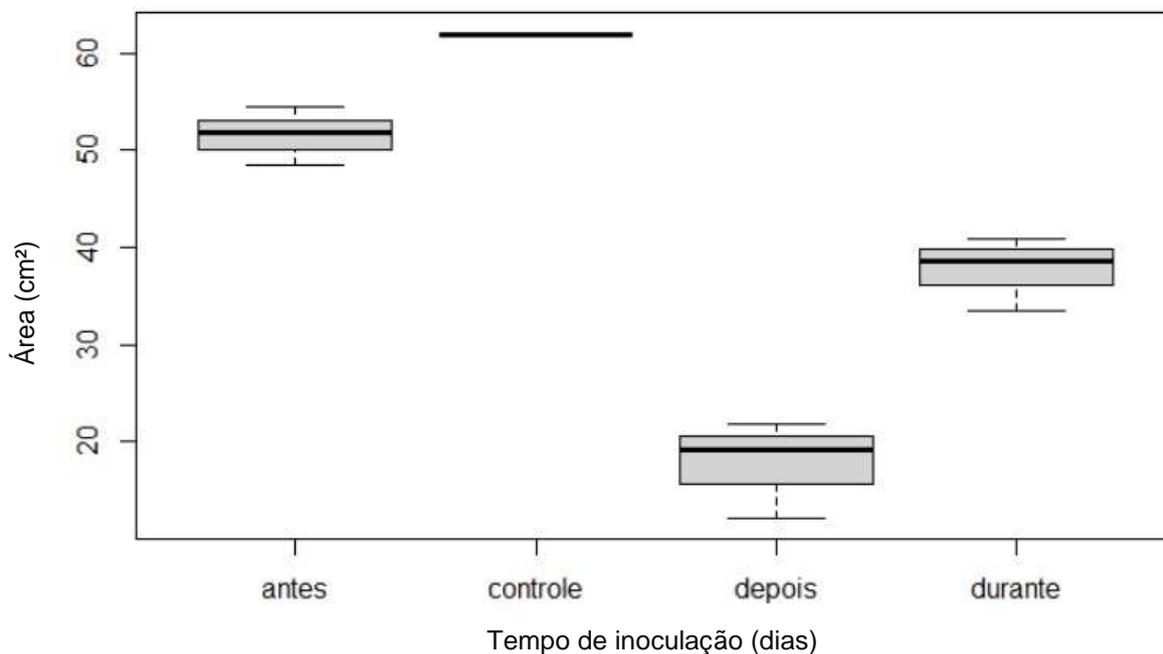


Tempo de inoculação (dias)

Fonte: Autoria própria

Para o fungo *Fusarium verticillioides* assim como nas análises anteriores passou pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk, com as hipóteses de que os erros possuem distribuição normal e a alternativa de que os mesmos não possuem. Com o p-valor $0,4248 > 0,05$ temos a normalidade dos dados, por isso foi possível realizar ANOVA seguida do teste de Tukey, onde todos apresentaram p-valor inferior a 0,05, o que indica que todos os tratamentos são diferentes e a escala tempo em incubação interfere de forma direta, podendo gerar vantagem competitiva ao microrganismo inoculado primeiramente, podendo ser observada na Figura 20 abaixo:

Figura 20. Boxplot *Fusarium verticillioides*



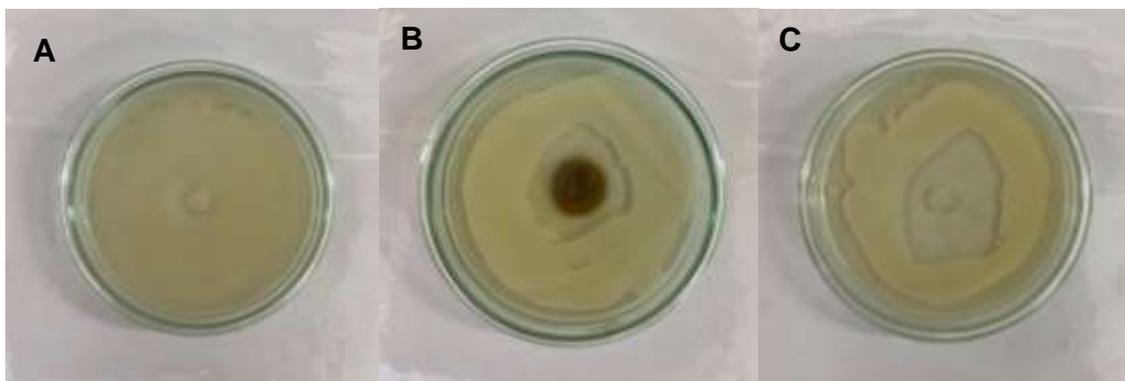
Fonte: Autoria própria

4.3.2 Difusão em Disco

Foram submetidos a difusão em disco os três fitopatógenos contra o extrato bruto, água destilada como controle positivo e fungicida como controle negativo. As Figuras 21,22 e 23 mostram os grupos conforme grupo de inibição. Apesar do cultivo pareado não apresentar inibição favorável a *Phyllosticta citricarpa* para todos os microrganismos, neste teste de difusão em disco é possível observar um halo de inibição semelhante ao controle com fungicida em todos os grupos, o que também ocorre com *Sclerotinia sclerotiorum* na Figura 21, *Fusarium verticillioides* na Figura 22 e até mesmo *Rhizoctonia solani* na Figura 23, que apresentou somente vantagem sobre *Phyllosticta citricarpa* em qualquer dos tempo de inoculação no cultivo pareado. Elias (2005) observou que alguns compostos presentes nos extratos inibiram o crescimento de *Colletotrichum* por meio de metabólitos secundários. Isso representa uma busca em

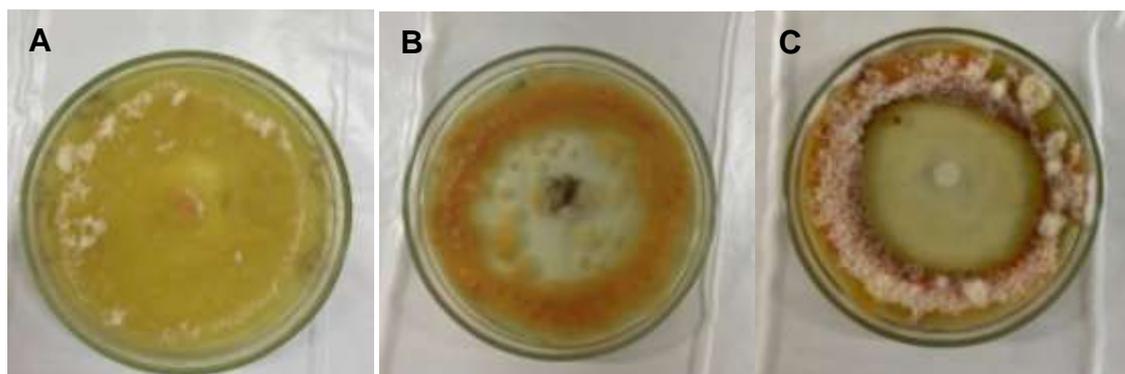
potencial para identificação desses compostos presentes enquanto extrato de *Phyllosticta citricarpa*.

Figura 21. Ensaio de difusão em disco de *Sclerotinia sclerotiorum*; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



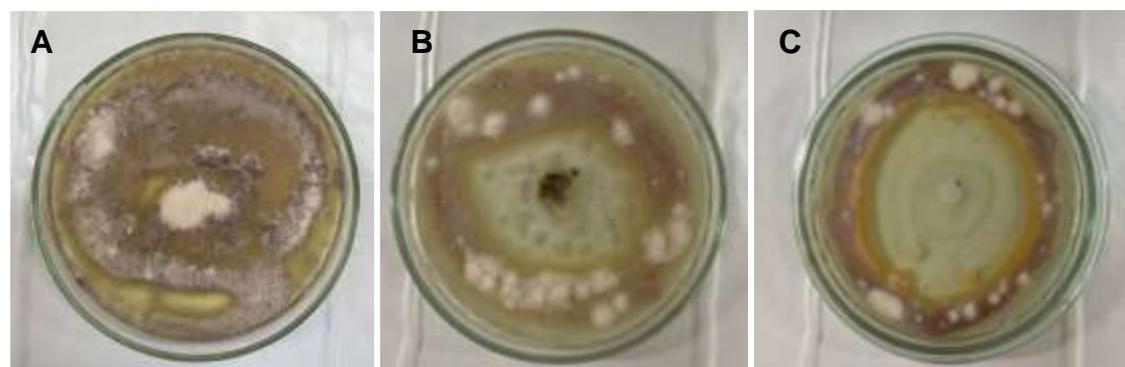
Fonte: Autoria própria

Figura 22. Ensaio de difusão em disco de *Fusarium verticillioides*; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



Fonte: Autoria própria

Figura 23. Ensaio de difusão em disco de *Rhizoctonia solani*; A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



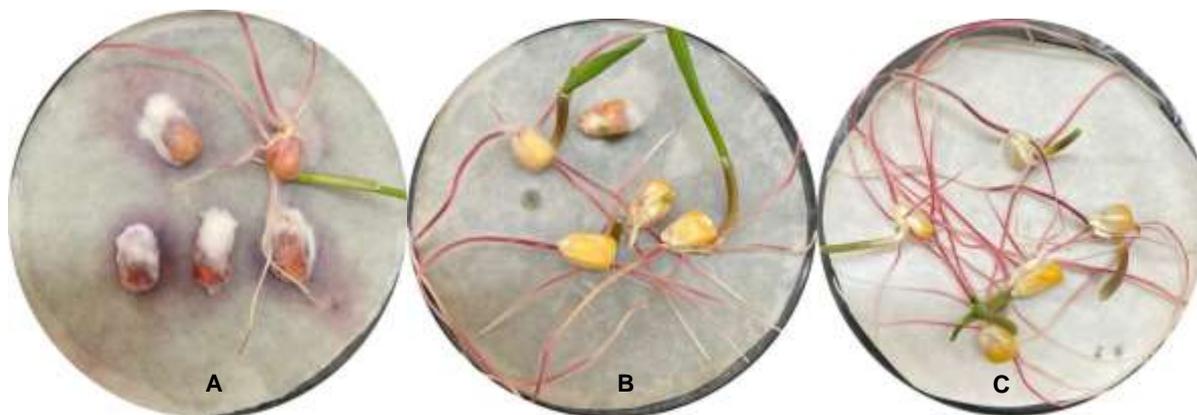
Fonte: Autoria própria

4.3.3 Tratamento de Sementes

Nas figuras de 24 a 29, podemos notar que as placas controle tiveram contaminação total das sementes inoculadas e menor quantidade de sementes germinadas, com exceção do Trigo que apresentou 100% de germinação em todos os tratamentos. Para o milho, o grupo contendo o fungicida comercial ainda apresentou sinais de colonização do patógeno, porém houve germinação e estabelecimento do cotilédone normalmente, com o grupo contendo o extrato de *Phyllosticta citricarpa* é possível notar que não houve contaminação e maior crescimento vegetal.

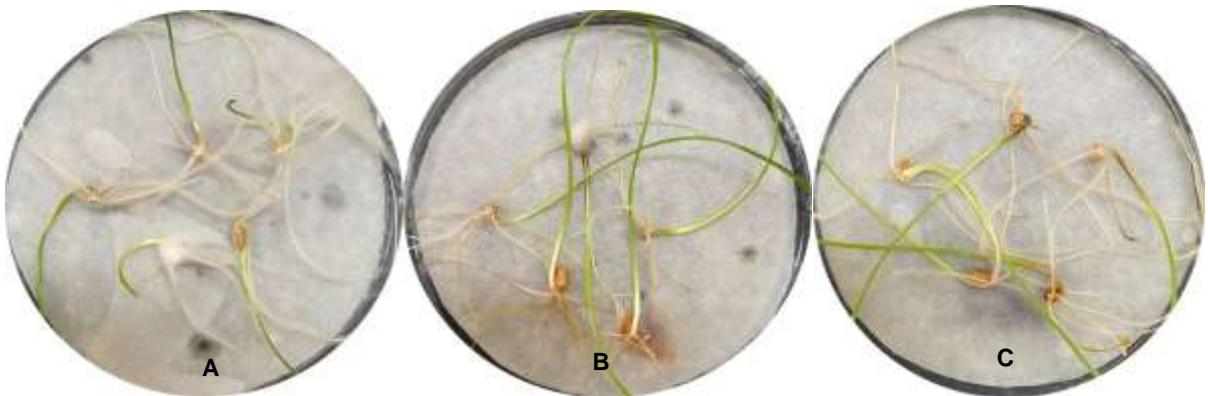
Na Figura 27 e 28, o extrato apresentou resultado semelhante ao comercial para a cultura da soja nos dois patógenos, *Rhizoctonia solani* e *Sclerotinia sclerotiorum*. O Feijão da Figura 29 apresentou contaminação no grupo controle e inibição total no grupo contendo o fungicida comercial e o extrato.

Figura 24. *F. verticillioides* em milho, A: controle, B: Fungicida, C: Extrato



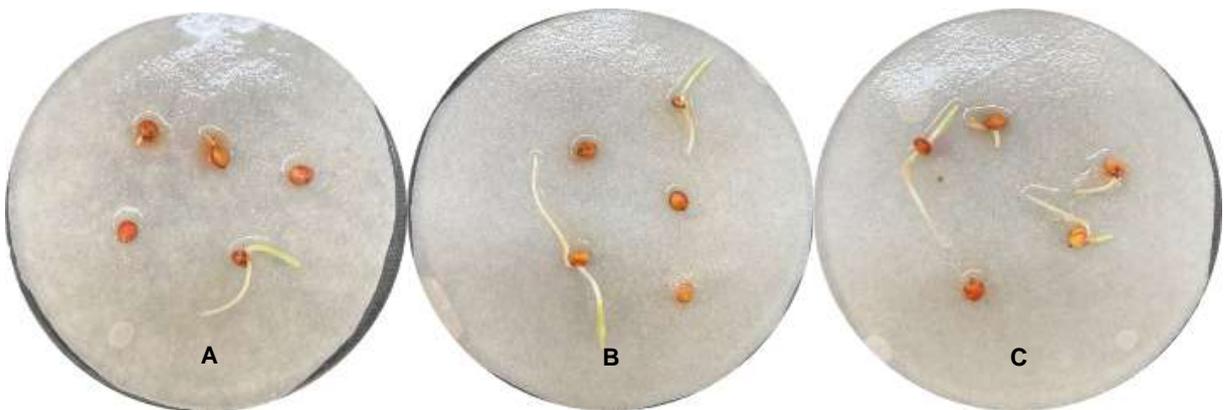
Fonte: Autoria própria

Figura 25. *R. solani* em Trigo A: controle, B: Fungicida, C: Extrato



Fonte: Autoria própria

Figura 26. *R. solani* em Sorgo A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



Fonte: Autoria própria

Figura 27. *S. sclerotiorum* em Soja, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



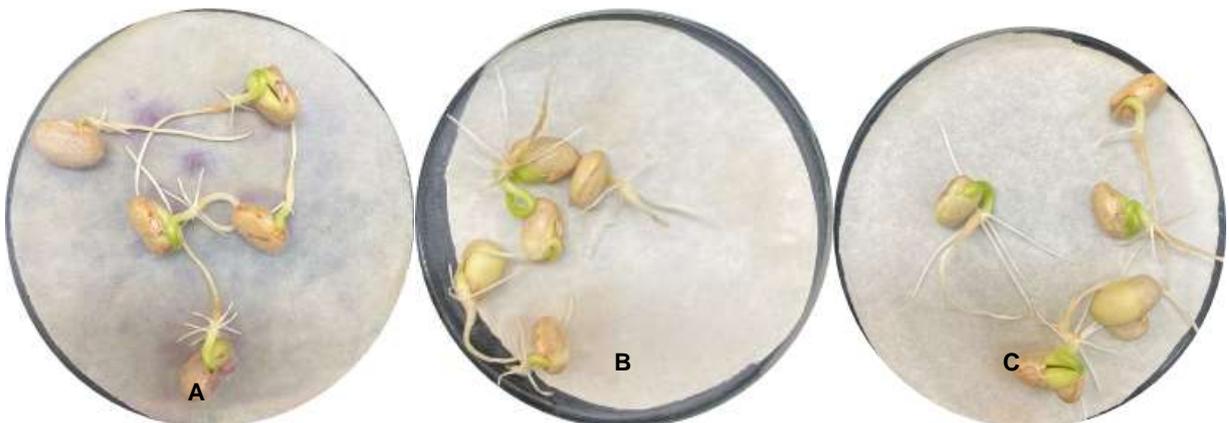
Fonte: Autoria própria

Figura 28. *R. solani* em Soja, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



Fonte: Autoria própria

Figura 29. *S. sclerotiorum* em Feijão, A: controle, B: Extrato, C: Fungicida



Fonte: Autoria própria

4.3.3.1 Escala de colonização

Nas Figuras de 30 a 35 podemos notar que as sementes classificadas como 10,00 e 7,5 não apresentam capacidade de germinação. Com base nas Figuras 24 a 29 é possível notar que todas as sementes classificadas nesta escala se encontram no grupo controle, enquanto as sementes de 05,00 a 0,00 no grupo contendo fungicida comercial, já com presença de sementes germinadas e desenvolvidas, enquanto no grupo contendo o extrato de *Phyllosticta citricarpa* as sementes foram classificadas de

2,5 a 0,0 conforme a escala das Figuras 29 a 34, o que reforça o desempenho positivo de controle do extrato frente aos fitopatógenos de solo.

Figura 30. *F. verticillioides* em milho



Fonte: Autoria própria

Figura 31. *R. solani* em Trigo



Fonte: Autoria própria

Figura 32. *R. solani* em Soja



Figura 33. *S. solani* em Soja



Fonte: Autoria própria

Figura 34. *R. solani* em Soja



Fonte: Autoria própria

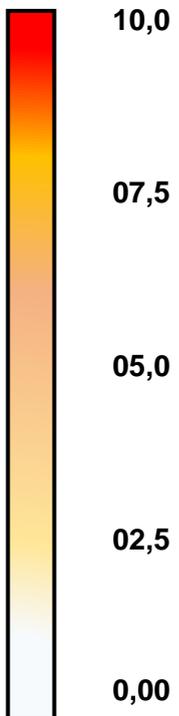


Figura 35. *R. solani* em Sorgo



Fonte: Autoria própria

Meyer et al. (2019) demonstra o estudo da viabilidade da associação do tratamento químico com fungicidas e com o tratamento biológico a base de *Trichoderma harzianum*, cujo resultado de controle foi positivo. Para estudos futuros a associação do controle químico de forma integrada ao Extrato de *Phyllosticta citricarpa* pode ser verificado para estudo de resultados superiores ao encontrado neste estudo. O próximo capítulo também explora o potencial de *Phyllosticta citricarpa*, de forma potencial biorremediadora de agrotóxicos.

5. CAPÍTULO 2 – BIODEGRADAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS PELOS HERBICIDAS OXYFLUORFEM E FLUMIOXAZINA

5.1 Introdução

Biodegradação refere-se na eliminação de compostos orgânicos em um ecossistema pela atividade metabólica dos organismos presentes nesse local, como a microbiota de solo. A escala de biodegradação pode determinar o comportamento de substâncias no ambiente, e quando o processo ocorre de forma eficiente resulta em produtos finais como dióxido de carbono e água (MONTAGNOLLI, 2011).

