

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**ECOTOXICOLOGIA DE RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA DO
TABACO EM OLIGOQUETAS**

Guilherme Karsten Schirmer
(Tese de Doutorado)

Porto Alegre (RS) Brasil
Setembro de 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

**ECOTOXICOLOGIA DE RESÍDUO DA AGROINDÚSTRIA
DO TABACO EM OLIGOQUETAS**

GUILHERME KARSTEN SCHIRMER
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
M. Sc. em Ciência do Solo (UFSM)

Tese apresentada como
um dos requisitos à obtenção do
Grau de Doutor em Ciência do solo

Porto Alegre (RS) Brasil

Setembro de 2014

Guilherme Karsten Schirmer
Engenheiro Agrônomo (UFSM)
Mestre em Ciência do Solo (UFSM)

TESE

Submetida como parte dos requisitos

Pra obtenção do grau de

DOUTOR EM CIÊNCIA DO SOLO

Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo

Faculdade de Agronomia

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em:
Pela Banca Examinadora

Homologado em:
por

FLÁVIO A. de OLIVEIRA CAMARGO
Professor Orientador
PPG-Ciência do Solo

ARBERTO V. INDA JR
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo

ENILSON L. SACCOL de SÁ
PPG-Ciência do Solo

PEDRO ALBERTO SELBACH
Departamento de Solo/UFRGS

PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

ROBSON ANDREAZZA
Centro de Engenharias/UFPeI

Dedico em especial à Elisete e Anália,
minha mãe e avó, sem este suporte
não chegaria a lugar algum.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

Aos meus pais Vilmar e Elisete e ao meu irmão Filipe pelo apoio e confiança depositada em mim.

A toda a minha família pelo incentivo, em especial a minha avó materna pela ajuda sempre que necessário.

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela oportunidade da realização do curso.

Ao meu orientador Flávio Camargo por sua orientação, paciência, compreensão e pelas inúmeras oportunidades oferecidas.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo.

À Universal Leaf e produtores rurais que me permitiram fazer as coletas de solo e resíduo para a realização deste trabalho.

ECOTOXICOLOGIA DE RESÍDUOS DA AGROINDÚSTRIA DO TABACO EM OLIGOQUETAS¹

Autor: Guilherme Karsten Schirmer

Orientador: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

RESUMO:

A indústria do tabaco gera resíduos que podem ser dispostos no solo desde que não cause impacto ao meio biótico e abiótico e que tenha potencial agrônomico comprovado. O impacto a biota do solo pode ser avaliado por meio de indicadores e/ou testes ecotoxicológicos aplicados a toda a biota ou a grupos específicos com maior sensibilidade ao resíduo. Deste modo, o objetivo do trabalho foi avaliar em oligoquetas (minhocas) a toxicidade do resíduo sólido da indústria do tabaco aplicado no solo. Primeiramente foi analisada a fuga ou atração das minhocas, quando submetidas à presença do resíduo, com e sem contato direto. Posteriormente foram avaliados os efeitos do resíduo na mortalidade, crescimento e reprodução das minhocas em solo natural, substrato artificial e solos com histórico de uso do resíduo, assim como, em ambiente de vermicompostagem. Também foi observado o desempenho adaptativo dos oligoquetas crescidos em solo e esterco bovino com adições graduais do resíduo agroindustrial. Os resultados indicaram que a presença do resíduo fumageiro sem contato direto com as minhocas não causou repelência aos organismos. Fugas em contato direto com o resíduo foram mais evidentes em ambientes de substrato artificial, com índices de fuga para todas as doses aplicadas. Não houveram mortes significativas em qualquer dose aplicada em solo natural. Minhocas crescidas em esterco bovino misturado ao resíduo tiveram sua sobrevivência comprometida apenas nas doses mais elevadas. Todas as minhocas crescendo nos solos ou substrato artificial com resíduo aumentaram a biomassa quando comparado ao tratamento controle. Quando o ambiente simulava a vermicompostagem, a mistura com resíduo fumageiro mostrou-se deletéria para o ganho de peso. O número de jovens sobreviventes foi mais afetado pelo resíduo. A biomassa por minhoca crescida em quantidades crescentes de resíduo não foi diferente da encontrada em minhocas que receberam tratamento sem parcelamento das doses. Indivíduos submetidos a doses e concentrações crescentes de resíduo fumageiro em ambos os substratos foram significativamente mais capazes de sobreviver. Minhocas sob processo de adaptação não geraram jovens mais resistentes a presença do resíduo. Conclui-se que uso do resíduo sólido fumageiro afetou as minhocas, principalmente indivíduos jovens e apenas quando utilizado em quantidades acima da liberada pelo órgão regulador.

1/ tese de Doutorado em Ciência do Solo. Programa de Pós-Graduação em Ciência do solo, Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (82 p.) Setembro, 2014. Trabalho realizado com apoio da CAPES.

ECOTOXICOLOGY OF AGROINDUSTRY TOBACCO WASTE IN OLIGOCHAETE¹

Author: Guilherme Karsten Schirmer

Advisor: Prof. Flávio Anastácio de Oliveira Camargo

SUMMARY:

The tobacco industry generates waste that can be disposed in the soil since it does not impact the biotic and abiotic environment and has proven agronomic potential. The impact of soil biota can be assessed through indicators and/or ecotoxicological tests applied at the biota or specific groups with greater sensitivity to the residue. Thus, the aim of the study was to evaluate in oligochaetes (earthworms) solid residue toxicity from the tobacco industry to the soil. First we analyzed the escape or attraction of earthworms, when subjected to the presence of the residue with and without direct contact. Subsequently evaluated the effects of residue on mortality, growth and reproduction of earthworms in natural soil and artificial substrate with a history soil of use of waste as well as in vermicomposting environment. Adaptive performance of oligochaetes grown in soil and manure with gradual additions of agroindustrial residue was also observed. The results indicated that the presence of the tobacco residue without direct contact with the worms did not cause repellency of organisms. Avoidance in direct contact with the residue were more evident in the artificial substrate environments, with rates of escape for all doses applied. There were no deaths at any dose applied in natural soil. Worms grown in manure mixed with residue had compromised their survival only in high doses. All worms growing on soils or artificial substrate with residue increased biomass compared to the control treatment. When the simulated vermicomposting environment, the mixture with the tobacco residue was shown to be deleterious to weight gain. The number of young survivors was most affected by the residue. The worm biomass grown in increasing amounts of waste was not different from that found in earthworms were treated without installment doses. Individuals undergoing increasing doses and concentrations of the tobacco residue in both substrates were significantly better able to survive. Earthworms in the adaptation process did not generate young tougher the presence of residue. We conclude that use of solid waste affect the tobacco worms, mostly young individuals, and only when used in amounts above released by the regulator.

¹/ Doctoral thesis in Soil Science. Programa de Pós-Graduação em Ciência do solo, Faculdade de agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. (82 p.) September, 2014. Work performed with financial support from CAPES.

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1 Resíduos da agroindústria do fumo no sul do Brasil	4
2.2 Reaproveitamento de resíduos agroindustriais do processamento do fumo.....	6
2.3 Organismos como indicadores de alterações na qualidade do solo pelo uso de resíduos	9
2.4 Ensaio ecotoxicológicos.....	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1 Coleta dos solos.....	17
3.2 Resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT).....	18
3.3 Coleta do esterco bovino.....	18
3.4 Preparo do substrato artificial.....	19
3.5 Organismos teste	19
3.6 Teste de atratividade e repelência	20
3.6.1 Unidades experimentais	20
3.6.2 Avaliações	22
3.7 Teste de fuga	22
3.7.1 Unidades experimentais	22
3.7.2 Avaliações	23
3.8 Teste de mortalidade e reprodução	24
3.8.1 Unidades experimentais	24
3.8.2 Avaliações	26
3.9 Teste de adaptação e viabilidade de casulos	26
3.9.1 Unidades experimentais	28
3.9.2 Avaliações	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 Teste de atratividade e repelência	30
4.2 Teste de fuga	34
4.3 Teste de mortalidade e reprodução	38

4.4	Teste adaptação e viabilidade de casulos.....	54
5	CONCLUSÕES	67
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

RELAÇÃO DE TABELAS

Página

TABELA 1.	Exigências frequentemente requisitadas pelo órgão fiscalizador (FEPAM) para liberação/monitoramento da aplicação de resíduos sólidos agroindustriais no solo no estado do Rio Grande do Sul.....	8
TABELA 2.	Propriedades físico-químicas dos solos utilizados nos experimentos.....	18
TABELA 3.	Organização dos experimentos de adaptação (avaliações a cada 30 dias).	27
TABELA 4.	Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em Solo Natural (SN), segundo análise com Teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).....	35
TABELA 5.	Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em Substrato artificial Tropical (SAT), segundo análise com teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).....	35
TABELA 6.	Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em Solo com histórico de uso do resíduo (SH), segundo análise com teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).....	36
TABELA 7.	Indicadores avaliados para minhocas da espécie <i>E. andrei</i> crescidas em solo natural, substrato artificial, solo com histórico e esterco bovino, nos testes de mortalidade e reprodução.....	39
TABELA 8.	Valores de pH dos substratos utilizados no experimento de mortalidade e reprodução, medidos em cada etapa de avaliação.....	43
TABELA 9.	Mortalidades durante teste de efeito crônico do RSAT em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em substrato artificial sob condições controladas.....	48
TABELA 10.	Mortalidades durante teste de efeito crônico do (RSAT) em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em solo natural sob condições controladas.....	49
TABELA 11.	Mortalidades durante teste de efeito crônico do (RSAT) em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em solo com histórico sob condições controladas.....	50
TABELA 12.	Mortalidades durante teste de efeito crônico do (RSAT) em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em esterco sob condições controladas.....	52
TABELA 13.	Percentual de mortes de minhocas da espécie <i>E. andrei</i> , crescidas em solo. Valores correspondem ao número de organismos que iniciaram o período imediatamente anterior (a cada 30 dias).....	55
TABELA 14.	Percentual de mortes de minhocas da espécie <i>E. andrei</i> ,	

	crescidas em esterco bovino. Valores correspondem ao número de organismos que iniciaram o período imediatamente anterior (a cada 30 dias).....	62
TABELA 15.	Índice biométrico de ganho ou perda de peso para minhocas da espécie <i>E. andrei</i> crescidas em ambiente com presença de RSAT.....	65

RELAÇÃO DE FIGURAS

Página

FIGURA 1.	Efeito de diversas práticas de manejo adotadas em agroecossistemas na população de organismos do solo. A posição das práticas no eixo y representa sua contribuição relativa (importância hipotética) ao aumento ou à diminuição das populações e diversidade de organismos (modificado de Brown e Domínguez, 2010).....	16
FIGURA 2.	Olfatômetros de múltipla escolha adaptados para o teste comportamental.....	21
FIGURA 3.	Unidades experimentais para os testes de fuga.....	23
FIGURA 4.	Unidades experimentais utilizadas nos testes de mortalidade e reprodução.....	25
FIGURA 5.	Unidades experimentais para o teste de adaptação.....	28
FIGURA 6.	Percentual de minhocas <i>E. andrei</i> encontrados em cada braço do olfatômetro de múltipla escolha. (A) Atratividade; (B) Controle duplo; (C) Repelência. Concentrações de 5 a 100% referentes aos extratos de RSAT. Para cada figura, barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.....	31
FIGURA 7.	Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca ⁻¹ , durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em substrato artificial, sob condições controladas.....	48
FIGURA 8.	Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca ⁻¹ , durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em solo natural, sob condições controladas.....	49
FIGURA 9.	Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca ⁻¹ , durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em solo com histórico de uso do resíduo, sob condições controladas.....	50
FIGURA 10.	Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca ⁻¹ , durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie <i>E. andrei</i> em esterco bovino, sob condições controladas.....	52
FIGURA 11.	Biomassa.minhocas ⁻¹ sobreviventes (a cada 30 dias) crescidas em solo. (*) Diferença estatística para cada dose, (P < 0,05) pelo teste de Tukey. RSAT (Resíduo sólido da agroindústria do tabaco).....	55
FIGURA 12.	Biomassa.minhocas ⁻¹ sobrevivente (a cada 30 dias). Não significativo para cada concentração, (P < 0,05) pelo teste de Tukey. RSAT (Resíduo sólido da agroindústria do tabaco).....	61
FIGURA 13.	Indivíduos nascidos de casulos após 28 dias de incubação em solo, sob condições ambientais controladas. Área rachurada representa faixa potencial de nascimentos/casulo	

	(Dominguez e Edwards, 2011). (*) Diferença estatística para cada dose, (P < 0,05) pelo teste de Scott-Knott.....	64
FIGURA 14.	Indivíduos nascidos de casulos após 28 dias de incubação em esterco bovino, sob condições ambientais controladas. Área rachurada representa faixa potencial de nascimentos/casulo (Dominguez e Edwards, 2011). (*) Diferença estatística para cada concentração, (P < 0,05) pelo teste de Scott-Knott.....	65

1 INTRODUÇÃO

A disposição de resíduos agroindustriais pode causar impactos negativos ao ambiente e aos seus constituintes. Este problema tende a se agravar quando esta aplicação não é feita adequadamente em função das condições locais e da biota presente no meio. Grande parte destes resíduos é de natureza orgânica e o descarte no solo pode ser uma alternativa, desde que a disposição seja tecnicamente avaliada, comprovada a sua eficiência agronômica e os efeitos benéficos para os organismos do solo. Estes materiais orgânicos podem atuar como condicionadores físicos e biológicos do solo e como fonte de nutrientes em áreas degradadas e/ou para a produção vegetal. Poderão ainda ser reciclados ou ter seus possíveis efeitos negativos atenuados pelo tratamento com a compostagem e vermicompostagem, agregando valor ao material e melhorando sua estabilidade química, física e biológica.

A fumicultura é uma atividade agrícola de grande importância para o estado do Rio Grande do Sul, pois além de destacar-se como o principal produtor nacional, apresenta também o maior complexo de processamento de tabaco do mundo. Durante as etapas de industrialização do tabaco, ocorre a geração de subprodutos do processamento das folhas, resíduos sólidos, com potencial reciclagem no sistema que pode ser utilizado como um adubo orgânico. Contudo, para que o material possa ser aproveitado como composto orgânico em áreas agrosilvipastoris, este deve ser avaliado, além da sua eficiência agronômica, também o seu potencial impacto no ecossistema. Para isso, se faz necessário um monitoramento relacionado a possíveis

contaminações do solo e da água por poluentes orgânicos e inorgânicos, que possam desencadear a perda da capacidade produtiva do solo devido à utilização inadequada e intensiva destes resíduos.

Embora o monitoramento exista, muitas vezes é realizado de forma pontual, sem levar em consideração alterações ao longo de períodos maiores que um ano agrícola. Somado a isso, fazem uso apenas indicadores físico-químicos do solo, deixando de lado a parte viva deste meio. A importância de um monitoramento durante mais de um ciclo de exploração agrossilvipastoril, que possibilite a obtenção de dados que revelem modificações em uma área sujeita a aplicação de determinados resíduos orgânicos é de fundamental importância, pois permite uma maior confiabilidade nos resultados encontrados. Além disso, é de grande relevância a avaliação de indicadores biológicos do solo, pois detectam mais rapidamente e de forma mais sensível alterações ambientais pontuais ou de longo prazo.

Existem inúmeros indicadores biológicos, desde os bacterianos até os componentes da macrofauna, como as minhocas que são amplamente utilizadas em testes ecotoxicológicos para avaliação de produtos e resíduos descartados no solo. Adiciona-se a estes indicadores, a caracterização das propriedades físico-químicas do solo e a possibilidade de estabelecer relações quali-quantitativas quanto à utilização destes resíduos, definindo os possíveis níveis críticos para o uso destes materiais, permitindo uma maior segurança para o seu emprego em áreas agriculturáveis.

Os resultados dos testes toxicológicos podem detectar os danos do uso deste sub-produto no solo e na vermicompostagem, considerando que o resíduo sólido da agroindústria do tabaco como composto orgânico modifica o comportamento de minhocas da espécie *Eisenia andrei* no solo. Assim como, que determinadas concentrações do resíduo acarretam em quedas nos parâmetros de reprodução e desenvolvimento destes organismos no solo e em ambiente de vermicompostagem. Ou ainda, que minhocas com histórico de contato direto com este composto, possuem maior resistência a eventuais danos em parâmetros de produção do que minhocas livres deste contato.

Deste modo, os objetivos deste trabalho foram: a) Avaliar o grau de rejeição e/ou atratividade de minhocas da espécie *Eisenia andrei* quando submetidas a presença, sem contato, do resíduo da agroindústria do tabaco em

concentrações crescentes; b) Determinar o percentual de fuga das minhocas da espécie *Eisenia andrei* quando em contato com doses crescentes do resíduo de processamento do tabaco; c) Averiguar o desenvolvimento e reprodução das minhocas da espécie *Eisenia andrei* em solos e ambiente de vermicompostagem na presença de resíduo da agroindústria do tabaco; d) Verificar a possibilidade adaptação e tolerância gradual das minhocas da espécie *Eisenia andrei* em solos e ambiente de vermicompostagem, quando submetidas a presença do resíduo de processamento do tabaco.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Resíduos da agroindústria do fumo no sul do Brasil

Nas unidades federativas da região sul do Brasil existem inúmeras indústrias voltadas para o setor agrário. Entre outras tantas, é possível citar com ampla participação as especializadas no processamento de alimentos como mel, carne, grãos e leite, obtenção de celulose e a indústrias de bebidas (IBGE, 2013). Outra agroindústria, de grande relevância nos estados sulinos, é a voltada para processamento de produtos do tabaco. A importância sócio-econômica do tabaco para a região Sul do Brasil é indiscutível. Presente em 640 municípios do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, o tabaco é cultivado em 332 mil hectares, por 160 mil produtores integrados. Estima-se que a produção de tabaco no sul do Brasil seja de aproximadamente 706 mil toneladas, 97,4% do total no país (AFUBRA, 2013). Além disso, o complexo agroindustrial de tabaco do sul do Brasil, o maior do mundo, é responsável por uma movimentação financeira que supera os R\$ 10 bilhões/ano, considerando as diversas etapas do processo produtivo e comercial, gerando mais de 30 mil empregos diretos (SINDITABACO, 2013).

Em função destes valores de produção e beneficiamento pode-se deduzir que grandes quantidades de resíduos são produzidas durante o processamento desta matéria-prima até chegar ao produto comercial. Estima-se que os resíduos do processamento das folhas de fumo nas indústrias cheguem a 4% do total produzido, aproximadamente 29 mil toneladas por ano

(KBH & C, 2004). Esta produção ocorre durante o beneficiamento das folhas, que passam basicamente pelas etapas de desponete, classificação da qualidade das folhas, reumidificação e a debulha, que separa os talos das lâminas das folhas, sendo esta a fase de maior geração de resíduos, pois o processo de debulha precisa ser repetido sucessivas vezes para que se obtenha satisfatória separação (Lauschner, 2005).

Os resíduos são constituídos basicamente de talos (5% do total gerado), que são produtos menos nobres, com baixo valor comercial, pó (95% do total gerado), obtido da exaustão e tamização, que ocorre durante todo processo produtivo de cigarros rejeitados ao final do beneficiamento. Durante a varrição das instalações partículas de argila e areia também se unem ao resíduo originado na agroindústria do tabaco. De acordo com Tedesco et al. (2011) a geração destes resíduos depende principalmente da qualidade das folhas, por exemplo, a posição destas nas plantas. O tipo de variedade pode induzir a maiores quantidades finais de resíduos, como no processamento de Virginia Flue Curado (VFC) e variedades de tabaco Burley. Além disso, conforme os mesmos autores, o nível de eficiência da unidade de processamento industrial também exerce forte influencia na produção de residuais.

Até o ano de 1982, segundo a Portaria nº 016, do Ministério da Agricultura, para classificação de resíduos gerados no processamento de tabaco, o pó de fumo recebia uma denominação como sendo “constituído dos resíduos finais provenientes da destala mecânica e que compreende o pó e resíduos de tamanho ínfimo, estes últimos não enquadráveis em SC”, (SC = fragmentos de folhas sem talo, de tamanho não superior a 10 (dez) milímetros quadrados). Entretanto, a partir de 13 de abril de 2007 a legislação foi alterada. Nesta última regimentação de identidade, qualidade, embalagem, marcação e apresentação do tabaco em folha curado, definida pela Instrução Normativa nº 10, não mais aparece a definição de pó de fumo. São considerados resíduos apenas o “SC” fragmentos de lâminas maiores que 1,56 cm², isentos de talos e “ST” constituído de fragmentos de talos com mais de 4 cm de comprimento.

Devido ao maior volume produzido, neste trabalho foi utilizado nos testes o resíduo em pó, enquadrado consoante a ABNT NBR 10.004 (2004)

como um Resíduo Sólido Industrial (RSI) Classe II – não inerte, e aqui referido como Resíduo Sólido da Agroindústria do Tabaco (RSAT).

2.2 Reaproveitamento de resíduos agroindustriais do processamento do fumo

A técnica de reaproveitamento de resíduos provenientes de agroindustrias já vem sendo implantada em vários setores nos seus resíduos característicos (Casagrande et al., 2008; Pelizer et al., 2007; Coelho et al., 2001; Schievano et al, 2009; Pandey et al.,2000; Kawabata, 2008). O emprego em sistemas agrosilvipastoris, se apresenta como uma alternativa viável, sendo o resíduo descartado no solo (Tasso Júnior et at., 2007; Bebé et al., 2009; De Moraes et al., 2012). Isso ocorre pela capacidade cicladora do solo, oriunda da vasta diversidade de espécies microbianas e vias metabólicas (Nahas, 1993). Alguns trabalhos inclusive apontam os eventuais impactos do descarte de resíduos no solo, indicando recomendações de medidas mitigatórias frente ao seu uso (Tedesco et al., 2008).

Outra possibilidade para estes materiais é a biotransformação controlada, através das técnicas de compostagem ou vermicompostagem, que permitem obter ao final do processo um composto mais estável e seguro para o descarte final (Sharma et al., 1997; Butt, 1993; Kaushik e Garg, 2003). Na sua maioria, os resíduos com potencial uso na agricultura são de origem agroindustrial. Esses podem ser oriundos do processamento de produtos de origem animal e vegetal (Rosa et al., 2011), com materiais diversos como alimentos, fibras, couro, madeira, produção de açúcar, álcool e o próprio fumo. A aptidão agrícola dos resíduos gerados em agroindústrias, sejam eles líquidos ou sólidos, é geralmente aproveitada pelas plantas e organismos em função da sua quantidade de material orgânico e de nutrientes (Primo et al., 2010), podendo também atuarem como condicionadores, contribuindo para melhoria de suas características físicas e biológicas (Raij,1991).

Os resíduos sólidos são constituídos pelas sobras de processo, descartes proveniente de embalagens, lodo de sistemas de tratamento de águas residuárias, além de resíduo gerado no refeitório, pátio e escritório da agroindústria (Matos, 2005). Os efluentes resultantes da lavagem do produto,

escaldamento, cozimento, pasteurização, resfriamento e lavagem do equipamento de processamento e das instalações. O emprego destes compostos na atividade agrônômica depende, sobretudo, da sua qualidade, que além do conteúdo de matéria orgânica, leva em consideração sua maturidade, a concentração dos nutrientes e a presença ou ausência de substâncias potencialmente perigosas e indesejáveis ao ambiente agrário (Zucconi et al., 1981; Bertoldi e Griselli, 1992).

Em relação aos resíduos sólidos da indústria do tabaco, determinados estudos já abordam algumas formas de aproveitamento, tais como combustível para obtenção de energia térmica em caldeiras, adição em massa cerâmica, para a atividade da lipase de *Aspergillus niger* em fermentação em fase sólida, objetivando a produção de biodiesel e obtenção de compostos aromáticos (Coelho, 2009; Winck, 2011; Teixeira, 2012; Lopes, 2010). Outros trabalhos focam no uso agrícola destes resíduos, mas, ainda assim poucos exploraram essa alternativa (Fenilli et al., 2010; Primo et al., 2010; Tedesco et al., 2011).

Desde que os resíduos de atividades agroindustriais deixaram de ser exclusivamente fonte de nutrientes e passaram a condição de fontes potenciais de poluição ambiental (Tedesco et al., 2008), faz-se uso de um monitoramento baseado em critérios como taxa de mineralização e/ou solubilização de seus elementos (Alexander, 1994; Sparks, 1995). Legalmente, a permissão para uso destes resíduos segue as condições estabelecidas pela Fundação Estadual de Proteção Ambiental (FEPAM), através do Decreto Estadual 38.356/98, que dispõe sobre a gestão de resíduos sólidos no estado do Rio Grande do Sul. Estes sólidos devem ter seu uso licenciado pelo órgão, com frequente monitoramento da área, efetuado por responsável técnico. Para obtenção da licença a empresa deve fornecer uma série de informações, como a tipologia da empresa, insumos e matérias primas utilizadas, fluxogramas do processo, onde se apresentam dados de pontos de geração, volumes e locais de armazenamento dos resíduos, assim como os eventuais sistemas de tratamento. Além destes, solicita-se a caracterização químico-física do resíduo e do solo existente na área a ser licenciada, juntamente com uma descrição deste local (Tabela 1).

