

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DO SOLO

PRISCILA STOCCO THEODORO

DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE
AGROTÓXICOS SOBRE RIZOBACTÉRIAS

LAGES, SC

2022

PRISCILA STOCCO THEODORO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE
AGROTÓXICOS SOBRE RIZOBACTÉRIAS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência do Solo.

Orientador: Dr. Osmar Klauberg Filho

LAGES, SC

2022.

FICHA CATALOGRÁFICA

**Ficha catalográfica elaborada pelo programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CAV/UDESC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

Theodoro, Priscila Stocco
Desenvolvimento de protocolos para avaliação do efeito de
agrotóxicos sobre rizobactérias / Priscila Stocco Theodoro. -- 2022.
97 p.

Orientador: Osmar Klauberg Filho
Tese (doutorado) -- Universidade do Estado de Santa Catarina,
Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de Pós-Graduação
em Ciência do Solo, Lages, 2022.

1. Azospirillum. 2. Bacillus. 3. Bioensaios. 4. Ecotoxicologia. I.
Klauberg Filho, Osmar. II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência do Solo. III. Título.

PRISCILA STOCCO THEODORO

**DESENVOLVIMENTO DE PROTOCOLOS PARA AVALIAÇÃO DO EFEITO DE
AGROTÓXICOS SOBRE RIZOBACTÉRIAS**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciência do Solo do Centro de Ciências Agroveterinárias, da Universidade do Estado de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutora em Ciência do Solo.

Banca examinadora:

Orientador/Presidente:

Dr. Osmar Klauberg Filho
UDESC, Lages

Membros:

Dra. Carolina Riviera Duarte Maluche Baretta
Unochapecó, Chapecó

Dr. Dennis Góss de Souza
IFPR, Palmas

Dra. Mari Lucia Campos
UDESC, Lages

Dr. Luís Carlos Iuñes de Oliveira Filho
UDESC, Lages

Lages, 26 de agosto de 2022

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter guiado todos os meus caminhos, me concedido saúde e força para superar as dificuldades e por mais essa vitória. Só Ele sabe das dificuldades que enfrentei e de todas as vezes que quis desistir no meio do caminho, mas com sua infinita bondade Ele não olhou para minhas faltas, segurou minha mão e me deu forças para vencer mais esse desafio.

Agradeço aos meus pais, Maria Aparecida e Antonio, por todo apoio e amor, e por motivarem e me mostrar o quanto é importante estudar.

As minhas irmãs, Camila e Caroliny pelos incentivos, conselhos e ajudas concedidas durante a vida.

Ao meu esposo Bruno pelo seu infinito cuidado, preocupação e amizade e que segurou minha mão me dando força nos momentos de desânimo. Obrigada por sempre acreditar no meu potencial, me lembrando que sou capaz de realizar tudo aquilo que me proponho a fazer.

À Universidade do Estado de Santa Catarina, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, pela oportunidade de realização do doutorado.

Ao meu orientador Dr. Osmar Klauberg Filho por seus valiosos ensinamentos, conselhos, disponibilidade, paciência e apoio ao longo desta jornada. Aqui lhe explico a minha imensa gratidão.

Ao professor Dr. Julio Cesar Pires Santos um agradecimento muito especial por pela grande amizade, incentivo e confiança ao longo desses anos.

Ao Dr. Dennis Góss de Souza, pela amizade e contribuições durante a execução do projeto.

Ao Dr. Luís Carlos Iuñes de Oliveira Filho, pela amizade, pelo auxílio nas análises estatísticas, pelo apoio e por sempre estar disposto a contribuir com seus conhecimentos durante o trabalho.

A Dra. Leticia Scopel pela troca de conhecimentos e por auxiliar nas minhas dúvidas.

Aos professores meu agradecimento, sem o conhecimento passado por vocês não conseguiria sozinha, cada um dos profissionais que tive o prazer de conhecer fazem parte da minha vitória.