Entender o cenário e as interações quando a relação ambiente contaminante se inicia é uma das lacunas que o estudo da cinética de biodegradação de agrotóxicos no ambiente fornece respostas. A microbiota local ou até mesmo inserida ou estimulada, somada a fatores externos como umidade, calor, pH, exposição solar, biodisponibilidade do contaminante e nutrientes podem ser responsáveis por esse processo de dissolução de contaminantes como agrotóxicos, fármacos, hidrocarbonetos e etc.

No cenário agrícola, a utilização de herbicidas facilita o controle de plantas daninhas, que por sua vez também controla o número de hospedeiros para patógenos de doenças agrícolas e aumenta o potencial produtivo. Entretanto é uma preocupação quando se trata de impactos ambientais na qualidade de ar, água e solo do ecossistema agrícola em que ele está sendo utilizado.

Este Capítulo estuda a biodegradação de dois herbicidas de pré-emergência e pós-emergência, as moléculas Oxifluorfem e Flumioxazina com a proposta de estimular o processo pelo uso do Extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa*. Também foi avaliada as interações microbianas da microbiota do solo frente aos contaminantes agrícolas.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Respirometria

Para este estudo foi utilizada a metodologia de respirometria de Bartha e Pramer (1965). A fim de determinar informações a respeito da análise do consumo de oxigênio ou produção de CO₂ por unidade de volume e de tempo (COSTA, 2009; BERNARDES E SOARES, 2005). As concentrações de CO₂ da atmosfera criadas no interior do respirômetro surgem como evidência indireta de biodegradação.

5.2.1.1 Solo

As amostras de solo utilizadas nesta pesquisa, foram coletadas em pomar de laranja Valência na cidade de Araras/SP, pertencente a região do cinturão citrícola do país. A região de Araras é predominantemente ocupada por Latossolos (SOUZA e FERREIRA, 2005). O ponto de coleta está localizado (22°20'25.01"S 47°12'44.43"O) conforme o indicador na Figura 36.

Figura 36. Imagem de Satélite do ponto de coleta das amostras de solo.



Fonte: A autoria própria

Foram coletadas 15 amostras simples em 15 pontos diferentes do pomar em profundidade de 0-20 cm do solo, todos os pontos foram de projeção de copa de árvore, localidade alvo de aplicação dos pulverizadores. Após a coleta de todos os pontos amostrais, as amostras simples foram homogeneizadas em recipiente plástico afim de se ter uma amostra composta única, cuja foi submetida a análise química (Tabela 3) O solo foi depositado em saco plástico e armazenado em geladeira até a realização dos experimentos.

Tabela 3. Análise química do solo

P Resina (mg/dm³)	M.O. (g/dm³)	pH Ca Cl2	K	Ca	Mg mmol/dm³	H+Al	SB	CTC	V %
16	30	5,3	1,9	38	13	20	52,9	72,9	73

P Resina (mg/dm³)	M.O. (g/dm³)	pH Ca Cl2	K	Ca	Mg mmol/dm³	H+Al	SB	CTC	V %
16	30	5,3	1,9	38	13	20	52,9	72,9	73

A área de coleta possui histórico de uso intensivo de manejo químico com herbicidas pré e pós-emergentes. A falta de assistência técnica individualizada provoca uso indiscriminado em muitas propriedades de pequenos produtores.

5.2.1.2 Herbicidas

Os herbicidas utilizados, são indicados e utilizados para a cultura dos Citros, o herbicida Goal®BR da Corteva, com ingrediente ativo Oxifluorfem, que é destinado para aplicações em pós-emergência das plantas daninhas com ação não sistêmica, e o herbicida Flumyzin 500® da Iharabras, cujo ingrediente ativo é a Flumioxazina e é destinado ao controle de pré e pós emergência em algumas culturas por apresentar alto poder residual.

5.2.1.3 Preparo dos Reagentes

O experimento é conduzido com água destilada fervida durante 30 minutos para redução da solubilidade dos gases no líquido. Após o resfriamento é utilizada para coleta de dados no respirômetro. Segundo a ABNT (1999) para a solução de hidróxido de potássio (KOH) dissolveram-se 11,2 g em 1000 mL em água isenta de CO₂, a mesma armazenada em recipiente plástico e ambiente escuro. Para obtenção de uma solução de ácido clorídrico (HCl) transferiu-se 8,5 mL do mesmo concentrado para um balão volumétrico de 1000 mL.

Para a solução indicadora de fenoftaleína dissolveram-se 0,2g de fenoftaleína em 60 mL de etanol e completou-se com água destilada até 100 mL. O preparo da solução de cloreto de Bário (BaCl₂) dissolveram-se 12,2 g de cloreto de bário bi-hidratado até completar um balão volumétrico de 100 mL de água destilada.

5.2.1.4 Preparo do Inóculo

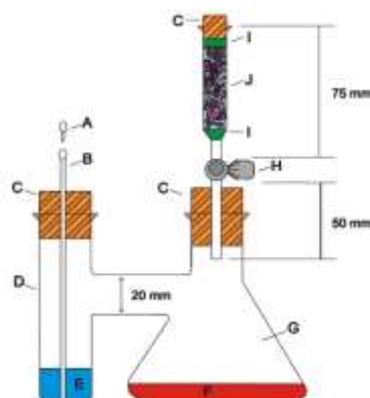
Para preparo do inóculo utilizados nos ensaios de biodegradação, foi inoculado *Phyllosticta citricarpa* em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio BD e mantidos em incubadora Shaker Solab com agitação de 100 rpm a 28°C durante 7 dias. Transcorrido o período de incubação eles foram filtrados em filtros Kitassato utilizando bomba a vácuo.

5.2.1.5 Montagem dos Ensaios

O experimento foi realizado em frascos respirométricos (Figura 37). Consiste em um frasco específico destinado à realização da respirometria, consiste em um sistema fechado, por duas câmaras conectadas, onde ocorre a biodegradação (Figura 37, G) e a outra contendo KOH que é capaz de identificar o CO₂ resultante da respiração

microbiana, com sua composição o respirômetro garante que o CO₂ contabilizado seja proveniente apenas da biodegradação dos resíduos.

Figura 37. Esquema de um respirômetro de Bartha. A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco Erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm).



Fonte: Montagnolli (2015); Montagnolli et al. (2009).

Neste estudo foi-se utilizada a metodologia segundo a antiga norma ABNT NBR 14283 de Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Com essa metodologia é possível determinar as concentrações de CO₂ ao longo do tempo e sua quantificação, inclusive as diferentes fases. Para determinar as concentrações ideais para este estudo, era necessário corresponder a quatro critérios distintos: (1) semelhança aos dados reais de contaminação ambiental (MARTINES et al., 1996; MONTAGNOLLI, 2015); (2) baixa toxicidade; (3) resposta da comunidade microbiana com diferença, estatisticamente, significativa entre os ensaios; e (4) dentro da janela de medição da técnica adotada (MONTAGNOLLI, 2015) entre 100 a 1500 µmol de CO₂. Por isso foram adotadas as doses comerciais recomendadas em bula e já aplicadas em campo na cultura do Citros, correspondente a cultura do local de coleta do solo. Os ensaios controle receberam uma quantidade de água destilada equivalente as quantidades dos contaminantes.

As concentrações dos herbicidas foram de 33-¹ µL/L para Flumioxazina e 16001-¹µL/L para Oxyfluorfen. Montados em triplicatas para cada grupo, na câmara menor de cada um dos respirômetros foram colocadas 10mL de solução de KOH, na câmara maior, 50 gramas de solo, que foram regados com 5mL de solutos referentes a cada ensaio, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Ensaio de respirometria

Ensaio	Solo	Flumioxazina	Oxyfluorfen	Água	Inóculo
Controle	50,00g	-	-	5mL	-
Flumioxazina	50,00g	5mL	-	-	-
Oxyfluorfen	50,00g	-	5mL	-	-
Inóculo	50,00g	-	-	5mL	1mL
Inóculo + Flumioxazin	50,00g	5mL	-	-	1mL
Inóculo + Oxyfluorfen	50,00g	-	5mL	-	1mL

Após a montagem, as válvulas presentes nos respirômetros foram devidamente fechadas, e 7 dias transcorridos deu-se início as titulações semanais para o registro de quantificação de CO₂, sendo repetidas semanalmente durante o período total de experimento por 90 dias.

5.2.1.6 Acompanhamento da biodegradação

O acompanhamento do processo de biodegradação foi estabelecido pela produção semanal de CO₂. Primeiramente preenchendo um frasco Erlenmeyer de 250 mL com 1mL de cloreto de bário (BaCl₂) e duas gotas de fenofaleína. Retirou-se a rolha de borracha para abertura da válvula do filtro de cal sodada para a remoção de CO₂ do ar. Posteriormente removeu-se também a vedação da cânula e com uma seringa de 10 mL, foi transferido a solução de KOH para o Erlenmeyer, após esse processo foi preenchida a pipeta com 10mL e transferido para o braço lateral para lavagem com água isenta de CO₂ e adicionada ao Erlenmeyer, foi repetida a mesma lavagem por três

vezes, conforme a norma. O conteúdo final foi titulado com solução de HCL 0,1M anotando-se a quantidade de ácido gasta para a viragem da fenofaleína, como mostra a Figura 38.

Figura 38. Titulometria semanal



Fonte: Autoria própria

Durante a titulação foi injetado ar comprimido com uma bomba de ar, que tem a função de passagem de ar pelo filtro de cal sodada retendo o CO_2 introduzido e possibilitando a reoxigenação do sistema sem adicional de CO_2 . Ao final da titulação adicionou-se 10mL de solução de KOH novamente, e fechou-se a válvula e a cânula, terminado esse processo, os respirômetros foram armazenados em BOD a 30°C até a próxima determinação semanal.

Para base de cálculo da determinação de CO_2 incorporado, foi preparado uma prova de branco contendo 10mL de solução de KOH, duas gotas de fenofaleína, 1mL de solução de BaCl_2 e 30mL de água destilada isenta de CO_2 . Essa solução foi titulada com HCL e tomou-se nota da quantia necessária para viragem da fenofaleína. O cálculo

é feito de acordo com o volume gasto de HCl na titulação de KOH conforme a Equação 1:

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * \theta_{HCl} + 0,044 \quad (1)$$

Onde:

GCO_2 = geração de gás carbônico;

A= volume de HCl gasto na titulação do branco (mL);

B= volume de HCl gasto na titulação da amostra (mL);

50= fator para transformar equivalente em μmol de CO_2 ;

0,044= fator para transformar μmol em mg de CO_2 .

5.2.1.7 Modelagem Matemática

A modelagem dos dados permite um melhor conhecimento da cinética de biodegradação, permitindo assim prever e otimizar o processo (MONTAGNOLLI, 2015; KERNANSHANI et al., 2006). Para este trabalho foi utilizado um modelo ajustado para fornecer a máxima produção de CO_2 semanal, como modelo foi adotada a adaptação de Montagnolli et al. (2009), conforme a Equação 2:

$$B = B_{max} / (1 + \left[\frac{B_{max} - B_0}{B_0} \right] e^{-rt}) \quad (2)$$

Onde:

B é o CO_2 Produzido;

B_{max} é a produção máxima de CO_2 ;

B_0 é a produção inicial de CO_2 ;

R é a taxa máxima de produção para o contaminante (herbicida);

t é o Tempo.

Para as curvas de respirometria semanal foi adotado um outro modelo, com maior número de parâmetros, também adaptado de Montagnolli et al. (2009) conforme a Equação 3:

$$B = \left[\left(\frac{1}{k_1} \right) e^{-m_1 t} + \left(\frac{1}{k_2} \right) e^{-m_2 t} \right]^{-1} \quad (3)$$

Onde:

B é o CO_2 Produzido

K_1 é a Constante de Aumento de Produção;

K_2 é a Constante de Diminuição de Produção;

m_1 é a Taxa de Aumento na Produção de CO_2 ;

m_2 é a Taxa de Diminuição na Produção de CO_2 ;

t é o Tempo.

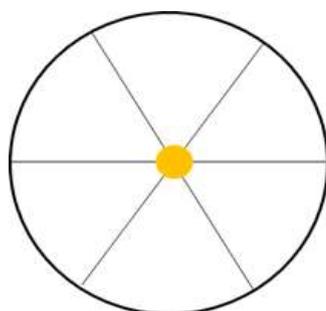
5.2.1.8 Análise Estatística dos Dados

O modelo admite uma correlação entre a dinâmica populacional de microrganismos e a produção de CO_2 semanal. Os dados foram analisados por ferramentas estatísticas e gráficos gerados no SYSTAT SIGMAPLOT 10. Para a modelagem dos dados e ajuste em equações foi utilizada a plataforma WOLFRAM MATHEMATICA 6 e o SYSTAT SIGMAPLOT 10 (MONTAGNOLLI, 2015).

5.2.2 Velocidade de Crescimento Radial

A velocidade de crescimento radial elevada indica a habilidade desses micro-organismos de crescerem em meios contendo herbicidas. Neste trabalho foi realizado uma inoculação pontual de *Phyllosticta citricarpa* no centro da placa contendo os meios: PDA com adição de Oxyfluorfem nas concentrações 1600 μ L/L, 160 μ L/L e 16 μ L/L, ágar com adição de Oxyfluorfem nas concentrações 1600 μ L/L, 160 μ L/L e 16 μ L/L e PDA com adição de Flumioxazina nas concentrações 330 μ L/L, 33 μ L/L e 3,3 μ L/L e ágar com adição de Flumioxazina nas concentrações 330 μ L/L, 33 μ L/L e 3,3 μ L/L e somente PDA como grupo controle. Essas concentrações foram respectivamente de (1) superdosagem, (2) dosagem comercial aplicada e (3) dosagem mínima. Os cultivos foram mantidos em estufa BOD a 30°C por 20 dias. As placas de Petri foram marcadas com três raios, com a finalidade de se medir o crescimento radial dos fungos a cada intervalo de tempo. Como raio inicial da colônia foi considerado 0,5 mm, correspondente ao raio do objeto inoculador (ponteira), conforme a Figura 39. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Figura 39. Representação dos raios desenhados no fundo das placas de Petri e o raio inicial do inóculo.



Fonte: Autoria própria

A velocidade de crescimento radial pode ser calculada por meio de regressão linear dos raios das colônias, utilizando-se a Equação 4:

$$r(t) = b + VCR.t \quad (4)$$

onde:

b= diâmetro inicial

r=raio (mm);

t= tempo (dias);

VCR= velocidade de crescimento radial (cm.d⁻¹).

5.2.3 Colorimetria

O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP – VETEC P. A.) é um indicador que altera a sua coloração de azul para incolor quando oxidado em meio líquido. Desta maneira é possível estimar a atividade microbiana através da mudança de coloração do meio. O nitrogênio presente na molécula de DCPIP funciona como um aceptor de elétrons mudando a coloração após esta sofrer redução. A mudança de cor está relacionada com a inativação da comunidade microbiana pelos compostos orgânicos. Neste trabalho, foram adotadas as amostras pré-biodegradação com e sem o extrato bruto de *Phyllosticta citricarpa* empregado nos Oxyfluorfem e Flumioxazina, como grupo controle adotamos a amostra contendo solo e outra sem os respectivos contaminantes. O experimento foi dividido em análises qualitativas e quantitativas que foram observadas durante 3 dias até que a coloração mudasse para incolor. Ao todo foram preparados 50 amostras de cada grupo, pois uma vez utilizada para fazer a análise espectrofotométrica, a mesma era descartada.

5.2.3.1 Preparo dos Reagentes

Preparou-se o Caldo Bushnell-Hass (BH) e Caldo nutriente (CN) em um litro de água destilada e autoclavada conforme componentes e concentração da Tabela 5.

Tabela 5. Meios de cultura utilizados no ensaio de Colorimetria

Meios de cultura	Componentes e concentração
BH (Bushnell Haas) caldo	0,2 g.L ⁻¹ de MgSO ₄ , 0,02 g.L ⁻¹ de CaCl ₂ , 1,0 g.L ⁻¹ de KH ₂ PO ₄ , 1,0 g.L ⁻¹ de K ₂ HPO ₄ , 1,0 g.L ⁻¹ de (NH ₄) ₂ SO ₄ e 0,05 g.L ⁻¹ de FeCl ₃
CN (Caldo nutriente)	3,0 g.L ⁻¹ de extrato de carne, 5,0 g.L ⁻¹ de peptona e 8,0 g.L ⁻¹ de NaCl

Para o indicador DCPIP (Figura 40) dissolveram-se 0,100 g do mesmo para solução 1g/L, homogeneizada e mantida em frasco âmbar protegida de luz e armazenada em geladeira.

Figura 40. Solução de DCPIP



Fonte: Autoria própria

5.2.3.2 Preparo do Inóculo

Para o preparo do inóculo, cinco discos de micélio de 5 mm de *Phyllosticta citricarpa* foram inoculados em Caldo nutriente em frascos Erlenmeyer de 250 mL sob agitação em Shaker durante 7 dias a 30°C.

5.2.3.3 Montagem dos Ensaio

O ensaio de colorimetria foi conduzido em tubos de ensaio tampados com algodão. Adicionou-se 0,1 g de solo amostrado (Figura 41) e também utilizado no ensaio de respirometria (5.2.1).

Figura 41. Solo coletado em pomar de Citros e anterior ao processo de biodegradação.



Fonte: Autoria própria

A Tabela 6 mostra as concentrações e conteúdo que foram utilizados no ensaio colorimétrico. Primeiramente adicionou-se a massa de solo aos tubos e posteriormente os outros componentes em ambiente estéril. Vedou-se os tubos com algodão e plástico filme. O conteúdo foi agitado em agitador de tubos (Vórtex) por 30 segundos em alta rotação para homogeneização. O ensaio foi armazenado em incubadora BOD a 30°C.

Tabela 6. Tratamentos utilizados no ensaio de colorimetria.

Ensaio	DCPIP (µL)	Caldo (mL)	Água	Oxyfluorfem (µL)	Flumioxazina (µL)	Massa de solo (g)	Extrato (µL)
1 (C1)	400	-	7,5mL	-	-	0,1	-
2 (C2)	400	7,75	-	-	-	0,1	-
3 (G)	400	7,75	-	50	-	0,1	-
4 (F)	400	7,5	-	-	50	0,1	-
5 (G+P)	400	7,5	-	50	-	0,1	100
6 (F+P)	400	7,5	-	-	50	0,1	100

*C1: solo+DCPIP+ água; C2: solo+DCPIP+BH; G: solo+DCPIP,BH,Oxyfluorfem; F: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina; G+P: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem+Inóculo; F+P: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo

5.2.3.4 Acompanhamento da Biodegradação

5.2.3.4.1 Análises qualitativas

O processo de biodegradação é caracterizado pela descoloração do indicador de DCPIP, a mesma foi monitorada durante 3 dias, até a descoloração total dos tubos. Essa análise qualitativa foi feita por meio de fotografias, onde se seguiu padrão de iluminação e ordenação dos tubos. Nas figuras estão presentes também os grupos controle.