A empresa Universal Leaf Tabacos Ltda. possui uma licença de operação (Nº 5805/2009 DL), que norteia o emprego deste sub-produto. Esta licença aborda aspectos como: as quantidades e frequências de aplicação por área (10 Mg/ha/ano, onde a área que recebeu a aplicação em um ano não poderá receber no ano seguinte), e quais culturas podem receber o resíduo, dentre elas as pastagens de inverno e verão, milho, fumo e mais recentemente a soja. Para se efetuar o monitoramento destas áreas, as exigências solicitadas são as mesmas da licença, utilizando apenas os indicadores físicos e químicos como referência. A necessidade de testar indicadores biológicos justifica-se pelo envolvimento dos organismos do solo na transformação de compostos orgânicos, na ciclagem de nutrientes e na eliminação/atenuação de contaminantes.

TABELA 1. Exigências frequentemente requisitadas pelo órgão fiscalizador (FEPAM) para liberação/monitoramento da aplicação de resíduos sólidos agroindustriais no solo no estado do Rio Grande do Sul.

Determinações físico-químicas do solo	Informações da área
pH em H ₂ O	<p>Dados da propriedade</p> <ul style="list-style-type: none"> • Cópia do registro • Termo de cessão de área <p>Localização e topografia</p> <ul style="list-style-type: none"> • Mapas de acesso • Tamanho da área • Limites de bacias hidrográficas • Área efetiva de aplicação • Coordenadas e declividades • Vegetação e uso da área • Profundidade do lençol freático <p>Dados climáticos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Precipitação média
Nitrogênio total	
Fósforo total	
Potássio total	
Magnésio e Cálcio total	
Enxofre total	
Cobre total	
Zinco total	
Ferro total	
Manganês total	
Sódio total	
Condutividade elétrica	
Granulometria	
Necessidade de calagem	
Matéria orgânica	

2.3 Organismos como indicadores de alterações na qualidade do solo pelo uso de resíduos

Os solos têm propriedades distintas para receber o descarte dos mais diversos tipos de resíduos (Pedron et al., 2004) e esta condição depende das características físicas, químicas e biológicas do sistema (Vezzani et al., 2008). A combinação destas propriedades entre si e com os outros compartimentos do ecossistema confere ao solo uma maior ou menor capacidade em desativar e estabilizar os resíduos (Nobile, 2009). A qualidade do solo pode sofrer alterações quando do descarte de resíduos, podendo ser benéfico ou prejudicial, dependendo do tipo, das quantidades e frequências de aplicação do material (Tedesco et al., 2008).

Se as premissas forem atendidas, a adição no solo de resíduos de natureza predominantemente orgânica traz benefícios para a fertilidade do solo, como o fornecimento de nutrientes para as culturas, a partir da mineralização, o aumento da capacidade de troca de cátions (CTC) do solo e da superfície específica do solo. Além disso, pode ocorrer a complexação de substâncias tóxicas, onde a matéria orgânica em estágios avançados de decomposição tem a habilidade de controlar a toxidez causada por certos elementos presentes no solo em teores acima do normal (Bayer e Mielniczuk, 2008). A adição de material orgânico favorece também as condições físicas, melhorando a sua estrutura, aumentando a estabilidade de agregados. Esse efeito agregador desencadeia benefícios nas outras características físicas do solo, como a densidade do solo, porosidade do solo, capacidade de retenção e infiltração de água (Guerra, 1990). Somando a isso, temos a parte viva do solo, onde organismos representando diferentes filos e funções dentro do sistema desempenham papéis fundamentais neste ambiente (Swift et al., 2010).

As melhorias para a comunidade biótica do solo estão ligadas à matéria orgânica, muitas vezes oriunda de resíduos orgânicos de agroindústrias. Esses materiais orgânicos, na forma de rejeitos de processos industriais servem como fonte de carbono e energia para micro-organismos decompositores, que os utilizam como substrato e são responsáveis pela decomposição e mineralização desse (Silveira, 2007). Além disso, podem aumentar a população de organismos benéficos para a manutenção da vida no

solo (Alcântara e Madeira, 2008). Para mensurar impactos no solo devido a descarte de resíduos é possível fazer uso de indicadores microbiológicos do solo, relacionando estes a sua qualidade (Mendes et al., 2003; Matsuoka et al., 2006).

São comuns os usos de medidas da biomassa microbiana, que representa até 5% da fração orgânica em um solo (Jenkinson e Ladd, 1981), contendo desde micro-organismos unicelulares, como as bactérias, até membros da microfauna. Trabalhos fazem uso desta medida, avaliando o efeito de diversas atividades antrópicas, como o uso de insumos (Delbem et al., 2012; Masto et al., 2006), o efeito das práticas de cultivo e manejo (Silva, et al., 2010; Benintende et al., 2008), contaminação com elementos tóxicos (Andrade e Silveira, 2004; Frey et al., 2006) aplicação de defensivos agrícolas (Reis et al., 2009; Perucci et al., 2000), e descarte de resíduos agroindustriais (Gonçalves, 2011; Nakatani, 2010).

Porém, como apenas de 15 a 30% da população microbiana é catabolicamente ativa no solo, apenas o dado de biomassa não é suficiente para avaliar alguma alteração no solo (MacDonald, 1986). A atividade microbiana é baseada na presença de células microbianas intactas e funcionais, que refletem o seu estado fisiológico. Afora sua importância na ciclagem de nutrientes, estes também podem degradar substâncias tóxicas muitas vezes presentes nos resíduos descartados no solo (Costa et al., 2001). Alguns trabalhos relacionam a implicação de impactos no solo sobre atividade dos micro-organismos, do manejo (Nolla et al., 2010; Lisboa et al., 2012), como o resultado do uso intensivo do solo (Zhang et al., 2006), da contaminação por substâncias orgânicas e inorgânicas (Riffaldi et al., 2006; Tischer et al., 2008).

De acordo com Silveira (2011), os micro-organismos apresentam expressiva diversidade genética, desempenhando funções específicas e importantes na manutenção de ecossistemas, como componentes fundamentais de cadeias alimentares e ciclos biogeoquímicos. Características ligadas a esta condição estão ligadas a habilidade de adaptação a distúrbios causados no sistema solo, que por esta razão podem indicar o *status quo* de qualidade da área avaliada. Para obtenção destes dados, grande parte dos trabalhos usa como estratégias de estudo técnicas moleculares, que permitem avaliar a diversidade e a estrutura das comunidades microbianas no solo.

Embora os atributos microbiológicos sejam de grande utilidade, segundo Anderson (2003), o conhecimento de aspectos macrobiológicos não deve ser negligenciado. As transformações dos detritos vegetais e animais no solo são processos biológicos fundamentais para o ecossistema, onde o carbono é reciclado para a atmosfera como dióxido de carbono, o nitrogênio se torna disponível como amônia e nitrato, e outros elementos associados (fósforo, enxofre e vários micronutrientes) são mineralizados sendo então assimilados pela vegetação (Stevenson e Cole, 1999). Mesmo que os micro-organismos sejam os principais responsáveis pelo processo de mineralização dos nutrientes, a fauna de solo tende a exercer um papel de regulação destas populações microbianas. A atividade predatória seletiva de fungos e bactérias, realizada por organismos pertencentes a microfauna (diâmetro corporal < 0,2 mm), representada, por exemplo, pelos nematoides. A estimulação, digestão e disseminação de micro-organismos ingeridos pela macrofauna, assim como, a fragmentação dos detritos desencadeada pelas mesofauna (com diâmetro corporal entre 0,2 e 2,0 mm), como ácaros e colêmbolos, e a macrofauna (com diâmetros superiores a 2,0 mm), exemplificada pelas minhocas, interferem na decomposição da matéria orgânica e alteram a disponibilidade de nutrientes para as plantas (Cragg e Bardgett, 2001).

Estudos já utilizam estes organismos para indicar diferentes distúrbios ambientais oriundos principalmente de atividades antrópicas como manejo do solo (Giracca et al. 2003; Nunes et al. 2008, Barreta et al. 2006), contaminação por metais (Barros, 2008), hidrocarbonetos (Pižl et al., 2009), lixo urbano em aterros (Rosa e Dalmolin, 2009), diferentes usos do solo (Rieff et al. 2010). Isto é possível, pois estes distúrbios tendem a alterar a disponibilidade do recurso alimentar, modificando as interações ecológicas intra e interespecíficas da fauna do solo existentes no ecossistema terrestre. Outro aspecto que endossa com a viabilidade em se estudar estes organismos é apontada por Karlen et al. (2003) que aborda a facilidade de se visualizar o que seria um solo saudável, exemplificando o uso de macro-organismos como as minhocas. Essa perceptível sensibilidade a mudanças induzidas pelas diferentes atividades antrópicas do solo, são avaliadas por modificações de comportamento, produção e reprodução destes organismos. Isso pode ser alcançado em estudos conduzidos em laboratórios com ensaios padronizados.

Permitindo a aquisição de respostas quanto à toxicidade de resíduos que tem como destino final o solo.

2.4 Ensaio ecotoxicológicos

Ecologia é o estudo da interação dos seres vivos entre si e com o ambiente em que vivem. Já a toxicologia procura compreender os efeitos causados por substâncias químicas e bioquímicas, além dos processos biológicos responsáveis por estes efeitos, levando em conta o quão sensíveis são os distintos tipos de organismos expostos às substâncias e as relativas toxicidades das diferentes substâncias. Desse modo, a ecotoxicologia busca entender e prever efeitos de substâncias químicas em seres vivos e comunidades naturais (Chapman, 2002), monitorando os efeitos letais, morfológicos, comportamentais, fisiológicos, citogenéticos e bioquímicos dos poluentes a que os organismos são expostos (Neuhauser et al, 1985)

As diferenças entre os bioensaios ecotoxicológicos são, principalmente, quanto ao tempo de exposição do organismo-teste ao agente ou substância a ser testada. O tempo varia conforme o organismo-teste utilizado, pois os fatores avaliados dependem do seu ciclo de vida (Nipper, 2002). Outra diferença são as condições ambientais a que esses são submetidos, podendo ser controlada em laboratório como conduzida a campo (Bianchi et al., 2010). A vantagem dos testes em laboratório é o maior domínio sobre fatores externos e a possibilidade de padronização (Carvalho et al., 2009). A escolha do organismo-teste vai depender muito do ecossistema a ser avaliado, da sua posição trófica na cadeia e o nicho que este ocupa no ambiente. De acordo com Fracácio (2006) critérios como: sensibilidade a uma ampla gama de substâncias; abundância e disponibilidade; sempre que possível utilizar espécies endógenas; importância comercial, recreacional ou ecológica; facilidade de cultivo em laboratório; vasto espectro de informações sobre sua biologia e ciclo de vida relativamente curto. Porém, conforme relato do mesmo autor, diante da dificuldade de se encontrar espécies com todos estes atributos, é usual o emprego de espécies padronizadas para determinados compartimentos ambientais.

Os principais organismos utilizados nestes testes provem de grupos representados por algas, poliquetas, microcrustáceos e peixes, quando o ambiente for aquático. Em ambientes terrestres os colêmbolos, enquitreídeos, e oligoquetas terrestres são os mais usuais (Bianchi et al., 2010). Os ensaios no Brasil que buscam determinar efeitos em organismos aquáticos contam com um amplo banco de protocolos, estabelecidos por órgãos como: A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental – SP (CETESB) e Fundação estadual de Engenharia do Meio Ambiente – RJ (FEEMA). No caso do solo ser o habitat, o país ainda não possui metodologias bem desenvolvidas, sendo que neste caso faz-se menção às técnicas internacionalmente reconhecidas como as da ISO (*International Organization for Standardization*), OECD (*Organization for Economic Co-operation and development*) e EPA (*Environmental Protection Agency – USA*) (Sisinno et al., 2004).

Conforme Domene et al. (2007), as metodologias para determinar a ecotoxicologia terrestre visam testar previamente um possível impacto de substâncias ou resíduos, como pesticidas e lodos, aplicados voluntariamente no ambiente. Por outro lado, é possível avaliar o grau de contaminação de ambientes já impactados, como no caso de metais pesados ou petróleo, acidentalmente depositados no solo (Natal da Luz et al., 2004), ou ainda investigar a ecotoxicologia no solo em que foram descartados resíduos urbanos e industriais (Araújo e Monteiro, 2007). Para obter as respostas em relação a contaminação são utilizados bioensaios com organismos terrestres, divididos em testes de fuga, agudo e crônico (Bianchi et al., 2010).

Os testes de fuga se caracterizam como ensaios de comportamento, proporcionando a determinação da biodisponibilidade de substâncias químicas ou de contaminantes no solo, onde a indicação é dada pela fuga do organismo, ou não, do ambiente contaminado (ISO 17512, 2007). Embora seja um ensaio simples e rápido, seu significado ecológico é importante, pois a fuga indica rejeição do local e a diminuição da população por um agente estressor como a contaminação. O teste de toxicidade aguda é um experimento realizado com organismos-teste que determinam se um efeito adverso observado ocorre em um curto período de tempo, em geral até 14 dias. Isto pode ocorrer após

administração de uma única dose da substância testada ou após múltiplas dosagens administradas em até 24 horas. Durante o período de avaliação desse teste mede-se o percentual de mortalidade ou sobrevivência, alterações de comportamento e aspectos relacionados a biometria atinentes a ganho/perda de peso e crescimento (Ferreira, 2004).

Em testes de toxicidade crônica, os organismos-teste são observados durante boa parte do seu ciclo de vida, quando acontece a exposição ao agente-teste (contaminante). Os efeitos crônicos persistem por um longo período de tempo, e podem ser evidentes, imediatamente ou não, após a exposição (Duffus, 1983). Os distúrbios devido a essa exposição manifestam-se em funções biológicas, tais como reprodução, produção, desenvolvimento de ovos e crescimento (Goldstein, 1988). Os três testes mencionados acima utilizam um suporte artificial para condução dos experimentos. O substrato artificial é constituído de uma mistura de areia, caulim e um substrato orgânico. Sendo os volumes divididos em 70%, 20% e 10%, respectivamente. Com adição de CaCO_3 para ajuste do pH em $6,0 \pm 0,5$ (OECD 222, 2004). O emprego deste substrato nestes ensaios tem sido criticado, pois conforme diversos autores, o material não condiz com as características naturais dos diferentes solos encontrados na natureza (Brown e Domínguez, 2010), muito embora permita uma padronização internacional dos testes, viabilizando a comparação dos resultados (Bianchi et al., 2010).

No solo, o uso de minhocas é aceito, principalmente, pela posição trófica e nicho ecológico ocupados, situando-se nos níveis mais baixos das teias alimentares terrestres. Além de servir de alimento para vários animais e como rota de transferência, é capaz de biomagnificar contaminantes ao longo dessas teias. Isto faz das minhocas excelentes bioindicadores de ecotoxicidade de substâncias químicas no sistema solo (Nahmani et al. 2007).

A espécie *Eisenia andrei*, juntamente com a *Eisenia fetida*, tem seu uso preconizado pelos protocolos específicos para este grupo de organismo (OECD 207, 1984; OECD 222, 2004). Isto ocorre, sobretudo, por serem espécies que já apresentam sua biologia bastante explorada e conhecida. Além disso, são organismos bastante prolíficos e adaptáveis a cultivo em cativeiro (Dominguez e Edwards, 2011). Abordagens utilizando espécies nativas são vistas como uma alternativa para substituir as espécies padrão. Segundo Buch et al., (2010)

isto aumentaria a relevância dos dados obtidos, visto que espécies autóctones são organismos adaptados as condições edáficas em que se quer testar o efeito do contaminante. Apesar de esta substituição ser desejada, ainda é difícil obter exemplares suficientes para estes testes, além de se conhecer pouco da biologia destas espécies, que acaba dificultado sua multiplicação em ambiente fora da natureza.

Ensaio com solos naturais, utilizando como organismos-teste as minhocas, já estão sendo conduzidos, como no caso da toxicidade de mercúrio em garimpos de ouro (Ramos et al., 2007), no impacto da exploração agrícola (Lima, 2010) e dos defensivos em áreas cultivadas com morango e batata-inglesa (Nunes, 2010). Resíduos de natureza orgânica estão tendo seu potencial ecotoxicológico estudado. Por exemplo, Natal da Luz et al. (2006) fez uso de colêmbolos e minhocas como organismos-teste, avaliando lodo do tratamento de efluentes de indústria têxtil. Assim como, Dores-Silva et al. (2013) que testaram um lodo de esgoto urbano, utilizando uma série de ensaios com minhocas.

Como a prática de descarte de resíduos em diferentes tipos de solos é frequente, são necessários dados e/ou resultados que orientem este descarte no ambiente. Trabalhos com abordagem ecotoxicológica surgem como complementadores dos estudos de alterações físico-químicas. Assim, um resíduo pode tanto ser transformado em um adubo orgânico como em um contaminante, caso as práticas de manejo do solo não sejam norteadas por estudos com diferentes abordagens (Figura 1).

Desta forma, os diversos resíduos oriundos de diferentes setores industriais, inclusive os oriundos da agroindústria do tabaco, necessitam de informações que ampliem os conhecimentos das alterações que causam em propriedades físico-químicas do solo usualmente caracterizadas. Isto abre espaço para que novos estudos, com foco na micro e macrofauna do solo, venham a contribuir para o uso adequado destes rejeitos industriais no solo.

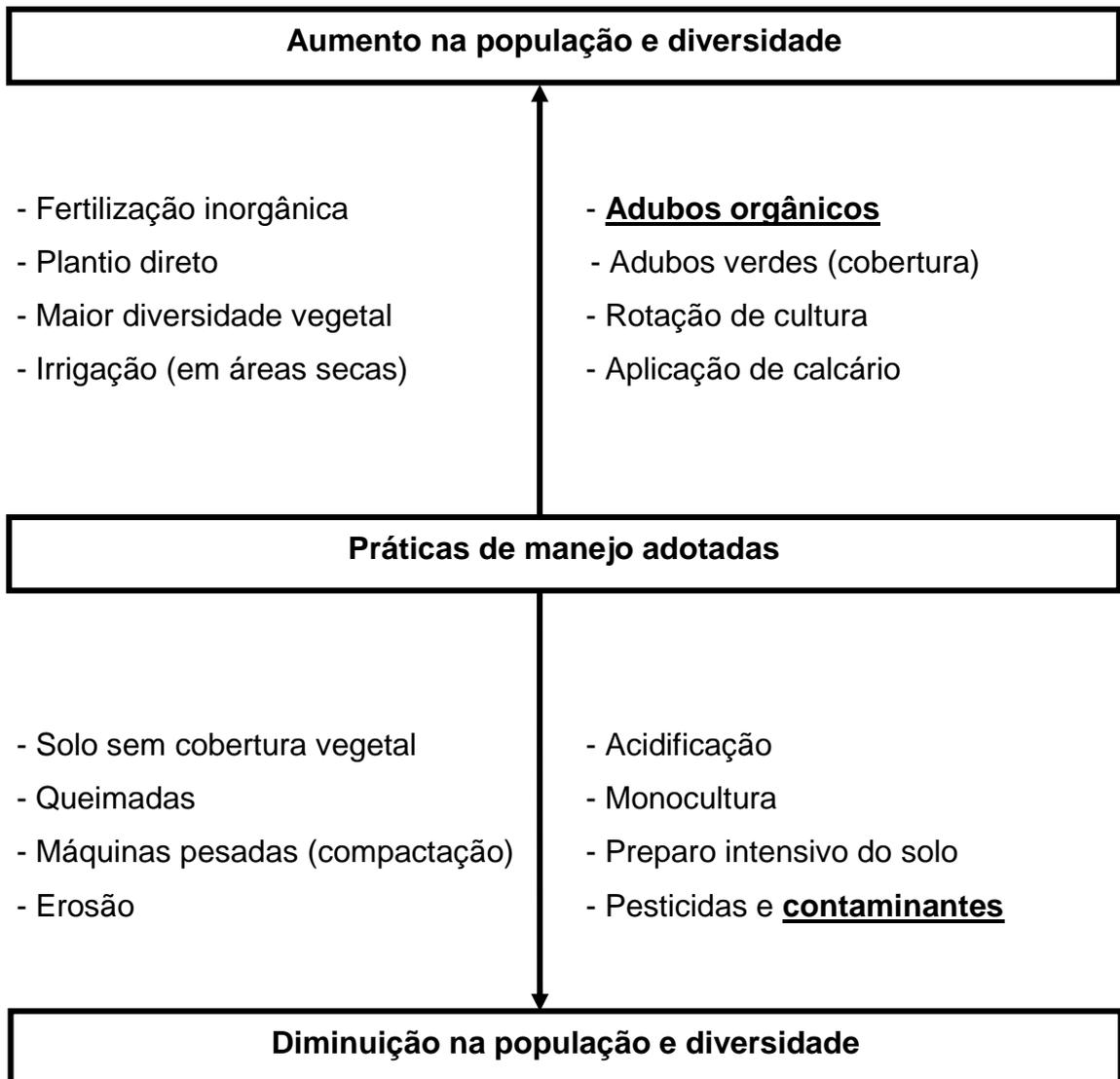


FIGURA 1. Efeito de diversas práticas de manejo adotadas em agroecossistemas na população de organismos do solo. A posição das práticas no eixo y representa sua contribuição relativa (importância hipotética) ao aumento ou à diminuição das populações e diversidade de organismos (modificado de Brown e Domínguez, 2010).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta dos solos

Para condução dos testes foram coletados solos de três localidades distintas, com históricos diferentes de uso do resíduo sólido do processamento do tabaco. Foram feitas cinco amostragens, sendo quatro na região entre os municípios de Santa Cruz do Sul/RS e Rio Pardo/RS e uma no município de Camaquã/RS. Todas coletadas da camada de 0 - 15 cm, com seus pontos georeferenciados, nas seguintes coordenadas: Ponto um (Santa Cruz do Sul/RS) S 29°52' – WO 52°19', a 841 metros de altitude, área onde ocorrem aplicações bianuais de 10 Mg.ha⁻¹, entre os meses de fevereiro a maio, sem incorporação, sempre em pastagens naturais, desde o ano 2005. Ponto dois (Santa Cruz do Sul/RS) S 29°51' – WO 52°19', a 703 metros de altitude, área com mata nativa, livre do uso do resíduo fumageiro. Ponto três (Rio Pardo/RS), S 29°50' – WO 52°.16', a 930 metros de altitude, área com histórico de uma aplicação de 10 Mg.ha⁻¹. Esta anteriormente teve seu uso voltado para cultivo de fumo e encontra-se no segundo cultivo de soja. Ponto quatro (Rio Pardo/RS), a coleta ocorreu na mesma área do ponto três, a aproximadamente 600 metros de distância da coordenada três. Contudo, esta foi feita em local onde não houve uso do resíduo sólido. Ponto cinco, S 30°54' – WO 51°.45', a 29 metros de altitude, solo de mata nativa, localizado no município de Camaquã/RS, sem qualquer histórico de exploração antrópica. Após coleta, as amostras tiveram suas características químicas determinadas (Tabela 2). Antes

de serem utilizados nos experimentos, todos os solos foram secos ao ar, moídos e peneirados.

TABELA 2. Propriedades físico-químicas dos solos utilizados nos experimentos.

Amostras de solo ¹	pH	P	K	CTC	M.O.	Argila	Densidade seca
	H ₂ O	-- mg/dm ³ --	--	cmol _c /dm ³	----- % -----	-----	g/dm ³
Natural	4,2	8,3	29	6,87	1,7	11	1313
2005 com	6,3	35	>400	15	4,6	13	1049
2005 sem	5,4	2,4	60	11,1	3,1	12	1175
2013 com	4,7	12	210	10,4	2,8	18	1726
2013 sem	4,8	37	172	8,13	2,7	15	1791

¹Natural (Ponto cinco): coletado no município de Camaquã/RS; 2005 com e sem (Ponto um e dois): representam os solos com 10 anos de histórico de aplicação do RSAT e seu respectivo controle, sem aplicação; 2013 com e sem (três e quatro): representam os solos com um ano de histórico de aplicação do RSAT e seu respectivo controle, sem aplicação.