A professora Dra. Mari Lucia Campos pela amizade, conversas, conselhos e apoio psicológico.

A minha fisioterapeuta Bruna Delfes e meu psicólogo José Lima que foram essenciais nos últimos meses para que eu ficasse bem.

A todos os colegas do Laboratório de Ecotoxicologia e da Pós-Graduação, pelos anos de amizade e convivência. Um agradecimento especial as amigas Ana Carolina Lovatel e Daniela Tomazelli que tanto me apoiaram, se preocuparam e vibraram comigo minhas conquistas.

As minhas amigas de longa data, Adelina, Tatiana, Paula e Eloiza pela amizade que não tem preço, pelos conselhos, desabafos, conversas, incentivo e compreensão.

Aos meus sobrinhos Lucca, Sophia, Benjamin, Miguel, Igor, Gabriel e os emprestados Benício e Pedro pelos momentos de descontração, aprendizado e de muita diversão nas nossas brincadeiras. A tia Pri tem um carinho enorme e sente muito orgulho por cada um de vocês.

As queridas Vó Dorinha (*in memorian*) e Cleusa Theodoro (*in memorian*) pelo convívio e exemplos de vida.

Agradeço a todos os animais que passaram em minha vida. Em especial a Mell que me acompanhou durante 17 anos e com todos os seus problemas de saúde aguentou uns dias após a minha defesa para se despedir desse mundo. A inseparável companheira Fiona, exemplo de força, superação e amor condicional que continua a alegrar os meus dias.

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma e acreditaram na realização deste trabalho:

Meu sincero obrigada!

RESUMO

THEODORO, Priscila Stocco. Desenvolvimento de protocolos para avaliação do efeito de agrotóxicos sobre rizobactérias. 2022. 97 p. Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2022.

O uso de agrotóxicos pode resultar em contaminação ambiental, levantando preocupações sobre os efeitos e riscos sobre organismos não-alvo nos ecossistemas. Uma série de testes ecotoxicológicos são usados para avaliar a toxicidade de agrotóxicos em vários organismos teste. As bactérias são um componente ecológico significativo e as mudanças podem ter um impacto significativo na produção de alimentos e nos ciclos biogeoquímicos, mas até agora são pouco estudadas com relação ao impacto dos agrotóxicos no solo. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um protocolo ecotoxicológico para avaliar o efeito de agrotóxicos no crescimento bacteriano e os efeitos das concentrações de inibição nas populações da espécie *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 e AbV6 e do gênero *Bacillus* (*Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*). O método empregado foi diluição em microplacas das concentrações dos ingredientes ativos dos agrotóxicos em meio de cultura contendo as suspensões bacterianas e incubadas a 30 °C por 48 horas. Os resultados demonstraram que o método permitiu definir com sucesso o tempo de exposição dos ensaios através do comportamento da curva de crescimento e as concentrações de inibição para os ingredientes ativos avaliados. As rizobactérias promotoras de crescimento de plantas foram sensíveis ao efeito dos agrotóxicos no crescimento bacteriano, apresentando sensibilidade em 8 horas de exposição após a contaminação. Os parâmetros número de gerações e a taxa de crescimento instantâneo foram mais sensíveis para ambos os micro-organismos testados do que a exposição total. Os resultados mostram o potencial do uso de rizobactérias em testes de ecotoxicologia e aumentam a crescente de evidências de impactos de agrotóxicos em organismos não-alvo.

Palavras-chave: Bioensaios; Crescimento bacteriano; Rizobactérias.

ABSTRACT

THEODORO, Priscila Stocco. Development of protocols to evaluate the effect of pesticides on rhizobacteria. 2022. 106p. Tese de Doutorado em Ciência do Solo. Universidade do Estado de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Lages, 2022.