5.2.3.4.2 Análises quantitativas

As medidas quantitativas foram feitas com o uso do espectrofotômetro no comprimento de 600 nm em todos os tubos (Figura 42). Os tubos foram submetidos a agitador Vortex para homogeneização da amostra e depois em repouso por 10 min sem agitação antes do início das medições, a passagem da amostra para as cubetas foi realizada com pipeta para evitar movimentos e assim não alterar os resultados de absorbância obtidos por conta do solo contido nas amostras.

Figura 42. Espectrofotômetro



Fonte: A autoria própria

5.3 Resultados e Discussão

5.3.1 Respirometria

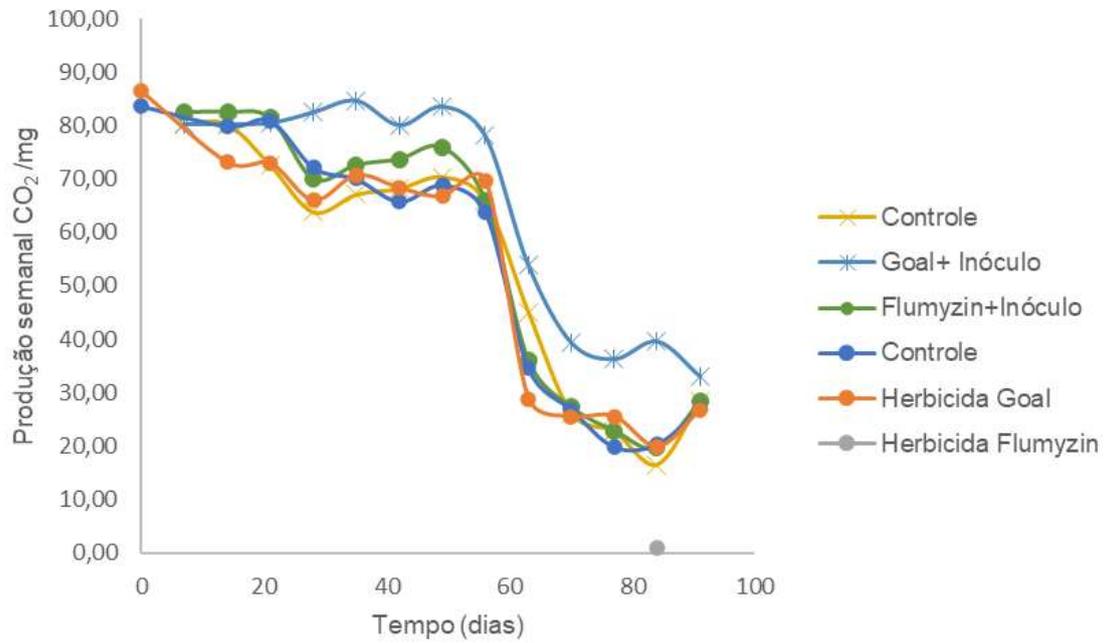
Com os ensaios de respirometria, a produção de CO₂ a partir da biodegradação dos herbicidas Oxyfluorfem (pré-emergente) e o Flumioxazina (pré e pós-emergente) com e sem adição do inóculo *Phyllosticta citricarpa*. estão os resultados da produção de CO₂ acumulado, ou seja, a somatória total de CO₂ gerado por cada um dos Barthas em triplicatas ao longo do experimento. A partir desses dados foi possível analisar qual herbicida foi mais degradado e se o inóculo contribuiu para a biodegradação, podendo-se discutir sobre os fatores que tornam possível a biodegradação.

5.3.2.1 Produção de CO₂

5.3.2.1.1 CO₂ semanal

A produção semanal de CO₂ pelos grupos pode ser observada na Figura 53. Os dados correspondentes podem ser vistos no Apêndice 10.2. O grupo Oxyfluorfem+Inóculo apresenta um maior desempenho de biodegradação enquanto o grupo controle o menor, porém ainda sim um valor de produção considerável, e isso deve-se ao fato de que o ponto de coleta é uma área de intensa atividade agrícola e também de aplicações recorrentes de herbicidas. No gráfico de produção semanal é possível observar uma queda de forma abrupta na produção de CO₂ no intervalo dos 60 dias e esse fato pode ter ocorrido em decorrência de um aumento de temperatura na BOD onde os frascos respirométricos estavam incubados e o volume gasto nas titulações ter sido superior.

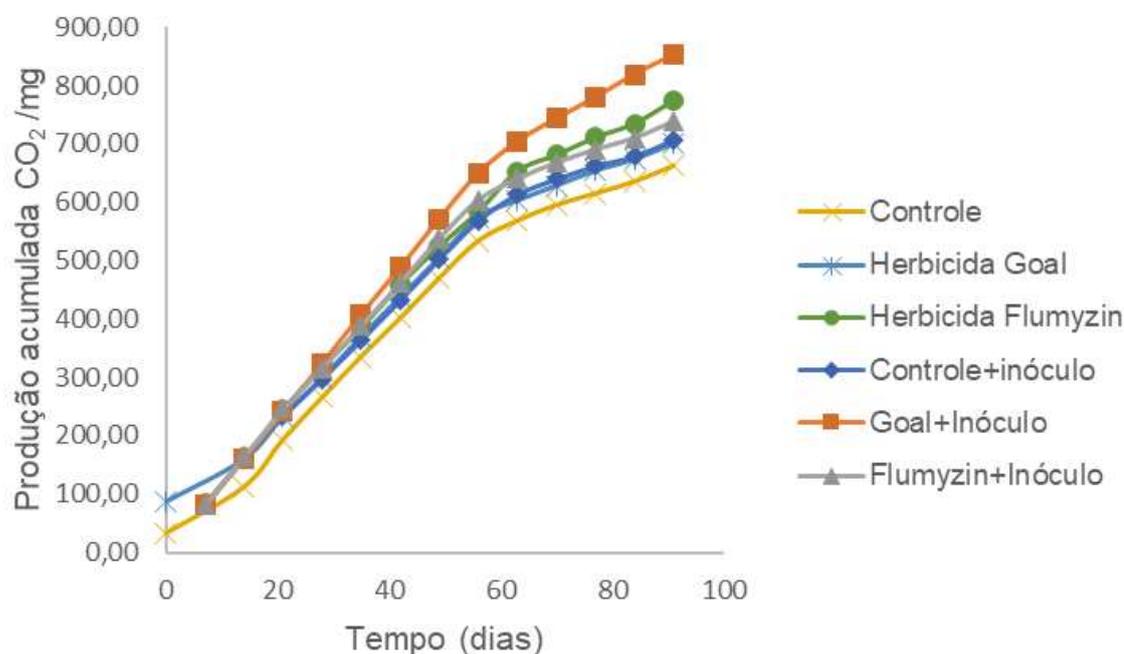
Figura 43. Produção semanal de CO₂ nos ensaios respirométricos.



5.3.2.1.2 CO₂ acumulado

A produção acumulada considera a soma de todo o CO₂ produzido ao longo do processo de biodegradação, conforme pode ser observada na Figura 54. Os dados correspondentes se encontram no Apêndice 10.1.

Figura 44. Produção acumulada de CO₂ nos ensaios respirométricos



Fonte: Autoria própria

Na Tabela 8 estão ordenados de forma crescente a produção acumulada de CO₂ e seus respectivos valores. Após submeter os dados ao teste de normalidade e apresentarem ($P = <0,001$) e ao teste-t é possível estabelecer diferença estatística significativa entre os grupos. Os ensaios de maior produção total de CO₂ foram aqueles que receberam a adição de inóculo, comparados aos grupos que não continham o mesmo. O herbicida Oxyfluorfem com adição de inóculo e o Herbicida Flumioxazina foram os maiores produtores ao longo do experimento, enquanto o grupo Controle e o grupo com adição do Herbicida Oxyfluorfem representaram os menores valores. Pereira (1987) aponta que Oxyfluorfem se degrada por completo no solo com a ação de luz e atividade microbiana, portanto quando bioaugmentada a comunidade microbiana do frasco respirométrico com o inóculo a biodegradação do mesmo sofre um estímulo maior. Enquanto o outro grupo de Flumioxazina+ Inóculo não obteve resultados superiores ao grupo contendo somente Flumioxazina, e com isso é possível considerar que o

contaminante pode inibir esse microorganismo e não obter resultados maiores de biodegradação em relação onde temos somente os microrganismos de solo.

Tabela 7. Produção acumulada de Co₂ nos ensaios respirométricos após 91 dias de experimento.

Ensaio	CO₂ acumulado (mg)
Herbicida Oxyfluorfem + Inóculo	852,28
Herbicida Flumioxazina	773,96
Herbicida Flumioxazina + Inóculo	738,76
Controle+Inóculo	707,52
Herbicida Oxyfluorfem	700,56
Controle	662,28

5.3.2.2 Modelagem matemática

A partir dos padrões de produção de CO₂ ao longo do tempo transcorrido, foi possível aplicar modelagem matemática para descrever e prever os parâmetros da cinética de biodegradação dos herbicidas estudados.

5.3.2.2.1 Semanal

Os gráficos de produção semanal do apêndice 10.2 mostram que o ajuste das curvas experimentais utilizando o modelo semanal adaptado de Membré et. al (1996) por Montagnolli (2009). Foi observado que ao longo do tempo os ensaios respirométricos atingiam um máximo de produção e depois um declínio e posterior crescimento. Entretanto dentro do conjunto de dados de produção semanal, o software não conseguiu ajustar ao modelo e foi considerado inadequado, e isso se deve ao fato de que a produção é ainda contínua e crescente, o que é incoerente com a realidade, visto que seria necessária uma quantidade infinita para biodegradação. Portanto, o modelo não é válido para descrever a cinética de biodegradação dos herbicidas.

5.3.2.2.2 Acumulado

Diferentemente do modelo adotado para a produção semanal, no acumulado é possível observar na Figura 54 uma distribuição linear, onde o modelo matemático foi ajustado aos dados e possibilitou obter valores de R^2 acima de 0,99, conforme na Tabela 8. Considerando que B_{max} é a produção máxima de CO_2 e T por sua vez refere-se ao tempo de experimentação que se leva para alcançar esse valor, sendo assim possível entender o que tempo que o herbicida levaria para ser degradado e isso é um ponto muito relevante para a aplicação em campo.

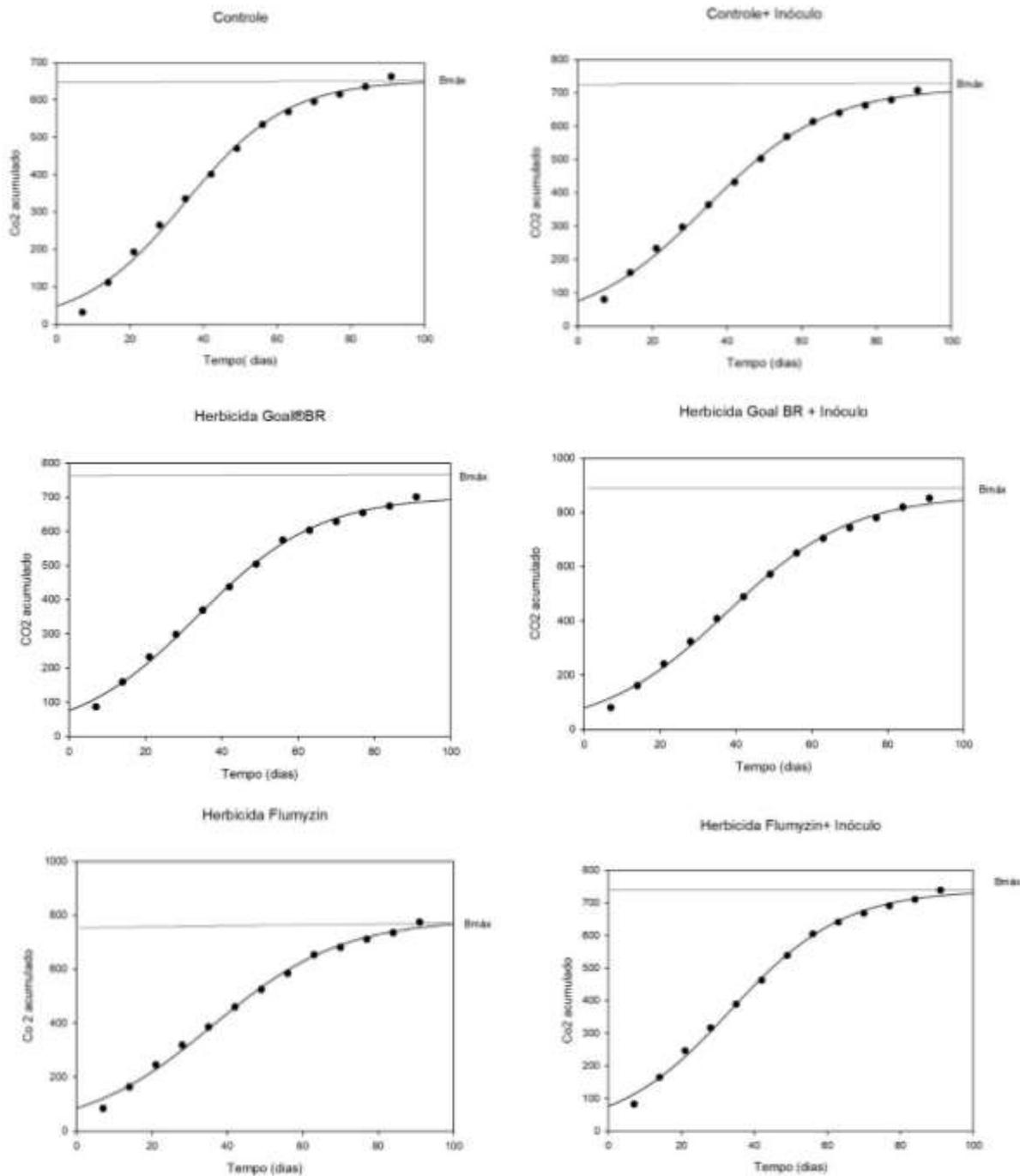
Oxyfluorfem+Inóculo apresentou a maior produção com 863,6991 mg em um tempo de 109 dias, enquanto o grupo contendo somente herbicida apresentou uma produção de 703,2145 em um período maior de 122 dias.

Tabela 8. Valor máximo de produção de CO_2 e o tempo previsto nos tratamentos realizados

	Controle	GoalBR	Flumyzin	Controle+Inóculo	Goal+Inóculo	Flumyzin+Inóculo
B_{máx} (mg)	652,2354	703,2145	784,4421	715,6244	863,6991	739,2404
T de B_{máx} (dias)	105	122	110	107	109	147
R²	0,9934	0,9973	0,9956	0,997	0,9968	0,9968
BO	48,7871	75,7082	84,5092	75,5022	79,5291	76,289
r	0,072	0,0629	0,0584	0,062	0,0608	0,0647

Com o tempo dado para que o valor de B_{max} seja alcançado é possível observar na Figura 55 que o mesmo ocorreria se o experimento fosse prolongado por mais algumas semanas. Um ponto de observação é de que se os valores de $B_{máx}$ fossem alcançados eles tenderiam ao infinito no mesmo valor.

Figura 45. Gráficos de produção acumulada de Co2 nos ensaios respirométricos após 91 dias de experimento. 1: Controle, 2: Controle+Inóculo, 3: Herbicida Oxyfluorfem, 4: Herbicida Oxyfluorfem+Inóculo, 5: Herbicida Flumioxazina+Inóculo.



Fonte: Autoria própria

5.3.2 Velocidade de Crescimento Radial

A velocidade de crescimento radial é o coeficiente angular da reta obtida da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo, maior a inclinação da reta, maior é sua velocidade de crescimento radial e portanto, maior potencial de crescimento do microrganismo. Na Tabela 7 é observada a velocidade de crescimento radial para os diferentes meios de cultura contendo os herbicidas Oxyfluorfem e Flumioxazina.

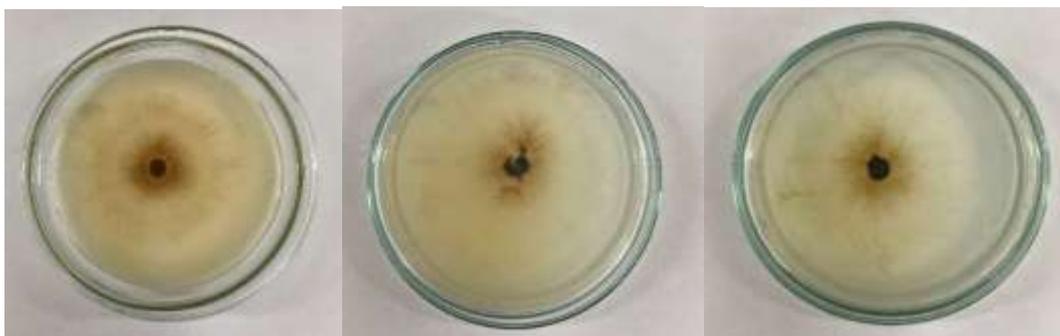
Tabela 9. Velocidade de crescimento radial para *Phyllosticta citricarpa* nos meios Agar+Herbicida e PDA+Herbicida nas diferentes concentrações.

Meio de cultura	Concentração	VCR (cm/d)
Herbicida Oxyfluorfem+ Agar	1	0,48
	2	0,58
	3	0,65
Herbicida Oxyfluorfem + BDA	1	0,42
	2	0,65
	3	0,70
Herbicida Flumioxazina+Agar	1	0,50
	2	0,43
	3	0,25
Herbicida Flumioxazina+PDA	1	0,66
	2	0,26
	3	0,77

Os meios de cultura que contêm BDA, apresentam um crescimento acelerado pela disponibilidade superior de nutrientes, e conforme a concentração do herbicida for maior, também aumenta. Nos primeiros dias de crescimento os contaminantes podem até representar um certo ponto de toxidez a *Phyllosticta citricarpa*, mas ao decorrer do tempo ocorre uma adaptação do mesmo, o que podemos observar também no ensaio de respirometria. Nas Figuras de 43 a 51 podemos notar que os grupos com concentração superior obtiveram maior crescimento em relação as concentrações 2 e 3. Colla (2008) avaliou o crescimento dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e

Trichoderma em meio contendo herbicidas triazínicos, cujos resultados apresentam elevada capacidade de crescimento em meio contendo 50 ppm de Atrazina. Um ponto a se destacar é de que os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* também são caracterizados como fitopatógenos e agentes de doenças em plantas, assim como *Phyllosticta citricarpa*.

Figura 46. *P. citricarpa* em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 1.



Fonte: Autoria própria

Figura 47. *P. citricarpa* em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 2.



Fonte: Autoria própria

Figura 48. *P. citricarpa* em meio Ágar+Flumioxazina na Concentração 3.