3.2 Resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT)

O resíduo fumageiro foi cedido pela empresa Universal Leaf com sede em Santa Cruz do Sul/RS. Após coleta do material foram determinadas as suas características físico-químicas: Umidade (m/m) 8,0%; pH em H₂O 6,0; Densidade úmida 480,0 kg/m³; Carbono orgânico (m/m) 24,0%; Nitrogênio TKN (m/m) 1,5%; Fósforo total (m/m) 0,11%; Potássio total (m/m) 1,6%; Cálcio total (m/m) 1,5%; Magnésio total (m/m) 0,39%; Enxofre total (m/m) 0,14%; Cobre Total 12,0 mg/kg; Zinco total 46,0 mg/kg; Ferro total (m/m) 0,87%; Manganês total 414,0 mg/kg; Sódio total 516,0 mg/kg; Boro total 24,0 mg/kg e Relação C/N 16,0%.

3.3 Coleta do esterco bovino

A coleta de esterco foi realizada no município de Camaquã/RS. O material foi obtido de sistema de semi-confinamento vacas leiteiras, holandesas e jerseys, alimentadas com pastagem cultivada e silagem. Os animais recebiam doses de medicamentos, entre eles vermífugos, sempre seguindo a prescrição e recomendação de profissional competente. Contudo, antes do início dos experimentos realizou-se um teste piloto para averiguar a qualidade do esterco quanto ao seu emprego como substrato para criação de minhocas.

Oito recipientes, com volume de 2 litros foram preenchidos com 1 litro do esterco bovino e receberam 10 minhocas da espécie *E. andrei*, cliteladas e com pesos iniciais entre 0,20 – 0,35 g. Os recipientes permaneceram em incubadora com temperatura de $24\pm 2^\circ\text{C}$, umidade de 75 – 80% e 12 horas de luz. O período de avaliação foi de 28 dias, os dados obtidos foram comparados com dados obtidos por Dominguez e Edwards (2011) para espécie *E. andrei*, quanto a produção em biomassa. Ao final do período de avaliação, foi obtido valor médio de biomassa/minhoca de 0,59 g, maior que o estabelecido pelos autores, como biomassa máxima desta espécie em condições ideais de cultivo.

Da mesma forma que ocorreu com o solo e o RSAT, o esterco, após coleta, teve seus parâmetros químicos determinados, sendo: pH em H_2O 7,8; Carbono orgânico (m/m) 17,0%; Nitrogênio TKN (m/m) 1,4%; Fósforo total (m/m) 0,3%; Potássio total (m/m) 2,0% e relação C/N 11,8%.

3.4 Preparo do substrato artificial

Para construção do substrato artificial utilizou-se o protocolo para testes de efeitos subletais, OECD *Test Guideline 222: Earthworm Reproduction Test (Eisenia fetida/Eisenia andrei)* modificado (OECD 222, 2004). O substrato artificial levou 10% de fibra de casca de côco em pó, 20% de caulim branco e 70% de areia fina. A areia passou por um processo de tríplice lavagem em água destilada. Na sequência o material permaneceu sob uma lona até que estivesse suficientemente seco para realização da mistura. Como a umidade dos materiais era bastante baixa, menor que 6%, foi considerada irrelevante para o processo de mistura. No momento da constituição do solo, realizou-se manualmente a mistura das três frações até o material apresentar aparência uniforme. Ao final, o pH foi ajustado para 6,0, com adição de CaCO_3 .

3.5 Organismos teste

As minhocas da espécie *E. andrei* submetidas aos testes foram obtidas do criatório do Instituto Federal Sul-rio-grandense, campus Camaquã. Estas permaneciam em esterco bovino sob temperatura $24\pm 2^\circ\text{C}$ e umidade de 75%. A seleção das matrizes para os testes se deu através de coleta de

casulos, retirados do criatório e acondicionados em novos recipientes sob as mesmas condições ambientais, contudo, sem a presença de oligoquetas.

Com base no conhecimento do padrão biológico desta espécie, onde o período médio de incubação de casulos gira em torno de 22 dias e que, estes jovens eclodidos levam, em média, 48 dias para atingir a maturidade (Dominguez e Edwards 2011). Usou-se o tempo de 80 dias para coletar as minhocas que apresentavam clitelo aparente, com biomassas entre 0,2 e 0,4g. Antes do início dos experimentos, as minhocas foram aclimatados por 48 horas as condições ambientais de substratos que ainda não haviam recebido as doses do resíduo, temperatura, luz e umidade do teste (OACD 222, 2004).

3.6 Teste de atratividade e repelência

Para este teste foram organizados três bioensaios. Visando investigar se o resíduo do tabaco exerce, em diferentes concentrações, algum grau de atratividade ou repelência sobre as minhocas da espécie *E. andrei*.

3.6.1 Unidades experimentais

No primeiro bioensaio foi montado um olfatômetro de seis braços (Figura 2). Para cada um dos braços, fez-se uso de recipientes cilíndricos de plástico (garrafas PET), com volume de 500 ml e 22 cm de comprimento. Na base central, onde cada braço foi fixado, usaram-se potes como abertura de raio de 7 cm na parte superior, que foi coberta com uma tampa perfurada. Nestes, foram abertos seis orifícios de 1,15 cm de raio, equidistantes, que serviram para o encaixe dos braços. O material tinha as mesmas características constitutivas das garrafas. As garrafas foram perfuradas com um orifício de 4 cm² na extremidade final, com intuito de aplicar as soluções testadas.

Como meio suporte para o experimento, foi preparado novamente o substrato artificial (70% areia, 20% caulim e 10% casca de coco moída), para que os organismos (12 minhocas adultas, com idades entre 50 e 60 dias pós-incubação) pudessem se deslocar pela estrutura montada. A umidade do material foi mantida em 75% em ambiente climatizado (24°C±2°C, totalmente no escuro). No recipiente central apenas 5% de fibra de casca de coco foi

misturada, objetivando diferenciar este compartimento, do braço onde iria localizar-se o tratamento controle com água destilada. Em cada uma das extremidades, quatro diferentes concentrações de Resíduo Sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) foram estabelecidas, além de um controle neutro, a base de água destilada e um controle positivo, feito à base esterco bovino.

As concentrações foram obtidas utilizando a técnica de extração a frio (Lovatto et al. 2004). O RSAT e o esterco bovino foram secos em estufa a 40°C por 24h. Após adicionaram-se aos resíduos à água destilada, na proporção (v:v) de 2:1 (água:resíduo), essas misturas permaneceram em frascos por 24h para aquisição dos extratos. Após esse período, obteve-se a concentração chamada de 100% esterco bovino e RSAT, por diluição, as concentrações de 50%, 25% e 5% de RSAT.



FIGURA 2. Olfatômetros de múltipla escolha adaptados para o teste comportamental.

Foram realizados ainda mais dois bioensaios com esta mesma estrutura inicial. Contudo, os tratamentos foram modificados para obtenção das

possíveis atrações e repelências que o resíduo de tabaco poderia exercer sobre os organismos testados. Para a atração, utilizaram-se cinco concentrações de RSAT (somou-se as quatro anteriores, a diluição de 75% do extrato inicial) e como controle esterco bovino. Já para a repelência, no lugar do esterco fez-se uso de água destilada. Adicionou-se 15 ml de cada extrato nas extremidades dos braços, no momento da montagem do ensaio e após 24 horas de ensaio. Em todos os experimentos foram utilizados quatro repetições.

3.6.2 Avaliações

Após 48 horas, foi computado o número de indivíduos que se deslocaram para cada uma das concentrações de RSAT avaliadas. Os valores percentuais obtidos, em sua forma decimal, foram transformados $(x+1)$ para serem submetidos à análise de variância e teste de médias pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Utilizou-se o programa estatístico SASMAgri (CANTERI et al., 2001).

3.7 Teste de fuga

Com intuito de complementar o estudo anterior, realizou-se um novo ensaio comportamental, analisando o efeito do contato do resíduo com os organismos. Sendo utilizado o protocolo padrão ISO 17512-1 (2007).

3.7.1 Unidades experimentais

O ensaio foi realizado em frascos plásticos transparentes (17,5 cm x 13 cm x 6 cm) preenchidos com solo natural, coletado no município de Camaquã/RS e substrato artificial, este segundo construído conforme item 3.4. Além destes, foram avaliados os dois solos com históricos diferentes de aplicação do RSAT. Em todos os casos, utilizou-se 500 g de solo (peso seco) por frasco.

Com o auxílio de um material rígido, colocado transversalmente no meio do frasco, uma das metades foi preenchida com solo natural ou substrato artificial, sem adição do resíduo, e a outra metade preenchida com os mesmos

solo e substrato, homogeneizados com cada dosagem teste do resíduo (Figura 3). Para todos os tratamentos um controle foi estabelecido, onde ambos os lados não recebiam o resíduo.



FIGURA 3. Unidades experimentais para os testes de fuga.

Em seguida, removeu-se o recorte de papelão e no espaço deixado foram adicionados 10 organismos clitelados da espécie *E. andrei*. Com tampas perfuradas, os frascos foram fechados e armazenadas no escuro, sob temperatura de $24\pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais não receberam alimentação durante os testes. Cada tratamento foi avaliado em quatro repetições. As doses testadas foram: 3,75; 7,5; 15; 30; 60; $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ de RSAT.

3.7.2 Avaliações

Após 48 horas verificou-se o número de minhocas em cada tratamento, determinando-se, desta forma, o seu comportamento de fuga. Os valores foram submetidos a dois testes de comparação. Utilizando a planilha de suplementos do pacote Excel, avaliou-se o comportamento de fuga pelo teste Exato de Fisher. De acordo com Natal da Luz et al. (2008a) este teste utiliza como hipótese nula a distribuição homogênea das minhocas, ou seja, ao final do período de avaliação metade das minhocas se encontrem em um dos lados do recipiente. Assim como, determinou-se a fuga pelo cálculo utilizando a fórmula preconizada no protocolo que descreve este teste (ISO 17512-1, 2007).

$$RL = [(C - T)/10] \times 100\%$$

Onde:

RL = Resposta líquida;

C = Soma de minhocas observadas no controle;

T = Soma de minhocas observadas no solo tratado;

10 = Número total de minhocas em cada repetição;

3.8 Teste de mortalidade e reprodução

Para este estudo, o substrato artificial foi construído conforme item 3.3, seguindo todas as etapas de estruturação para os ensaios preconizados pelas OECD 222 (2004) e OECD 207 (1984). Do mesmo modo, os solos naturais e o esterco, foram coletados e preparados conforme itens 3.1 e 3.2, respectivamente. Optou-se por não fazer o ajuste do pH dos solos coletados, para manter as características naturais destes ambientes. As minhocas foram selecionadas do criatório em ambiente controlado (temperatura: $24 \pm 2^\circ\text{C}$; umidade: de 75%; e 12 horas de luz por dia. Todas tinham clitelo desenvolvido e apresentavam entre 40 - 50 dias pós-incubação.

3.8.1 Unidades experimentais

Os recipientes utilizados foram potes cilíndricos transparentes de 1 litro de capacidade, com tampa perfurada (Figura 4). Em cada frasco, foram adicionados 6 cm de solo seco ao ar, coletado em Camaquã/RS, e os mesmos 6 cm para frascos com o substrato artificial. Após, a umidade foi corrigida para 60% da capacidade de retenção de água. Para a obtenção deste percentual, realizaram-se os seguintes procedimentos: Amostras deformadas dos solos, de densidades conhecidas, foram inseridas em anéis volumétricos (100 cm^3) de fundo vedado com tecido de nylon. Na sequência colocou-se sobre um recipiente, que foi gradualmente preenchido de água até a borda superior do anel. Permaneceu nestas condições durante cerca de três horas. Como nem toda a água absorvida pelos capilares do solo pode ser mantida, a amostra ficou, durante um período de duas horas, sobre um leito de areia fina umedecida, dentro de um dessecador, para evitar a perdas por evaporação.

Depois, as amostras foram pesadas e secas a 105°C até à massa constante. Assim, capacidade de retenção de água (CRA) pode ser calculada da seguinte forma:

$$CRA \text{ (em \% massa seca)} = \left(\frac{S - T - D}{D} \right) \times 100$$

Onde:

S = Massa do solo saturado + massa do anel + massa do tecido de nylon;

T = Tara (massa do anel + massa do tecido de nylon)

D = Massa seca do solo



FIGURA 4. Unidades experimentais utilizadas nos testes de mortalidade e reprodução.

Nos ambientes que simulavam vermicompostagem, foi preenchido, após realização das misturas, com 8 cm de material que teve sua umidade corrigida para 75%. Concomitantemente, foram testados os solos com os diferentes históricos de uso coletados nas proximidades do município de Rio Pardo/RS.

Todos os tratamentos foram conduzidos em quatro repetições. Selecionaram-se 10 minhocas para cada recipiente, que tiveram seus pesos conferidos (entre 0,2 e 0,3g) instantes antes de serem adicionados aos tratamentos. Até o 28º dia as minhocas crescidas nos três ensaios que

levavam solo como substrato, receberam alimentação semanal, com de 5 g de esterco seco e moído. As doses de RSAT utilizadas para o solo natural e o substrato artificial foram em $\text{Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$: 3,75; 7,5; 15; 30; 60 e um controle sem resíduo. Já as concentrações usadas em mistura com o esterco bovino, foram em percentuais: 1,5; 3; 6; 12; 24; além do controle sem o resíduo. Todos os substratos tiveram seu pH medido aos 7, 14, 28 e 56 dias de experimento.

3.8.2 Avaliações

Após sete dias foram determinados os pesos dos organismos adultos. Assim como, o número de mortes e alterações comportamentais e morfológicas em cada recipiente. Todos os sobreviventes permaneceram até o 14º dia, onde novamente foram aferidos os pesos e mortes. Na terceira avaliação, aos 28 dias, os organismos adultos foram pesados, contados e retirados dos frascos. Desta coleta, até o 56º dia, ficaram nos recipientes apenas os ovos e as minhocas jovens. Ao final, ambos foram contados e pesados.

Conforme medida sugerida pelo protocolo OECD 222 (2004), quando os dados coletados não apresentam normalidade e homogeneidade na variância, devem ser transformados e caso isso não seja suficiente análises não paramétricas devem ser empregadas. Desse modo, os dados percentuais de mortalidade, em sua forma decimal, foram transformados $(x+1)$. Atingido o objetivo, realizou-se o teste de Dunnett e Tukey a 5% de probabilidade de erro com a da planilha de suplementos do Excel - Action 2.6. A mesma transformação foi realizada para as avaliações de biomassa aos 28 dias. Após, novamente fez-se uso do teste de Dunnett sob mesmo percentual de erro, aplicando-o também para o número de indivíduos jovens aos 56 dias.

Para determinar a influência do tempo (7, 14 e 28 dias) na biomassa das minhocas, assim como das doses/concentrações do RSAT, os dados foram submetidos à análise de variância num esquema bifatorial 3x6 (três períodos de avaliação e seis níveis de RSAT). Utilizou-se o programa estatístico SASMAgri (CANTERI et al., 2001).

3.9 Teste de adaptação e viabilidade de casulos

O teste serviu para verificar a possibilidade de adaptação das minhocas da espécie *E. andrei* quando submetidas a doses e concentrações crescentes em ambiente de solo e vermicompostagem. A formatação do experimento teve a lógica de transferência do grupo de organismos. Após um período de tempo fixo (a cada 30 dias) estes eram realocados dos frascos onde estavam para recipientes idênticos em volume de substrato, solo ou esterco, porém com dose e concentração, respectivamente, maior que a anterior. Para efeito de comparação, um tratamento com mesma dosagem ou concentração era conduzido. Contudo, neste caso os organismos advinham de um recipiente livre do resíduo, possibilitando a comparação entre adaptação e o tratamento sem adaptação. Paralelamente, um controle, sem adição de resíduo seguia os mesmos passos de transferência utilizados nos frascos de adaptação (Tabela 3).

TABELA 3. Organização dos experimentos de adaptação (avaliações a cada 30 dias).

Substrato teste: Solo natural						Avaliações	
----- Doses (Mg.ha ⁻¹) -----						---- Dias ----	
Controle	Adaptação	----- Sem adaptação -----					
0	3,75	0	0	0	0	0	30
0	7,5	7,5	0	0	0	0	60
0	15	-	15	0	0	0	90
0	30	-	-	30	0	0	120
0	60	-	-	-	60	0	150

Substrato teste: Esterco bovino						Avaliações	
----- Concentração (%) -----						---- Dias ----	
Controle	Adaptação	----- Sem adaptação -----					
0	2	0	0	0	0	0	30
0	4	4	0	0	0	0	60
0	6	-	6	0	0	0	90
0	8	-	-	8	0	0	120
0	10	-	-	-	10	0	150
0	12	-	-	-	-	12	180

Concomitante, realizou-se a avaliação da viabilidade dos casulos produzidos em cada etapa deste experimento, através de incubação e contagem de indivíduos nascidos. O solo e esterco utilizados no experimento foram os mesmos oriundos no município de Camaquã/RS, seguindo os mesmos procedimentos de coleta e preparo dos itens 3.1 e 3.2. Na obtenção

dos organismos, todos clitelados, foi necessário passarem pela mesma etapa de aclimação utilizada nos experimentos anteriores (48 horas, na temperatura, umidade e substratos sem adição do resíduo).

3.9.1 Unidades experimentais

Neste ensaio fez-se uso de frascos com 2 litros de capacidade, foscos que impediam a passagem de luz e cobertos com TNT (Tecido-não-tecido) fixo por uma borracha, para possibilitar as trocas gasosas (Figura 5). Levando em consideração a densidade e umidade inicial do solo, foi adicionado o equivalente a 1 litro de solo seco. Após, foi misturado o resíduo e a umidade regulada para 60% da capacidade de retenção de água (OECD 222, 2004). Foram utilizados 10 organismos por frasco, com idades entre 50 – 60 dias pós-incubação, previamente pesados (biomassas entre 0,3 – 0,4 g).

Para o esterco, após aferição de sua densidade e umidade, realizava-se a mistura proporcional do resíduo até que o frasco tivesse 1 litro de substrato. A umidade era então ajustada até 75%, para após inserir os organismos na unidade experimental. Os tratamentos que utilizam solo como substrato base receberam semanalmente 5 g de esterco seco moído. Os frascos permaneceram em ambiente com controle de temperatura ($24\pm 2^{\circ}\text{C}$) e a umidade era repostada sempre que atingia um percentual 15% abaixo do padronizado. Todos os tratamentos foram conduzidos em quatro repetições.



FIGURA 5. Unidades experimentais para o teste de adaptação.

A viabilidade dos casulos foi determinada, destacando aleatoriamente seis casulos por tratamento que eram depositados separadamente em recipientes plásticos que continham o mesmo substrato de onde o casulo havia sido liberado.

3.9.2 Avaliações

A cada 30 dias, num total de 150 dias para o solo e 180 dias para o esterco, os oligoquetas foram contados e pesados. Aspectos comportamentais e, morfológicos (afilamento, contração, líquido celomático aparente e agitação) também foram observados. Após um período de 28 dias de incubação (a $24\pm 2^{\circ}\text{C}$), contou-se o número de indivíduos jovens nascidos de cada casulo incubado. Os valores de mortalidade e biomassa (transformados conforme item 3.7.2) foram submetidos à análise de variância e teste de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para averiguar os tratamentos de minhocas/casulos utilizou-se o teste de médias de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Empregou-se o programa estatístico SASMAgri (CANTERI et al.,2001).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Teste de atratividade e repelência

Não foram constatadas mortes, tampouco permanências na arena central, pois todas as minhocas optaram por algum dos braços do olfatômetro ao final do experimento (Figura 6A, B e C). Possivelmente isto decorreu do fato da menor quantidade de material orgânico presente na arena central. Especificamente para o estudo de atratividade de diferentes concentrações de extrato do RSAT utilizando como controle positivo o extrato de esterco bovino, não foi observada atração dos organismos para nenhuma das concentrações testadas. Embora tenham sido encontradas minhocas em quase todas as concentrações, excetuando-se a diluição de 50% de RSAT, os deslocamentos não foram significativos, sendo que a soma destes foi três vezes menor que o encontrado no extrato controle.

Entre os tratamentos de RSAT, foi possível perceber maior atração para os extratos mais concentrados, com RSAT 100% e 75%, ambos com média de 1,25 minhocas de um total de 12 animais (Figura 6A). Quando o teste contava com um tratamento neutro, a base de água destilada, os resultados foram bastante semelhantes com os anteriores. Pois, mais de 65% das movimentações tiveram como destino o controle à base de esterco bovino, sendo contabilizados percentuais de 10,4; 12,5; 8,3; 2,1 e 0 para, os extratos de RSAT 100%, 50%, 25%, 5% e água, respectivamente, que não diferiram estatisticamente entre si (Figura 6B).

A avaliação de repelência, sem o tratamento com esterco bovino, os resultados mostraram que com ausência deste resíduo, houve preferência pelos braços do olfatrômetro que contavam com 100%, 75% e 50%, em média tiveram 3,25; 4,25 e 3,5 minhocas, respectivamente. Assim como no experimento que contava com o esterco bovino, o controle com água neste experimento não exerceu qualquer influencia no comportamento deslocamento, apresentando novamente ausência de organismos no recipiente (Figura 6C).

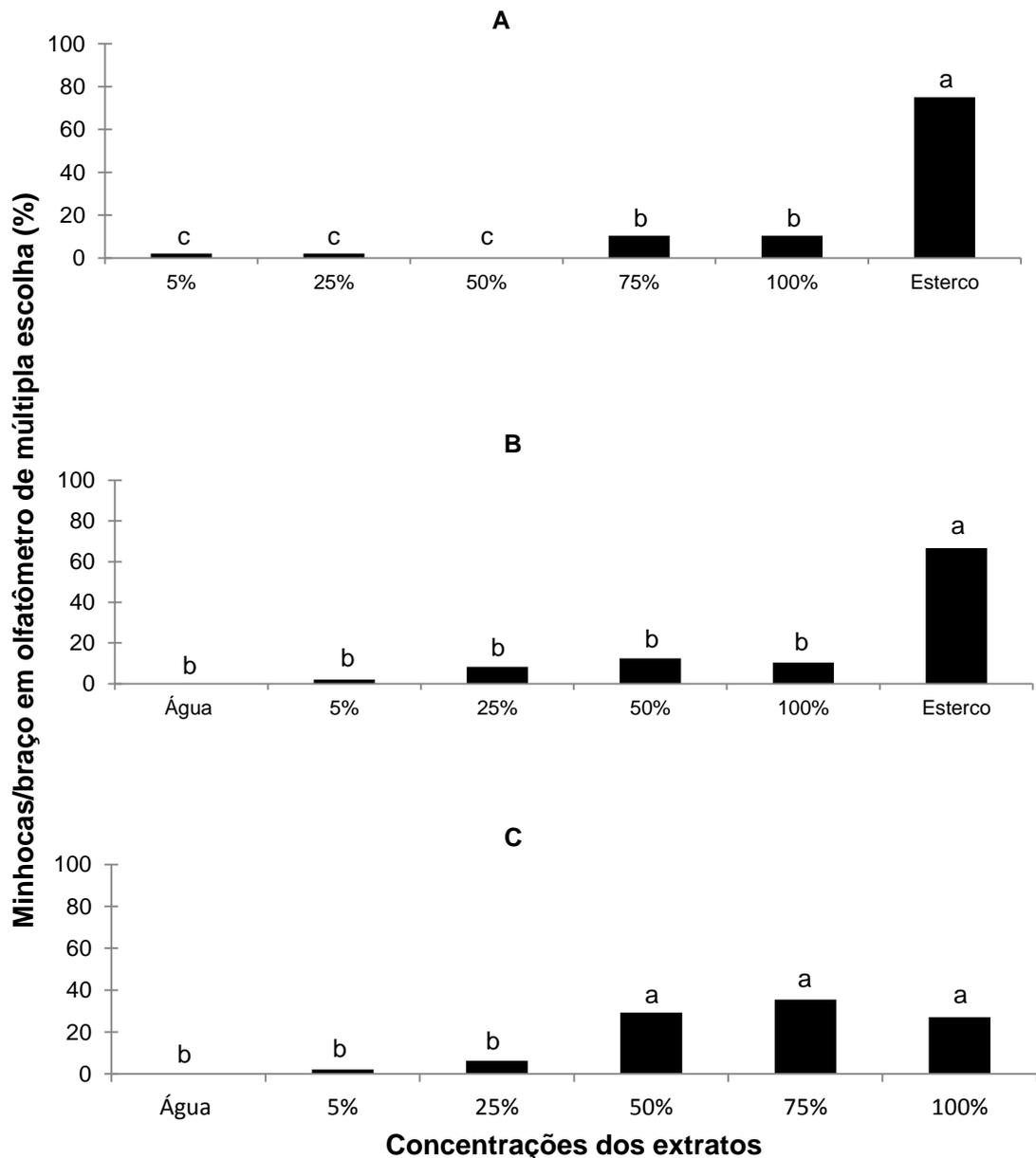


FIGURA 6. Percentual de minhocas da espécie *E. andrei* encontrados em cada braço do olfatômetro de múltipla escolha. (A) Atratividade; (B) Controle duplo; (C) Repelência. Concentrações de 5 a 100% referentes aos extratos de RSAT. Para cada figura, barras com letras iguais não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade de erro.