The use of pesticides can lead to environmental contamination, which raises concerns about the effects and risks to non-target organisms in ecosystems. A series of ecotoxicological tests are used to assess the toxicity of pesticides on various test organisms. Bacteria are important component of the ecosystem and changes can have a significant effect on the biogeochemical cycles and food chain, but so far, they have been little studied in relation to the impact of pesticides on soil. In this context, the objective of this work was to develop an ecotoxicological protocol to evaluate the effect of pesticides on bacterial growth and the effects of inhibition concentrations on populations of the species *Azospirillum brasilense* strains AbV5 and AbV6 and the genus *Bacillus* (*Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis*). The method used was dilution in microplates of the concentrations of the active ingredients of the pesticides in a culture medium containing the bacterial suspensions and incubated at 30 °C for 48 hours. The results showed that the method successfully defined the exposure time of the tests through the behavior of the growth curve and the inhibition concentrations for the evaluated active ingredients. Plant growth-promoting rhizobacteria were sensitive to the effect of pesticides on bacterial growth, showing sensitivity at 8 hours of exposure after contamination. The parameters number of generations and instantaneous growth rate were more sensitive for both tested microorganisms than total exposure. The results show the potential of using rhizobacteria in ecotoxicology tests and add to the growing evidence of impacts of pesticides on non-target organisms.

Keywords: Bacterial growth; Bioassays; Rhizobacteria.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Esquema experimental mostrando o preparo da solução tóxica e do pré-inóculo, seguido da montagem do teste em microplacas de 96 poços com as doses de agrotóxicos em ordem crescente para a leitura das densidades ópticas de 450, 540 e 690 nm, no intervalo de 0 a 48 horas.....39
- Figura 2 – Curva de crescimento de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 em função do tempo de exposição (h), nas absorvâncias 450, 540 e 690 nm, em meio Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), 30 °C, 100 rpm.....41
- Figura 3 – Curva de crescimento de *Bacillus* em função do tempo de exposição (h), nas absorvâncias 450, 540 e 690 nm em meio Luria Bertani (LB), 30 °C, 100 rpm.....72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro exposição total para <i>A. brasiliense</i> AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	42
Tabela 2 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro número de gerações para <i>A. brasiliense</i> AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	43
Tabela 3 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro taxa de crescimento instantânea para <i>A. brasiliense</i> AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	44
Tabela 4 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.....	50
Tabela 5 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.....	51
Tabela 6 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.....	52
Tabela 7 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.....	53
Tabela 8 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.	54
Tabela 9 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.....	55
Tabela 10 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.....	56
Tabela 11 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.	57
Tabela 12 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.	58
Tabela 13 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.	59
Tabela 14 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasiliense</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.....	60

Tabela 15 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	61
Tabela 16 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	62
Tabela 17 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	63
Tabela 18 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	64
Tabela 19 - Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	65
Tabela 20 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>A. brasilense</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	66
Tabela 21 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro exposição total para <i>Bacillus</i> em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	73
Tabela 22 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro número de gerações para <i>Bacillus</i> em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	74
Tabela 23 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro taxa de crescimento instantânea para <i>Bacillus</i> em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.....	75
Tabela 24 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.....	80
Tabela 25 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.....	81
Tabela 26 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.....	82
Tabela 27 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.....	83
Tabela 28 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.....	84
Tabela 29 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.....	85

Tabela 30 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.....	86
Tabela 31 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.....	87
Tabela 32 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.	88
Tabela 32 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.	89
Tabela 34 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.....	90
Tabela 35 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.....	91
Tabela 36 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	92
Tabela 37 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	93
Tabela 38 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	94
Tabela 39 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	95
Tabela 40 - Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.....	96
Tabela 41 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para <i>Bacillus</i> contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.....	97