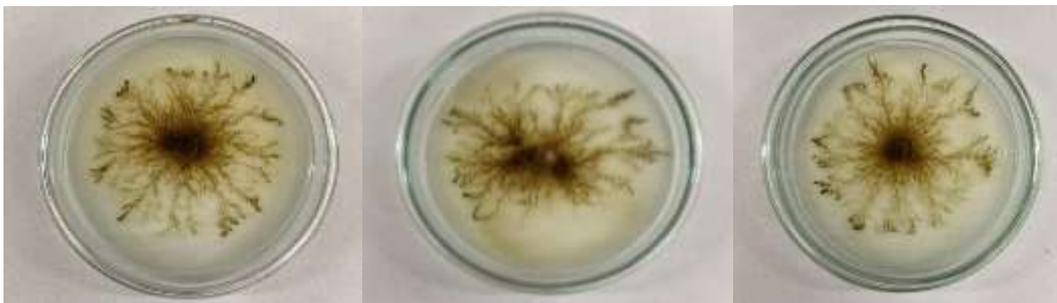
Fonte: Autoria própria

Figura 49. *P. citricarpa* em meio Ágar+Oxyfluorfem na Concentração 1.



Fonte: Autoria própria

Figura 50. *P. citricarpa* em meio Ágar+Oxyfluorfem na Concentração 2.



Fonte: Autoria própria

Figura 51. *P. citricarpa* em meio Ágar+ Oxyfluorfem na Concentração 3.



Fonte: Autoria própria

Figura 52. *P. citricarpa* em meio BDA+ Oxyfluorfem na Concentração 1.



Fonte: Autoria própria

Figura 53. *P. citricarpa* em meio BDA+ Oxyfluorfem na Concentração 2.



Fonte: Autoria própria

Figura 54. *P. citricarpa* em meio BDA+ Oxyfluorfen na Concentração 3.



Fonte: Autoria própria

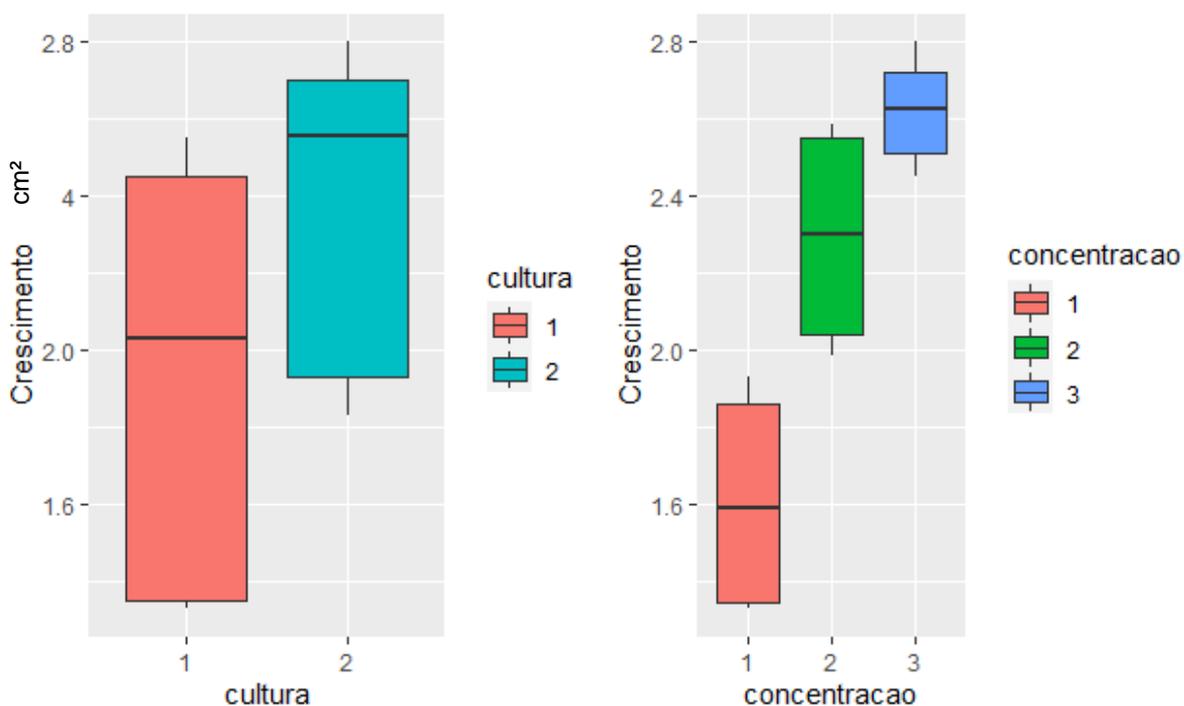
Além do raio de crescimento das colônias, é possível observar que houve mudanças estruturais no microrganismo em um meio onde sua única fonte de obter nutrientes era proveniente dos herbicidas, como nas Figuras 46, 47 e 48 do grupo Oxyfluorfen+Agar em todas as concentrações. Nunes *et. al* (2010) demonstra que *Colletotrichum sublineolum* agente causal da antracnose em sorgo mostra dimorfismo conidial, produzindo conídios falcados ou ovais dependendo das condições de cultivo, como em solução contendo o fungicida Benomil.

5.3.2.1 Análise Estatística

A normalidade dos dados de crescimento radial de *Phyllosticta citricarpa* nos diferentes meios de cultura com os herbicidas possibilitou a análise de variância (ANOVA) onde é possível observar que todos os fatores são significativos para o modelo assim como a interação. Com o p-valor é pequeno menor que 0,05 é possível

afirmar com nível de confiança de 95% que os diferentes tratamentos afetam o crescimento microbiano radial de acordo com a concentração e tipo de meio. Quanto mais alta a concentração, maior fonte de carbono, assim como, quando há a presença de PD, a disponibilidade também é maior em relação ao grupo Agar+ Herbicida. Na Figura 52, é possível observar que a média dos grupos com Agar é quase o mínimo dos grupos que contém PD, mas ainda sim existe o crescimento microbiano. Também podemos observar que os grupos PD, independente de concentração apresentam uma variação entre si menor que os grupos de Agar, isso pela disponibilidade adicional de nutrientes constante, além de considerar a adição dos herbicidas.

Figura 55. Gráfico de crescimento radial

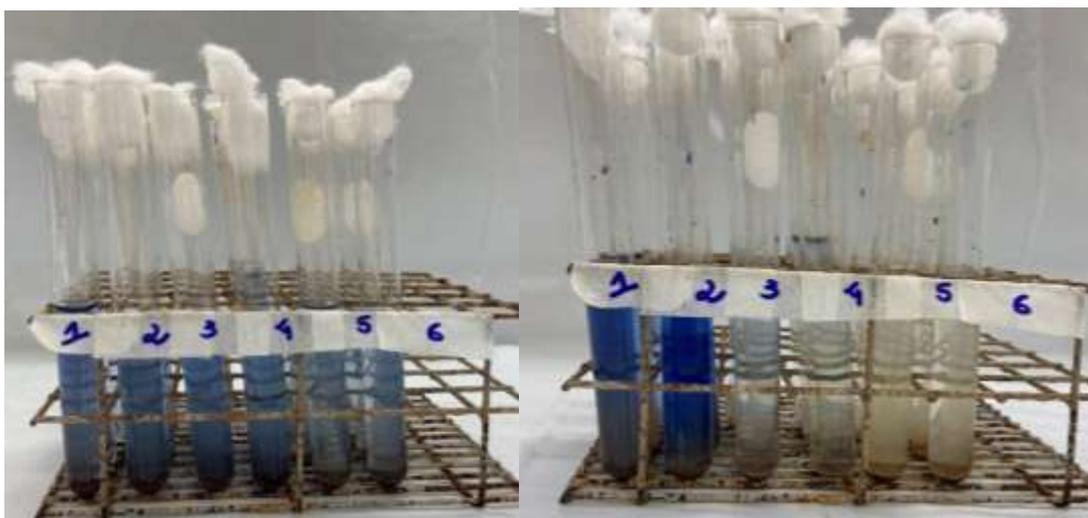


Fonte: Autoria própria

5.3.3 Colorimetria

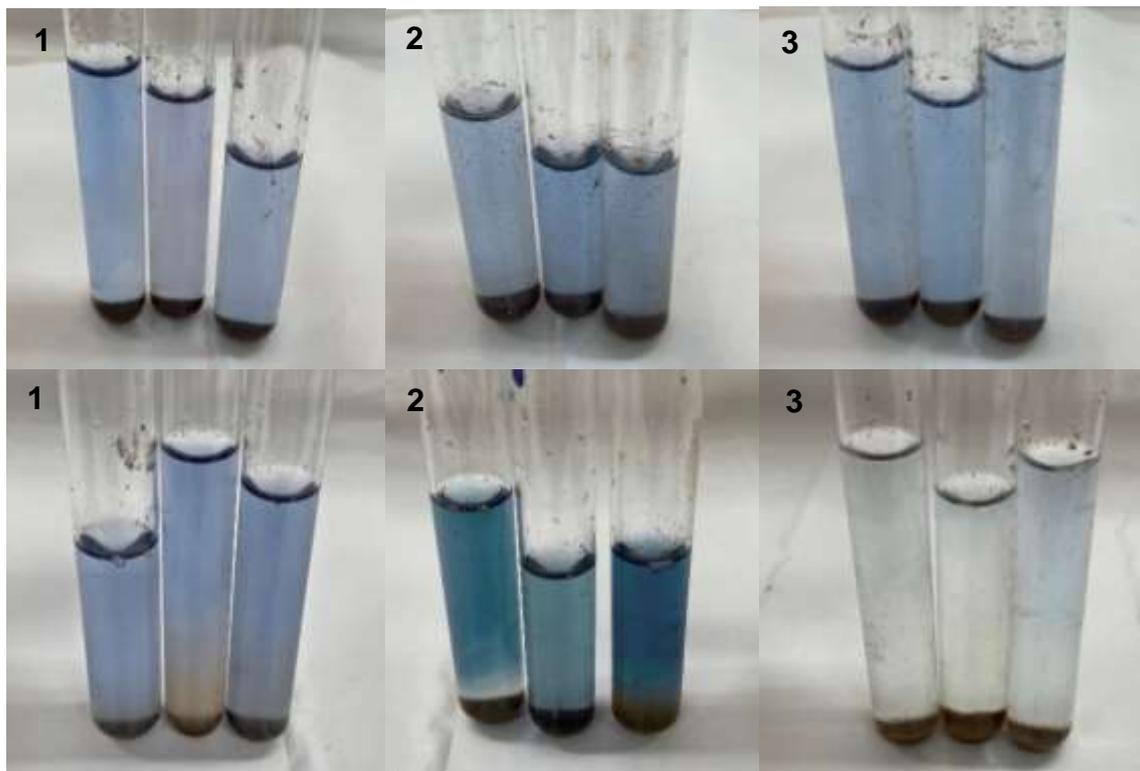
Na seção 5.3.1 de respirometria, foi possível quantificar de forma indireta a produção de CO₂ gerada pelos microrganismos e estimar sua atividade microbiana de biodegradação dos contaminantes. Na análise de colorimetria é possível estimar a biodegradação por meio da mudança de coloração do indicador DCPIP. A descoloração de azul para incolor é visível ao longo do tempo conforme a Figura 56. O processo de descoloração inicial e final por grupo está representado nas Figuras 57 e 58.

Figura 56. 1: solo+DCPIP+ água; 2: solo+DCPIP+BH; 3: solo+DCPIP,BH,Oxyfluorfem; 4: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina; 5: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem+Inóculo; 6: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo.



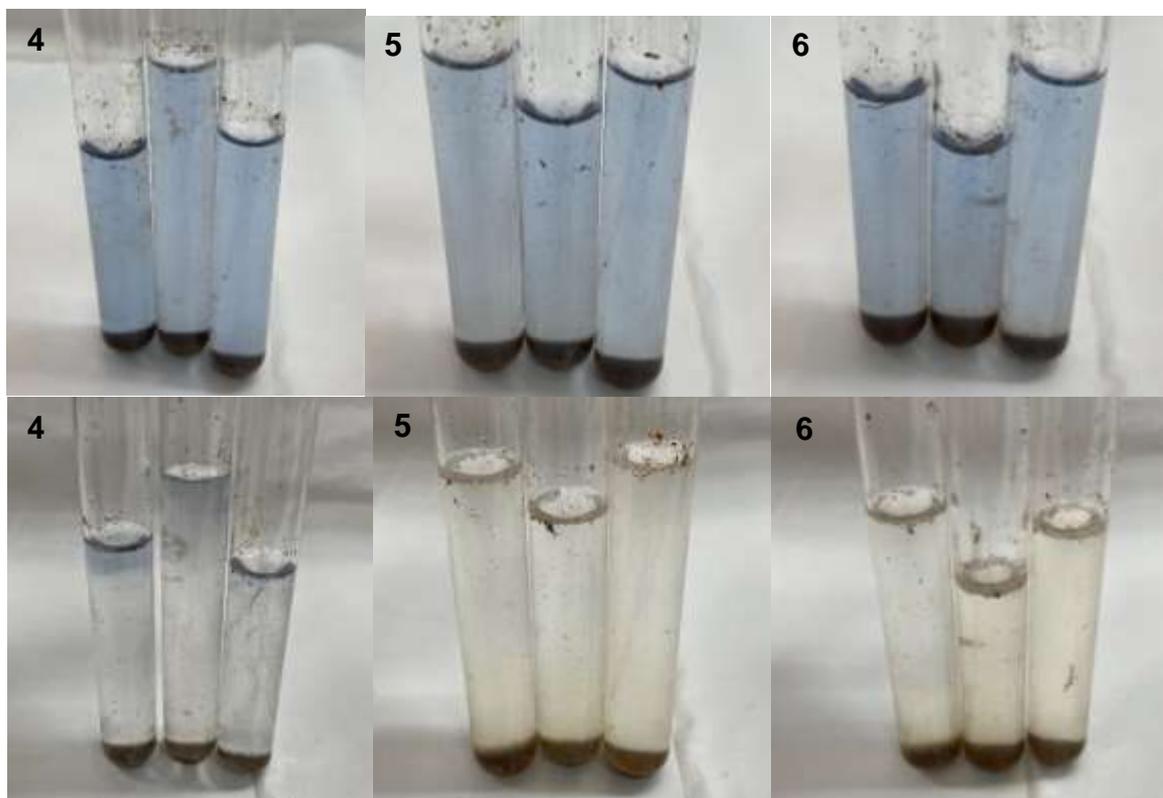
Fonte: Autoria própria

Figura 57. 1: solo+ DCPIP+água; 2: solo+DCPIP+BH; 3: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem



Fonte: Autoria própria

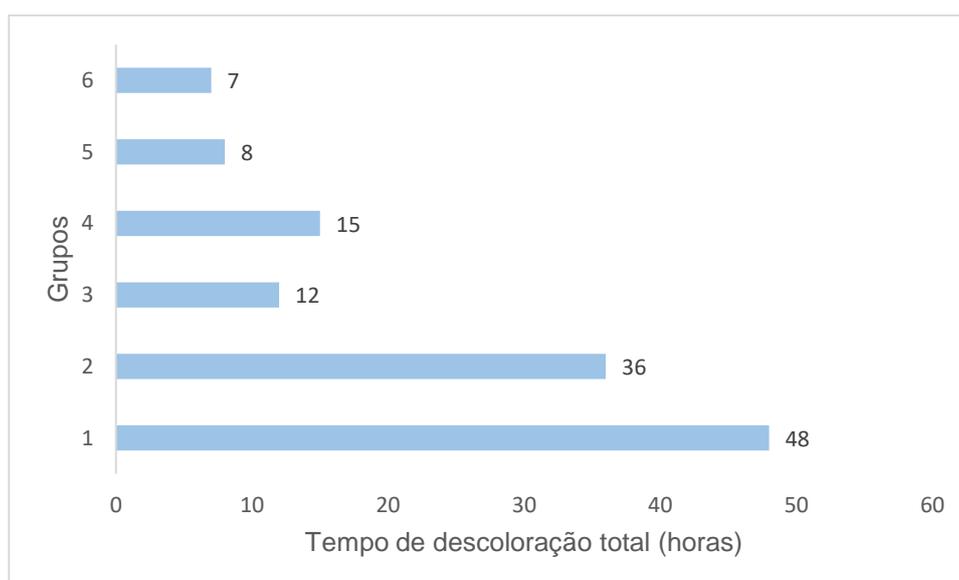
Figura 58. 4: solo+ DCPIP+BH+ Flumioxazina; 5: solo+DCPIP+BH+ Oxyfluorfem+ Inóculo; 6: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo.



Fonte: Autoria própria

As Figuras 57 e 58 ilustram a biodegradação dos herbicidas Oxyfluorfem e Flumioxazina nos ensaios 3,4,5 e 6. De forma geral, os ensaios de biodegradação que continham a adição de inóculo foram mais rapidamente biodegradados com o início do processo de descoloração de 4 horas, e total no tempo de 7 e 8 horas para Oxyfluorfem e Flumioxazina respectivamente. Esse fato se deve a adição do mesmo e corrobora com os resultados de respirometria, que apresentaram uma maior produção de CO₂ os respirômetros que apresentavam a adição de inóculo. Seguido desse grupo, os tubos 3 e 4 que continham a adição dos herbicidas, tiveram tempo de descoloração total de 12 e 15 horas conforme a Figura 59.

Figura 59. Tempo de descoloração total dos ensaios.



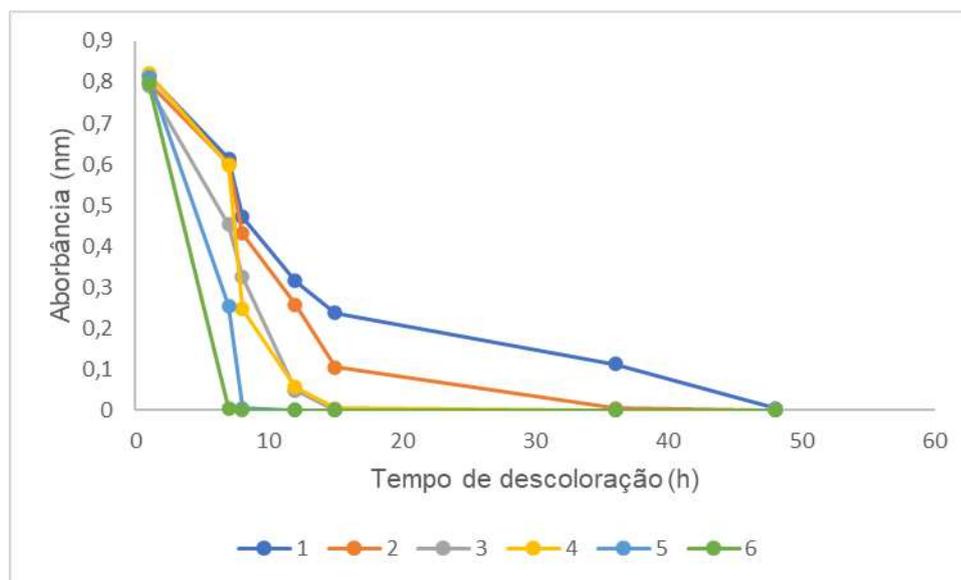
*1: solo+DCPIP+ água; 2: solo+DCPIP+BH; 3: solo+DCPIP,BH,Oxyfluorfem; 4: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina; 5: solo+DCPIP+BH+Oxyfluorfem+Inóculo; 6: solo+DCPIP+BH+Flumioxazina+Inóculo.