São poucos os estudos com minhocas no que se refere ao comportamento de deslocamento quando submetidas a estímulos (Zirbes et al., 2011). Pesquisas que visam determinar a preferência de minhocas por fontes distintas de alimento mostram que tanto a espécie de minhoca como a natureza do alimento, orgânica ou não, exercem influência na escolha (Nielson e Boag, 2003). A espécie *E. andrei*, uma minhoca epigeica, é um organismo bem adaptado a ambientes ricos em material orgânico (Bouche, 1977). Isto pode explicar os resultados encontrados, onde sempre que concentrações maiores de material orgânico estavam presentes no braço do olfatômetro, eram localizados um número maior de organismos (Figuras 8A, B e C). Estes resultados seguem a mesma tendência dos encontrados por Elvira et al. (1996) que constataram uma densidade de minhocas superior em ambientes com maior quantidade de material orgânico, chegando até 14.600 indivíduos/m².

Uma série de trabalhos aponta a relação C:N ou o conteúdo de N como um indicativo de qualidade percebida por minhocas quando optam por determinado alimento (Lavelle 1988; Hameed et al. 1993; Bohlen e Edwards 1995; Bohlen et al. 1997; Ketterings et al. 1997). Quando se compara a relação C:N dos tratamentos esterco bovino e 100% do RSAT que tinham, 11,88 e 16, com percentuais de N de 1,43 e 1,5, respectivamente, percebe-se que a primeira opção, foi escolhida sempre por um número maior de organismos. Os conteúdos encontrados nos materiais utilizados não chegam a se enquadrar como de qualidade distintas. Nielson e Boag, (2003) avaliando a preferência alimentar de seis espécies de minhocas, consideraram materiais com relação C:N entre 11,4 e 15 como de mesma qualidade. Contudo, nesse mesmo trabalho, os autores utilizaram materiais livres de contaminação biológica, diferindo do que foi proposto no presente estudo, que procurou alterar o mínimo possível os resíduos utilizados.

Uma provável hipótese que se atribui aos resultados encontrados, mostrando priorização pelos braços do olfatômetro que continham esterco bovino ao invés do extrato de RSAT, seria o fato de este material ser rico em micro-organismos (Tiago et al. 2008). Isto ocorre principalmente pela diferença de umidade entre estes materiais antes do preparo do extrato, próxima de 80% para o esterco e menor que 7% para o pó de fumo, que facilita o aumento da população de bactérias e fungos.

Esse comportamento foi também encontrado por Zirbes et al. (2011) trabalhando com *E. fetida* em um olfatômetro de quatro braços, obteve resposta positiva após 24 horas quanto a atratividade, quando adicionava um filtrado de 25 ml de inóculo do fungo *Geotrichum candidum* em uma das extremidades do equipamento, com um número de indivíduos maior que o dobro dos encontrados no controle. Além disso, nesse mesmo estudo os autores avaliaram a influência da densidade de minhocas no deslocamento dentro do equipamento, e verificaram que independente do número inicial de organismos, que variou de 5 a 160, sempre o braço que continha o filtrado o número de minhocas era significativamente maior do que nos controles.

A ausência de indivíduos nos braços onde a mistura levava água destilada, mostrando que mesmo o braço tendo o dobro de material orgânico disponível do que o sitio central do olfatômetro, as minhocas buscaram os braços onde haviam extratos de RSAT. Isto demonstra que quando não existia um atrativo, no experimento se tratava do esterco bovino, os extratos mais concentrados foram percebidos e preferidos. Descartando a possibilidade de repelência do resíduo industrial nas condições em que o experimento foi conduzido.

A percepção de odores voláteis por minhocas é atribuída a quimiorreceptores localizados, principalmente, no prostômio e epitélio bucal que são associados aos neurônios (Edwards e Bohlen, 1996). Escolher os extratos de RSAT e não o tratamento que levava água destilada pode estar ligado ao grau de estabilidade do material orgânico. Pois quanto mais estabilizado, maior a presença de moléculas recalcitrantes resistentes a atividade de decomposição microbiana, isto por consequência diminui a liberação de odores voláteis, reduzindo a percepção destes materiais por parte das minhocas.

Conforme Zagustina et al. (2012), as folhas de tabaco liberam uma série de compostos voláteis, com a nicotina excedendo em quantidade, qualquer outra molécula presente neste material, sendo também o constituinte mais tóxico nas folhas de fumo. Isto pode indicar que nos volumes de mistura utilizados nos extratos do RSAT no experimento, num primeiro momento o resíduo não se mostrou repulsivo as minhocas. Apresentando-se inclusive atrativo as minhocas presentes nos olfatômetro.

A maior presença de minhocas nos braços de concentração mais elevadas de extrato do RSAT, também pode ter estreita relação com atividade microbiana vinculada à decomposição destes materiais. Laushner (2005) em experimento que avaliou a atividade microbiana, na degradação deste mesmo resíduo pela evolução do CO₂, obteve produção continuamente crescente deste gás sempre que a dosagem do RSAT era aumentada. Além disso, a estabilização da atividade microbiana foi atingida apenas na 12ª semana no tratamento que levava maior dose, mostrando que este material *in natura* permite intensa degradação durante período bem superior às 48 horas utilizadas no presente trabalho.

Outro fator que pode interferir no comportamento do deslocamento destes organismos é o contato físico entre indivíduos. Zirbes et al. (2010) através de uma série de ensaios binários, concluiu que um indivíduo pode influenciar a direção que outro irá tomar para chegar em um mesmo ponto final. Isto pode explicar os resultados encontrados nas diferentes concentrações dos extratos de RSAT que foram estatisticamente iguais nas maiores concentrações, mostrando que o resíduo é perceptível mesmo quando diluído. Embora as 12 minhocas tenham sido depositadas no centro do recipiente, é possível que alguns indivíduos tenham tomado inicialmente direções diferentes e influenciado o comportamento de outro que estivesse mais próximo dele.

4.2 Teste de fuga

Os resultados encontrados utilizando o teste exato de Fisher e o cálculo preconizado pelo protocolo ISO se mostraram coerentes, independente do tipo de solo avaliado. Havendo divergências apenas em dois tratamentos, um em solo natural e outro em substrato artificial. Para o solo natural cuja principal característica era a inexistência de exploração agrícola, analisado pelo teste exato de Fisher, foi encontrado comportamento de fuga apenas na dose de 60 Mg.ha⁻¹ (Tabela 4). Avaliando este mesmo solo, porém fazendo uso do cálculo ISO, seguindo a premissa de que percentuais positivos indicam repulsa ao solo tratado com a substância teste, constatou-se fuga também para a dose de 30 Mg.ha⁻¹ (Tabela 4).

TABELA 4. Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie *E. andrei* em Solo Natural (SN), segundo análise com Teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).

Tratamentos SN	N° de indivíduos ¹		Fisher p	Fuga	ISO %	Fuga
	Controle	Teste				
Controle / Controle	4,75	5,25	1	Não	-5	Não
Controle / 3,75 Mg.ha ⁻¹	0,5	9,5	1	Não	-90	Não
Controle / 7,5 Mg.ha ⁻¹	1,75	8,25	1	Não	-65	Não
Controle / 15 Mg.ha ⁻¹	5	5	1	Não	0	Não
Controle / 30 Mg.ha ⁻¹	5,5	4,5	0,29	Não	10	Sim
Controle / 60 Mg.ha ⁻¹	7,25	2,75	0,01	Sim	45	Sim

¹ Média de quatro repetições.

A diferença constatada entre os dois métodos de verificação de fuga para a dose de 30 Mg.ha⁻¹, na verdade não configura-se como uma divergência. Lima (2010) usando solos explorados por diferentes culturas hortícolas frente a solos de mata encontrou este mesmo contraste para as metodologias. A autora obteve ausência de fuga quando usou o teste de Fisher e 10% de fuga com o cálculo ISO, para tratamento que avaliava solo de mata (controle) de um lado e solo sob cultivo de batata (teste) do outro. Esse percentual segundo a norma ISO 17512-1 (2007) não evidencia fuga, sendo apenas caracterizada fuga efetiva, percentuais acima de 20%. Quando o ambiente em questão era o substrato artificial, os casos de fuga foram observados em todos os tratamentos que continham o RSAT, independente do método utilizado para verificação (Tabela 5). A única disparidade entre as técnicas de averiguação foi constatada no controle, que apontou fuga quando calculado pela fórmula ISO (Tabela 5).

TABELA 5. Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie *E. andrei* em Substrato artificial Tropical (SAT), segundo análise com teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).

Tratamentos SAT	N° de indivíduos ¹		Fisher p	Fuga	ISO %	Fuga
	Controle	Teste				
Controle / Controle	5,25	4,75	0,52	Não	5	Sim
Controle / 3,75 Mg.ha ⁻¹	7,25	2,75	0,01	Sim	45	Sim
Controle / 7,5 Mg.ha ⁻¹	8,25	1,75	0,005	Sim	65	Sim
Controle / 15 Mg.ha ⁻¹	8	2	0,006	Sim	60	Sim
Controle / 30 Mg.ha ⁻¹	7,75	2,25	0,01	Sim	55	Sim
Controle / 60 Mg.ha ⁻¹	8,75	1,25	0,03	Sim	75	Sim

¹ Média de quatro repetições.

Da mesma forma que ocorreu quando houve desacordo entre as técnicas no solo natural, os 5% encontrados pelo cálculo no substrato artificial não determinam, pois assim como discutido anteriormente, a normativa ISO aceita valores entre -20% e 20% para os tratamentos controle, considerando esta faixa percentual como distribuição homogênea de minhocas entre os lados. Odum (1983) explica que em sistemas naturais é comum distribuições divergentes das oligoquetas, não ocorrendo sempre de forma homogênea. São corriqueiros comportamentos na maneira de se difundir no meio, sejam agregados, espalhados aleatoriamente ou uniformes. Para os solos com diferentes históricos de uso do RSAT, apenas o de exploração mais recente teve seu volume evitado, com p significativo a 5% pelo teste exato de Fisher (Tabela 6). Fato também confirmado pelo cálculo ISO, onde foram obtidos 55% de fugas (Tabela 6).

TABELA 6. Resultados do teste de fuga de resíduo sólido da agroindústria do tabaco (RSAT) de minhocas da espécie *E. andrei* em Solo com histórico de uso do resíduo (SH), segundo análise com teste exato de Fisher e fórmula de cálculo ISO (2007).

Tratamentos SH	Nº de indivíduos ¹		Fisher p	Fuga	ISO %	Fuga
	Controle	Teste				
Controle 2005 / Controle 2005	4	6	1	Não	-20	Não
Controle 2013 / Controle 2013	4,75	5,25	1	Não	-5	Não
Controle 2005 / Histórico 2005	5	5	1	Não	0	Não
Controle 2013 / Histórico 2013	7,75	2,25	0,01	Sim	55	Sim

¹ Média de quatro repetições.

A oposição de respostas encontradas entre os solo natural e substrato artificial no presente estudo pode estar ligada a características intrínsecas de cada substrato. Natal da Luz et al. (2008b) obtiveram respostas que confirmam a interferência de propriedades do solo no comportamento de deslocamento das minhocas neste tipo de teste. Os autores utilizaram substratos artificiais construídos simulando textura argilosa, média e arenosa, assim como conteúdos de matéria orgânica de 2%, 5% e 10%. Os pesquisadores unindo os dois atributos, obtinham um tipo de solo, que era pareado em um experimento de fuga, com outra combinação destas mesmas propriedades do solo, somando um total de 47 tratamentos. Estes concluíram que conteúdos baixos de matéria orgânica e texturas extremas podem

influenciar no comportamento dos organismos, mostrando maior rejeição quando o ambiente tem estas características.

Como todos os meios suportes utilizados aqui tinham faixa de textura média, uma explicação dos resultados de ausência de fuga obtidos para o solo natural com RSAT, foi o conteúdo de matéria orgânica adicionada via resíduo. Com teor inicial de 1,7%, quase 6 vezes menor se comparado ao substrato artificial (Tabela 2). No momento que se adicionavam as doses crescentes de RSAT, resíduo rico de material orgânico, as minhocas optavam pelo lado mais rico neste atributo. Tal conduta se repetiu até a aplicação de 30 Mg.ha^{-1} , mostrando que mesmo doses altas não provocaram repulsa dos organismos. Já o substrato artificial provocou repulsa das minhocas desde a dose mais baixa de 3,75 Mg.ha^{-1} . Pode-se atribuir isso ao maior conteúdo de matéria orgânica, 10%, já existente do lado controle deste solo, fazendo com que estes organismos evitassem o deslocamento para o sítio onde o resíduo foi misturado.

Outro fator que pode ter provocado este comportamento diferenciado entre o solo e o substrato foi o pH destes, com 6,0 para o substrato artificial e 4,2 para o solo natural (Tabela 2). Lauschner et al. (2012) avaliando o poder corretivo do RSAT no pH do solo, encontraram aumentos no atributo conforme as doses do resíduo aumentavam, dependendo do poder tampão do solo testado. Com doses e solo semelhantes as utilizadas no presente estudo, os autores obtiveram aumentos do pH já aos 3 dias de incubação do solo. Chegando a um pH entre 6,5-7,0 com aplicação de 15 Mg.ha^{-1} do resíduo, até 8,0-8,5 quando a dose foi de 60 Mg.ha^{-1} .

Considerando como ideal para as minhocas epigeicas um pH de ácido para neutro (entre 5 – 7), mas tolerando uma faixa entre 4 - 9 (Jänsch et al., 2005). O acréscimo do RSAT no solo natural proporcionou o aumento do pH, fazendo com que o ambiente ficasse mais propício à permanência dos organismos. Diferente do que ocorreu no substrato artificial, que já tinha valores de pH próximos da faixa ideal, onde qualquer mudança poderia tornar o espaço menos atrativo para seu desenvolvimento.

Distinto das possíveis razões encontradas para os diferentes comportamentos de fuga no solo natural e substrato artificial, os resultados dos solos com histórico de aplicação, não parecem ter relação com conteúdo de

matéria orgânica, textura ou pH do solos. Isto por que os solos pareados tinham estes atributos bastante semelhantes. A única fuga se deu justamente no solo com histórico mais recente, que havia tido sua segunda aplicação com intervalo de um ano, de 10 Mg.ha⁻¹ a menos de um mês da data da coleta.

4.3 Teste de mortalidade e reprodução

Neste trabalho, foi verificado efeito significativo em pelo menos um dos parâmetros avaliados em cada substrato de desenvolvimento das minhocas (Tabela 7). O indicador de mortalidade, que é determinado conforme protocolo OECD 207 (1984) aos 14 dias após instalação do experimento, mostrou-se significativo para a dose de 60 Mg.ha⁻¹ do resíduo em substrato artificial, com média de 0,75 sobreviventes. Da mesma forma, nas duas maiores concentrações da mistura RSAT:esterco bovino, iguais 42,5% de indivíduos mortos em 14 dias. O solo natural e ambos os solos com histórico de uso do material não apresentaram percentuais de mortes estatisticamente diferentes de seus controles.

Em se tratando da diferença de biomassa inicial e do 28º dia, estabeleceram-se resultados significativamente distintos nas comparações, controle – tratamento para o solo com histórico de uso do resíduo desde o ano de 2005, onde o local que recebeu tais aplicações apresentou acréscimo superior ao local sem histórico. Alterações significativas para biomassa.minhoca⁻¹ também foram encontradas no caso do esterco bovino, onde concentrações a partir de 6% de RSAT na mistura mostrou prejuízo neste parâmetro biométrico.

Para o substrato artificial e solo natural, encontraram-se tendências de acréscimos superiores aos seus respectivos controles no peso corporal por indivíduo, para concentrações de 3,75 Mg.ha⁻¹ até 15 Mg.ha⁻¹ no substrato artificial e até a maior dosagem para o solo. Embora estas ocorrências não tenham sido estatisticamente significativas.

O último indicador avaliado foi o número de indivíduos jovens presnetes ao final do experimento. Foi possível verificar números minhocas jovens mais reduzidos nos tratamentos do que em seus respectivos controles, para todos os substratos avaliados. As três maiores doses e concentrações,

em se tratando do substrato artificial, solo natural e esterco bovino foram prejudicados nesta medida, ficando com valores próximos da metade do controle, ou bem abaixo disto. Comportamento oposto foi destacado para o solo com histórico mais longo de aplicação, onde o solo explorado como disposição final do RSAT teve em média 11 jovens a mais que o não utilizado.

TABELA 7. Indicadores avaliados para minhocas da espécie *E. andrei* crescidas em solo natural, substrato artificial, solo com histórico e esterco bovino, nos testes de mortalidade e reprodução.

Substrato artificial	Mortes 14° dia	Biomassa.minhoca ⁻¹ 28° dia ²	Jovens 56° dia
--- Mg.ha ⁻¹ ---	----- % -----	----- mg -----	----- N° -----
3,7 - Controle	12,5 - 10 (0,999) ¹	84 - 64 (0,996)	23 - 20 (0,368)
7,5 - Controle	22,5 - 10 (0,684)	90 - 64 (0,992)	21 - 20 (0,995)
15 - Controle	17,5 - 10 (0,985)	86 - 64 (0,994)	11 - 20 (<0,001)
30 - Controle	15,0 - 10 (0,942)	59 - 64 (0,999)	10 - 20 (<0,001)
60 - Controle	92,5 - 10 (0,002)	-129 - 64 (0,075)	01 - 20 (<0,001)
Solo natural	Mortes 14° dia	Biomassa.minhoca ⁻¹ 28° dia ²	Jovens 56° dia
--- Mg.ha ⁻¹ ---	----- % -----	----- mg -----	----- N° -----
3,7 - Controle	15 - 10 (0,777)	60 - 24 (0,935)	17 - 22 (0,060)
7,5 - Controle	7,5 - 10 (0,975)	79 - 24 (0,740)	18 - 22 (0,147)
15 - Controle	15 - 10 (0,777)	80 - 24 (0,749)	10 - 22 (<0,001)
30 - Controle	15 - 10 (0,733)	61 - 24 (0,932)	12 - 22 (<0,001)
60 - Controle	15 - 10 (0,777)	26 - 24 (0,999)	10 - 22 (<0,001)
Solo Histórico de uso	Mortes 14° dia	Biomassa.minhoca ⁻¹ 28° dia ²	Jovens 56° dia
----- % -----	----- % -----	----- mg -----	----- N° -----
2005 com - sem	10 - 15 (0,777)	156 - 69 (0,020)	27 - 16 (0,068)
2013 com - sem	22 - 17 (0,975)	116 - 40 (0,168)	11 - 11 (1,000)
Esterco	Mortes 14° dia	Biomassa.minhoca ⁻¹ 28° dia ²	Jovens 56° dia
----- % -----	----- % -----	----- mg -----	----- N° -----
1,5 - Controle	0 - 0 (1,000)	274 - 282 (0,999)	45 - 47 (0,978)
3 - Controle	2,5 - 0 (0,997)	115 - 282 (0,199)	38 - 47 (0,144)
6 - Controle	17,5 - 0 (0,454)	61 - 282 (0,058)	21 - 47 (0,001)
12 - Controle	42,5 - 0 (0,030)	-91 - 282 (0,001)	09 - 47 (<0,001)
24 - Controle	42,5 - 0 (0,030)	-128 - 282 (<0,001)	00 - 47 (<0,001)

¹ Valores de p para o teste de Dunnett a 5% de probabilidade de erro.

² Diferença entre biomassa final e inicial.

Como não existem precedentes para o efeito em minhocas quanto ao uso de resíduo fumageiro, em solo ou ambiente de vermicompostagem, os

dados obtidos no presente trabalho foram comparados a outros resíduos em estudos ecotoxicológicos padronizados ou não. Massukado e Schalch (2010) encontraram mortalidade significativa de minhocas da espécie *E. andrei* utilizando resíduos sólidos domiciliares compostados misturados ao substrato artificial. Este efeito foi aparente a partir da mistura que levava 16% do composto. Os autores atribuem o efeito tóxico a condutividade elétrica do material, que chegou a $1901 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ e do teor de NH_4 de $456,67 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, já que a concentração de metais pesados e os demais parâmetros químicos e físicos se aproximavam da faixa ideal para os organismos. Contudo, Lauschner (2005) trabalhando exatamente com o mesmo resíduo fumageiro e com as mesmas doses de aplicação do presente trabalho, encontraram condutividades de 887, 1106, 1055 e $935 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ para as doses de 7,5; 15; 30 e $60 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$, respectivamente. Da mesma forma, os teores de NH_4 permaneceram abaixo do encontrado como tóxico no trabalho citado anteriormente, não superando os $3,08 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Além disso, é importante ressaltar que os autores obtiveram ausência de mortalidade das minhocas quando a condutividade elétrica foi de $1081 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, para a mistura com 8% do composto de origem domiciliar, bastante próxima da obtida para a dose de $60 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ do RSAT, que apresentou alto índice de mortalidade (Tabela 7). Isto demonstra que para o RSAT, pode não ser este parâmetro o motivo do percentual de mortalidade apresentado.

Lima (2010) destaca, que testes de mortalidade expressam resultados de toxicidade quando o agente contaminante é disposto ou encontrado em doses ou concentrações muito altas. Isto vem ao encontro dos resultados obtidos no trabalho, onde apenas as doses ou concentrações mais elevadas apresentaram mortalidade expressiva. Conforme mencionado em diversas trabalhos (Gestel et al., 1991; Rinke e Wiechering, 2001; Spurgeon et al., 1994), o uso da mortalidade como *end point*, não é o parâmetro mais sensível para prever efeitos em populações de campo. Esse ensaio indica o perigo máximo de um contaminante para com os organismos teste e, geralmente, apenas com concentrações acima das habituais se estabelece algum efeito letal.

Entre os meios utilizados no experimento, apenas o substrato artificial com maior dosagem foi tóxico a ponto de causar mortes significativas.

Segundo Spurgeon et al. (2003) em testes de toxicidade aguda que utilizam este tipo de substrato, a biodisponibilidade de poluentes é maior do que quando os solos são coletados em áreas naturais. Entretanto cabe destacar que isto não isenta o RSAT de causar efeitos negativos nos organismos testados em outros ambientes.

Outras propriedades do solo podem exercer influencia em testes agudos onde o *end point* é a morte, ou em testes crônicos onde, por exemplo, a reprodução e desenvolvimento são os pontos delimitadores do experimento. Assim, como discutido anteriormente nos resultados dos testes de fuga, o conteúdo de matéria orgânica, principalmente, se em estagio de decomposição inicial e o pH encontrado no espaço de crescimento das minhocas são os principais atributos que diferenciam os ambientes testados neste trabalho.

Para os resultados de mortalidade encontrados no substrato artificial e esterco bovino, a elevação do pH após as adições do RSAT poderia ter ocasionado os percentuais obtidos aos 14 dias. Os 92,5% de mortes encontrados no substrato artificial com adição de 60 Mg.ha⁻¹ do resíduo, teriam relação com o súbito aumento do pH que passou de 6,0 para 9,4, já aos 7 dias (Tabela 8). Da mesma forma que os ambientes de vermicompostagem, com concentrações de 12 e 24% do RSAT, ambos com 42,5% de mortalidade, passando de um pH de 7,8 para 8,9 e 9,4, respectivamente, aos 14 dias (tabela 8).

No entanto, doses e concentrações imediatamente menores que as supracitadas também tiveram pH altos, com 8,9, no substrato artificial e 8,5 no esterco bovino, sendo que nos dois casos não foram constatadas mortes significativas.

Da mesma forma, Holz et al. (2010) utilizando cinza de eucalipto na mistura com esterco bovino, obteve medidas de pH entre 8,0 e 9,7, apresentando menos de 10% de mortes após 56 dias. Porém, constatando decréscimos na produção de casulos quando o pH foi mais básico. Mostrando que provavelmente no presente estudo os casos de mortes sejam oriundos de algum fator relacionado diretamente ao resíduo fumageiro.

Os casos onde não são detectados resultados deletérios em testes ecotoxicológicos agudos de mortalidade podem ser apontados efeitos no desenvolvimento e reprodução. O que geralmente ocorre é a perda de

biomassa conforme a quantidade de contaminante aumenta (Dores-Silva et al., 2013). Os autores averiguaram a existência de toxicidade de lodo de esgoto doméstico misturado ao solo, apenas com uso de ensaios crônicos, medindo perda/ganho de biomassa e reprodução, os resultados mostraram quedas no peso.indivíduo⁻¹, após 28 dias e total inabilidade de reproduzir quando em contato com o bio sólido, sem obter qualquer indício de morte de minhocas.