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	15
1.1 OBJETIVOS	17
1.2 HIPÓTESES	17
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1. Ensaios ecotoxicológicos	19
2.2 Desenvolvimento de protocolos	19
2.3 Turbidimetria	20
2.4 Micro-organismos com potencial para serem usados nos testes	21
2.5 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs)	22
2.6 Uso de agrotóxicos	25
REFERÊNCIAS	27
3 CAPÍTULO 1 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO DE FUNGICIDA E INSETICIDA SOBRE <i>Azospirillum brasilense</i> cepas AbV5 e AbV6.....	33
RESUMO	33
ABSTRACT	34
3.1 INTRODUÇÃO	35
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	37
3.2.1 Micro-organismo estudado	37
3.2.2 Produtos avaliados	37
3.2.3 Teste de toxicidade bacteriana <i>in vitro</i>	37
3.2.4 Avaliações	39
3.2.5 Análise estatística	40
3.3 RESULTADOS	40
3.4 DISCUSSÃO	45
3.5 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS	48
APÊNDICE A	50

4 CAPÍTULO 2 PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FUNGICIDA E INSETICIDA SOBRE RIZOBACTÉRIA SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Bacillus subtilis</i>	67
RESUMO	67
ABSTRACT	68
4.1 INTRODUÇÃO	69
4.2 MATERIAL E MÉTODOS	71
4.2.1 Micro-organismo estudado	71
4.2.3 Teste de toxicidade bacteriana <i>in vitro</i>	71
4.3 RESULTADOS	71
4.4 DISCUSSÃO	76
4.5 CONCLUSÃO	77
5 CONCLUSÕES GERAIS	78
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICE B	80

1 INTRODUÇÃO GERAL

O crescimento da população intensificou a procura por bens de consumo, espaço, tecnologia e, principalmente, na produção de alimentos e, conseqüentemente, o aumento do uso de agrotóxicos e fertilizantes (LIU et al., 2019). O uso de agrotóxicos tem causado impactos negativos, que podem levar à contaminação da água e do solo e causar efeitos adversos sobre espécies não-alvo, afetando a biodiversidade, a cadeia trófica, as funções ecossistêmicas tanto em ecossistemas aquáticos como terrestres (MEENA et al., 2020). Atualmente, os órgãos reguladores têm intensificado as exigências de dados e de protocolos ecotoxicológicos que permitam inferir sobre o risco ambiental de substâncias a serem utilizadas na agricultura, na saúde, no processamento e conservação de alimentos, e outros produtos, inclusive resíduos dos processos produtivos. Deste modo, as avaliações de riscos ecológico (ARE) de agrotóxicos devem ser cada vez mais abrangentes incluído organismos representativos das funções ecológicas que mantêm os sistemas produtivos.

No Brasil, os testes ecotoxicológicos exigidos pelo IBAMA são com abelhas e minhocas, mas outros organismos não-alvo vêm sendo amplamente estudados, como microcrustáceos (BARSZCZ et al., 2019), peixes (FREITAS, 2020), aves (WANG, 2021), algas (MILOLOZA et al., 2021), enquitreídeos e colêmbolos (NIEMEYER et al., 2017; ZÓRTEA et al., 2018; ALVES et al., 2019; CARNIEL et al., 2020). Em 2017, a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) recomendou os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) como objetivo de proteção para análise de risco dos efeitos de agrotóxicos no solo dada sua importância ecológica, entretanto, protocolos para testes de efeitos ecotoxicológicos sobre micro-organismos do solo não-alvo ainda são escassos. Os FMA constituem um grupo de grande relevância ecológica que vem sendo estudado, para os quais recentemente foram validados para agrotóxicos dois protocolos padronizados: um para avaliar efeitos na fase pré-simbiótica (MALLMANN et al., 2018) e outro para a fase simbiótica (MALLMANN, 2020).

Para outros micro-organismos presentes no solo, tais como as bactérias rizosféricas são escassos os protocolos de avaliações de risco ambiental que permitam avaliar de forma padronizada o risco de agrotóxicos que norteie a sensibilidade desses organismos (BASILE, 2008; MALLMANN, 2018). Logo, determinar espécies de referência de rizobactérias é fundamental no desenvolvimento de metodologia eficiente para a avaliação. Até o momento a OECD (2000a e 2000b) estabelece normas para testes ecotoxicológicos com micro-organismos do solo com base apenas nas transformações do nitrogênio e do carbono no solo,

como forma de avaliar os riscos do uso de agrotóxicos na atividade microbiana global. Nestes testes não há a caracterização da microbiota edáfica, que pode ser a causa das grandes variações dos resultados obtidos para um mesmo tipo de solo, mesmo em condições padronizadas de laboratório.