Fonte: Autoria própria

Essa biodegradação presente nesses grupos sem adição do inóculo se deve a comunidade microbiana local do solo, visto que a amostra de solo coletada é de ambiente agrícola e da cultura dos Citros, a mesma que é recomendada para a utilização dos herbicidas do estudo. Isso indica uma provável aclimatação dos microrganismos para a degradação desse tipo de agrotóxico. Da mesma forma que

ocorreu no ensaio de respirometria. A Figura 60 identifica que houve uma grande queda da concentração de DCPIP oxidado em todos os tratamentos com a diminuição da absorbância no período de 0 a 15 horas.

Figura 60. Gráfico de descoloração.



Fonte: Autoria própria

Herbicidas são grande fonte de carbono a ser degradado, entretanto nem sempre está na forma biodisponível, por isso os grupos onde o inóculo é adicionado ocorre o aceleração da biodegradação (REGO, 2017). Diante do exposto é importante verificar os efeitos do Extrato de *Phyllosticta citricarpa* desenvolvido nesta pesquisa. O capítulo 3 discorre sob os efeitos ecotoxicológicos frente a organismos-teste.

6. CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE ORGANISMOS TESTES FRENTE A HERBICIDAS E EXTRATO *PHYLLOSTICTA CITRICARPA*

6.1 Introdução

O declínio na qualidade de água e solo frente aos contaminantes em que os cenários ambientais são expostos é uma grande preocupação. No cenário de produção mundial de alimentos, a manutenção da qualidade ambiental e garantia da manutenção dos ecossistemas é prioridade. Nesta situação os agrotóxicos representam grande parte dos problemas de exposição.

Em algumas situações, as concentrações de agrotóxicos presentes no ambiente podem levar a mortalidade de organismos não alvos, e até mesmo efeitos adversos como o Hormese em comunidades de fitoplâncton (EDGE et al.,2020).

Para a avaliação dos possíveis efeitos ambientais, a ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sendo possível avaliar a toxicidade e a cinética ambiental. É uma ferramenta importante que permite verificar como o ecossistema em que os contaminantes está inserido consegue metaboliza-lo, transformá-lo, eliminá-lo ou biodegradá-lo.

A utilização de organismos-teste como bioindicadores pode responder aos estímulos ambientais, por essa razão organismos nativos e representativos dos locais onde a substância é utilizada responde uma estimativa real da toxicidade. Em estudos de solo *Eisenia fétida* é utilizada para avaliação da contaminação por diversos motivos: ingestão de grande quantidade de solo, demonstrando capacidade de acumulação de poluentes presentes neste compartimento, representam cerca de 92% da biomassa de invertebrados presentes no solo e são importantes na ciclagem de nutrientes (RAMOS et al, 2007).

Os bioensaios com sementes também se apresentam como excelentes bioindicadores de contaminação. Eles possibilitam avaliar o ambiente natural do ponto de vista tóxico e mutagênico (SANDALIO et al., 2001), e apresentam maior sensibilidade às mudanças ambientais que outros bioindicadores. O uso de bioensaios com plantas, incluindo a *Lactuca Sativa*, são aprovados e padronizados. Neste capítulo os organismos teste: *Eisenia fétida* e *Lactuca sativa* serão submetidos as amostras ambientais contendo os herbicidas Oxyfluorfem e Flumioxazina e o Extrato de *Phyllosticta citricarpa* obtido no Capítulo 01.

6.2 Material e Métodos

6.2.1 Ecotoxicidade com *Eisenia fetida*

6.2.1.1 Ensaio de comportamento de Fuga

A avaliação de fuga ou rejeição dos organismos testes frente aos contaminantes e ao extrato obtido determinam que ao evitar um local contaminado, temos uma redução de população e pode ser adotado como um parâmetro subletal de substâncias. A norma que descreve o método adequado para o ensaio é a NBR ISO 17512-1/2011, entretanto para a montagem do ensaio, foi utilizada a proposta de Stephenson *et. al*, em que o recipiente-teste possui seis seções. Essa metodologia é adotada em situações em que está sendo avaliado mais de um contaminante. O recipiente-teste foi montado utilizando uma embalagem plástica onde foram feitos furos em toda a tampa e as divisões feitas com acetato (Figura 61).

Figura 61. Recipiente teste para ensaio de fuga.



Fonte: A autoria própria

O solo utilizado é o mesmo do ensaio de Respirometria (Capítulo 2) coletado em pomar de Laranja. O solo foi peneirado em peneira granulométrica de 0,85mm, malha 20. Em cada seção foi depositado 300 gramas de solo até atingir 5 centímetros de profundidade e foram identificados de forma aleatória (Figura 62)

Figura 62. Recipiente teste montado contendo as amostras de solo.



Fonte: Autoria própria

As concentrações dos herbicidas foram as mesmas adotadas no ensaio de Respirometria (Capítulo 2, seção 5.2.1) e o ensaio foi montado conforme a Tabela 10.

Tabela 10. Tratamentos utilizados no ensaio de fuga.

Ensaio	Solo	Flumioxazina	Oxyfluorfen	Água	Extrato
Controle	300,00g	-	-	5mL	-
Flumioxazina	300,00g	5mL	-	-	-
Oxyfluorfen	300,00g	-	5mL	-	-
Extrato	300,00g	-	-	-	5mL
Extrato + Flumioxazin	300,00g	5mL	-	-	5mL
Extrato + Oxyfluorfen	300,00g	-	5mL	-	5mL

Os organismos utilizados no ensaio correspondem a espécie *Eisenia fétida* e foram adquiridos em loja agropecuária onde são comercializadas como iscas de pesca. Esses organismos são caracterizados por odor de decomposição bem forte e temperaturas elevadas acabam por elevar o mesmo e levar a mortalidade dos organismos. Para armazenamento e manutenção elas foram armazenadas BOD a 23°C para estabilização da temperatura e em recipientes plásticos contendo substrato vegetal, onde a cada três dias era realizada a manutenção com revolvimento do solo, adição de esterco bovino para alimentação e água. Esse recipiente estava envolto por saco plástico preto com furos para evitar a entrada de luz. Os organismos foram criados durante 30 dias, para garantir a reprodução e uniformização da espécie a ser utilizada. Para a montagem do teste, as minhocas selecionadas foram adaptadas ao solo teste

controle 24 horas antes para adaptação, já que estavam condicionadas em substrato padrão.

Após adicionados e homogeneizados no solo as soluções do ensaio em cada câmara, dez minhocas foram pesadas e depositadas no compartimento central sem solo, para que as mesmas percorressem a mesma distância até as divisórias sem existir vantagem entre os grupos analisados. Depois de retirada a divisória central o restante também foi retirado e a embalagem plástica foi devidamente tampada e armazenada em incubadora BOD no período de 48 horas a 23°C conforme a Figura 63. As minhocas foram adaptadas ao solo teste controle 24 horas antes para adaptação, já que elas estavam condicionadas em substrato padrão.

Figura 63. Minhocas selecionadas para o ensaio de fuga, recipientes-teste em incubadora BOD para manutenção de temperatura.



Fonte: Autoria própria

No término do período de 48 horas os divisores são reposicionados para impedir a movimentação entre as câmaras, e assim contabilizado o número total de organismos em cada unidade do ensaio.

O cálculo do percentual de fuga dos solos-teste é realizado conforme a Equação 5 de Niva e Brown (2019).

$$x = \left(\frac{nc - nt}{N} \right) * 100$$

Onde:

X= fuga, expressa em porcentagem.

Nc = número de minhocas no solo controle.

Nt= número de minhocas no solo teste.

N= número total de minhocas.

6.2.1.2 Ensaio de teste de contato

O teste de toxicidade de contato permite compreender melhor as características de produtos químicos potencialmente tóxicos para as minhocas no solo (SOARES et. al, 2020). O teste foi realizado com base na norma OCDE 207 (1984) com adaptações as condições dos objetos de estudo deste trabalho. Foram depositadas folhas de Papel filtro de dez centímetros de diâmetro em Placas de Petri de Vidro e umedecidos com pipeta em 1,5 mL das soluções de Oxyfluorfem, Flumioxazina nas concentrações padrão recomendadas em bula, o grupo controle foi irrigado com 1,5mL de água destilada, o ensaio contendo Extrato de *Phyllosticta citricarpa* obtido no Capítulo 01 com 1,5mL, e os grupos contendo os herbicidas e o extrato, foram de 1,5mL de cada solução conforme a Tabela 11.

Tabela 11. Tratamentos utilizados no ensaio de teste de contato com *Eisenia fetida*.

Ensaio	Água	Oxyfluorfem (µL)	Flumioxazina (µL)	Extrato (µL)
Controle	1,5mL	-	-	-
Extrato	-	-	-	1,5mL
Flumioxazina	-	-	1,5mL	-
Oxyfluorfem	-	1,5mL	-	-
F+E	-	-	1,5mL	1,5mL
O+E	-	1,5,L	-	1,5mL

Após o preparo das placas, cada organismo teste foi pesado em balança analítica e colocado um por placa. Os ensaios foram realizados em cinco repetições, tampados com placa e posicionados em bandejas plásticas vedadas por saco plástico preto. A bandeja foi armazenada em incubadora BOD à 23C° durante 5 dias. Durante esse período as minhocas não foram alimentadas e nem expostas a qualquer tipo de luz.

Para a avaliação de dados, foi realizada a pesagem no final do experimento e calculada a perda de massa. Os resultados foram submetidos a teste de normalidade de dados e ANOVA.

6.2.2 Teste de germinação com *Lactuca sativa*

A fim de determinar as condições de toxicidade, sementes de *Lactuca sativa* foram submetidas a teste de germinação sobre papel e sobre solo utilizado neste estudo. As sementes utilizadas de *Lactuca sativa* são da variedade Delícia Americana, da fabricante ISLA, livre de tratamento de sementes com agrotóxicos, lote 148153-004, 100% de pureza e 98% de taxa de germinação.

6.2.2.1 Teste de germinação sobre papel

Para o teste de germinação sobre papel, segundo a RAS (Regras para Análises de Sementes) o papel filtro é embebido com a solução. Primeiramente o papel foi cortado em discos de 10 centímetros de diâmetro para encaixe nas placas de Petri e posteriormente autoclavados. As soluções de herbicidas utilizados foram definidas no Capítulo 2 e o Extrato de *Phyllosticta citricarpa* no Capítulo 01. Neste ensaio foram considerados os grupos da seguinte forma conforme a Tabela 12.

Tabela 12. Tratamentos utilizados no ensaio de germinação.

Ensaio	Flumioxazina	Oxyfluorfen	Água	Extrato
Controle	-	-	1,5mL	-
Flumioxazina	1,5mL	-	-	-
Oxyfluorfen	-	1,5mL	-	-
Extrato	-	-	-	1,5mL
Extrato + Flumioxazina	1,5mL	-	-	1,5mL
Extrato + Oxyfluorfen	-	1,5mL	-	1,5mL

Em ambiente estéril, os discos foram colocados nas placas de Petri autoclavadas e regadas por pipeta com as soluções da Tabela 10. Posteriormente foram depositadas vinte sementes de *Lactuca sativa* com pinça estéril conforme a Figura 64.

Figura 64. Placa de Petri com sementes de *Lactuca sativa* sob papel filtro.



Fonte: Autoria própria

Após a montagem, as placas foram envoltas em plástico filme PVC para proteção, colocadas em bandeja plástica e envolta por saco plástico preto para que não

houvesse interferência de luminosidade. O ensaio foi mantido em incubadora BOD a 23°C por 120 horas.

6.2.2.2 Teste de germinação em solo

Da amostra de solo coletada para este estudo (Capítulo 2) a mesma foi peneirada e adicionado 50,00 gramas em cada placa de Petri. Nelas foram dispostas vinte sementes de *Lactuca sativa* e o solo foi regado com pipeta com 1,5 mL de cada solução (RAS, 2009). Os grupos desse experimento foram delineados da seguinte forma conforme a Tabela 13.

Tabela 13. Tratamento utilizados no ensaio de germinação.

Ensaio	Solo	Flumioxazina	Oxyfluorfen	Água	Extrato
Controle	50,00g	-	-	1,5mL	-
Flumioxazina	50,00g	1,5mL	-	-	-
Oxyfluorfen	50,00g	-	1,5mL	-	-
Extrato	50,00g	-	-	-	1,5mL
Extrato + Flumioxazina	50,00g	1,5mL	-	-	1,5mL
Extrato + Oxyfluorfen	50,00g	-	1,5mL	-	1,5mL

O grupo controle foi regado com água destilada, enquanto os grupos contendo herbicidas foram regados com a solução das concentrações estabelecidas no (Capítulo 2) e o Extrato obtido (Capítulo 01). A montagem do experimento ocorreu em ambiente estéril com pinça estéril. Após a montagem, as placas foram envoltas em plástico filme PVC para proteção, colocadas em bandeja plástica e envolta por saco plástico preto para que não houvesse interferência de luminosidade. O ensaio foi mantido em incubadora BOD a 23°C por 120 horas.

6.2.2.3 Análise Estatística de dados

Posteriormente, todas as plântulas que germinaram dos ensaios sobre papel e sobre solo são submetidas a medidas, levando em consideração o comprimento do hipocótilo e da raiz de cada uma. Após as medidas serem efetuadas as mesmas foram submetidas a teste de normalidade de dados e análise estatística pelo teste de Tukey.

6.3 Resultados e Discussão

6.3.1 Teste de fuga

No início do experimento, ao retirar as divisórias centrais, as minhocas foram observadas e se dirigiram principalmente em direção aos compartimentos onde existia os contaminantes. Esse fato pode ser justificado por substâncias alelopáticas dos herbicidas sejam atrativas aos organismos (Niva e Brown, 2019)

Conforme a Tabela 14, em todos as repetições do experimento houve aumento na massa dos organismos, o que confirma a ingestão da massa de solo de todos os compartimentos, inclusive contendo os contaminantes. As médias de % de diferença de massa após serem submetidas a Teste – T apresentaram diferença significativa entre todos os tratamentos.

Tabela 14. Peso e % de diferença de massa.

Repetição	Peso Inicial	Peso Final	% Diferença de Massa
1	6,34	8,45	24,97
2	5,24	9,61	45,47
3	6,73	10,77	37,51
4	4,75	6,85	30,65
5	5,97	6,73	11,29

Ao inserir novamente as divisórias nos compartimentos, foi realizada a contagem de organismos-teste por seção. O cálculo de porcentagem de fuga também expresso na Tabela 15 mostra que o solo contendo extrato é até mais atrativo para os organismos-

teste que o solo controle o qual deve ser considerado um efeito. Niva e Brown (2019) apontam que no cálculo do ensaio de fuga, resultados com respostas negativas, como no caso deste experimento são consideradas como % de fuga, quando as minhocas preferem os solos-teste.

Tabela 15. Quantidade de organismos por seção e % de fuga.

	Ensaio 01	Ensaio 02	Ensaio 03	Ensaio 04	Ensaio 05	Total	% de Fuga
Controle	2	1	2	2	1	8	0
Goal	1	0	0	0	1	2	60
Flumyzin	0	1	1	0	0	2	60
Extrato	2	3	3	4	3	15	-70
G+E	3	3	3	2	3	14	-60
F+E	2	2	1	2	2	9	-10

A média total de organismos dos seis grupos foi submetido e aprovado em teste de Normalidade de dados com $P= 0,304$. Realizado o Teste T-pareado as médias apresentaram diferença significativas entre si, rejeitando a hipótese nula de que as minhocas se distribuiriam de forma uniforme nos compartimentos.

6.3.2 Teste de contato

Todos os grupos apresentaram perda de massa (Tabela 16).

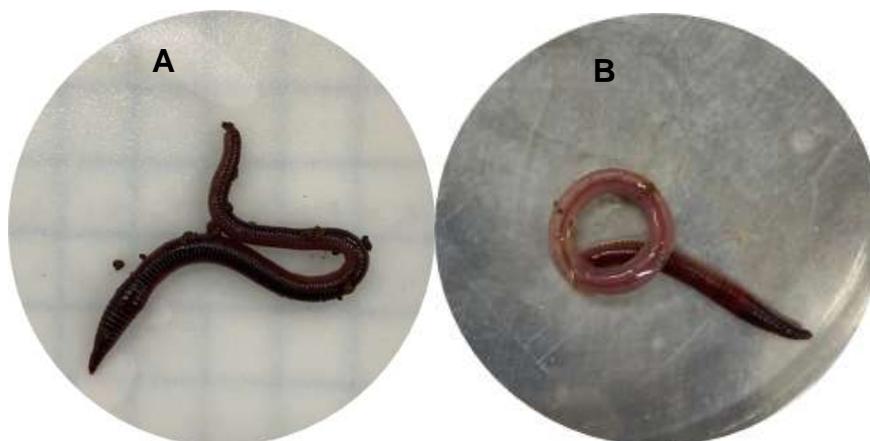
Tabela 16. Perda de massa de *Eisenia fetida* após teste de contato.

Extrato	F+E	Flumioxazina	O+E	Oxyfluorfen	Controle
0,21	0,06	0,13	0,23	0,03	0,14
0,03	0,02	0,03	0,19	0,27	0,38
0,03	0,16	0,07	0,2	0,29	0,13
0,14	0,14	0,19	0,13	0,06	0,38
0,05	0,07	0,07	0,27	0,28	0

Embora os grupos que continham os herbicidas e o extrato de *Phyllosticta citricarpa*, na análise estatística ANOVA não houve diferença significativa entre os grupos. Essa sinalização pode reforçar a hipótese nula de que os organismos testes

perderam massa de forma natural, justificada pela falta de fonte de alimento. Como não existiu a mortalidade de nenhum dos organismos testes, a taxa de letalidade não será considerada neste estudo. Soares et. al (2020) também não contabilizou mortalidade em seu ensaio com biopesticida à base de *Bacillus subtilis*, foi notado ao final da exposição letargia e diminuição dos reflexos. Diferente do autor, nesta pesquisa foi possível notar movimentos acelerados e agitação nos grupos contendo os dois herbicidas. Foi possível observar a descoloração das minhocas nos grupos dos herbicidas. Soares et. al (2020) considera essas alterações como resposta direta ao contaminante quando ocorre prejuízos morfofisiológicos. Ramos (2007) classifica a perda de coloração como efeito sub-letal de contaminantes, conforme a Figura 65.

Figura 65. A: Minhoca antes do ensaio; B: Minhoca com processo de descoloração como efeito sub-letal do ensaio.



Fonte: A autoria própria

Portanto, embora não foi possível expor a diferença significativa da perda de massa entre os grupos e nem a taxa de mortalidade, os grupos que continham o extrato bruto mantiveram sua coloração natural da mesma forma que o grupo controle, apresentando então um parâmetro positivo frente a efeitos sub-letais dos herbicidas.

6.3.3 Teste de germinação

Ambos os experimentos, em papel filtro ou no solo de estudo, houve germinação de 100% das sementes, esse fato pode ser atribuído a qualidade da cultivar escolhida que apresenta índice de germinação de 98% e ao fato de que a partir das medidas de comprimento de raiz e hipocótilo é possível concluir que os herbicidas afetam o desenvolvimento, mas não inibem a germinação, como na Figura 66.