TABELA 8. Valores de pH dos substratos utilizados no experimento de mortalidade e reprodução, medidos em cada etapa de avaliação.

Substratos	pH em H ₂ O			
	----- Dia -----			
	7 ^o	14 ^o	28 ^o	56 ^o
Solo natural				
Controle	4,2	4,3	4,2	4,1
3,75 Mg.ha ⁻¹	4,4	4,5	4,4	4,3
7,5 Mg.ha ⁻¹	5,2	5,1	4,8	4,8
15 Mg.ha ⁻¹	6,3	6,7	6,3	6,2
30 Mg.ha ⁻¹	7,2	7,4	7,4	7,2
60 Mg.ha ⁻¹	8,0	8,2	7,9	7,8
Substrato artificial				
Controle	6,0	6,1	6,0	5,9
3,75 Mg.ha ⁻¹	6,3	6,5	6,5	6,3
7,5 Mg.ha ⁻¹	7,4	7,7	7,5	7,4
15 Mg.ha ⁻¹	8,1	8,4	8,3	8,0
30 Mg.ha ⁻¹	8,9	8,9	8,4	8,3
60 Mg.ha ⁻¹	9,4	9,3	8,9	8,7
Solo com histórico				
2005 sem	5,4	5,4	5,3	5,3
2005 com	6,3	6,2	6,2	6,2
2013 sem	4,8	4,9	4,9	4,7
2013 com	4,7	4,7	4,6	4,6
Esterco bovino				
Controle	7,8	7,8	7,7	7,6
1,5%	7,9	7,9	7,7	7,6
3%	7,9	7,9	7,8	7,7
6%	8,4	8,5	8,2	8,0
12%	8,7	8,9	8,9	8,7
24%	9,3	9,4	9,4	8,9

Diferente disso, os aumentos em peso.minhoca⁻¹ obtidos com RSAT adicionado ao solo natural e substrato artificial, mostram que este foi

positivamente assimilado pelas minhocas sobreviventes até sua retirada aos 28 dias. Exceto nas doses de 30 e 60 Mg.ha⁻¹ em substrato artificial, que mostraram biomassa menor que seu tratamento controle, inclusive com decréscimos do índice (Tabela 7). Esta oposição de comportamento dos resultados entre os dois trabalhos pode ser atribuída, principalmente, pelo fato do lodo ter sido utilizado sem ser estabilizado e pela presença de metais pesados neste material, o que não ocorre no RSAT, com teores baixos destes elementos (Laushner, 2005).

Foi possível detectar tendência inversamente proporcional entre ganho de biomassa e aumento das doses do RSAT nos solos. Quanto maiores as doses aplicadas nos solos, menores foram os incrementos de biomassa.indivíduo⁻¹. Revelando que os aumentos em material orgânico proporcionado pelo resíduo não são suficientes para melhorar o crescimento dos organismos. Além disso, os acréscimos das medidas de pH encontrados quando as doses do resíduo eram dobradas, distanciam o parâmetro do ideal para o desenvolvimento das minhocas, reduzindo o seu ganho em biomassa.

Quando se compararam os dois controles do substrato artificial e solo natural, os acréscimos de biomassa inicial são maiores no primeiro, superiores em 30 mg.minhoca⁻¹. Para este caso, o maior teor de material orgânico, aliado ao pH próximo do ideal, podem ter tido papel fundamental no resultado deste índice biométrico. Estes resultados mostram que o tipo de material orgânico produzido ou adicionado ao solo modifica e interfere nos ambientes onde estes organismos se desenvolvem. Lima (2010) obteve resultados que mostram o efeito do conteúdo de matéria orgânica encontrado em solos de mata, cultivo de batata e morango, onde quanto maiores os teores de matéria orgânica, menores foram as perdas de biomassa por minhoca aos 28 dias de experimento.

Dos solos com diferentes históricos, o significativo ganho médio de 87 mg de peso.minhoca⁻¹, conseguido no solo que recebe aplicações bianuais de 10 Mg.ha⁻¹ a 10 anos, frente ao seu controle, pode ter estreita relação com as diferenças químicas entre os dois ambientes. Avaliando estas diferenças é possível perceber que o solo com histórico apresenta teores de N, P, K, matéria orgânica e pH superiores a seu controle. O resultado mostra que as condições em que o resíduo foi aplicado, acumulada durante este período na

área onde o solo foi coletado, melhoraram as condições edáficas, a ponto de beneficiar as minhocas em seu ganho de peso.

O presente trabalho mostrou resultados que seguem o mesmo padrão de estudos de longa duração, que avaliam número de organismos e suas biomassas após fertilização orgânica ou mineral. Estevez et al. (1996) em experimento de adubação orgânica via esterco bovino e mineral NPK, com 14 anos de duração, apresentou maiores populações de três espécies de minhocas nas áreas onde o esterco era aplicado anualmente na taxa de 20 Mg.ha⁻¹. Já no estudo de Lordache e Borza (2010), em uma área com histórico de 33 anos de fertilização mineral de N e P, que relacionava atributos químicos de um solo a abundância de minhocas neste ambiente, é possível observar correspondência entre as modificações do pH após anos de fertilização e as biomassa.minhoca⁻¹, onde quanto mais ácido o pH do solo, menor foi o índice biométrico. Whalen et al. (1998) aponta a importância da qualidade do material orgânico disponível no solo em ensaio conduzido por 6 anos em área de cultivo de milho sob aplicação de esterco bovino ou fertilização nitrogenada mineral. Os autores observaram biomassas e populações médias, maiores nos locais onde o resíduo orgânico era adicionado. A principal diferença ocorreu na relação C:N da resteva presente na superfície do solo, sendo de 30:1 com esterco bovino, 10 partes de C a menos que o encontrado na adubação mineral. Sabendo que as minhocas preferem materiais com uma baixa razão (Bohlen et al. 1997; Ketterings et al.1997), pode-se inferir que os 10 anos de utilização do RSAT no solo tenham permitido esta redução da relação, tornado o ambiente propício para o desenvolvimento dos organismos.

No sistema que simulava vermicompostagem de esterco bovino, a menor biomassa encontrada nos tratamentos com RSAT podem estar ligadas tanto ao pH das misturas como a algum constituinte do resíduo. Diferente dos resultados de mortalidade, onde a mistura que levava 6% no material não foi significativa, no índice de peso médio de minhocas sobreviventes nesta proporção mostrou relevância (Tabela 7). Este resíduo sólido na forma de pó, segundo a União Europeia, é considerado tóxico e perigoso, por possuir mais de 500 mg.Kg⁻¹ de nicotina em sua constituição (Civinili et al., 1997). Além do mais, a nicotina pode ser convertida numa variedade de metabolitos intermediários mais tóxicos, tal como: N'-nitrosonornicotina, 4-

(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona, cotinina e N-nitrosaminas (Brunneman et al., 1996). Embora esta molécula possa ser consumida como fonte de C pelos micro-organismos (Gurusamy e Natarajan, 2013), boa parte pode lixiviar devido a sua alta solubilidade (Wang et al., 2005). Isto tende ser um problema, pois além de causar toxicidade em organismos do solo quando aplicado *in natura* pode contaminar a vida aquática em corpos hídricos.

Alguns trabalhos relatam a toxicidade da nicotina em organismos aquáticos. Os efeitos variam entre os organismos testados e vão desde efeitos sub-letais como crescimento, intoxicação, motilidade e reprodução, até efeito letal de mortalidade (Savino e Tanabe, 1989; Best e Morita, 1991). Implicações ecotoxicológicas desta molécula também vêm sendo estudadas em organismos que vivem no solo. O destaque é dado a testes com *Caenorhabditis elegans*, um nematóide bacteriófago utilizado em estudos de genética e desenvolvimento.

O principal alvo da nicotina são os receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs) (Schafer, 2002; Darsow et al., 2005). Estes mediam a neurotransmissão rápida em nervos e músculos, alguns dos quais controlam os músculos sexuais específicos na postura de ovos em *C. elegans* (Kim et al., 2001; Mongan et al., 2002). Além disso, a nicotina pode causar paralisia nos músculos corporais (Matta et al. 2007). Smith Jr. (2011) avaliando as implicações da nicotina sobre a estes nematóides de vida livre, observaram relação dose-resposta para mortalidade após 24 horas de exposição à molécula. Os autores constataram que a partir dose de 3,16 ppm as mortes eram significativamente maiores que o controle. Contudo, a dose letal onde 20% dos organismos estavam mortos, foi atingida quando a concentração era de 26 ppm.

Analisando as mortalidades encontradas para as minhocas, significativas apenas nas concentrações mais elevadas do RSAT, percebe-se comportamento semelhante ao obtido no experimento com os nematoides. No entanto, vale ressaltar as diferenças metodológicas entre os estudos. O ambiente, sendo as minhocas testadas em mesocosmos simulando solo e vermicompostagem, enquanto com os nematóides eram inoculados em placas de petri com meio de cultura específico. Além disso, a forma com que a nicotina foi administrada também foi um diferencial. No presente trabalho via

resíduo sólido, que segundo Meher et al. (1995) possui teores de nicotina entre 3 - 4%, e no experimento com *C. elegans*, através de um produto líquido de alta pureza. Apesar disso, o comparativo entre os dois grupos de organismos é válido, visto que as minhocas também usam os nAChRs como transmissores neuromusculares (Walker et al.,1993), podendo responder a presença de nicotina.

Considerando como indicador o aspecto reprodutivo de *C. elegans*, mais especificamente velocidade de postura e número de ovos, Smith Jr. et al. (2013) mediante quantidades crônicas de nicotina (6,17 até 194,5 μ M), verificaram alterações significativas, quanto maiores eram as doses. Obtendo posturas precoces e aumento na produção de ovos durante as primeiras 72 horas de vida adulta. Embora o RSAT tenha parecido pouco tóxico para as minhocas, quando teve a mortalidade avaliada na 2ª semana e a biomassa até a 4ª semana, para o aspecto reprodutivo doses e concentrações intermediárias foram prejudiciais na contagem de jovens aos 56 dias de experimento. Isto demonstra, mesmo que as minhocas possam se beneficiar da nicotina presente no resíduo, para o aumento na postura de casulos, após o nascimento as minhocas tenderam a ser prejudicadas conforme a quantidade de RSAT era aumentada.

Resíduos com alguma toxicidade descartados no solo podem comprometer a imunidade dos organismos que habitam o local. Segundo Brousseau et al, (1997) e Fournier et al. (2000) espécies imunodeficientes seriam mais propensas a infecções e doenças, sendo menos capazes de sustentar um estresse ambiental adicional. Isso pode ocorrer com maior severidade em animais mais jovens. Conforme, Sauvé e Fournier (2005) que investigaram a imunocompetência de minhocas da espécie *E. andrei* com diferentes idades, quando expostas ao cloreto de metilmercurio, puderam concluir que quanto mais jovens eram as minhocas, maior era sua sensibilidade ao xenobiótico. Os dados mostraram que indivíduos jovens foram até três vezes mais sensíveis ao metal, desencadeando inclusive mais mortes para esta faixa etária. Da mesma forma Spurgeon e Hopkin (1995 e 1996) realizando experimentos com minhocas juvenis e adultas da espécie *E. fetida*, constataram índices de mortalidade distintos entre os dois grupos. No trabalho

os mesmos sítios contaminados com metais geraram mortes significativas em organismos juvenis, sem repetir o efeito em indivíduos adultos.

Os resultados do efeito das diferentes doses do RSAT na biomassa das minhocas, crescidas nos solos e esterco, não modificaram significativamente a forma como este parâmetro de altera ao longo do tempo em cada ambiente estudado. Ou seja, em nenhum dos casos houve interação entre tempo de crescimento e doses, históricos ou concentrações utilizadas. Considerando os fatores separadamente, independentes dos substratos testados, o RSAT em quantidades diferentes, foi significativo para o comportamento de perda e ou ganho de peso no grupo de minhocas presentes. Por outro lado, para o fator tempo não foi expresso significância nos substratos solo natural e esterco bovino, mostrando que as doses e concentrações alteraram este atributo independente da idade das minhocas.

Analisando o substrato artificial no 7º dia, temos quedas na biomassa por individuo sobrevivente para quatro doses, em ordem crescente de reduções para, 7,5; 3,75 Mg.ha⁻¹, controle e mais acentuada em 60 Mg.ha⁻¹. Com acréscimos na biomassa, as doses 15 e 30 Mg.ha⁻¹, respectivamente com 5,5 e 26% (Figura 7).

Na segunda semana de avaliação, todos os tratamentos, exceto o de maior dosagem de aplicação permaneceram acima do peso inicial, embora tenha sido observada uma queda para o tratamento de 30 Mg.ha⁻¹ de 18 pontos percentuais com relação ao período anterior (Figura 7).

Na última data de pesagem, as cinco doses e o controle mostraram recuperação variando de 23,7% para o controle, a 32,1% na dose 15 Mg.ha⁻¹.

A mortalidade para estes intervalos de tempo se mostrou significativa, na concentração de 60 Mg.ha⁻¹, atingindo 92,5% de mortes já na primeira semana (Tabela 9).

Para o solo natural, os piores percentuais de ganho ou perda de peso foram sempre do controle, sem adição de RSAT (Figura 8). Neste solo, a sobrevivência foi de no mínimo 77,5% na quarta semana de avaliação. Não diferindo do tratamento controle que atingiu o percentual de 85% para o mesmo período (Tabela 10).

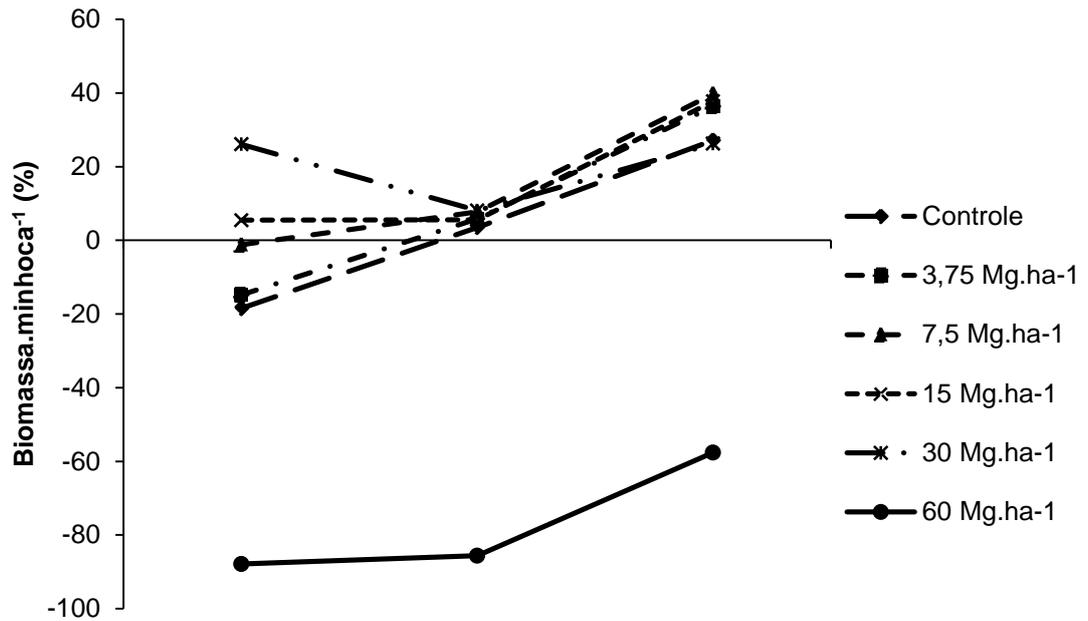


FIGURA 7. Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca⁻¹, durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie *E. andrei* em substrato artificial, sob condições controladas.

TABELA 9. Mortalidades durante teste de efeito crônico do RSAT em minhocas da espécie *E. andrei* em substrato artificial sob condições controladas.

Doses Mg.ha ⁻¹	Mortalidade		
	7º dia	14º dia	28º dia
Controle	5 a ¹	10 a	10 a
3,75	2,5 a	12,5 a	32,5 a
7,5	7,5 a	22,5 a	37,5 ab
15	15 a	17,5 a	32,5 a
30	5 a	15 a	32,5 a
60	92,5 b	92,5 b	92,5 b

¹ Médias seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Os organismos sobreviventes nos solos com e sem histórico de aplicação do RSAT proporcionaram incrementos sempre crescentes de biomassa entre a primeira e quarta semana de avaliação (Figura 9). Minhocas crescidas em solos sem histórico obtiveram crescimentos próximos da linearidade, enquanto que solos com prévia aplicação, após a primeira semana mais do que dobraram de peso alcançando um acréscimo aproximadamente de 43 pontos percentuais em um período de 15 dias (Figura 9).

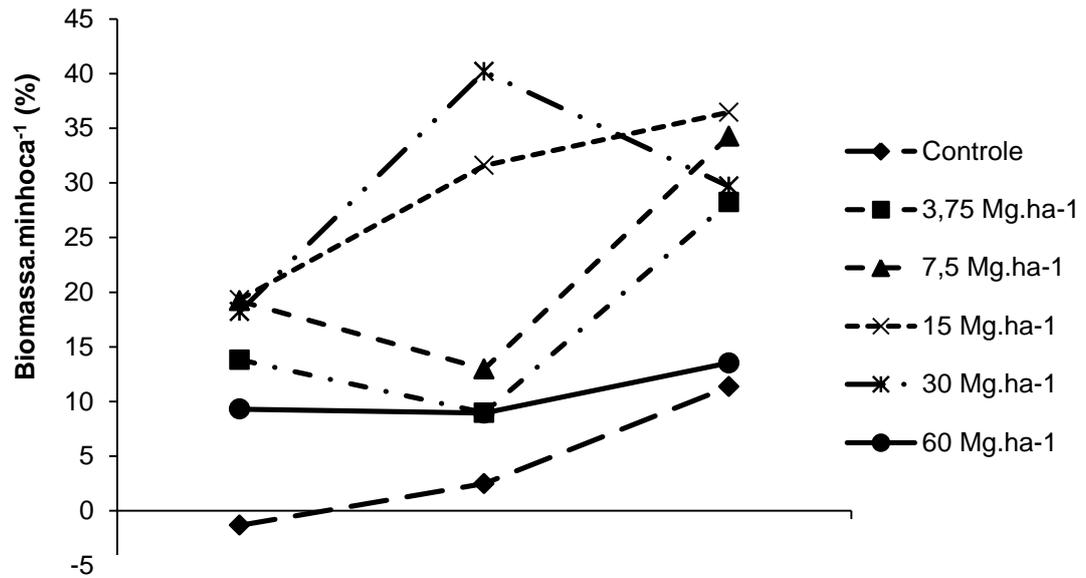


FIGURA 8. Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca⁻¹, durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie *E. andrei* em solo natural, sob condições controladas.

TABELA 10. Mortalidades durante teste de efeito crônico do RSAT em minhocas da espécie *E. andrei* em solo natural sob condições controladas.

Doses	Mortalidade		
	7º dia	14º dia	28º dia
Mg.ha ⁻¹	----- % -----		
Controle	10 ns ¹	10 ns	15 ns
3,75	12,5 ns	15 ns	17,5 ns
7,5	7,5 ns	7,5 ns	15 ns
15	15 ns	15 ns	22,5 ns
30	15 ns	15 ns	17,5 ns
60	0 ns	15 ns	22,5 ns

¹ Média seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Não significativo (ns)

Assim como ocorreu no solo natural, nos solos com histórico de aplicação do RSAT não foi constatado percentual de mortes com diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 11). Os resultados obtidos para os mesocosmos que levaram como substrato o solo natural, substrato artificial ou solo com histórico, o que se viu foram aumentos das mortalidades e recuperações de biomassas ao final dos 28 dias de permanência das minhocas nos ambientes testados. Lima (2010) relacionou o ineficiente fornecimento ou a falta de alimentação as minhocas, aos seus resultados quanto a mortalidade e a biomassa de *E. andrei* em teste agudo e crônico, em solo natural e substrato

artificial. No trabalho a autora verificou que ocorreram perdas de peso aos 7, 14 e 28 dias devido a falta de alimento e não ao contaminante testado, sem encontrar mortes significativas de indivíduos.

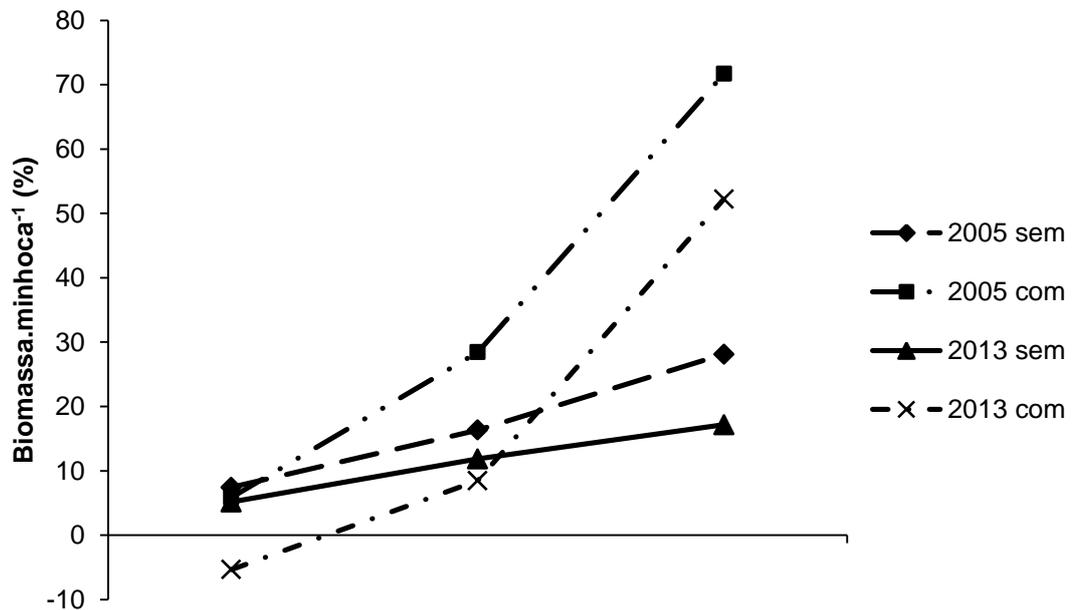


FIGURA 9. Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca⁻¹, durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie *E. andrei* em solo com histórico de uso do resíduo, sob condições controladas.

TABELA 11. Mortalidades durante teste de efeito crônico do RSAT em minhocas da espécie *E. andrei* em solo com histórico sob condições controladas.

Históricos	Mortalidade		
	7º dia	14º dia	28º dia
	----- % -----		
2005 com	7,5 ns ¹	10 ns	22,5 ns
2005 sem	12,5 ns	15 ns	27,5 ns
2013 com	2,5 ns	22,5 ns	22,5 ns
2013 sem	17,5 ns	17,5 ns	30 ns

¹ Média seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%. Não significativo (ns).

A diferença encontrada entre os resultados dos estudos pode ser atribuída a dois fatores: o fornecimento semanal de 5 g de esterco seco e moído, e ao tipo de contaminante testado. No estudo citado, a autora iniciou a alimentação a partir do 14º dia, utilizando a mesma quantidade expressa aqui. Além disso, fez uso de solos naturais coletados em áreas com históricos de exploração agrícola e uso de defensivos industrializados. Nos experimentos do

presente trabalho, houve o fornecimento de alimento, desde o 7^o dia do ensaio, e o material testado é de natureza orgânica. Isto pode explicar os aumentos de biomassa encontrados ao final do ensaio, mostrando que os organismos sobreviventes (biomassa por indivíduo sobrevivente) foram capazes de utilizar o RSAT como fonte de alimento, obtendo biomassas maiores que seus respectivos controles. Padrão não encontrado apenas quando o resíduo foi aplicado na dose de 60 Mg.ha⁻¹ em substrato artificial.

Segundo Spurgeon et al. (2003) o ato de alimentar os organismos testados pode beneficiar a credibilidade dos resultados. Os autores destacaram que a falta de alimento para os organismos durante o teste de mortalidade pode provocar decréscimo de biomassa nos organismos teste, inclusive nos controles. Desse modo, a recomendação, é de adicionar alimento nos recipientes testes evitando um possível estresse aos organismos provocado por inanição, já que isso poderia mascarar os resultados toxicológicos que são o objetivo da avaliação. Nesta linha, um teste que emprega a adição de alimento, a perda de peso poderia ser utilizada como um critério de validação do teste, considerando os recipientes controles. Onde se a variação de peso nos solos contaminados for significativamente pior do que no controle, esse efeito pode ser considerado como uma indicação de efeito subletal.