A análise de risco e autorização de registro de agrotóxicos tanto no Brasil como no Exterior são feitas considerando os efeitos apenas sobre organismos chave da fauna do solo e não consideram efeitos de toxicidade aguda ou crônica sobre fungos ou bactérias rizosféricas (BASILE, 2008; MALLMANN, 2018), o que está relacionado a ausência de estudos e desenvolvimento de protocolos padronizados, reprodutíveis e robustos para tal. Neste sentido, as rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCP) podem constituir grupo importante de organismos não-alvo quanto a utilização em protocolos ecotoxicológicos e aos efeitos dos agrotóxicos no solo sobre elas. Esse grupo de organismos destaca-se por suas funções ecossistêmicas essenciais relacionadas a fixação biológica do N, biorregulação, solubilização de fosfatos e produção de promotores de crescimento vegetal (GALINDO et al., 2019). Para a validação de uma resposta ecotoxicológica é necessária a padronização do organismo e de sua resposta à variação da relação concentração-mortalidade ou concentração-inibição do crescimento. A eleição de organismos testes para avaliações da toxicidade de agrotóxicos em condições de laboratório segue os seguintes critérios: os organismos devem ser representativos de um grupo taxonômico de importância ambiental, ser de fácil disponibilidade para execução de teste, existência de informações adequadas da espécie e sempre que possível, ser uma espécie nativa (BUCH et al., 2016).

As rizobactérias promotoras de crescimento das espécies *Azospirillum brasilense*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* apresentam grande parte dos quesitos de eleição de um organismo-teste, onde destacam-se: crescimento rápido e uniforme, fácil obtenção e cultivo, e facilidade nas avaliações de crescimento. Trata-se de organismos úteis de grande importância na dinâmica dos agroecossistemas e de grande relevância biológica. Além disso estes organismos são amplamente utilizados com bioinsumos na agricultura. A inclusão de um teste com RPCP seria um complemento ecologicamente relevante ao conjunto de organismos utilizados em testes de ecotoxicológicos.

Neste contexto, considerando a importância ecológica e tecnológica das RPCPs e a necessidade de metodologias padronizadas para conhecer o efeito dos agrotóxicos que permitam incluir no esquema de análise de risco ecológico de substâncias para o solo, realizou-

se o presente estudo com os objetivos de propor protocolo inicial para avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre o crescimento das rizobactérias *Azospirillum brasilense* e de uma cultura de *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*, micro-organismos que compõem a formulação de inoculantes microbianos usados no Brasil.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

Estabelecer protocolos ecotoxicológicos para avaliação dos efeitos de agrotóxicos em populações de *Azospirillum* e *Bacillus* oriundas de formulações comerciais de bioinsumos.

Objetivos específicos

1. Definir as condições de ensaio, o tempo de exposição e os efeitos das concentrações de inibição de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) do gênero *Azospirillum*, *in vitro*, a agrotóxicos.
2. Definir as condições de ensaio, o tempo de exposição e os efeitos das concentrações de inibição de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) do gênero *Bacillus*, *in vitro*, a agrotóxicos.

1.2 HIPÓTESES

1. As populações de RPCPs da espécie *Azospirillum brasilense* e do gênero *Bacillus* (*B. megaterium* + *B. subtilis*) são sensíveis à presença de agrotóxicos e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente ao intervalo de tempo de exposição que define a fase log de crescimento.
2. Os valores de concentração de inibição do crescimento bacteriano podem ser utilizados para indicar a toxicidade tanto de fungicidas, inseticidas ou ainda de mistura sobre populações de RPCPs endofíticas e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente com o tempo de exposição, comprimento de onda e aos parâmetros de exposição total, número de gerações e na taxa de crescimento.