Figura 66. A: Ensaio de germinação em solo; B: Ensaio de germinação em papel filtro



Fonte: Autoria própria

É exposto então um efeito inibidor dos contaminantes frente a espécie *Lactuca sativa*. Por isso neste estudo não foi calculado o índice de germinação. Foi levado em nota os comprimentos de raiz e hipocótilo para as análises estatísticas. Os dados passaram por teste de Normalidade e apresentaram uma distribuição normal, em seguida foi realizado ANOVA. As diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento são maiores do que seria esperado por acaso; há diferença estatisticamente significativa ($P = <0,001$). Com exceção do grupo que contém o herbicida Flumioxazina e o grupo Flumiozazina+Extrato, onde eles não se diferem, levando a considerar que neste caso o Extrato não é eficiente como um inibidor de fitotoxicidade. Alencar (2022) observou em testes de germinação de *Lactuca sativa* em Glifosato os valores de raízes com ordem de grandeza semelhante entre os grupos, e isso ocorre por um efeito

conhecido como hormese, em que um elemento tóxico pode apresentar efeitos inibitórios e estimulatórios dependendo da sua concentração.

O experimento conduzido em solo apresentou maiores índices de crescimento de raiz e hipocótilo e isso é devido ao fato de o solo possuir características ambientais que podem favorecer o desenvolvimento da plântula, como por exemplo microbiota local benéfica e que possui características de promoção de crescimento vegetal. Além de ser mais próximo as condições naturais de cultivo.

7. CONCLUSÃO GERAL

A bioprospecção do fungo *Phyllosticta citricarpa* demonstra alto potencial para a agricultura. As curvas de respirometria indicam que comunidades microbianas adaptadas a ambientes com intensa atividade agrícola apresentam pré-disposição para a biodegradação e quando bioaugmentada os resultados para biodegradação dos herbicidas são superiores, assim como o tempo de descoloração do indicador de DCPIP. Dessa forma, no ensaio de VCR, as concentrações mais altas de herbicida possuem maior velocidade de crescimento, mesmo apresentando características de dimorfismo. Como agente de controle biológico, o fungo é capaz de criar halos de inibição semelhantes ao fungicida comercial e em cultivo pareado aponta o caráter inibitório e antagônico, que é intensificado quanto ao tempo de inoculação antecipado aos patógenos. Portanto existe uma vantagem competitiva de crescimento em relação ao tempo, visto que todos os microrganismos deste estudo possuem crescimento rápido. A aplicabilidade do extrato como fungicida para tratamento de sementes possui eficácia semelhante ao fungicida químico comercial para as culturas de Soja, Trigo, Sorgo e Feijão e resultado efetivo de controle à cultura do milho. Para estudos futuros é interessante a identificação dos metabólitos do extrato assim como sua análise como promotor de crescimento vegetal.

A partir das análises com os organismos-teste foi possível concluir que os herbicidas apresentam efeitos sub-letais e quando submetidos a presença do extrato bruto o efeito de toxicidade é atenuado.

Portanto a bioprospecção de *Phyllosticta citricarpa* é promissora para biorremediação de solos contaminados por herbicidas pré e pós-emergentes, e possui ação inibitória de crescimento do fungo *Sclerotinia sclerotiorum*, *Fusarium verticillioides* e *Rhizoctonia solani* respectivamente.

8. REFERÊNCIAS

ALENCAR, L. P. Análise da fitotoxicidade do glifosato (Round up) em sementes de Alface elba (*Lactuca sativa*). 2022. 49 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal de Mato Grosso, Várzea Grande.

ARAÚJO, A. S. F. Biodegradação, extração e análise de Glifosato em dois tipos de solos. 2002. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Microbiologia Agrícola). Universidade de São Paulo, Piracicaba.

ARAÚJO, L. C. A.; ORLANDA, J. F. F. Biodegradação do herbicida 2,4D utilizando bactérias selecionadas do solo do cerrado maranhense. *Pesticidas: r. ecotox. e meio ambiente*, v. 21, p. 21-32, 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS ABNT-NBR 14283: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro. 1999

BADALYAN, S.M.; INNOCENTI, G.; GABRIBYAN, N.G. Antagonist activity of xylotrophic mushrooms against pathogenic fungi of cereals in dual culture. *Phytopathologia Mediterranea*, Bologna, v.41, p-200-225, 2002.

BALDASSARI, R. B; BRANDIMARTE, I; ANDRADE, A.G; SOUZA, D. C. G. S; MORRETO, C; GOES, A. Indução da expressão precoce de sintomas de *Guignardia citricarpa* em frutos de laranja 'Pêra- rio'. *Rev. Bras. Frutic.*, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 2, p. 269-275, Agosto 2007

BARBOSA, N. P. S ; NASCIMENTO, I. O; SILVA, P. B R; CAVALCANTE, D. L. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo manejado com

herbicidas. In: VII CONGRESSO BRASILEIRO DE AGROECOLOGIA. Porto Alegre, 2013, v. 8, n.2

BASSETO, M. A; CERESINI, P. C; FILHO, W. V. V. Severidade da soja causada por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA em função de doses de potássio. *Summa PHYtopathologica*, v.33 n.1 p. 56-62,2007.

BERNADES, F.R.A; SOARES, S.R.A Fundamentos da Respirimetria no controle de poluição da água e do solo. Editora Universidade de Brasília: Finatec, Brasília, 2005.

CARMO, Diego Almeida do et al . Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Rev. Ambiente e Água, Taubaté* , v. 8, n. 1, p. 133-143, Apr. 2013

CARVALHO, L. B. Livro Herbicidas. v.1, p. 63. 2013

Chen, Y., Han, J., Chen, D. *et al.* Persistence, mobility, and leaching risk of flumioxazin in four Chinese soils. *J Soils Sediments* **21**, 1743–1754 (2021).

Controle biológico no Brasil: parasitoides e

COSTA, M. R.. Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em latossolo vermelho-escuro. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) – Departamento de Engenharia Civil e Ambiental, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

CRATO, F, F. **Quantificação de escleródios e germinação miceliogênica e carpogênica de *Sclerotinia sclerotiorum* oriundos da cultura da soja tratada química e biologicamente.** Dissertação (Mestrado em Fitopatologia), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DURIGAN, J. C.; CORREIA, N. M.; BELLOTTE, J. A. M.; REVOREDO, M. D. Eficácia do Flumioxazin, aplicado isolado em mistura com Glyphosate, para o controle de plantas daninhas em citros. **Revista Brasileira de Herbicidas**, Passo Fundo, nº2, p 45 – 56, 2006.

EDGINTON, L. V.; KNEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, v. 62, n. 7, p. 42-44, 1971

ELIAS, L.M. **Bioprospecção de fungos endofíticos isolados de guaranazeiros da Amazônia**.2015. Tese (Doutorado em Ciências- Microbiologia Agrícola, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M. B. Doenças fúngicas dos citros: manejo integrado. **Revista Visão Agrícola**, Piracicaba, n. 2, p. 44-47, 2004

FEICHTENBERGER, E.; SPÓSITO, M.B. Tratamentos com fungicidas no controle de mancha preta (*Guignardia citricarpa*) em laranjeiras 'Valência'. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 28, p. 310S, 2003

FERREIRA, A.; TCACENCO, F. A.; NOLDIN, J. A. ; EDERHARDT, D. S. Bioprospecção de microrganismos resistentes e/ou degradadores de herbicidas. *Revista Agropec. Catarin.*, v.19, n.2, p. 60-65, 2006

FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, p. 179-183, 2004.

Fundo de Defesa da Citricultura. 2019. Inventário de árvores e estimativa da safra de

Fundo de Defesa da Citricultura. 2020. Inventário de árvores e estimativa da safra de

Fundo de Defesa da Citricultura. **Manual técnico sobre pinta preta**. Araraquara, 200. 10p. (Boletim Técnico)

GOES, A. de; BALDASSARI, R.B.; FEICHTENBERGER, E.; AGUILAR-VILDOSO, C.I. & SPÓSITO, M.B. Cracked spot, a new symptom of citrus black spot in Brazil. **Proceedings of the International Society of Citriculture**. Orlando, Flórida, p.1001-1002, 2000.

GOMES, E. V. Análise de populações de *Sclerotinia sclerotiorum* em cultura de Feijoeiro através de marcadores SSR. Dissertação (Mestrado em Biologia), Universidade Federal de Goiás, 2005

JAREMTCHUK, C.C., CONSTANTIN, J., OLIVEIRA JÚNIOR, R.S., ALONSO, D.G., ARANTES, J.G.Z., BIFFE, D.F., ROSO, A.C. e CAVALIERI, S.D. Efeito residual de Flumioxazin sobre a emergência de plantas daninhas em solos de texturas distintas. *Revista Planta Daninha*, v.27,n.1, p. 191-196, 2009

JUNG, L. F. **Fungos Endofíticos de Citros no controle biológico de *Phyllosticta citricarpa***. 2012. Dissertação (Mestrado em Genética) - Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

JUNIOR, P. R. K.; SPOLTI, R. S. P.; PONTE, E. M.; Características patogênicas de isolados do complexo *Fusarium graminearum* e de *Fusarium verticillioides* em sementes de e plântulas de milho. *Revista Ciência Rural*. v. 43, n.4, p. 583-588, 2013.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 204–211, 2006.

KIELY, T.B. Control and epiphytology of black spot of citrus on the central coast of New South Wales. New South Wales: Department of Agriculture Science Bulletin, 1948a. 88p. KIELY, T.B. Preliminary studies on *Guignardia citricarpa* n. sp. the ascigenous stage of *Phoma citricarpa* McAlp. and its relation to black spot of citrus. Proceedings of the Linnean Society of New South Wales. v.73, p.249-92, 1948b.

LAMDUM, M. C; FÉLIZ, M. R; ALHO, J; GARCIA, R; CABRITA, M. J; REI, F; VARANDA; C. C. R. Antagonistic activity of fungi of *Olea europaea* L against *Colletotrichum acutatum*. **Microbiological Research**.v. 183,p. 100-108, 2015.

laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro 2019/2020.

laranja do cinturão citrícola de São Paulo e Triângulo/Sudoeste Mineiro 2020/2021.

LAURETT, I; RIBEIRO, J. R. D; VITÓRIA, E. L. Produtos alternativos no controle de doenças fúngicas- Revisão Bibliográfica. **Revista Univap**. V.22, n.40, 2016

LOPES, M.V. **Mapas de zonas de risco de epidemias para doenças dos citros no Estado de São Paulo**. 2007. 55p. Dissertação (Mestrado em Ciências agrárias e veterinárias). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

LOUZADA, G.A.S., CARVALHO, D.D.C., MELLO, S.C.M., LOBO JÚNIOR, M., MARTINS, I. & BRAÚNA, L.M. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. **Biota Neotrop**. Brasília, v. 09,n.03, p. 14-149, 2009

MARTINES, C.; LONGO, M.; LERDA, D.; CERONI, G.; CAVALLÁRO, A. A GC Method for the Quantitative Determination of BTEX in Gasoline. **Journal of Chromatographic Science**, v. 34, n. 1, p. 413-417, 1996.

MELLO, Gabriela Sá Leitão de et al . Viabilidade da aplicação do método respirométrico de Bartha para determinação da biodegradação de poluentes ou resíduos em latossolos. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro , v. 12, n. 1, p. 71-78, Mar. 2007

MEYER, M.C.; MAZARO, S.M.; SILVA, J.C. Trichoderma Uso na Agricultura. 1. ed. Brasília - DF: Embrapa, 2019.

MONTAGNOLLI, R. N. Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. 2011. 245f. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2011.

MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e pretoquímicos: biorremediação de áreas afetadas**. 2015. 267 f. Tese - (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro, 2015

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 297-305, 2009.

NIVA, C. C.; BROWN, G. G. Ecotoxicologia Terrestre: Métodos e Aplicações dos Ensaio com Oligoquetas. In Impress.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline N° 207 - Earthworm, Acute Toxicity Tests, Organization for Economic Co-operation and Development. (OECD): Paris, France, 1984

OLIVEIRA, E.C.P.; LAMEIRA, O.A.; BARROS, P.L.C.; POLTRONIERE, L. S. Avaliação do óleo de copaíba (*Copaífera*) na inibição do crescimento micelial *in vitro* de Fitopatógenos. Rev. Ciências Agrárias, Belém, n.46, p.53-61, 2006

Parra, J. R. P.; Botelho, P. S. M.; Corrêa-Ferreira, B. S.; Bento, J. M.

PEDRO, J. Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste *Allium cepa*. 2008. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biologia Celular e Molecular). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

PEREIRA, W, S. P. Herbicida de Pré-emergência- Oxifluorfen. Seção Técnica IPEF, v.4, n.12, p. 45. Barueri, 1987

predadores

RAMOS, A.S. , EGLER, S.G. ; CESAR, R.G. ; RODRIGUES, A.C. XAVIER, J.L.C. ; CASTILHOS, Z.C. Teste de Ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie *Eiseinia foetida* para avaliação da contaminação mercurial em solos. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA. Rio de Janeiro, 2007,p. 5

RAMOS, D. P; BARBOSA, R. M; VIEIRA, B; G. T. L.; PANIZZI, R. C.; VIEIRA, R. D. Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. *Revista Pesquisa Agropec. Trop.* V. 44, n.1, p. 24-31, 2014.

RAS. Regras para Análise de Semente. Ministério da Agricultura. Brasília: SNAD/DNPV/CLAV, 2009. 365p.

RÉGO, A. P. J. **Influência do herbicida Gesapax na atividade microbiana do solo e sua ecotoxicidade.** 2017. 144 p. Tese (Doutorado em Ciências - Microbiologia Aplicada). Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.

RODRIGUES NETO, L. L.; POLETTI, E. C. C. Modelagem matemática de atividade microbiana. Matemática, **Revista Eletrônica Paulista de Bauru**, v. 2, n. 1, p. 49-58, jul. 2013.

RODRIGUEZ, M.B.C.; ANDREOTE, F.D.; SPÓSITO, M.B.; AGUILLAR-VILDOSO, C.I.; ARAÚJO, W.L.; PIZZIRANI-KLEINER, A.A. Resistência a benzimidazóis por *Guignardia citricarpa*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 42: 323-327, 2007.

S. (Eds.). (2002).

SANDALIO, L. M. et al. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. *Journal of Experimental Botany*, Oxford, v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 2001.

SCALOPPI, E. M. T. **Mancha Preta dos Citros: Técnicas de manejo e queda precoce de frutos**. 2010. 84 p. Tese (Doutorado em Agronomia- Produção Vegetal). Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

SHIOMI, H. F.; FERREIRA, M. V. R.; MELO, I. S. *Scientific Electronic Archives*, Sinop, v. 10, n. 2, p. 56-63, 2017.

SILVA, A. O. **Sobrevivência em ramos e controle alternativo de *Phyllosticta citricarpa*, agente causal da mancha preta dos citros**. 2014. 79p. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SILVA-PINHATI, A.C.O.; GOES, A.; WICKERT, E.; ALMEIDA, T.F.; MACHADO, M.A. Mancha preta dos Citros: Epidemiologia e Manejo. **Laranja**, Cordeirópolis, v. 30, n. 1-2, p. 45-64, 2009.

SOARES, K. W. P; MARIANO, W. S; PAULINO, M. G. Teste de fuga com minhocas (*Eisenia andrei*) em solo natural tratado com biopesticida a base de *Bacillus thuringiensis*

para avaliação da qualidade do solo. **Research Society and Development**, v.9, n.8, 2020.

SOUZA, J. L.; FERREIRA, F. J. F. Anomalias aerogamaespectrométricas (K, eU e eTh) da quadrícula de Araras e suas relações com processos pedogenéticos e fertilizantes fosfatados. **Revista Brasileira de Geofísica**, v. 23, p.251-274, 2005.

SOUZA, J. R.; REBOUÇAS, T. N.; LUZ, J. M.; AMARAL, C. L.; FIGUEIREDO, R. M.; SANTANA, C. M. Potencialidade de fungicidas biológicos no controle de requeima do tomateiro. **Horticultura Brasileira**, Vitória da Conquista, v. 32, p. 115-119, 2014

STEPHENSON, G. L.; KAUSHIK, A.; KAUSHIK, N. K.; SOLOMON, K. R.; STEELE, T.; SCROGGINS, R. P. Use of an avoidance-response test to assess the toxicity of contaminated soils to earthworms. In: SHEPPARD, S.; BEMBRIDGE, J.; HOLMSTRUP, M.; POSTHUMA, L. (Ed.). *Advances in earthworm ecotoxicology*. Pensacola: Setac Press, 1998. p. 67-81.

SURYANARAYANAN, T. S.; THIRUNAVUKKARASU, N.; GOVINDARAJULU, M. B. et al. Fungal endophytes and bioprospecting. *Fungal Biology Reviews*, v. 23, n. 1-2, p. 9-19, 2009.

VAN DER AA, H.A. *Studies Phyllosticta 1. A studies in Mycology*, v.5, p.1-110, 1973.

ZULIAN, A; DORR, A. C.; ALMEIDA, S. C. Citricultura e agronegócio cooperativo no Brasil. *Revista Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental*, v. 11, n. 11, p. 2290-2306, 2013.