O ambiente de vermicompostagem de esterco bovino proporcionou ganhos de até 167% do peso inicial. Estabelecendo-se um padrão de menor ganho de biomassa conforme a concentração do RSAT era aumentada (Figura 10). Para as misturas que levaram 12 e 24% apresentaram perda de peso quando comparado a sua pesagem inicial. O número de organismos mortos foi significativo para os mesmos tratamentos que apresentaram redução no parâmetro biomassa, atingindo 45% de mortes no tratamento 12% RSAT e 72,5% quando o dobro de resíduo foi empregado (Tabela 12). O esterco bovino se difere do solo como base para o desenvolvimento das minhocas. Entre outros fatores, a qualidade nutricional e o conteúdo de matéria orgânica existentes neste dejetos o tornam um material mais equilibrado para este fim, sendo inclusive utilizado para manutenção de matrizes no período anterior aos ensaios ecotoxicológicos.

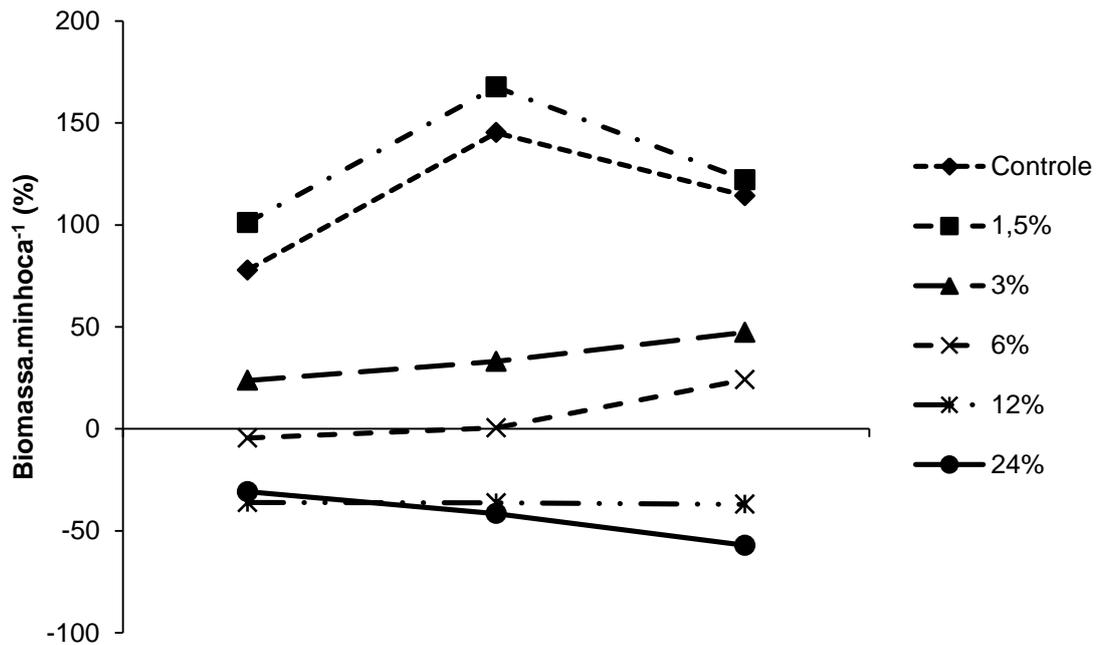


FIGURA 10. Percentuais de perda e ganho de biomassa.minhoca⁻¹, durante teste de efeito crônico do RSAT, em minhocas da espécie *E. andrei* em esterco bovino, sob condições controladas.

TABELA 12. Mortalidades durante teste de efeito crônico do RSAT em minhocas da espécie *E. andrei* em esterco sob condições controladas.

Concentrações	Mortalidade		
	7º dia	14º dia	28º dia
%	----- % -----		
Controle	0 a ¹	0 a	2,5 a
1,5	0 a	0 a	0 a
3	0 a	2,5 a	5 a
6	12,5 a	17,5 a	17,5 a
12	27,5 ab	42,5 b	45 b
24	35 b	42,5 b	72,5 b

¹ Média seguidas das mesmas letras nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

Já o solo, a qualidade nutricional tende a melhorar pela adição do RSAT, quando este acrescenta nutrientes e material orgânico a mistura.

Segundo Antonioli et al. (2009) o esterco bovino é o material com mais emprego na criação de minhocas e produção de vermicomposto. Desta forma, vários testes visam analisar o desempenho biológico de misturas de materiais com este esterco em espécies de minhocas (Schirmer, 2010; Zibetti, 2013; Schiavon 2007). O que se percebe nestes trabalhos são alterações, principalmente, químicas e físicas, que levam as minhocas a responderem de maneira distinta.

Além das já discutidas modificações químicas do pH após adição do RSAT e da presença da nicotina neste resíduo, mudanças de natureza física também podem desencadear diferentes comportamentos. Schiavon et al. (2007) utilizando a casca de arroz na mistura, obteve desempenho superior, aos 7, 14 e 28 dias, para o tratamento que levava 25% do resíduo agroindustrial, quando comparado ao controle com esterco puro. Esta resposta foi atribuída as características físicas do substrato. O percentual de mistura facilitou a locomoção e respiração em comparação ao controle apenas com esterco bovino. No entanto, conforme a mistura era aumentada, por exemplo, 50% de casca de arroz *in natura*, a influencia foi negativa para o ganho de biomassa e crescimento das minhocas, pela desidratação do esterco para a casca ou pela diluição da composição do substrato, reduzindo sua qualidade nutricional.

O RSAT, devido a sua granulometria, pode levar a um maior adensamento dentro do recipiente de criação, ocasionando dificuldade de respiração e o próprio deslocamento das minhocas. Contudo, no trabalho onde as misturas tinham casca de arroz carbonizada, que também provoca as mesmas modificações físicas que o RSAT promove, não foram encontradas mortes significativas, diferente do que se obteve nas duas maiores proporções do resíduo fumageiro. Tal resultado indica que o problema não é apenas físico, mostrando que em grande quantidade o RSAT pode causar toxicidade às minhocas.

Ao mesmo tempo, foi observado que o auge em aumento de biomassa aconteceu entre o 7º e 14º dia, para o tratamento com 25% de casca de arroz. De forma semelhante ocorreu nos dois melhores resultados de peso.minhoca⁻¹ do presente estudo, onde o controle com esterco bovino puro e 1,5% de RSAT obtiveram seu máximo aos 14 dias. Singh e Suthar (2012) estudando a viabilidade do uso de resíduo de indústria farmacêutica, como componente da mistura com esterco bovino na vermicompostagem, também encontraram ganhos máximos de biomassa no início (10 dias) do experimento. O resultado foi atribuído a dois fatores. Primeiramente devido ao decréscimo de qualidade do substrato, onde conforme os dias passam as minhocas consomem o material, acelerando sua biotransformação, tornando o material remanescente cada vez menos atrativo. A segunda suposição é que

organismos estressados por algum fator ambiental podem acelerar a ingestão de alimento e conseqüentemente apresentar êxito inicial no ganho de peso.

No caso do RSAT, podem ter ocorrido as duas hipóteses. A primeira durante o período do experimento dos animais crescidos em substrato a base de esterco não foi fornecida nenhuma alimentação suplementar. Isto deve ter levado a queda de biomassa após as minhocas atingirem o pico para este atributo. A segunda, o estresse ambiental causado pela adição do resíduo fumageiro, seja físico ou químico, podem ter levado as minhocas a consumirem o substrato, apresentando aumento inicial do peso corpóreo.

4.4 Teste adaptação e viabilidade de casulos

Observações quanto a aspectos morfológicos e de comportamento não se mostraram aparentes nos momentos das avaliações. Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos para cada período de avaliação quando o parâmetro em questão foi a biomassa por minhoca sobrevivente (Figuras 13 e 14). Com exceção na avaliação aos 120 dias, nos substratos solo, onde tanto o tratamento de adaptação quanto o sem adaptação diferiram do controle (Figura 11).

No solo natural, o tratamento controle permaneceu perdendo peso durante todas as determinações desta medida (Figura 11). Neste ambiente, apenas após 120 dias, com dose de aplicação equivalente a 30 Mg.ha^{-1} , os tratamentos testes de adaptação e sem adaptação apresentaram ganhos de biomassa quando comparada ao período imediatamente anterior (Figura 11).

Quanto a mortalidade, as minhocas se comportaram de maneira diferente entre os tratamentos, havendo diferenças com significado estatístico a partir dos 90 dias onde a dosagem foi de 15 Mg.ha^{-1} (Tabela 13). Nesta data de avaliação, o percentual de mortes no tratamento sem adaptação foi 5,6 vezes maior que o solo controle e 2,5 vezes maior que o ambiente onde se testava a adaptação. Quando a quantidade de RSAT utilizada foi de 30 Mg.ha^{-1} as maiores mortandades chegaram a 38% do tratamento Adaptação, sendo 27% no controle negativo (tratamento sem adaptação) e 8,3% no controle positivo (solo sem RSAT).

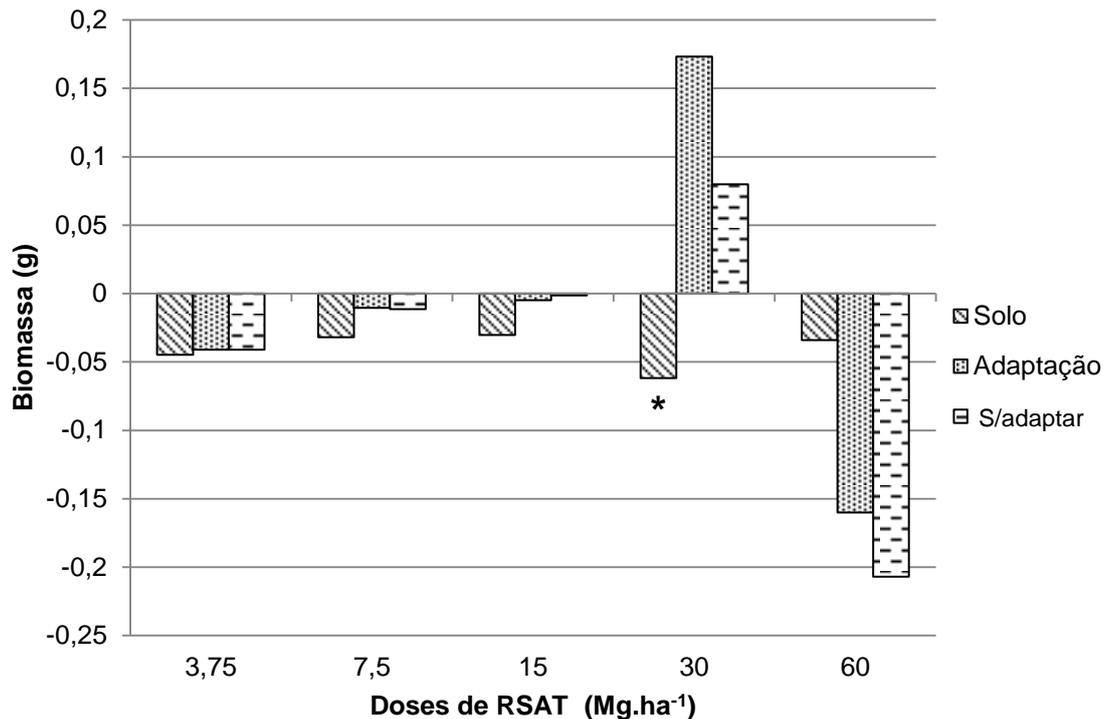


FIGURA 11. Biomassa.minhocas⁻¹ sobreviventes (a cada 30 dias) crescidas em solo. (*) Diferença estatística para cada dose, ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. RSAT (Resíduo sólido da agroindústria do tabaco).

No momento da última avaliação, a média de sobrevivência nos frascos onde se buscava averiguar a possibilidade de adaptação das minhocas, foram perdidos somente 17% dos organismos (Tabela 14). Percentual baixo se comparado com o que ocorreu no tratamento sem adaptação, onde um espécime sobreviveu dos 10 iniciantes. Da mesma forma que apenas 41% dos organismos permaneceram vivos no solo sem adição do resíduo (Tabela 13).

TABELA 13. Percentual de mortes de minhocas da espécie *E. andrei*, crescidas em solo. Valores correspondem ao número de organismos que iniciaram o período imediatamente anterior (a cada 30 dias).

Ambiente	Mg.ha ⁻¹				
	30 dias 3,75	60 dias 7,5	90 dias 15	120 dias 30	150 dias 60
	----- % -----				
Solo	0 (10) ¹	7 a ³ (9,2)	5,3 a (8,7)	8,3 a (8)	59 b (3,5)
Adaptação	0 (10)	7 a (9,2)	12 ab (8)	38 c (5)	17 a (4)
Sem ad. ²	0 (10)	12 a (8,7)	30 c (7)	27 b (7,2)	90 b (1)

¹ Dados entre parênteses indicam o número de organismos sobreviventes (depois de 30 dias). Média de quatro repetições.

² tratamento sem adaptação, iniciavam com 10 minhocas.frasco⁻¹.

³ Letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Os resultados obtidos neste experimento, para o ambiente onde o substrato base era o solo natural diferiu dos dados verificados no teste crônico do resíduo. Algumas diferenças metodológicas e de condução entre os estudos contribuiram para isto. Primeiramente, aspectos ligados as minhocas utilizados nos trabalhos. A biomassa e a idade iniciais das minhocas foram menores no teste crônico quando comparado ao teste de adaptabilidade, descritos nos itens 3.7, 3.7.1 e 3.8.1. Além disso, pode ter ocorrido influencia de fatores ambientais como: presença de luz (12 horas no teste crônico) e quantidade de substrato (aproximadamente 500 g no teste crônico, menos da metade do utilizado no teste de adaptação). Somado ao supracitado, embora as dosagens do RSAT tenham sido exatamente as mesmas em ambos os testes, o tempo de condução dos trabalhos foram distintos, de 28 dias na avaliação do efeito crônico e de 150 dias (Tabela 3) quando o objetivo era a capacidade de adaptação.

Analisando de forma combinada os dados mortalidade e de ganho/perda de peso, do tratamento sem adaptação do teste de adaptação, verifica-se para dosagem de $3,75 \text{ Mg.ha}^{-1}$ ausência de mortes com queda da biomassa inicial após 30 dias. Já no teste crônico, transcorridos 28 dias, observou-se 17,5% de mortalidade, com ganho de peso para os organismos sobreviventes. Neste caso específico, onde tempo de condução foi praticamente o mesmo, e as idades das minhocas eram muito próximas, é possível que o estresse causado pela incidência de 12 horas de luz sobre as unidades experimentais tenha desencadeado as mortes, proporcionado um aumento inicial do consumo de alimento nos organismos sobreviventes, hipótese levantada por Singh e Suthar (2012) discutida anteriormente no trabalho.

Conforme Chuang et al. (2006) a incidência de luz, especialmente a UV, pode desencadear efeitos adversos de natureza aguda ou crônica em minhocas. Essas implicações vão depender da intensidade e tempo de exposição a que os organismos são submetidos. Segundo os autores minhocas que vivem na superfície do solo, como no caso das epigeicas, apenas poucas horas de exposição à radiação já podem desencadear mortes de indivíduos. O fato dos recipientes utilizados nos testes crônicos serem transparentes e levarem menos da metade do conteúdo em substrato base, com relação ao ensaio de adaptação, podem ter contribuído para o número de mortes, pois os

organismos tinham menos espaço físico para se proteger da radiação. No ambiente onde não houve incidência da luz, não foram constatadas mortes. Contudo, observou-se tendência de queda no peso por indivíduo, sem, no entanto diferir do tratamento que não possuía aplicação o RSAT. Isto leva a entender que nesta dose, o resíduo não apresentava influencia negativa nas minhocas, sendo inclusive material que contribui para o atributo ganho de biomassa.

Esta argumentação se confirma quando se analisa os controles sem adição do resíduo. Um ganho de peso de 0,024 g no teste crônico, menor que todos os tratamentos com adição RSAT, apontando 15% de mortes. Divergindo do teste de adaptação, que obteve uma queda na biomassa.indivíduo⁻¹ de 0,05 g, maior que o observado no tratamento sem adaptação, sem ocorrência de mortes. Mostrando que os 5 g de esterco secos e moídos adicionados semanalmente foram suficientes para um pequeno aumento na biomassa dos sobreviventes, mas não permitiram o ganho de peso quando o número inicial de minhocas foi igual ao final. Lima (2010) e Spurgeon et al. (2003) destacam que a alimentação preconizada pelos testes padronizados, geralmente é insuficiente para os 10 organismos que iniciam os ensaios. Contudo, em caso de mortes o número reduzido de minhocas pode se beneficiar deste suprimento, mantendo ou até ganhando peso corporal.

Nas comparações seguintes, o fator idade e permanência no substrato solo, conforme explicado na Tabela 3, podem ter exercido influencia nos resultados dos dois ensaios. Como o solo caracteriza-se como um ambiente pobre em matéria orgânica (Tabela 2). Organismos cada vez mais velhos e com pouco aporte de alimento, tenderam a tornar-se mais debilitados (Lima 2010; Reinecke e Vijjoen, 1990). Ao serem expostos a doses crescentes do RSAT, tiveram a mortalidade gradualmente aumentada. Contudo, a biomassa diminuiu cada vez menos chegando ao ponto de apresentarem recuperação na penúltima avaliação para os organismos sobreviventes, diferindo significativamente do controle. Tal fato não se repetiu quando, os organismos que estavam em estado nutricional adequados para a condição fisiológica momentânea, eram submetidos a doses maiores do RSAT. Mesmo ocorrendo mortes em todas as concentrações, as minhocas remanescentes se beneficiaram da adição do resíduo, apresentando acréscimos neste atributo.

A interação de estado de fome ou inanição com substâncias potencialmente tóxicas, em comparação a interação com outros estressores naturais como, temperaturas extremas e déficits de umidade, tem sido pouco estudadas (Holmstrup et al., 2010). Contudo, experimentos com outros organismos atestam que podem existir sequelas de períodos sem suficiente aporte de alimento combinados a presença de agentes tóxicos. Campero e De Block (2008) trabalhando com larvas de *Coenagrion puella* submetida a diferentes doses de endosulfam após período de privação de alimento, observou que as fêmeas posteriormente tratadas com o produto, recuperaram a biomassa na sua totalidade, não sendo verificado mesmo comportamento nos machos, que não atingiram a mesma biomassa dos indivíduos que mantiveram aporte de alimento do início ao fim do ensaio. Os autores relatam que no caso destes organismos é esperada resposta diferencial entre os sexos. Para as fêmeas, no momento que atingem a maturidade o atributo mais importante é ter biomassa ótima, diferente dos machos onde a idade caracteriza-se como fator determinante para o sucesso reprodutivo. Por isso os mecanismos de recuperação após o estresse são diferentes para fêmeas e machos.

No caso do presente estudo, os organismos hermafroditas, submetidos à restrição de alimento por período prolongado, foram menos competentes na recuperação da biomassa.indivíduo⁻¹ do que organismos que não passaram pelo mesmo período de fome. Isto deve ter ocorrido pelo fato das distribuições das reservas de energia nestes períodos de escassez ser realizada de maneira preferencial, sendo desviada maior parte para manutenção das funções vitais, depois o aspecto reprodutivo que garante o sucesso da espécie é prioridade e apenas em terceiro lugar o crescimento é levado em conta (Johnston et al., 2014).

Quanto aos tratamentos de adaptação, em que um mesmo grupo de minhocas era gradualmente submetido a doses maiores do resíduo fumageiro. Embora não se tenha estabelecido em nenhum momento, diferença estatística quando comparada com a biomassa do controle negativo. O que se viu foi uma tendência a melhores resultados para esta medida em minhocas anteriormente expostas ao RSAT. Já para a mortalidade, foi bastante expressivo o contraste dos dados, principalmente quando avaliado na dose mais elevada do resíduo. Ao analisar esta mortalidade, percebe-se a capacidade de adaptação as

condições estabelecidas no ambiente experimental. O grupo de cinco minhocas sobreviventes após 150 dias de ensaio, advindas de sucessivos aumentos na dose de resíduo aplicada, apresentou apenas um indivíduo perdido na presença de $60 \text{ Mg}\cdot\text{ha}^{-1}$ do RSAT. Enquanto que no tratamento sem adaptação, onde as minhocas passaram o mesmo período sem ter contato com o RSAT, encerraram com um único sobrevivente.

Nas condições em que o ensaio foi conduzido, o ambiente natural se assemelha ao encontrado em cada etapa do tratamento controle negativo, ou seja, minhocas presentes no solo pobre sem aporte de alimento, que recebe uma determinada dose de resíduo em determinado momento. Neste caso, os organismos estariam debilitados, podendo responder negativamente com maior facilidade frente a uma modificação do ambiente, a aplicação do resíduo. O aumento gradual do RSAT permitiu que os organismos remanescentes tivessem um tempo para assimilar o material e conforme as doses ou concentrações eram aumentadas estes apresentavam melhores resultados nos parâmetros avaliados.

A capacidade de adaptar-se a um ambiente contaminado já vem sendo estudada para espécies de minhocas, com destaque para contaminação com metais pesados. Os mecanismos de adaptação podem ser diferentes para cada elemento ou resíduo e entre populações de minhocas. Estas adaptações são ligadas a fatores genéticos ou a capacidade fisiológica de aclimatação dos oligoquetas (Aziz et al., 1999; Langdon et al. 2003). Langdon et al. (2003) apresentando dados de um estudo onde duas populações de minhocas coletadas de áreas com e sem histórico de contaminação de arsênico, foram isoladas em ambiente não contaminado por nove semanas, tendo posteriormente a geração seguinte exposta a um ambiente com $2000 \text{ mg As kg}^{-1}$. Estas gerações F1 tiveram a mortalidade significativamente afetada, com 15% e 100% de sobrevivência para descendentes das populações sem e com contato anterior com o metal, respectivamente. Já quando o metal foi o cobre, neste mesmo ensaio, as mortalidades foram estatisticamente iguais, mostrando que as respostas adaptativas variam frente a diferentes contaminantes.

Além da capacidade de adaptação a metais, populações também foram competentes neste sentido quando expostas a contaminantes orgânicos. Minhocas coletadas de áreas com sistemas de cultivo convencional (aplicação

de defensivo) e orgânico, com mais de 20 anos de atividade, foram utilizadas em experimento para testar se ajustamentos fisiológicos contribuiriam para adaptação à presença de epoxiconazole no solo (Givaudan et al., 2014). Fazendo uso de um desenho experimental onde minhocas pré-expostas e sem exposição, eram introduzidas em ambos os ambientes com e sem aplicação do defensivo. Os pesquisadores concluíram que no geral todos os testes metabólicos indicam capacidade de adaptação fisiológica gerada pela pré-exposição ao xenobiótico. Porém, os mesmos não descartam a uma adaptação a nível genético, visto que as minhocas provem de áreas com 20 - 25 anos de uso do defensivo, destacando que mais estudos devem ser conduzidos para averiguar tal hipótese.

No caso do presente estudo a aclimatação fisiológica deve ter sido o fator que permitiu a adaptação das minhocas as doses e concentrações do resíduo fumageiro. Conforme Wirgin et al. (2006) a adaptação fisiológica difere da genética, pelo fato da primeira não ser transferida para os descendentes. Esta ocorre quando a resistência de um indivíduo é aumentada após a sua exposição a doses menores da substância tóxica, e esta desaparece quando o organismo volta a habitar um ambiente limpo. Um exemplo desta adaptação foi a encontrada por Gudbrandsen et al. (2007), que utilizando um período de sete dias de pré-exposição ao mercúrio obteve resultados significativamente superiores para percentuais de sobrevivência e número de casulos produzidos, quando comparado aos tratamentos que não passaram pela etapa adaptativa. Embora o efeito benéfico tenha sido atribuído à exposição inicial, no trabalho concluiu-se que este não teve ligação com os níveis de glutathione, um tiol não protéico, conhecido por proteger as células da presença do mercúrio. Visto que as quantidades de glutathione foram semelhantes em minhocas adaptadas ou não.

Outro fator também atribuído a decréscimos de rendimento em funções vitais como reprodução e crescimento de minhocas quando expostas a contaminantes, é a realocação de energia para o aumento de produção de enzimas de proteção, voltadas a mecanismos de desintoxicação de contaminantes (Calow, 1991; Jansen et al., 2011; Yasmin e D'Souza, 2010). Desta forma, para determinar qual o mecanismo utilizado pelas minhocas na adaptação ao ambiente que recebeu o RSAT, um estudo mais aprofundado deve

ser conduzido, averiguando se estas fazem uso de uma ou mais formas de adaptação.