3. Os inoculantes comerciais a base de RPCPs do gênero *Azospirillum* e *Bacillus* podem ser incluídos em protocolos ecotoxicológicos padronizados para avaliação do efeito de agrotóxicos em rizobactérias.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ensaios ecotoxicológicos

O uso de ensaios ecotoxicológicos para detectar alterações causadas por substâncias tóxicas sobre a biota terrestre e aquática no ambiente tem sido frequente em estudos de diagnóstico e monitoramento ambiental onde são utilizados organismos terrestres, aquáticos e plantas, que ficam expostos aos contaminantes sob condições controladas (CETESB, 2001; COTTA et al., 2019). Para estes fins, os ensaios ecotoxicológicos precisam reunir algumas características, tais como: rapidez, padronização, baixo custo e sensibilidade para distinguir entre graus de contaminação (ALVES et al., 2013). Sendo assim, por meio dos ensaios ecotoxicológicos, são verificados os efeitos das variáveis ambientais capazes de afetar a toxicidade das substâncias disponíveis aos seres vivos de um ecossistema, podendo indicar uma resposta mais precisa dos contaminantes presentes nas amostras ambientais (FONSECA et al., 2020). Diversos organismos que desempenham funções essenciais na manutenção dos serviços ecossistêmicos são utilizados em teste ecotoxicológicos, como: minhocas, enquitreídeos e colêmbolos. Recentemente, foram desenvolvidos testes de germinação de esporos de FMAs, com a obtenção de protocolos ISO para os grupos de FMAs utilizados (MALLMANN et al., 2018). A necessidade de incluir outros micro-organismos-chave, já vem sendo discutida para integrar protocolos e fornecer respostas sobre os efeitos de substâncias sobre esses organismos, já que protocolos para esses grupos-chave no solo ainda são escassos (EFSA, 2017).

2.2 Desenvolvimento de protocolos

O estudo da ecotoxicologia em ambientes terrestres é uma ciência relativamente nova, cujo maior desenvolvimento científico ocorreu nos últimos 30 anos e se concentrou principalmente na Europa e Estados Unidos e ainda há muitos questionamentos sobre as possíveis situações de impacto sobre os organismos representantes do ambiente edáfico em países tropicais (BIANCHI et al., 2010).

É importante que qualquer método de monitoramento ambiental, principalmente os baseados na reposta de organismos individuais a estressores químicos, seja padronizado e baseado em métodos bem estabelecidos. A utilização de testes padronizados traz inúmeras vantagens principalmente por permitir a seleção de um ou mais testes uniformes e úteis para

uma variedade de laboratórios, facilitar a comparação dos dados contribuindo para aumentar a utilização dos dados publicados e permitir a reprodução de cada teste. Os efeitos ecotoxicológicos podem ocorrer em todos os níveis de organização biológica, desde molecular até o ecossistema, nas suas estruturas e funções (SUARES-ROCHA & UMBUZEIRO, 2022).

Com a necessidade de criação de novos modelos que envolvam organismos distintos e diferentes moléculas como ferramentas científicas de avaliação do potencial tóxico dos agrotóxicos foram e vem sendo desenvolvidas. Testes *in vitro* e *in vivo* avaliando efeitos que não apenas a mortalidade em sistemas testes alternativos como as células cultivadas em laboratório começaram a ser utilizados, aliando a necessidade de novas ferramentas de investigação. A combinação de diferentes métodos permite investigar múltiplos parâmetros, além de auxiliar no melhor entendimento de modos de ação, vias de toxicidade e na interpretação dos resultados das investigações. (SUARES-ROCHA & UMBUZEIRO, 2022). A introdução de metodologias adequadas para verificar o efeito dos agrotóxicos nos micro-organismos do solo é um passo decisivo para verificar qualquer efeito indesejado em um alto nível de segurança (SCHÄFER et al., 2019). Até o momento, a ecotoxicologia bacteriana estava restrita a níveis comunitários, mas também é importante investigar como os agrotóxicos em populações individuais influenciam os diferentes níveis de organizações biológicas para permitir um conhecimento mais profundo dos efeitos dos agrotóxicos.