9. APÊNDICES

9.1 Titulação

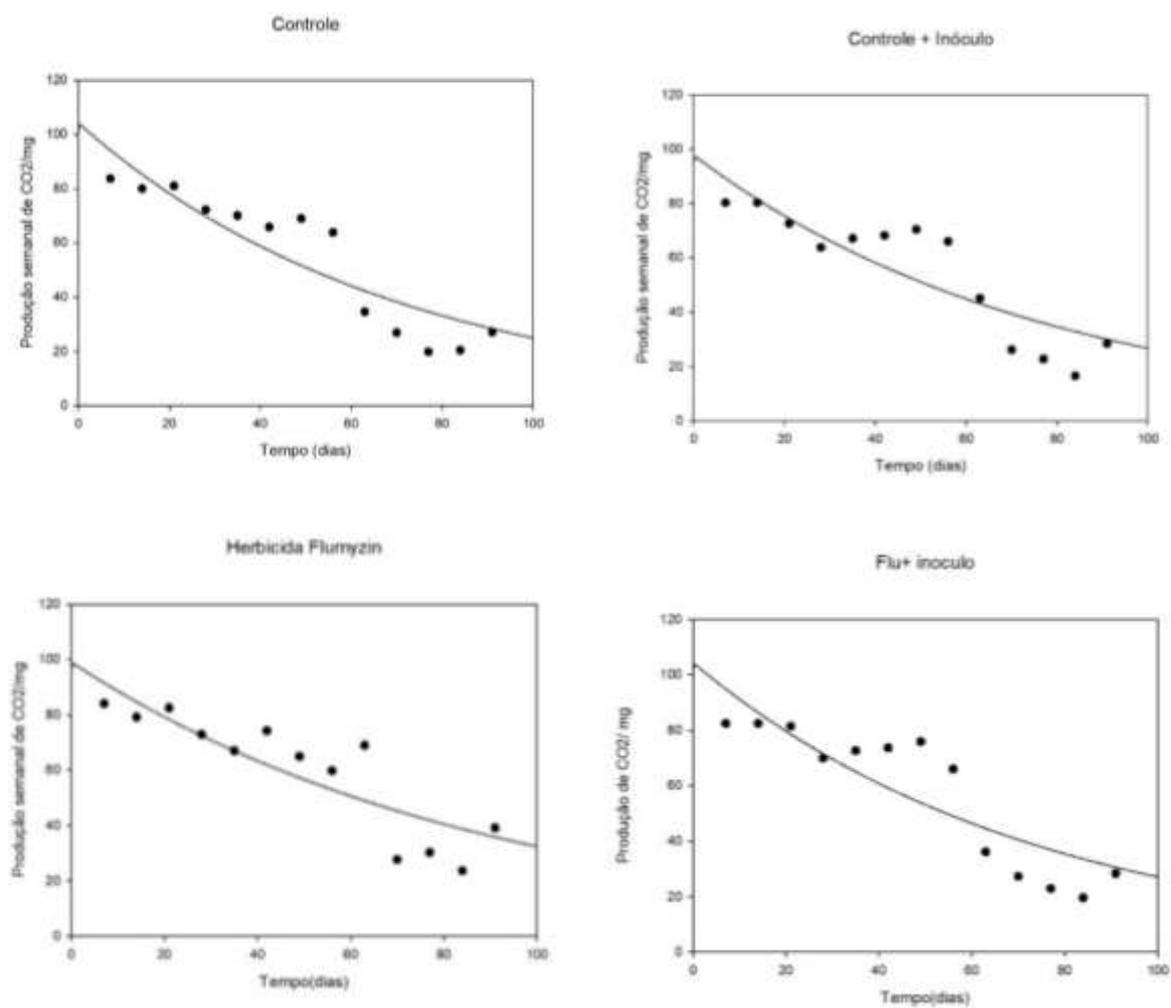
Figura 67. Dados de titulação

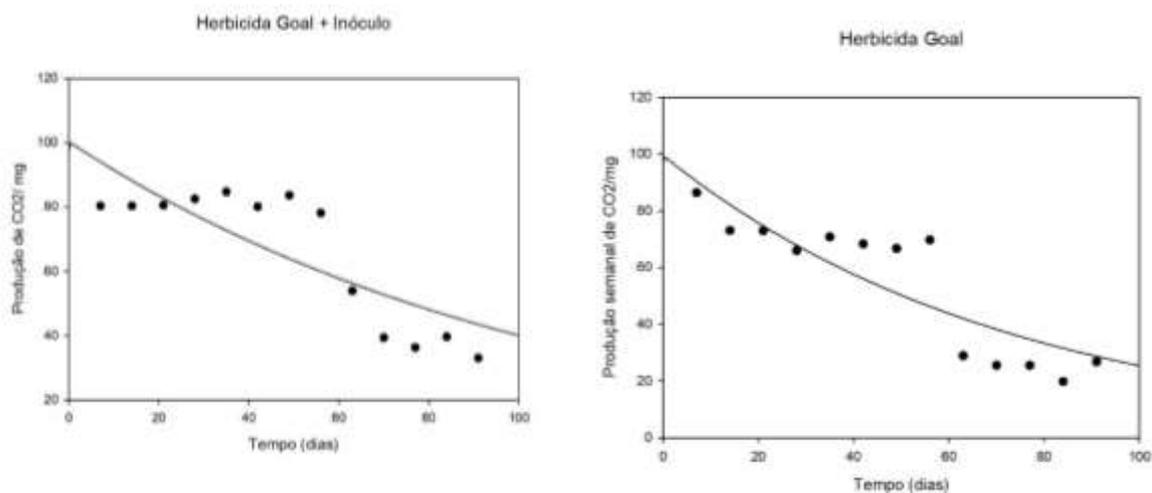
DIAS	CONTROLE 1	CO2	CONTROLE 2	CO2	CONTROLE 3	CO2	MÉDIA	MÉDIA AC
7	8,40	80,52	7,50	82,50	5,00	88,00	83,67	32,06
14	13,00	70,40	13,00	70,40	0,00	99,00	79,93	111,99
21	14,10	67,98	10,50	75,90	0,00	99,00	80,96	192,95
28	15,00	66,00	16,00	63,80	5,60	86,68	72,16	265,11
35	12,50	71,50	14,00	68,20	13,00	70,40	70,03	335,14
42	14,60	66,88	14,50	67,10	16,20	63,36	65,78	400,92
49	14,50	67,10	14,00	68,20	12,50	71,50	68,93	469,86
56	15,50	64,90	17,00	61,60	15,50	64,90	63,80	533,66
63	32,00	28,60	26,10	41,58	29,80	33,44	34,54	568,20
70	34,90	22,22	30,00	33,00	33,50	25,30	26,84	595,04
77	36,00	19,80	36,90	17,82	35,10	21,78	19,80	614,84
84	33,50	25,30	38,30	14,74	35,40	21,12	20,39	635,22
91	32,90	26,62	34,10	23,98	31,10	30,58	27,06	662,28
DIAS	OXYFLUORFEM 1	CO2	OXYFLUORFEM 2	CO2	OXYFLUORFEM 3	CO2	MÉDIA	MÉDIA AC
7	2,50	93,50	6,50	84,70	8,20	80,96	86,39	86,39
14	10,00	77,00	13,50	69,30	11,80	73,04	73,11	159,50
21	12,50	71,50	12,50	71,50	10,50	75,90	72,97	232,47
28	14,00	68,20	17,00	61,60	14,00	68,20	66,00	298,47
35	9,50	78,10	15,50	64,90	13,50	69,30	70,77	369,24
42	12,00	72,60	15,50	64,90	14,30	67,54	68,35	437,58
49	14,00	68,20	16,50	62,70	13,50	69,30	66,73	504,32
56	13,50	69,30	13,00	70,40	13,40	69,52	69,74	574,06
63	28,60	36,08	34,10	23,98	32,90	26,62	28,89	602,95
70	33,30	25,74	34,30	23,54	32,60	27,28	25,52	628,47
77	29,50	34,10	35,10	21,78	35,60	20,68	25,52	653,99
84	33,90	24,42	36,50	18,70	37,60	16,28	19,80	673,79
91	29,70	33,66	35,10	21,78	33,70	24,86	26,77	700,56
DIAS	FLU 1	CO2	FLU 2	CO2	FLU 3	CO2	MÉDIA	MÉDIA AC
7	7,00	83,60	5,90	86,02	7,50	82,50	84,04	84,04
14	14,10	67,98	0,00	99,00	13,00	70,40	79,13	163,17
21	12,00	72,60	0,00	99,00	10,50	75,90	82,50	245,67
28	16,50	62,70	4,00	90,20	15,10	65,78	72,89	318,56

35	12,50	71,50	15,00	66,00	16,10	63,58	67,03	385,59	
42	15,50	64,90	5,00	88,00	13,30	69,74	74,21	459,80	
49	14,50	67,10	15,50	64,90	16,50	62,70	64,90	524,70	
56	20,00	55,00	19,00	57,20	14,50	67,10	59,77	584,47	
63	15,20	65,56	13,30	69,74	12,50	71,50	68,93	653,40	
70	32,60	27,28	30,60	31,68	34,10	23,98	27,65	681,05	
77	35,40	21,12	24,50	45,10	33,90	24,42	30,21	711,26	
84	35,20	21,56	30,00	33,00	37,60	16,28	23,61	734,87	
91	15,10	65,78	33,00	26,40	33,60	25,08	39,09	773,96	
DIAS	CONTROLE	CO2	M ACUMULADA	OXYFLUORFEM	CO2	MÉDIA AC	FLU	CO2	MÉDIA AC
7	8,50	80,30	80,30	8,50	80,30	80,30	7,50	82,50	82,50
14	8,50	80,30	160,60	8,50	80,30	160,60	7,50	82,50	165,00
21	12,00	72,60	233,20	8,40	80,52	241,12	8,00	81,40	246,40
28	16,00	63,80	297,00	7,50	82,50	323,62	13,20	69,96	316,36
35	14,50	67,10	364,10	6,50	84,70	408,32	12,00	72,60	388,96
42	14,00	68,20	432,30	8,60	80,08	488,40	11,50	73,70	462,66
49	13,00	70,40	502,70	7,00	83,60	572,00	10,50	75,90	538,56
56	15,00	66,00	568,70	9,50	78,10	650,10	15,00	66,00	604,56
63	24,50	45,10	613,80	20,50	53,90	704,00	28,60	36,08	640,64
70	33,10	26,18	639,98	27,10	39,38	743,38	32,60	27,28	667,92
77	34,70	22,66	662,64	28,50	36,30	779,68	34,60	22,88	690,80
84	37,50	16,50	679,14	27,00	39,60	819,28	36,10	19,58	710,38
91	32,10	28,38	707,52	30,00	33,00	852,28	32,10	28,38	738,76

9.2 Produção de CO2 semanal

Figura 68. Gráficos de produção de Co2 semanal





9.3 Dados de Velocidade de Crescimento Radial

Tabela 17. Raios dos ensaios de VCR

DIAS	FA1	FA2	FA3	FB1	FB2	FB3	GA1	GA2	GA3	GB1	GB2	GB3
3	0,00	0,00	0,10	0,10	0,20	0,10	0,30	0,30	0,40	0,30	0,50	0,50
	0,00	0,00	0,10	0,10	0,20	0,10	0,30	0,30	0,35	0,30	0,50	0,50
	0,00	0,00	0,10	0,10	0,20	0,10	0,31	0,30	0,45	0,30	0,50	0,50
5	0,50	0,10	0,10	0,10	0,90	0,60	0,39	0,90	1,20	1,10	1,10	1,20
	0,50	0,10	0,10	0,10	0,90	0,70	0,39	1,00	1,10	1,20	1,20	1,20
	0,50	0,10	0,10	0,10	1,20	0,80	0,42	1,20	1,30	1,10	1,30	1,20
6	0,80	0,10	0,10	0,20	1,20	1,90	0,69	1,20	1,80	1,60	2,00	2,00
	0,70	0,10	0,10	0,20	1,10	1,50	0,70	1,30	1,70	1,50	1,90	1,90
	0,90	0,10	0,10	0,20	1,30	1,70	0,71	1,30	1,90	1,70	2,10	2,10
10	1,20	0,20	0,30	1,30	2,00	2,60	1,00	1,90	2,50	2,10	2,20	2,90
	1,20	0,10	0,30	1,20	2,00	2,60	1,00	2,00	2,50	2,10	2,20	3,00
	1,20	0,30	0,30	1,40	2,00	2,60	0,90	2,10	2,50	2,10	2,20	3,10
13	1,60	0,30	0,30	2,00	2,00	3,70	1,50	2,60	3,60	2,50	3,40	3,90
	1,40	0,30	0,30	1,90	2,00	3,30	1,40	2,60	3,50	2,30	3,50	4,00
	1,50	0,30	0,30	2,10	2,00	3,50	1,60	2,60	3,70	2,70	3,60	4,10
17	2,00	1,50	1,40	3,40	2,00	4,30	2,50	3,00	4,00	2,50	4,20	4,10
	2,00	1,40	1,50	3,30	2,00	4,30	2,50	3,00	4,00	2,40	4,30	4,20
	2,00	1,60	1,30	3,20	2,00	4,30	2,50	3,00	4,00	2,60	4,10	4,30
21	3,60	3,00	1,50	3,50	2,00	4,30	3,00	4,00	4,00	3,00	4,30	4,30
	3,40	3,00	1,50	3,50	2,00	4,30	3,00	4,00	4,00	3,00	4,30	4,30
	3,50	3,00	1,50	3,50	2,00	4,30	3,00	4,00	4,00	3,00	4,30	4,30

9.4 Áreas de cultivo pareado

Tabela 18. Áreas de cultivo pareado

Repetições	Tratamento	%f	%p	%r	%p	%s	%p
1	f, r s antes	69,3578	13,2513	79,7413	18,5276	7,82544	83,3476
	ao mesmo tempo	51,9481	37,8824	59,9994	38,8237	11,2699	72,5685
	p depois do f, r, s	27,7838	56,9433	29,129	51,2844	4,46931	74,7504
2	f, r s antes	61,5919	5,9781	71,3468	19,5667	65,5745	8,58938
	ao mesmo tempo	42,5637	40,3268	60,7293	39,1888	14,2688	55,5242
	p depois do f, r, s	24,5093	66,3118	38,9342	57,2294	7,74408	80,809
3	f, r s antes	65,868	7,53947	77,7147	17,7751	4,74255	75,5222
	ao mesmo tempo	49,2126	42,425	63,6301	33,7837	4,30405	54,8922
	p depois do f, r, s	15,3672	62,6907	69,7573	27,2106	9,73529	85,2637

9.5 Dados de Cultivo pareado

Figura 69. Outputs das análises estatísticas do R

```
Kruskal-wallis rank sum test
data: medida_r by tratamento
Kruskal-Wallis chi-squared = 9.4615, df = 3, p-value = 0.02374

Pairwise comparisons using Tukey and Kramer (Nemenyi) test
with Tukey-Dist approximation for independent samples
data: medida_r by tratamento
  antes controle depois
controle 0.738 - -
depois 0.324 0.033 -
durante 0.525 0.081 0.987

Kruskal-wallis rank sum test
data: medida_s by tratamento
Kruskal-Wallis chi-squared = 6.5897, df = 3, p-value = 0.08619

Shapiro-wilk normality test
data: resid(fit_fusarium_2)
W = 0.93403, p-value = 0.4248
```

```
> aov(aov(fusarium))
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: medida_f
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tratamento	3	3281.5	1093.84	88.771	1.759e-06 ***
Residuals	8	98.6	12.32		

```
---  
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> |
```

```
> TukeyHSD(aov(fusarium))
```

```
Tukey multiple comparisons of means  
95% family-wise confidence level
```

```
Fit: aov(formula = medida_f ~ tratamento, data = dados_fusarium)
```

```
$tratamento
```

	diff	lwr	upr	p adj
controle-antes	10.33393	1.155575	19.512291	0.0284911
depois-antes	-33.81000	-42.988358	-24.631642	0.0000115
durante-antes	-13.89667	-23.075025	-4.718309	0.0055701
depois-controle	-44.14393	-53.322291	-34.965575	0.0000015
durante-controle	-24.23060	-33.408958	-15.052242	0.0001354
durante-depois	19.91333	10.734975	29.091691	0.0005412

.4

```
> aov(aov(fusarium))
```

```
Analysis of Variance Table
```

```
Response: medida_f
```

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)
tratamento	3	3281.5	1093.84	88.771	1.759e-06 ***
Residuals	8	98.6	12.32		

```
---  
Signif. codes:  0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1
```