Na simulação da vermicompostagem de esterco bovino, o controle positivo sem presença de RSAT obteve ganho de biomassa, do início aos 30 dias, até a tomada desta medida aos 120 dias, mantendo o parâmetro inalterado aos 150 dias e só aos 180 dias foi observado perda de peso (Figura 12). O tratamento de adaptação apresentou desempenho semelhante ao controle negativo, não havendo diferença significativa no peso por indivíduo. Sendo tal comportamento independente da data de avaliação (Figura 12).

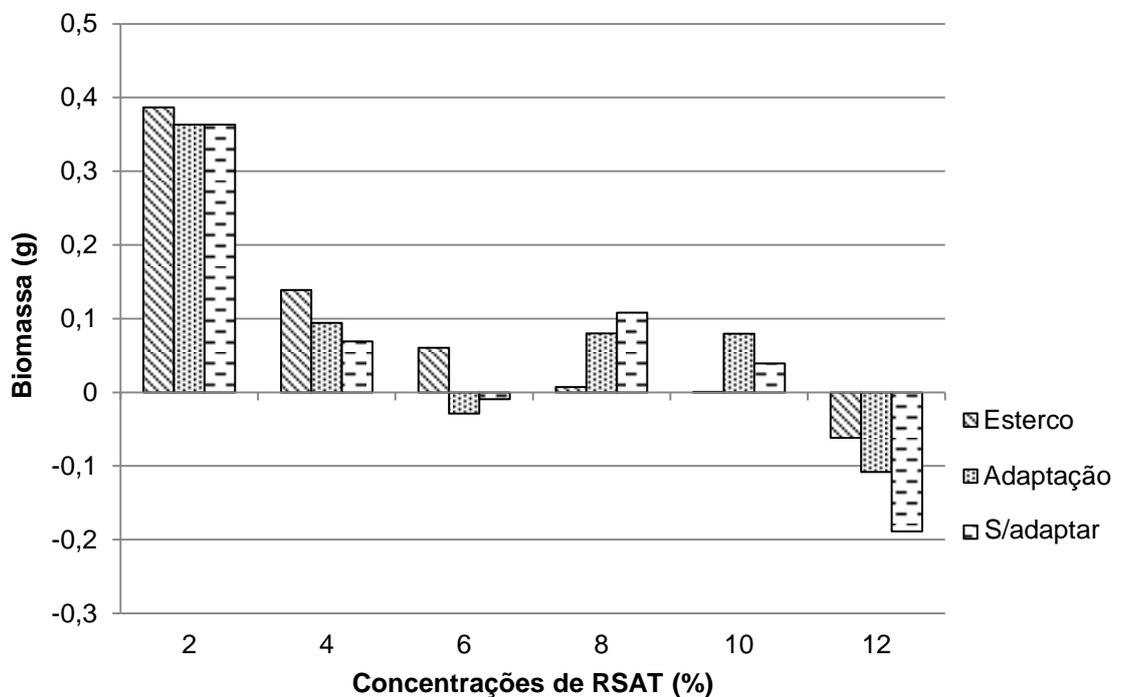


FIGURA 12. Biomassa.minhocas⁻¹ sobrevivente (a cada 30 dias) crescidas em esterco bovino. Não significativo para cada concentração, ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey. RSAT (Resíduo sólido da agroindústria do tabaco).

Da mesma forma que ocorreu nos tratamentos com solo (Tabela 13), não houve diferença estatística nas datas iniciais de avaliação da mortalidade (Tabela 14). Apenas aos 120 dias (8%) constatou-se mortalidade significativa e com diferença entre os tratamentos. O tratamento adaptação apresentou do início ao fim do experimento, conduta estatisticamente análoga ao controle positivo quanto ao número de sobreviventes. Exceto aos 150 dias onde diferiu negativamente do controle apenas com esterco bovino e positivamente do

tratamento de sem adaptação (Tabela 14). Quando os organismos foram submetidos a dosagens sem adaptação, a mortalidade foi expressa de maneira mais acentuada, mostrando quedas significativas de resultado a partir da concentração de 8% do RSAT (Tabela 14).

TABELA 14. Percentual de mortes de minhocas da espécie *E. andrei*, crescidas em esterco bovino. Valores correspondem ao número de organismos que iniciaram o período imediatamente anterior (a cada 30 dias).

	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias	150 dias	180 dias
Ambiente	----- % -----					
	2	4	6	8	10	12
	----- % -----					
Esterco	0 (10) ¹	5 (9,5)	3 (9,2)	0 a ³ (9,2)	0 a (9,2)	0 a (9,2)
Adaptação	0 (10)	5 (9,5)	0 (9,5)	16 ab (8)	12 b (7)	0 a (7)
Sem ad. ²	0 (10)	0 (10)	0 (10)	27 b (7,2)	27 c (7,2)	40 b (6)

¹ Dados entre parênteses indicam o número de organismos sobreviventes (depois de 30 dias). Média de quatro repetições.

² Tratamento sem adaptação, iniciavam com 10 minhocas.frasco⁻¹.

³ Letras iguais em uma mesma coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5%.

Quando o ambiente era predominantemente constituído de esterco bovino, comparando novamente os dois ensaios, teste crônico e teste de adaptação - controle negativo (tratamento sem adaptação) percebe-se para as concentrações semelhantes, que quanto maior o tempo de permanência dos organismos em ambiente sem, ou com menor teor de RSAT, maiores eram os acréscimos de biomassa e menores eram as mortalidades. Concordando com Lima (2010), que argumenta que organismos bem nutridos tendem a sentir com menos intensidade os estresses ambientais ligados a possíveis contaminantes.

Contudo, ao avaliar a capacidade de adaptação das minhocas, analisando os dados de mortalidade pode-se perceber que mesmo após as minhocas passarem por 90 dias em ambiente com condições ótimas de alimentação, quando submetidas à concentração de 8% do RSAT, estas tiveram significativo número de mortes. Chegando a 40% de mortalidade na concentração mais elevada ao final do ensaio. Enquanto que o tratamento de adaptação, passados 180 dias de contato crescente e ininterrupto com o resíduo, chegou a 33% de mortes acumuladas. Isto leva ao entendimento, que nas condições em que o experimento foi conduzido, é possível a adaptação à mistura do RSAT com o esterco bovino, obtendo resultados que não diferem em nenhum aspecto do controle que levava apenas o dejetos bovino. Esta capacidade de adaptar-se quando exposta a níveis crescentes de materiais

distintos ao que o a minhoca cresce é encontrado em trabalhos que usam a mistura esterco bovino e outro resíduo (Kaushik e Garg, 2003; Vig et al. 2011). Sendo os mecanismos de adaptação ligados aos fatores fisiológicos discutidos anteriormente, que dependo do estresse causado pelo resíduo adicionado, pode conferir quedas de rendimento quanto a reprodução e crescimento. Já que isto leva a uma realocação na distribuição de energia para produtos ligados a defesa contra elementos tóxicos (Calow, 1991; Jansen et al., 2011; Yasmin e D'Souza, 2010).

Foi possível verificar, considerando as diferenças iniciais e finais entre as biomassas totais levando em conta as mortes, e biomassa por minhoca desconsiderando a mortalidade, que os tratamentos de adaptação no ambiente solo apresentaram perda de peso aos 150 dias e para o ambiente de vermicompostagem foram obtidos ganhos na massa final de minhocas (Tabela 15).

O tratamento adaptação no solo mostrou desempenhos positivos, perdendo 70% da biomassa total perdida pelo controle. Quando a mortalidade não foi levada em conta o índice teve resultado ainda mais expressivo, com queda de 20% biomassa por espécime perdida pelo controle. Quando o RSAT foi misturado com esterco bovino, o ensaio que buscava adaptação obteve rendimentos em peso corpóreo de 49% do peso total obtido pelo controle positivo e 90% do peso alcançado por individuo ao final de 180 dias.

Nos ensaios avaliando o desempenho número de organismos eclodidos e sobreviventes após 28 dias de incubação em solo não se atingiu a faixa potencial da espécie analisada para este atributo (Figura 13). Para a última data de avaliação não foram obtidos casulos suficientes para o tratamento sem adaptação em solo, deste modo a medida não foi realizada para este período.

O número de minhocas nascidas e sobreviventes por casulo no tratamento controle em solo teve um aumento de 0,6 na segunda data de avaliação, mantendo a média de 2,5 organismos por casulo até o final das contagens. Os tratamentos de adaptação e sem adaptação tiveram comportamento muito parecido para todas as datas de verificação, com ponto máximo de minhocas eclodidas aos 60 dias, quando a dose foi de $7,5 \text{ Mg.ha}^{-1}$ (Figura 13).

TABELA 15. Índice biométrico de ganho ou perda de peso para minhocas da espécie *E. andrei* crescidas em ambiente com presença de RSAT.

Biomassa total ¹					
Solo	Solo adaptação	% ²	Esterco	Esterco adaptação	%
----- g -----			----- g -----		
- 2,97	- 2,10	70	4,68	2,27	49
Biomassa/minhoca ¹					
Solo	Solo adaptação	%	Esterco	Esterco adaptação	%
----- g -----			----- g -----		
- 0,20	- 0,04	20	0,53	0,48	90

¹ Diferenças entre biomassa final e inicial aos 150 e 180 dias, para solo e esterco, respectivamente.

² Percentuais alcançados pelos tratamentos de adaptação, com relação ao seu respectivo controle.

Contudo, apenas na quarta determinação foi encontrada diferença significativa de ambos para com o controle, ficando esses abaixo em 1,0 e 1,1 indivíduos eclodidos de cada casulo no teste de adaptação e sem adaptação, respectivamente (Figura 15).

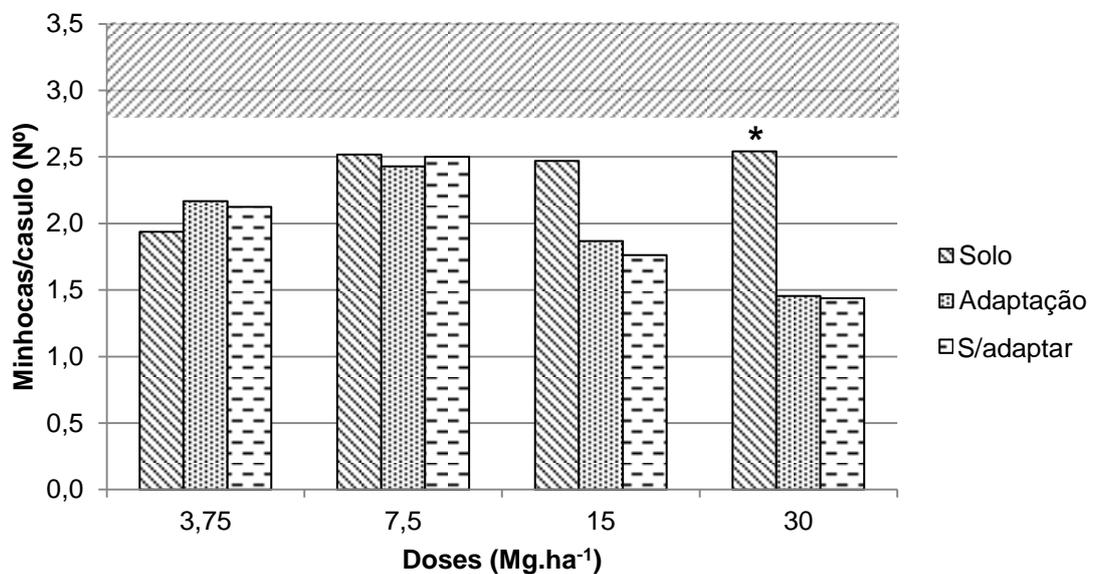


FIGURA 13. Indivíduos nascidos de casulos após 28 dias de incubação em solo, sob condições ambientais controladas. Área rachurada representa faixa potencial de nascimentos/casulo (Dominguez e Edwards, 2011). (*) Diferença estatística para cada dose, ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Em ambiente de vermicompostagem foi verificado queda do número de minhocas eclodidas a partir da concentração de 6% do RSAT, com valor médio de até 1,8 vezes maior no tratamento sem o resíduo (Figura 14). Neste

atributo, nos tratamentos que usavam o resíduo, somente na mistura que teve de 4% de RSAT foi atingida a potencialidade biológica (Figura 14).

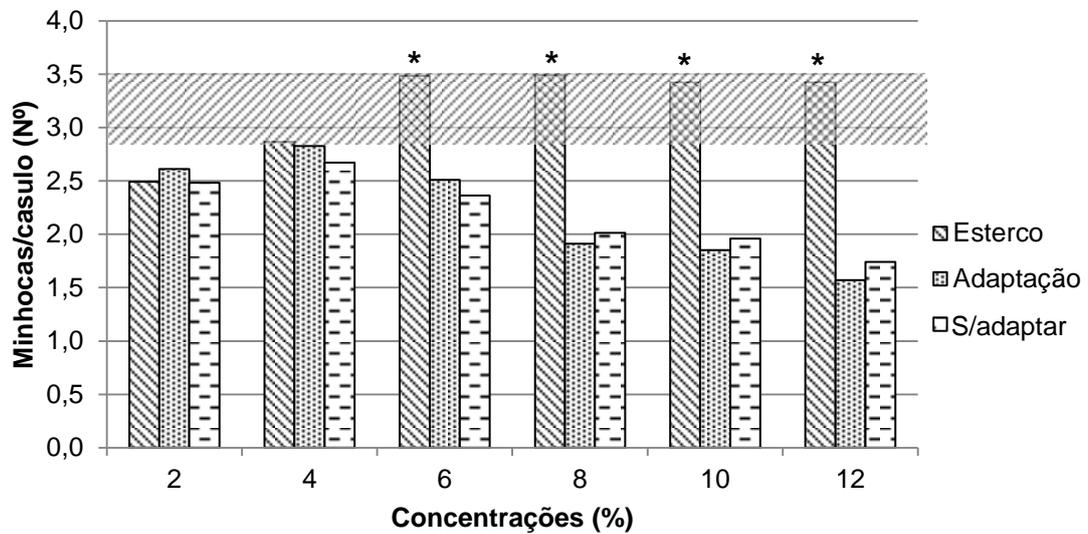


FIGURA 14. Indivíduos nascidos de casulos após 28 dias de incubação em esterco bovino, sob condições ambientais controladas. Área rachurada representa faixa potencial de nascimentos/casulo (Dominguez e Edwards, 2011). (*) Diferença estatística para cada concentração, ($P < 0,05$) pelo teste de Scott-Knott.

Os valores encontrados para minhocas eclodidas em solo ficaram abaixo do potencial biológico dos organismos, pelo fato do substrato não apresentar as condições consideradas ideais para esta espécie de minhoca. Conforme dados apresentados por Dominguez e Edwards (2011) o determinante neste estudo pode ter sido a umidade do solo, abaixo da faixa ideal, entre 80 – 85%. Este percentual é alcançado em materiais como o esterco bovino, o que pode ter contribuído para os melhores resultados obtidos quando o meio suporte foi este dejetos. Outra propriedade que poderia alterar a dinâmica do meio seria o pH do solo, contudo este manteve-se bastante próximo da faixa ideal (entre 5 – 7) (Jänsch et al., 2005).

Antunes et al. (2011) avaliou o número de jovens de *E. fetida* eclodidos em diferentes materiais orgânicos, concluindo que o esterco bovino foi o melhor meio para multiplicação da espécie. Um aspecto importante foi que quanto mais estabilizado era o material, menores foram os números de minhocas eclodidas. Isto pode explicar a diferença encontrada entre os

controles com solo e esterco. Onde a qualidade nutricional do esterco pode ter contribuído para o maior número de jovens.

Apesar deste tipo de avaliação não ser comum em testes ecotoxicológicos, avaliar a sobrevivência dos organismos eclodidos é fator determinante para verificar a toxicidade do resíduo adicionado no meio, visto que minhocas jovens apresentam maior fragilidade frente a modificações de fatores ambientais (Sauvé e Fournier, 2005; Spurgeon e Hopkin, 1995 e 1996).

Xiao et al. (2006) fazendo uso de substrato artificial, encontraram redução significativa de indivíduos eclodidos para uso do herbicida acetocloro, apenas nas dosagens mais elevadas, após um período de 28 dias de incubação em condições controladas. Salientando a diferença dos solos naturais e do substrato artificial quanto a biodisponibilidade de substâncias adicionadas no meio (Spurgeon et al., 2003). Ainda que o produto possa causar mais efeito neste ambiente artificial, nas doses mais baixas o número de jovens eclodidos não foi comprometido. De forma análoga, o que se viu na presença do RSAT, foi que nas doses e concentrações mais baixas o comportamento também se assemelhou aos controles. No entanto, com o contínuo aumento do resíduo fumageiro no solo e esterco, o número de minhocas diminuiu cada vez mais, mostrando que existiu efeito deletério deste nas minhocas recém-nascidas.

5 CONCLUSÕES

- A presença do resíduo fumageiro sem contato direto com as minhocas, não causa repelência aos indivíduos testados.
- A fuga de minhocas, em contato direto com o RSAT, é mais evidente em ambientes de substrato artificial, com índices de fuga para todas as doses aplicadas.
- Não há mortes significativas em qualquer dose do resíduo fumageiro aplicada em solo natural. Minhocas crescidas em esterco bovino misturado ao resíduo tem sua sobrevivência comprometida apenas nas doses mais elevadas do resíduo.
- As minhocas crescidas em todos os solos utilizados no trabalho, acrescidos de RSAT mostram uma tendência de ganhos de biomassa quando comparado ao controle. Quando o ambiente simula a vermicompostagem, a mistura com resíduo fumageiro mostra-se deletéria quanto ao ganho de peso das minhocas.
- O número de minhocas jovens sobreviventes é o índice mais prejudicado pelo RSAT.
- A biomassa por minhoca oriunda do tratamento de adaptação, com quantidades crescentes de RSAT, não é diferente da encontrada em minhocas que receberam tratamento sem adaptação.
- Oligoquetas submetidas a doses crescentes de resíduo fumageiro em ambos os substratos base, são significativamente mais capazes de sobreviver do que os tratamentos sem adaptação. Minhocas sob

processo de adaptação, não geram jovens mais resistentes a presença do RSAT.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Resíduos sólidos - Classificação**. Rio de Janeiro: ABNT, 2004. 71p. (NBR 10.004).

AFUBRA. **Fumicultura regional**. Disponível em: <<http://www.afubra.com.br>>. Acesso em: 10 out. 2013.

ALCÂNTARA, F. A. de; MADEIRA, N. R. **Manejo do solo no sistema de produção orgânico de hortaliças**. Brasília: Embrapa Hortaliças, 2008. 10 p.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2nd ed. New York: Academic, 1994. 453p.

ANDERSON. T. H. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v.98, p. 285-293, 2003.

ANDRADE, S. A. L; SILVEIRA, A. P. D. Biomassa e atividade microbiana do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, n. 2, p. 1191-1198, 2004.

ANTONIOLLI, Z. I. et al. Utilização de casca de arroz e esterco bovino como substrato Eisenia fetida Savigny (1826). **Ciência Agrotecnologia**, Lavras , v. 33, n. 3, 2009.

ANTUNES, M. O. et al. Eclosão de minhocas (Eisenia fetida, Savigny, 1826) em diferentes substratos e misturas. In: ENPOS, 15., 2011, Pelotas. **Anais... Pelotas**, 2011. p. 124.

ARAÚJO, A. S. F. de; MONTEIRO, R. T. R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 23, n. 3, p. 66-75, 2007.

AZIZ, N. A. et al. Metal resistance in earthworms: genetic adaptation or physiological acclimation. **Pedobiologia**, Jena, v. 43, n. 6, p. 594-601, 1999.

BARETTA, D. et al. Análise multivariada da fauna edáfica em diferentes sistemas de preparo e cultivo do solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1675-1679, 2006.

BARROS, Y.J. **Indicadores biológicos de qualidade de solos de área de mineração e processamento de chumbo, no município de Adrianópolis (PR)**. 2008. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. de A. et al. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.7-18.

BEBÉ ET AL. Avaliação de solos sob diferentes períodos de aplicação com vinhaça. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.13, n.6, p.781-787, 2009.

BENINTENDE, S. M. et al. Soil microbiological indicators of soil quality in four rice rotations systems. **Ecological Indicators**, Amsterdam, v. 8, n. 5, p. 704-708, Sep. 2008.

BERTOLDI, M. de; GRISELLI, V. M. C. Microbial populations in the compost process In: COMPOSTING the staff of compost science and land utilization. New York: J. G. Press, Emmaus Pam, 1992. 26p.

BEST, J. B.; MORITA, M. Toxicology of planarians. **Hydrobiologia**, Berlin, v. 227, p 375 - 383, 1991.

BIANCHI, M. O et al. **Importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo**. Seropédica: Embrapa Agrobiologia, 2010. 32 p.

BOHLEN, P. J. et al. Earthworm effects on carbon and nitrogen dynamics of surface litter in corn agroecosystems. **Ecological Applications**, Berlin, v. 7, p. 1341-1349, 1997.

BOHLEN, P. J., EDWARDS, C. A. Earthworm effects on N dynamics and soil respiration in microcosms receiving organic and inorganic nutrients. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 341-348, 1995.

BOUCHÉ, M.B. Strategies Lombriciennes. **Ecological Bulletin**, Stockholm, v.25, p. 122-132. 1977.

BROUSSEAU, P. et al. Marqueurs immunologiques. In: LAGADIC, L. et al. (Ed.), **Biomarqueurs en écotoxicologie: aspect fondamentaux**. Paris: Masson, 1997, p. 287-314.

BROWN, G.G.; DOMINGUES, J. Uso das minhocas como bioindicadoras ambientais: princípios e práticas. **Acta Zoológica Mexicana**, Ciudad de México, v. 26, n. 2, p. 1-18, 2010.

BRUNNEMAN, K. D. et al. Formation and analysis of tobacco specific N-nitrosamines. **Critical Reviews in Toxicology**, London, v. 26, p. 121-137, 1996.

BUCH, A. C. et al. Minhocas nativas em testes ecotoxicológicos. In: ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE ECOLOGIA E TAXONOMIA DE OLIGOQUETAS, 4. 2010, Curitiba. **Anais...**Curitiba, Brasil, 2010.

BUTT, K.R. Utilization of solid paper mill ludge and spent brewery yeast as a feed for soil-dwelling earthworms. **Bioresource Technology**, Oxon, v. 44, p. 105-107, 1993.

CALOW, P. Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, Amsterdam, v. 100, n 1-2, p. 3-6, 1991.

CAMPERO, M.; DE BLOCK, M. Correcting the short-term effect of food deprivation in a damselfly: mechanisms and costs. **Journal of Animal ecology**, New Jersey, v. 77, n. 1, p. 66-73, 2008.

CANTERI, M. G. et al. SASM-Agri – Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. **Revista Brasileira de Agrocomputação**, Ponta Grossa, v. 1, p.18-24, 2001.

CASAGRANDE, M. C. et al. Reaproveitamento de resíduos sólidos industriais: processamento e aplicações no setor cerâmico. **Cerâmica Industrial**, São Paulo, v. 13, n. 1/2, p. 34-37, 2008.

CARVALHO, A. E. F. et al. Avaliação ecotoxicológica de ecossistemas aquáticos da bacia hidrográfica do rio Itaqueri (Itirapina/Brotas, SP): uma análise espacial. In: JORNADA CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFSCAR, 8.; CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17.; ENCONTRO DE EXTENSÃO, 7.; CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 5.; WORKSHOP DE GRUPOS DE PESQUISA, 4.; CONGRESSO DE MEIO AMBIENTE DA AUGM, 6., 2009, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2009. p. 144-159.

CHAPMAN, P. M. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. **Marine Pollution Bulletin**, Amsterdam, v.44, p.7-15. 2002.

CHUANG, S.C. et al. Influence of ultraviolet radiation on selected physiological responses of earthworms. **Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 209, p. 4304-4312, 2006.

CIVILINI, M. et al. Nicotine decontamination of tobacco agro-industrial waste and its degradation by microorganisms. **Waste Management & Research**, Amsterdam, v. 15, p. 349-358, 1997.

COELHO, M. A. A. **Aproveitamento de resíduo de pó de fumo e sebo bovino para produção de lipase de *Aspergillus Niger* usp 898 por fermentação em fase sólida**. 2009. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2009.

COELHO et al. Aproveitamento de resíduos agroindustriais: produção de enzimas a partir da casca de coco verde. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 19, n. 1, p. 33-42, 2001.

COSTA, A. F. S. et al. Obtenção de consórcio de microorganismos a partir de amostra de petróleo. **Revista Ciências & Tecnologia**, Recife, n. 1, p. 1-7, 2007.

CRAGG, R. G.; BARDGETT, R. How changes in soil faunal diversity and composition within a trophic group influence decomposition processes. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 2073-2081, 2001.