As bactérias exercem funções essenciais na manutenção dos ecossistemas e fornecem informações que contribuem efetivamente na interpretação dos efeitos atribuídos às perturbações do solo (MENDES et al., 2015). Por esta razão tornam-se bons indicadores da qualidade ambiental já que um poluente ambiental, mesmo em concentrações baixas, pode ser identificado por estes organismos e com respostas em um curto intervalo de tempo.

2.3 Turbidimetria

As medições de turbidez são usadas para estimar os parâmetros de crescimento de bactérias como uma alternativa às tradicionais contagens em placas. Seu uso aumentou à medida que novas tendências em microbiologia preditiva começaram a concentrar na quantificação na variabilidade das respostas bacterianas aos ambientes, especialmente em relação aos estudos de avaliação de risco microbiológico. Os sistemas automatizados de medição de turbidez permitem a produção de grandes quantidades de observações replicadas por longos períodos. A turbidimetria apresenta vantagem de ser rápida e de fácil execução e pode

ser utilizada para monitorar o crescimento bacteriano sem destruir ou alterar as amostras (TORTORA et al., 2016).

A turbidez é a razão entre a intensidade da luz incidente e a luz espalhada pela cultura em um comprimento de onda definido. O método de turbidez é aplicável em densidades celulares mais altas entre 10^6 e 10^7 mL⁻¹ (TORTORA et al., 2016).

Os comprimentos de onda normalmente utilizados para medir turbidez bacteriana incluem 480 nm (azul), 540 nm (verde), 600 nm (laranja) e 660 nm (vermelho), tendo como unidade de medida correspondente a densidade óptica (DO). Em organismos unicelulares, a densidade óptica é proporcional, ao número de células bacterianas. (ALTERTHUM, 2008)

Os comprimentos de onda mais curtos, região do espectro azul, permitem uma maior sensibilidade nas leituras de absorvância. Porém em suspensões celulares densas as medidas de absorvância são mais precisas em leituras realizadas com comprimentos de onda mais longos, região vermelha do espectro que corresponde a uma absorvância de aproximadamente 660 nm, isso ocorre porque nesta faixa de comprimento de onda é gerada uma menor dispersão de luz (TORTORA et al., 2016).

2.4 Micro-organismos com potencial para serem usados nos testes

O solo é um recurso limitado que fornece um habitat único e complexo para uma ampla gama de micro-organismos que suportam as principais funções do ecossistema do solo e contribuem para processos complexos (BLUM, 2006; GRAHAM et al., 2016). Os micro-organismos do solo são os organismos mais abundantes nos ecossistemas terrestres (PEDRÓS-ALIÓ & MANRUBIA, 2016). Eles cumprem uma gama de funções que suportam os ciclos biogeoquímicos, contribuem para o abastecimento de alimentos e a qualidade da água, regulam as emissões de gases de efeito estufa e participam de processos de detoxificação do solo (SMITH et al., 2015). A perda de diversidade microbiana pode alterar múltiplas funções e serviços do solo, com grandes consequências no ecossistema (PHILIPPOT et al., 2013; DELGADO-BAQUERIZO et al., 2016).

Poluentes como os agrotóxicos, podem afetar indiretamente os micro-organismos do solo ao inibir enzimas envolvidas em processos microbianos na sobrevivência de certas espécies e o comprometimento das funções desenvolvidas por estes (PUGLISI et al., 2012; KARPOUZAS et al., 2014; ROMDHANE et al., 2016). Ainda, a exposição repetida a poluentes pode induzir o surgimento de micro-organismos capazes de metabolizá-los para obter nutrientes

e energia através da biorremediação (ARBELI & FUENTES, 2007). Nesse contexto, os micro-organismos representam bioindicadores relevantes da qualidade do solo (THIELE-BRUHN et al., 2020).