```
> |
```

9.6 Análises Espectrofotométricas do ensaio de colorimetria

Tabela 19. Análises espectrofotométricas do ensaio de DCPIP

Ensaio/Horas	1	7	8	12	15	36	48
1	0,816	0,613	0,471	0,316	0,238	0,112	0,004
2	0,799	0,601	0,43	0,257	0,104	0,005	0
3	0,789	0,453	0,325	0,048	0	0	0
4	0,821	0,598	0,247	0,056	0,004	0	0
5	0,813	0,254	0,0042	0	0	0	0
6	0,798	0,0052	0	0	0	0	0

9.7 Dados de teste de germinação de *Lactuca sativa*

Tabela 20. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo controle.

	CONTROLE 01		CONTROLE 02		CONTROLE 03		CONTROLE 04		CONTROLE 05	
	RAIZ	RADICULA								
1	3,5	2,2	4	2	3	2,5	3	2,5	4	2
2	3	2,5	4	2,2	3,1	2,6	3	2	3	1,5
3	2	2	2,5	2	4,5	3	3,5	2	4,5	2
4	2,3	2,5	4,5	2,5	2	2,5	3,5	2	3	1,5
5	2,6	3	3,5	2,5	2,5	2,3	2	2	3,5	2
6	4,6	2,5	3	2,5	3,5	2	3	2,5	2,5	1,5
7	1,9	2,5	4	2	5	2	2,5	2	1,5	1
8	3,5	2,5	4,5	2	4,5	2,5	2	1	3,5	2
9	2,5	2,5	4	2	3	2	3	1,5	4	2
10	2,5	2	3	2,5	5	3	4	2	4	2
11	4	2	2	2,5	3	3	1	1	3,5	2
12	3,5	2,1	3	1,5	3	3	5	2	3,5	2
13	2,1	2	3,9	2	4	3,5	4,5	1	3	2
14	2,5	2,5	3,5	2	3	2,5	2	1,5	3	1,5
15	4,1	3	3,5	2	3,5	3,5	4,5	2	3	1
16	2	2	3,5	2	2	3	3	2	5	2
17	1,5	2	3,6	2	4,5	3	2	1	3	2
18	3	2,5	2	2	2,5	2,5	3	1	2	2
19	2,1	3,5	3,4	2	3	2,5	3	1,5	3,5	2,5
20	2,1	3	4	2,1	4,5	4	3	1,5	3	2,1

Tabela 21. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Flumioxazina+extrato.

	FLUMYZIN 1+E		FLUMYZIN 2+E		FLUMYZIN 3 +E		FLUMYZIN 4 +E		FLUMYZIN 5 +E	
	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA
1	1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1
2	1,5	1	0,5	1	1	1,3	0,5	1	1,5	1
3	1	1	1	1	1,5	1,5	0,5	1	1	1
4	1,5	1	1	0,9	1	1	0,5	1	1	1,5
5	1	0,9	1	1	0,7	1,5	0,5	1	1,5	1,5
6	1	1	0,6	1	0,7	0,9	0,5	1	1,5	1
7	1	1	1	1	0,7	1	1	1	1	1
8	2	1,5	0,3	0,9	0,3	1	0,5	1	1	1
9	2	1	1	1,2	0,4	1	1	1	1	2
10	1,5	1,5	1	1,5	0,5	1,2	0,5	1	2	1
11	1	1	1	1	1	1	0,5	1	2	1,5
12	1,5	1	0,5	1	0,5	1	1	1	2	1
13	1	1	0,7	1	0,9	0,1	0,5	1	1	1
14	1,5	1	0,6	1	0,3	1	0,7	1	1,5	1
15	0,5	0,4	1	1	1	1	0,9	1	1	1
16	0,7	0,7	1	1,2	1	0,3	0,3	1	2	1
17	1	1	0,5	1	0,5	0,3	0,7	1	2	1
18	1,5	1,5	0,3	1	0,5	0,5	0,5	1	1,5	1
19	0,9	1	1	1,5	0,5	1	0,6	0,3	0,5	0,5
20	1	1	1,5	1	0,5	1	0,7	1	1,2	1,2

Tabela 22. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Extrato.

	EXTRATO 1		EXTRATO 2		EXTRATO 3		EXTRATO 4		EXTRATO 5	
	RAIZ	RADICULA								
1	2	1,5	2,2	1,5	2	1,5	3,5	2,5	2	1,5
2	2,5	1	2,5	1,3	0,5	1	2,5	2,3	1	1
3	2	1,3	3	1,5	1	1,3	2	1	4	1,3
4	1,7	1	3,4	1,5	0,7	1	2,4	1,5	1,9	1,5
5	2	1	3,5	1	2,5	1	3	2	1,5	1
6	1,9	1	1,5	1	1	1,2	2,5	2	3,5	1
7	2,2	1,1	1,5	1,3	2	1	2	1,5	3	1,2
8	2,5	1,1	2,2	1,2	2	1	1,5	1	2,5	1
9	2,4	2	1,5	1,7	1,5	1	0,5	1	2	2
10	0,5	1,1	2	1,5	2,5	1,3	0,5	1,3	1	1
11	0,5	1	4	1,5	3	1,5	3	2	4	1,2
12	2,5	1,3	2	1	2	1	2,5	2	4	1,5
13	2,7	1,5	4	2	2	1,2	2	1,6	1	1
14	0,5	1	2	1,5	0,5	0,5	2,3	2	4	1
15	2,5	1	2	1,3	2	1,5	4	2	2	1,5
16	1,3	1	3	1	3	1,5	2,5	2	4	1
17	1,2	1	0,9	0,5	2,5	1,5	3	2	2	1
18	2	1,2	4	1,6	1,5	1	3	2,2	1,5	1,5
19	2,4	1	2	1	2	1	4	2	3	2
20	2	1	2	1	0,5	0,5	2	1	3	2

Tabela 23. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Flumioxazina.

	FLU 1		FLU 2		FLU 3		FLU 4		FLU 5	
	RAIZ	RADICULA								
1	0,5	1	0,6	1	1	1	0,5	1	0,6	1,1
2	1	1	0,9	1	1	1	0,6	1	0,9	1
3	1	0,4	1	1	0,5	0,7	0,5	1,2	0,6	1,1
4	1	0,5	1	1,1	0,7	1	0,5	0,6	1	1
5	0,7	1,2	0,5	1	0,5	0,5	0,5	1	0,8	1
6	1	1	0,5	1	0,5	0,6	0,6	1	0,3	1,1
7	0,7	1	0,5	1	0,5	0,6	0,5	1,1	0,7	0,6
8	1	1,1	0,6	1,1	0,3	0,7	0,6	0,7	1	1
9	0,7	1,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,6	1,1	0,5	0,3
10	0,6	0,5	0,5	1	0,6	0,6	0,7	1	1	1
11	0,5	0,6	1	1,2	0,6	0,6	1	1	0,4	1
12	1	0,5	1	1,2	1	0,7	1	1,2	0,7	1
13	1	0,4	0,6	0,6	0,9	0,8	0,5	0,5	0,7	1,2
14	1	0,5	0,5	0,5	1	0,5	0,6	1,3	1	1,1
15	1	0,3	0,7	1,2	0,6	0,5	0,9	1	0,9	1,4
16	1	1	0,5	0,5	1	0,7	0,5	1,1	1	1,2
17	1,2	1,1	0,5	1	0,7	0,6	0,7	1	0,3	1,7
18	0,4	0,5	0,7	1	0,6	0,4	0,6	1	0,5	0,4
19	0,5	0,5	0,6	0,9	0,5	1	0,6	1,1	0,5	0,5
20	1	1	0,5	0,5	1	1	0,2	1,3	0,5	0,5

Tabela 24. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Oxyfluorfen.

	GOAL		GOAL		GOAL		GOAL		GOAL	
	RAIZ	RADICULA								
1	1,5	1	2	1	2,5	2	5	2	0,5	1
2	2,5	1	2	1	1	1	1,5	1,5	2,3	1,2
3	2	1	1	1	2	1,5	4	1	1,2	1
4	1	1	1,5	0,5	2	1	5	2	0,5	0,5
5	1,5	1	0,5	0,5	4	1,5	4	2	1,5	1
6	0,5	0,5	0,5	0,5	2	1	4	1	2	1
7	2	1	0,5	1,5	2	1	5	1	2	1
8	1	0,5	2	1	0,5	1	5,5	1	3	1
9	1	1	1,5	1	2	1	4	1	1	1
10	1	1	0,5	1	3,5	1,5	2	1	1	0,5
11	1,5	1	1	1	2	1,1	2	1	1	1,5
12	3	1	1,5	1	0,5	0,7	6	1	1,5	1,5
13	2,5	1	1	1	1	0,9	1	1	0,5	0,5
14	3	1	1,5	1	2	1	2	0,5	0,5	0,5
15	3,5	2	1	0,5	2	0,5	2,5	1	3	1
16	2	1	0,5	0,5	1	1	3	1	1,2	0,7
17	0,5	1	1,5	1	3	1	3	1,5	1	1
18	0,5	0,5	1,5	1,5	2	1	5,5	1,5	3,9	1,2
19	0,5	0,5	1,5	1	0,5	0,4	5	2	0,5	0,5
20	0,5	0,5	1,5	1	0,5	0,3	2	2	0,5	0,5

Tabela 25. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em papel filtro no grupo Oxyfluorfem + Extrato.

	GOAL+E1		GOAL+E2		GOAL+E3		GOAL+E4		GOAL+E5	
	RAIZ	RADICULA								
1	4	1,5	2	2	4	2	4,5	1	4	2
2	5	1	5	2	4	2,1	0,5	1	4	1,5
3	4	1	4	2	5	1,5	3	1	5,5	2
4	5	2	1,5	1,5	4	2	4	1	2	2
5	4	1	4,5	2	5,1	2,5	3	1	5,5	2
6	5	2	4,5	1	4	2,1	1,5	1	4,5	3
7	4	1	3	2	4	2	2,5	1	4,5	2
8	5	1,5	4,5	2	3,7	2	4	1	3	2
9	4	0,9	5	2	4	2	4,1	1	5	3
10	4	1,3	2	2	3,3	2	3	1	5	3
11	5	1	3	2,9	4	3,1	3	1	2,5	1,5
12	4,5	1	3,3	3	5	2	2	1	4	2
13	4	1	5	2	4	2	3,5	1	2	2
14	4	1	4	2	4	2,5	2,5	3,5	5	3
15	5	1	4	4	0,5	0,5	4	1	4,5	2,5
16	5	1	3,5	1,5	3,3	1	3	2	4	2
17	4	1,1	6	2,5	4	2	3	2	4,5	3
18	4	2	4	1	5	3	3	2	4	2
19	5	1	2,5	1	3	2,1	3	1,5	4,1	2
20	3	2	5	1	1	1	3	1	2	2

Tabela 26. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo controle.

	CONTROLE 01		CONTROLE 02		CONTROLE 03		CONTROLE 04		CONTROLE 05	
	RAIZ	RADICULA								
1	4	3,5	1,5	3,5	3	5,1	3,1	6	4	5,1
2	3,5	4	4	4	3,1	5	4,4	5,1	3	4,3
3	1	4	3,1	4	3,5	4,9	3,5	5,5	3,5	4,3
4	3	4,1	3,5	4,1	3,6	4,5	2,6	5	3,5	4
5	1	3,1	4	3,1	3,2	4,1	3	4	3,5	3,3
6	5	2	1	2	2,5	3,1	4,5	5	4	4
7	3,1	5	2,5	5	2,1	5	2	4	4,1	5
8	3	5	3	5	1	4,5	3,1	4,9	2,1	3,5
9	3	4	2,5	4	3,5	4,1	4,3	5,2	3,1	3,6
10	2,1	3,3	4,5	3,3	4	5,1	4	4	4	4
11	3	4,5	1	4,5	3,1	5	2,1	3	1,5	3
12	4	4,1	3,5	4,1	1,1	3	3,9	5,1	4,1	5
13	1,2	2,6	4	2,6	2	5,1	2,1	4	1,5	2
141	3,5	4	2	4	4,1	5	3,1	4	5,1	3,3
151	4	2	3	2	3,4	3	4,6	5,1	3,1	5
16	5,5	6	4	6	3,6	4,1	2,5	3,1	4	2,5
17	5	4,3	4,2	4,3	4,5	5	4	4	2	2,5
18	3,1	5	1,5	5	4,2	3,1	3,9	4,5	3,5	2,6
19	2,5	5	3	5	4	5	5	5,3	5,2	3,3
20	4	3	2	3	3,9	4	2,1	3	4,1	3

Tabela 27. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Flumioxazina.

	FLUMYZIN 1		FLU 2		FLU 3		FLU 4		FLU 5	
	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA
1	2,5	4	1,5	4,3	0,5	2,5	2	4,2	1	3,5
2	2	3	2	4,4	2,7	3	1,5	3,3	2	3
3	2	2,9	2,1	4,6	3	2,4	2,6	3,2	2	3
4	2,3	3	1,7	3,6	1,5	3,1	2	4,3	1	2
5	2	3,5	0,5	2	1,3	3	2	4	2	2
6	2,1	2,5	1,5	3	1,3	4,2	1,5	3	1	2,5
7	2	3,1	2	2	0,5	1,5	1	3	2	1,5
8	2,2	4,6	2	2,3	0,6	2,6	2,5	2,5	2	3
9	2,5	25,5	0,5	2	1	2,6	1	2,5	0,5	1,5
10	0,5	2	2	2	0,5	1	2	4	2	2
11	2,2	3,6	1,2	2,4	1,5	1,7	1	3	2	2,4
12	1,5	2,5	2,1	3	0,5	1	2,4	4,5	3	3
13	2,5	3,5	2,6	1,9	1,2	1,6	2	4	2,5	1,5
14	2	3,4	1,5	2,5	0,5	1	3	3,9	0,5	2
15	2,2	2,2	0	1,6	0,5	1	2	2	1	2
16	2	3,2	0	0,8	0	1	1,2	3,3	1	3
17	2,6	4	0	0,8	1	1,5	1	2,5	1	1
18	3	2,7	1	2,6	0	0	1	3	0	2
19	2,5	2,5	1,2	3	0	0	0	2	1	0
20	1,5	2,7	1	1	1	1	3	1	1,1	1

Tabela 28. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Flumioxazina+ Extrato.

	F+E1		F+E2		F+E3		F+E4		F+E5	
	RAIZ	RADICULA								
1	4,5	3,5	3	3,2	4,5	3	1	2,5	0,5	1
2	4	4,1	3,2	3,5	2,5	3,5	2,5	2	1,5	3
3	2,5	3,5	2	1	2,5	3,5	2	1,5	1	1,5
4	3	4	2,5	2,5	2	3,5	1	1,5	1	2
5	1,5	2	3	3	2	3	2	2	0,5	1
6	2	3,5	0,5	2	2	2	2	2,1	1,5	3
7	1,2	1	2	3,4	2,7	2	1	1,5	0,5	1,6
8	1,2	3,5	2,5	3,2	1	3	1	1	1,5	1,5
9	3,5	2,5	2	1,5	1,5	3	3,5	3	1,5	2
10	2,5	3	1	1	1	4	2,5	2,5	0,5	2
11	4,5	3	1,5	2	3	4,1	3	1,3	0,5	2
12	3	3	0,5	1,5	3	3	2	2	0,5	2,1
13	2,5	2,6	1	2	1	2	3	2	1,5	2
14	2	2,5	0,5	2,5	1,5	1	1	1	2	2,1
15	1,5	2	0,5	0,5	2,5	1,5	2,3	3	1,9	2,1
16	1,5	2	0,5	1	2,5	1,5	2,2	2	1,8	2
17	1,5	3,6	1	2	3,5	2	2	2,1	2	2
18	2,6	2	1	1	3	2,5	2,2	2	1	1
19	1,5	1	3,3	3	3	1,5	2,5	2,3	0,9	1
20	1	1	3	2	1	1	2	3	1	1

Tabela 29. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Extrato.

	EXT 1		EXT 2		EXT 3		EXT 4		EXT 5	
	RAIZ	RADICULA								
1	1	2	4	4	2	4	3,5	2	2,5	2,5
2	1,5	1,5	4	4	2,3	3,5	2	4	5	5
3	1	1,5	3	3	3	3	2	2	3	3
4	2	2	4,1	4,1	1	4	3	3	4	4
5	1,5	2,5	4	4	4	3	2	3	3	3
6	2	2	3	3	1,3	3,5	2,1	3,3	3,5	3,5
7	3,1	2,2	3,5	3,5	1,5	2,3	3	2	3	3
8	4,1	2,1	4	4	2	2	2	3,3	4,1	4,1
9	3,3	2,2	1	1	3	3,1	3	2,1	4	4
10	3,3	3	2,5	2,5	2,5	2	3,3	2,3	3,5	3,5
11	4	3,1	2	2	1	1,5	1	1,3	2,9	2,9
12	3	4,1	1	1	1,5	3	1,5	3,5	4	4
13	4,2	3,1	3,5	3,5	1,6	2	3,1	3	3	3
14	3	2,9	3	3	2,3	4,1	1,7	1,5	3,3	3,3
15	3,3	2,9	3,1	3,1	3,1	3	1,5	1	3,3	3,3
16	3,4	3	3	3	2,9	3,1	3	4	1	1,5
17	4	3,9	2,9	2,9	3,3	2,9	3	4,1	2,9	3,3
18	3	3,1	4,1	4,1	2,7	3,1	2,9	3,2	3,8	4,2
19	3,3	2,9	2,7	2,7	2,9	3	3,1	3,5	3,5	4
20	3,7	3	2,6	2,6	3	3,3	2,7	3,5	3,4	3,5

Tabela 30. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Oxyfluorfen+ extrato.

	G+E 1		G+E2		G+E3		G+E4		G+E5	
	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA	RAIZ	RADICULA
1	3	0,5	3,25	3,5	5,5	5	0,5		4	5,1
2	3	3	3	5	4	4	3	3	3	5,2
3	4	2	5	2,5	4,5	4,5	3,5	3,5	5	4,6
4	3	4,3	3	3,5	5	5,5	3,5	3,25	3,5	5,5
5	3	3,3	3,3	4	5,6	3	3	3	3,5	3,5
6	3	5	3,5	1	5	5	4,3	3,5	4,2	3
7	3,5	4,6	4,1	4,5	4,5	3,3	2	4	4,3	3,5
8	2,5	5	3,6	4,2	4,6	2,5	2,5	4,1	4	3,8
9	3	3,5	3	3,5	4,5	1	2,6	3,5	5,2	2,7
10	3	3,5	2,6	3,6	4,2	1,5	0,5	3,8	3,6	3,5
11	2,5	3,5	2,8	5	4	2	2,5	3,3	3	3,5
12	3,5	5,3	3	3,6	3,8	6	3	3,5	3,2	3
13	4	4	3,5	2,8	3,5	2,3	3,3	4,5	3,3	2,9
14	3,5	4	3,5	3	4	2,9	3,5	3	2,9	4,1
15	3,6	5,5	4	3,3	4,2	3	4,1	3,5	3,5	5
16	3,5	4,3	3	3,5	3	3,5	4	3,5	3,6	5,1
17	4,1	2,5	3	3,6	3,5	4,1	3,5	3,9	4,2	4,9
18	2,5	3,5	3,1	3,1	3,5	4,2	3,2	4	4,5	5,2
19	3	3,5	3,2	3	3	3,5	3	4,1	3,3	4,6
20	3,5	2,5	3	3	3,2	3,5	2,9	4,2	3,5	3,5

Tabela 31. Comprimento de raiz e radícula de teste de germinação em solo no grupo Oxyfluorfen.

	GOAL 1		GOAL 2		GOAL 3		GOAL 4		GOAL 5	
	RAIZ	RADICULA								
1	2	3	0,5	3	2,3	3,2	1,5	1	2	3
2	2,1	2,9	1,7	2	3,2	3	2	2	1	2,5
3	2,3	2,5	2,8	2,9	3	3,3	3,2	2,1	1,3	3,8
4	1,5	2,5	2	3	2,5	3	3	2	2	2,1
5	2	2,6	3	2,5	2	3	2,5	1,9	2,5	2
6	2,6	3,1	1,5	3	2,1	3	2,1	2,5	2,8	3
7	2,8	2,3	1,6	3,5	2,3	3,2	3	1,9	1,9	3,1
8	2	2,3	1	2,5	2,6	3,1	2,9	2	2	2,5
9	3	2,5	1	2,6	2	1,9	3,1	2	2	3,6
10	2,5	2	2	2	2,5	2,3	1,8	3,1	3	2,4
11	2,4	2	2,3	3,1	2,3	2,3	2,2	3	3,1	3
12	2	2,1	2	3,4	2,6	3	1,9	3,4	2,8	2,3
13	2,1	2,4	1,8	2	2	2,1	3,1	3,2	2,9	2,1
14	2,2	1,9	2,6	3	2	2	2	3,5	1,9	2,3
15	2	2	3,1	3,2	3,1	2	2,3	3	2	2,5
16	2	2	2,9	3	3	3,2	1,9	3	2,1	2,6
17	2,3	2,3	2	2,8	3,2	2,6	1,8	2,1	2,8	2
18	2	2,5	2,5	2	3	2	3	2	2,33	3,2
19	2	2,3	2,4	3,1	3,1	2,1	2,5	3,2	2,5	3
20	2,3	2,6	2	2,5	2,5	2	2	3,1	2	2,1

Figura 70. Análises estatísticas.

Normality Test (Shapiro-Wilk)

sexta-feira, maio 27, 2022, 13:11:12

Data source: Data 1 in Notebook1

FLUMYZIN: W-Statistic = 0,901 P = 0,415 Passed
 EXTRATO: W-Statistic = 0,816 P = 0,109 Passed
 CONTROLE: W-Statistic = 0,891 P = 0,361 Passed
 G+E: W-Statistic = 0,938 P = 0,655 Passed
 F+E: W-Statistic = 0,875 P = 0,288 Passed

test that fails indicates that the data varies significantly from the pattern expected if the data was drawn from a population with a normal distribution.

test that passes indicates that the data matches the pattern expected if the data was drawn from a population with a normal distribution.

CONTROLE	5	0	3,203	0,303	0,130
G+E	5	0	3,784	0,499	0,223
F+E	5	0	0,947	0,316	0,141

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	4	36,636	9,159	77,511	<0,001
Residual	20	2,363	0,118		
Total	24	38,999			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):

Overall significance level = 0,05

Comparisons for factor:

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
G+E vs. FLUMYZIN	3,083	14,181	<0,001	0,005	Yes
G+E vs. F+E	2,837	13,049	<0,001	0,006	Yes
CONTROLE vs. FLUMYZIN	2,502	11,508	<0,001	0,006	Yes
CONTROLE vs. F+E	2,256	10,377	<0,001	0,007	Yes
G+E vs. EXTRATO	1,576	7,249	<0,001	0,009	Yes
EXTRATO vs. FLUMYZIN	1,507	6,932	<0,001	0,010	Yes
EXTRATO vs. F+E	1,261	5,800	<0,001	0,013	Yes
CONTROLE vs. EXTRATO	0,995	4,577	<0,001	0,017	Yes
G+E vs. CONTROLE	0,581	2,672	0,015	0,025	Yes
F+E vs. FLUMYZIN	0,246	1,132	0,271	0,050	No

9.8 Dados do ensaio de *Eisenia fétida*

Tabela 32. Peso Inicial e final no ensaio de Teste de contato

Peso inicial					
Extrato	F+E	Flumioxazina	O+E	Oxyfluorfem	Controle
0,74	0,65	0,55	0,92	0,46	0,68
0,8	0,45	0,56	0,87	0,6	0,83
0,66	0,95	0,37	0,69	0,63	0,7
0,87	0,86	0,68	0,57	0,46	0,64
0,7	0,69	0,93	0,71	0,51	0,38
Peso Final					
Extrato	F+E	Flumioxazina	O+E	Oxyfluorfem	Controle
0,53	0,59	0,42	0,69	0,43	0,54
0,77	0,43	0,53	0,68	0,33	0,45
0,63	0,79	0,3	0,49	0,34	0,57
0,73	0,72	0,49	0,44	0,4	0,26
0,65	0,62	0,86	0,44	0,23	0,38