DARSOW, T. et al. Exocytic trafficking is required for nicotine-induced up-regulation of alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors. **Journal of Biological Chemistry, Maryland**, v. 280, n. 18, p.11-20, 2005.

DE MORAES, et al. Resíduos líquidos de efluentes de agroindústria de carnes na produtividade do girassol. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v.8, n.14, p. 844-855, 2012.

DELBEM, F. C. et al. Fontes e doses de adubação nitrogenada na atividade microbiana e fertilidade do solo cultivado com *Brachiaria brizantha*. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 33, n. 2, p. 361-367, 2011.

DOMÍNGUEZ, J.; EDWARDS, C. A. Biology and ecology of earthworm species used for vermicomposting. In: EDWARDS, C. A. et al. (Ed.) **Vermiculture technology**. Boca Raton: CRC Press, 2011. p. 27-40.

DOMENE, X. et al. Feeding inhibition the soil collembolan *Folsomia candida* as an endpoint for the estimation of organic waste ecotoxicity. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 26, n. 7, p. 1538-1544, 2007.

DORES-SILVA P. R. et al. Bioensaios para avaliação da toxicidade aguda, reprodução e ganho de biomassa de minhocas (*Eisenia fetida*) ambientadas em lodo de esgoto doméstico. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, Itajaí, v. 8, n. 1, p. 143-146, 2013.

DUFFUS, J. H. **Toxicologia Ambiental**. Barcelona: Omega, 1983. 284 p.

EDWARDS, C. A.; BOHLEN, P. J. **Biology and ecology of earthworms**. London: Chapman and Hall, 1996. 426 p.

ELVIRA, C. et al. Earthworm community composition in an uncontrolled rubbish dump, a pig farm dunghill, and a deposit of primary sludges. **Nova Acta Científica Compostelana**, Santiago de Compostela, v. 6, p. 123-129, 1996.

ESTEVEZ, B. et al. The effect on earthworm abundance and selected soil properties after 14 years of solid cattle manure and NPKMg fertilizer application. **Canadian Journal Of Soil Science**, Ottawa, v. 76, p 351-355, 1996.

FENILLI, T. A. B. et al. Utilização do pó de fumo no substrato para produção de mudas de tucaneira. **Revista acadêmica: Ciências Agrárias e Ambiental**, Curitiba, v. 8, n. 2, p. 183-190, 2010.

FERREIRA, C.M. Análises complementares obtidas a partir de testes de toxicidade aquática. In: RANZANI-PAIVA, M.J.T. et al. (Ed.). **Sanidade de organismos aquáticos**. São Paulo: Varela, 2004. p. 273-284.

FOURNIER, M. et al. Phagocytosis as a biomarker of immunotoxicity in wildlife species exposed to environmental xenobiotics. **American Zoologist**, Washington, v. 40, p. 412-420, 2000.

FRACÁCIO, R. **Estudos limnológicos e ecotoxicológicos (laboratoriais e in situ), com ênfase na avaliação de toxicidade de metais e de pesticidas organoclorados em peixes (Danio rerio e Poecilia reticulata) - Sub-bacia do rio Monjolinho**. 2006. 209 f. Tese (Doutorado) Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

FREY, B. et al. Microbial activity and community structure of a soil after heavy metal contamination in a model forest ecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 1745-1756, 2006.

GESTEL, C. A. M. V. et al. Influence of cadmium, copper and pentachlorophenol on growth and sexual development of Eisenia Andrei (Oligochaeta; Annelida). **Biology and Fertility of Soil**, Berlin, v. 12, p. 117-121, 1991.

GIRACCA, E. M. N. Levantamento da meso e macrofauna do solo na microbacia de Arroio Lino, Agudo/RS. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 9, n.3, p. 257-261, 2003.

GIVAUDAN, N. Acclimation of earthworms to chemicals in anthropogenic landscapes, physiological mechanisms and soil ecological implications. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 73, p. 49-58, 2014.

GOLDSTEIN, E. G. Testes de toxicidade de efluentes industriais. **Revista Ambiente**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 33-38, 1988.

GONÇALVES, I. C. R. **Atributos químicos e biológicos do solo e produtividade do feijão-caupi após dois anos de aplicação de lodo de curtume compostado**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-graduação em Agronomia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2011.

GUERRA, A. J. T. O papel da matéria orgânica e dos agregados na erodibilidade dos solos. **Anuário do Instituto de Geociências**, Rio de Janeiro, v. 13, p. 43-52, 1990.

GUDBRANDSEN et al. Short-term pre-exposure increases earthworm tolerance to mercury. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam, v. 43, p. 261-267, 2007.

GURUSAMY, R.; NATARAJAN, S. Current Status on Biochemistry and Molecular Biology of Microbial Degradation of Nicotine. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 1, p. 1-16, 2013.

HAMEED, R. et al. Influence de la qualité de la litière apporté à Lumbricus terrestres L. sur la dynamique de l'azote et la production végétale. **Pedobiologia**, Jena, v.37, p.178-192, 1993.

HOLMSTRUP et al. Interactions between effects of environmental chemicals and natural stressors: A review. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 18, p. 3746-3762, 2010.

HOLZ, F. P. et al. Efeito da cinza de eucalipto sobre a biologia de minhocas durante a produção de húmus. **Cadernos de Agroecologia**, [Cruz Alta], v. 6, n. 2, p. 1-5, 2011. (Trabalho apresentado no 7. Congresso Brasileiro de Agroecologia, 2011, Fortaleza)

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Industrial Mensal Produção Física – Regional**. Brasília: IBGE, 2013. 61 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Soil quality: avoidance test for testing the quality of soils and effects of chemical on behavior, part 1 - test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)**. Geneva: ISO, 2007. 24 p. (ISO 17512-1).

JÄNSCH, S. et al. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, Ottawa, v.13, n.8, p.51-83, 2005.

JANSEN, M. et al. Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance: a case study in *Daphnia*. **Ecotoxicology**, London, v. 20, p. 543 - 551, 2011.

JENKINSON, D. S.; LADD, J. N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E. A.; LADD, J. N. (Ed.). **Soil Biochemistry**. New York: Marcel Dekker, v. 5, 1981. p. 415-471.

JOHNSTON, A. S. A. et al. An energy budget agent-based model of earthworm populations and its application to study the effects of pesticides. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 280, n. 24, p. 5-17, 2014.

KAUSHIK, P; GARG, V. K. Vermicomposting of mixed solid textile mill sludge and cow dung with the epigeic earthworm *Eisenia foetida*. **Bioresource Technology**, Oxon, v.90, n.3, p.311–316, 2003.

KARLEN, D. L. et al. Soil quality: why and how? **Geoderma**, Amsterdam, v. 114, n. 3/4, p. 145-156, 2003.

KAWABATA, C. Y. **Aproveitamento de cinzas da queima de resíduos agroindustriais na produção de compósitos fibrosos e concreto leve para a construção rural**. 2008. 181 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Qualidade e Produtividade Animal, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

KETTERINGS, Q. M. The effects of earthworms on soil aggregate stability and carbon and nitrogen storage in a legume cover crop agroecosystem. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p. 401-408, 1997.

- KIM, J. et al. Genes affecting the activity of nicotinic receptors involved in *Caenorhabditis elegans* egg-laying behavior. **Genetics**, Bethesda, v. 157, n. 4, p. 599-610, 2001.
- KBH & C. **Coordenação de Processos Industriais**. Vera Cruz, 2004. (Comunicado Técnico).
- LANGDON, C. J. et al. Interactions between earthworms and arsenic in the soil environment: a review. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 124, n. 3, p. 361-373, 2003.
- LAUSCHNER, M. H. **Potencial de reciclagem agrícola de resíduo de agroindústria fumageira**. 2005. 144 f. Dissertação (Mestrado) -Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.
- LAUSCHNER, M. H. et al. Utilização de resíduos de agroindústria fumageira como corretivo de acidez em diferentes solos. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 18, n. 1, p. 75-80, 2012.
- LAVELLE, P. Earthworm activities and the soil system. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 6, p. 237-251, 1988.
- LIMA, N. C. **Avaliação do impacto da contaminação do solo de áreas agrícolas de Bom Repouso (MG) por meio de ensaios ecotoxicológicos**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado) -Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental), Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.
- LISBOA, B. B. et al. Indicadores microbianos de qualidade do solo em diferentes sistemas de manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 36, p. 45-55, 2012.
- LOPES, D. C. **Estudo da viabilidade de adição de resíduo de pó de fumo à massa cerâmica**. 2005. 94 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.
- LORDACHE, M.; BORZA, I. Relation between chemical indices of soil and earthworm abundance under chemical fertilization. **Plant, Soil and Environmental**, Praga, v. 56, n. 9, p. 401 – 407, 2010.
- LOVATTO, P. B. et al. Efeito de extratos de plantas silvestres da família Solanaceae sobre o controle de *Brevicoryne brassicae* em couve (*Brassica oleracea* var. *acephala*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.4, p.971-978, 2004.
- MaCDONALD, R. M. Extraction of microorganisms from soil. **Biological Agriculture and Horticulture: an international journal**, Oxon, v. 3, n. 4, p. 361-365, 1986.

MASSUKADO, L. M.; SCHALCH, V. Avaliação da qualidade do composto proveniente da compostagem da fração orgânica dos resíduos sólidos domiciliares. **Revista DAE**, São Paulo, n. 183, 2010.

MATTA et al. Guidelines on nicotine dose selection for in vivo research. **Psychopharmacology**, Berlin, v. 190, p. 269-319, 2007.

MATOS, A.T. Tratamento de resíduos agroindustriais. In: CURSO SOBRE TRATAMENTO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS, 2005, Viçosa. **Anais...** Viçosa, 2005. p. 1-34.

MATSUOKA, M. **Atributos biológicos de solos cultivados com videira na região da Serra Gaúcha**. 2006. 171 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

MASTO, R. E. et al. Changes in soil biological and biochemical characteristics in a long field trial on a sub-tropical inceptisol. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 38, n. 7, p 1577-1582, 2006.

MEHER, K. K. et al. Biomethanation of Tobacco Waste. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 90, n. 2, p. 199-202, 1995.

MENDES, I.C. et al. Propriedades biológicas em agregados de um Latossolo Vermelho-Escuro sob plantio convencional e direto no Cerrado. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.27, p.435-443, 2003.

MONGAN, N. P. et al. Novel alpha7-like nicotinic acetylcholine receptor subunits in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Protein Science**, New Jersey, v. 11, n. 5, p. 62-71, 2002.

NAHAS, E. A produtividade das culturas e a preservação do ambiente pelo uso de resíduos agrícolas. In: GIANELLO, C. (Ed.). **Produzir sem degradar**. Porto Alegre: UFRGS/DS, 1993. p.111-140.

NAKATANI, A. S. **Atributos microbiológicos do solo em área agrícola sob disposição de lodo de curtume**. 2010. 103 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

NAHMANI, J. et al. A Review of studies performed to assess metal uptake by earthworms. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 145, p. 402-424, 2007.

NATAL DA LUZ, T. et al. Avoidance tests with earthworms and springtails: defining the minimum exposure time to observe a significant response. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 71, p. 545-551, 2008a.

NATAL DA LUZ, T. et al. Avoidance tests in site-specific risk assessment influence of soil properties on the avoidance response of *Collembola* and

earthworms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v.27, p.1112-1117, 2008b.

NATAL DA LUZ, T. et al. Valorização agrícola de lamas de ETAR de tratamento de efluentes têxteis: avaliação do impacto ecotoxicológico. In: SIMPÓSIO LUSO-BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, 12. 2006, Figueira da Foz. **Anais...Figueira da Foz**, 2006. p. 1-15.

NATAL DA LUZ, T. et al. Avoidance tests with Collembola and earthworms as early screening tools for site-specific assessment of polluted soils. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 23, n. 9, p. 2188-2193, 2004.

NEUHAUSER, E. F. et al. Toxicity of metals to the earthworms *Eisenia foetida*. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 1, p. 149-152, 1985.

NIPPER, M. **Métodos em Ecotoxicologia Marinha**: aplicações no Brasil. Salvador: Artes gráficas, 2002.

NIELSEN, R.; BOAG, B. Feeding preferences of some earthworm species common to upland pastures in Scotland. **Pedobiologia**, Jena, v. 47, p. 1-8, 2003.

NOBILE, F. O. Uso de resíduos na agricultura. **Revista Uniara**, Araraquara, v. 12, n.2, p. 169-184, 2009.

NOLLA, A. et al. Comportamento da microbiota de um Argissolo submetido à aplicação de resíduos orgânicos e insumos agrícolas. **Cultivando o Saber**, Cascavel, v.3, n.1, p.125-134, 2010.

NUNES, M. E. T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural do solo**. 2010. 175 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2010.

NUNES, L. A. P. L. et al. Recolonização da fauna edáfica em áreas de Caatinga submetidas a queimadas. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, p.214-220, 2008.

ODUM, E.P. **Ecologia**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 1983. 434 p.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Earthworm Acute Toxicity Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*)**. 1984. 9p. (Guideline for the testing of chemicals, Section 2, n. 207).

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Earthworm Reproduction Test (*Eisenia fetida/ Eisenia andrei*)**. 2004. 18p. (Guideline for the testing of chemicals, Section 2, n. 222).

- PANDEY, A. et al. Biotechnological potential of coffee pulp and coffee husk for bioprocesses. **Biochemical Engineering Journal**, Manchester ,v.6, p. 153-162, 2000.
- PARRÉ, J.L.; ALVES, A.F.; PEREIRA, M.F. Desempenho do setor agroindustrial da Região Sul do Brasil. In: MONTOYA, M.A.; ROSSETTO, C.R. (Org.). **Abertura econômica e competitividade no agronegócio brasileiro: impactos regionais e gestão estratégica**. Passo Fundo: EDIUPF, 2002. p. 161-179.
- PEDRON, F. et al. Solos Urbanos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.34, n.5, p.1647-1653, 2004.
- PELIZER, L.H. et al. Utilização de resíduos agro-industriais em processos biotecnológicos como perspectiva de redução do impacto ambiental. **Journal of Technology Management and Innovation**, Santiago, v.2, p.118-127, 2007.
- PERUCCI, P. et al. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, n.1, p. 17-23, 2000.
- PIŽL V. et al. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals on terrestrial annelids in urban soils. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.44, n.8, p.1050-1055, 2009.
- PRIMO et al. Avaliação da qualidade nutricional de composto orgânico produzido com resíduos de fumo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v.14, n.7, p.742-746, 2010.
- RAIJ, B. van. **Fertilidade do solo e adubação**. Piracicaba: Agronômica Ceres, 1991. 328p.
- RAMOS, A.S. et al. Testes de ecotoxicidade utilizando minhocas da espécie *Eisenia foetida* para avaliação da contaminação mercurial em solos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GEOQUÍMICA, 11., 2007, Rio de Janeiro. **Anais...**Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007. 1 CD-ROM.
- REIS, M.R et al. Impacto do glyphosate associado a inseticida e fungicida na Atividade microbiana e no potencial de solubilização de Fosfato em solo cultivado com soja Roundup Ready ®. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, n. 4, p. 729-737, 2009.
- REINECKE, A.J.; VIIJOEN S. A. The influence of feeding patterns on growth and reproduction of the vermicomposting earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Biology and Fertility of Soils**, New York, v. 10, p. 184-187, 1990.
- RIEFF G. G. et al. Diversidade de famílias de ácaros e colêmbolos edáficos em cultivo de eucalipto e áreas nativas. **Revista Brasileira de Agrociência**, Pelotas, v. 16, n. 1, p 57-61, 2010.

RIFFALDI, R. et al. Soil biological activities in monitoring the bioremediation of diesel oil-contaminated soil. **Water, Air and Soil Pollution**, Totowa, v. 170, n. 3, p. 3-15, 2006.

RINKE, K. H.; WIECHERING, H. Earthworm avoidance test for soil assessments: an alternative for acute and reproduction tests. **Journal of Soils and Sediments**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 15–20, 2001.

ROSA, M. F. Valorização de resíduos da agroindústria. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS AGROPECUÁRIOS E AGROINDUSTRIAIS, 2., 2011, Foz do Iguaçu. **Palestras...Foz do Iguaçu**, 2011.

SAMUEL-ROSA, A.; DALMOLIN, R.S.D. Fauna edáfica em solo construído, campo nativo e lavoura anual. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.39, p. 913-917, 2009.

SAUVÈ, S.; FOURNIER, M. Age-specific Immunocompetence of the Earthworm *Eisenia andrei*: Exposure to Methylmercury Chloride. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 60, p. 67-72, 2005.

SAVINO, J. F.; TANABE, L. L. Sublethal Effects of Phenanthrene, Nicotine, and Pinane on *Daphnia pulex*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, Gewerbestrasse, v.42, p.778-784, 1989.

SCHAFER, W. R. Genetic analysis of nicotinic signaling in worms and flies. **Journal of Neurobiology**, Berlin, v. 53, n. 4, p. 35-41, 2002.

SCHIAVON, G. A. et al. Efeito da casca de arroz no crescimento e reprodução de minhocas. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 995-999, 2007.

SCHIEVANO, A. et al. Substituting energy crops with organic wastes and agro-industrial residues for biogas production. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 90, n. 8, p. 2537-2541, 2009.

SCHIRMER, G. K. **Utilização do lodo de esgoto na vermicompostagem e como substrato para a produção de mudas de *Pinus elliottii* Engelm.** 2010. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

SHARMA, V. K. et al. Processing of urban and agro-industrial residues by aerobic composting: a review. **Energy Conversion and Management**, Elmsford, v. 38, n. 5, p. 453-478, 1997.

SINGH, D.; SUTHAR, S. Vermicomposting of herbal pharmaceutical industry waste: Earthworm growth, plant-available nutrient and microbial quality of end materials. **Bioresource Technology**, Amsterdam, v. 112, p. 179-185, 2012.

SILVA, R. R. et al. Biomassa e atividade microbiana em solo sob diferentes sistemas de manejo na região fisiográfica Campos das Vertentes – MG. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v.34, p.1585-1592, 2010.

SILVEIRA, A. O. **Avaliação de metodologias para o monitoramento da qualidade do solo**. 2011. 102 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

SILVEIRA, A. O. **Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul**. 2007. 94 f. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SINDITABACO. **Dimensões do setor**. Disponível em: <<http://www.sinditabaco.com.br/>> Acesso em: 12 ago. 2013.

SMITH JR., M. A. **Effects of Nicotine on Caenorhabditis elegans survival, reproduction, and gene expressions – Development of an Invertebrate Animal Model for Drug of Abuse**. 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia, East Carolina University, Greenville, 2011.

SMITH JR, M. A. et al. Impacts of chronic low-level nicotine exposure on *Caenorhabditis elegans* reproduction: identification of novel gene targets. **Reproductive Toxicology**, Amsterdam, v. 40, p. 69-75, 2013.

SPARKS, D.L. **Environmental soil chemistry**. San Diego: Academic, 1995. 267p.

SPURGEON, D. J. et al. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. **Pedobiologia**, Jena, v. 47, p. 588-606, 2003.

SPURGEON, D. J. et al. Effects of cadmium, copper, lead and zinc on growth, reproduction and survival of the earthworm *Eisenia foetida* (Savigny): assessing the environmental impact of point-source metal contamination in terrestrial ecosystems. **Environmental Pollution**, Amsterdam, v. 84, p. 123-130, 1994.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. Extrapolation of the laboratory based OECD earthworm toxicity test to metal-contaminated field sites. **Ecotoxicology**, London, v. 4, p. 190-205, 1995.

SPURGEON, D. J.; HOPKIN, S. P. Effects of metal-contaminated soils on the growth, sexual development, and early cocoon production of the earthworm *Eisenia foetida*, with particular reference to zinc. **Ecotoxicology Environmental Safety**, Amsterdam, v. 35, p. 86-95, 1996.

SISINNO, C. et al. Ensaio ecotoxicológicos como um instrumento de complementação da avaliação de áreas contaminadas: resultados preliminares em áreas contaminadas por hidrocarbonetos. In: SEMINÁRIO NACIONAL DE

SAÚDE E AMBIENTE, 3., 2004, Rio de Janeiro. **[Anais...]**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2004.

STEVENSON, F.J.; COLE, M.A. **Cycles of soil**: Carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1999. 427p.

SWIFT, M. J. et al. O inventário da diversidade biológica do solo: conceitos e orientações. In: MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. (Ed.). **Manual de biologia dos solos tropicais amostragem e caracterização da biodiversidade**. Lavras: Editora UFLA, 2010. p. 23-31.

TASSO JUNIOR, et al. Produtividade e qualidade de cana-de-açúcar cultivada em solo tratado com lodo de esgoto. **Engenharia Agrícola**, Jaboticabal, v.27, n.1, p.276-283, 2007.

TEDESCO, M. J. et al. Land disposal potential of tobacco processing residues. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 2, p. 233-241, 2011.

TEDESCO, M. J. et al. Resíduos orgânicos no solo e os impactos no ambiente. In: SANTOS, G. de A. et al. (Org.). **Fundamentos da matéria orgânica: ecossistemas tropicais e subtropicais**. 2. ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 113-135.

TEIXEIRA, D. B. **Análise do desempenho tecnológico e ambiental de produtos cerâmicos contendo resíduo industrial como material agregado**. 2012. 63 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul, 2012.

TIAGO, P.V. et al. Comunidade de bactérias e fungos de esterco antes e após vermicompostagem e no substrato hortícola após uso de vermicomposto. **Revista Ciência Agrônoma**, Fortaleza, v.39, n.2, p.187-192, 2008.

TISCHER, S. et al. Microbial parameters of soils contaminated with heavy metals: assessment for ecotoxicological monitoring. **Polish Journal of Ecology**, Warsaw, v. 56, n. 3, p. 471-479, 2008.

VEZZANI, F. M. et al. Matéria orgânica e a qualidade do solo. In: SANTOS, G. A. et al. (Org.) **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais & subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p. 483-494.

VIG, A. P. Vermicomposting of tannery sludge mixed with cattle dung into valuable manure using earthworm *Eisenia fetida* (Savigny). **Bioresource Technology**, Philadelphia, v. 102, n. 17, p. 7941-7945, 2011.

WANG, S. N. et al. "Green" route to 6-hydroxy-3-succinoyl-pyridine from (s)-nicotine of tobacco waste by whole cells of a *Pseudomonas* sp. **Environmental Science Technology**, New York, v. 39, p. 6877-6880, 2005.

WALKER, R. J. et al. Physiological and pharmacological studies on annelid and nematode body wall muscle. **Comparative Biochemistry and Physiology**

Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, Amsterdam, v. 106, p. 49-58, 1993.

WHALEN, J. K. et al. Population dynamics of earthworm communities in corn agroecosystems receiving organic or inorganic fertilizer amendments. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 27, p. 400-407, 1998.

WINCK, P. R. **Estudo de viabilidade técnica da queima de resíduos gerados em uma indústria de tabaco para obtenção de energia térmica a ser aproveitada em uma caldeira geradora de vapor.** 2011. 49 f. Trabalho de Conclusão (Graduação) – Curso de Engenharia Química, Escola de Engenharia, Universidade Federal Do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

WIRGIN et al. Physiological and genetic. In: LEVINTON J. S.; WALDMAN, J. R. (Ed.) **The Hudson river estuary**. New York: Cambridge Press, 2006. p 444-475.

YASMIN, S.; D'SOUZA, D. Effects of pesticides on the growth and reproduction of earthworm: a review. **Applied and Environmental Soil Science**, Cairo, v. 1, p. 1-9. 2010.

XIAO, N. et al. The fate of herbicide acetochlor and its toxicity to *Eisenia fetida* under laboratory conditions. **Chemosphere**, Oxford, v. 62, n. 8, p. 66 – 73, 2005.

ZAGUSTINA, N. A. et al. Elimination of volatile compounds of leaf tobacco from air emissions using biofiltration. **Applied Biochemistry and Microbiology**, Berlin, v. 48, n. 4, p. 385-395, 2012.

ZHANG, P. et al. Soil quality changes in land degradation as indicated by soil chemical, biochemical and microbiological properties in a karst area of southwest Guizhou, China. **Environmental Geology**, Berlin: Springer, v. 51, n. 4, p. 609–619, 2006.

ZIBETTI, V. K. et al. Biomassa e produção de casulos de *Eisenia andrei* Bouché avaliados em diferentes fontes de alimentos. **Caderno de Agroecologia**, [Cruz Alta], v. 8, n. 2, p. 1-5, 2013.

ZIRBES, et al. A new case of consensual cecision: Collective movement in earthworms. **Ethology**, New York, v. 116, p. 546–553, 2010.

ZIRBES, et al. Earthworms use odor cues to locate and feed on microorganisms in soil. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 7, 2011.

ZUCCONI, F. F. M. et al. Biological evaluation of compost maturity. **BioCycle**, Emmaus, v.22, n.4, p.27-29, 1981.