2.5 Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas (RPCPs)

Muitos micro-organismos coexistem e vivem na região da rizosfera devido à alta quantidade de exsudatos liberados pelas plantas, sendo as bactérias as mais abundantes, de vida livre ou ainda de forma associativa, como as rizobactérias endofíticas (SAHARAN & NEHRA, 2011). A utilização de micro-organismos benéficos às plantas, como as RPCPs, vem ganhando atenção crescente na busca por sistemas agrícolas mais sustentáveis (KOSKEY et al., 2021; SANTOS et al., 2021). Devido ao seu potencial na substituição e/ou redução do uso de fertilizantes, certamente nas próximas décadas, os inoculantes microbianos irão desempenhar um papel importante na revolução agrícola, visando uma agricultura sustentável (PARNELL et al., 2016). A importância de RPCPs na agricultura foi apresentada pela primeira vez por Kloepper e Schroth (1978) e, a partir disso, diversos pesquisadores em todo mundo começaram a investigar os mecanismos, modo de ação, fisiologia e bioquímica dessas bactérias, alcançando uma compreensão mais detalhada da mecânica empregada por RPCPs para promover o crescimento de plantas (GOSWAMI et al. 2016). Esse entendimento permitiu o uso prático de RPCPs na agricultura na forma de produtos formulados, utilizados como bioinoculantes (JHA & SARAF, 2015).

A interação entre plantas e RPCPs é um processo complexo e recíproco. A colonização bacteriana de plantas é a etapa inicial e fundamental nessa interação benéfica. Ela se inicia através da exsudação de diversos compostos pelas raízes, os quais atraem micro-organismos do solo e da rizosfera em sua direção por quimiotaxia, causando subsequente movimento bacteriano ao longo das raízes e possível aderência na superfície radicular por RPCP que influenciam positivamente o desenvolvimento vegetal através de mecanismos diretos e/ou indiretos (VESSEY et al, 2003). Mecanismos diretos compreendem tanto a facilitação da aquisição de nutrientes como: fixação biológica de nitrogênio (FUKAMI et al., 2018), solubilização de fosfato (WAHYUDI et al., 2011; BAHADIR et al., 2018) e a produção de sideróforos quelantes específicos de íons ferro (BJELIĆ et al., 2018), quanto à modulação de níveis hormonais vegetais na produção de ácido indol acético (AIA) e outros fito-hormônios (WAHYUDI et al., 2011; MOHITE, 2013; FUKAMI et al. 2018). Mecanismos indiretos

envolvem a redução dos efeitos inibitórios de vários patógenos sobre o desenvolvimento e crescimento vegetal, mais especificamente, por meio de competição por nutrientes, exclusão de nichos, indução de resistência sistêmica e produção de metabólitos antimicrobianos (SHAFI et al., 2017).

Dentre os gêneros bacterianos de RPCPs estão: *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azorhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Delftia*, *Enterobacter*, *Frankia*, *Gluconacetobacter*, *Klebsiella*, *Mesorhizobium*, *Micrococcus*, *Paenabacillus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Streptomyces* e *Thiobacillus* (GLICK, 1995; BASU et al., 2021), sendo os gêneros *Azospirillum*, *Pseudomonas* e *Bacillus* os mais extensivamente estudados (BENEDUZI et al., 2012; SANTOS et al., 2021). As bactérias do gênero *Bacillus* têm se destacado, devido a sua ampla distribuição no ambiente, compreendendo um grupo de bactérias gram positivas, em formato de bastonete e capaz de formar estruturas dormentes estáveis, os endósporos, permitindo adaptação a condições abióticas extremas, como temperaturas, pH ou exposição a agrotóxicos (BAHADIR et al., 2018). A produção de auxinas e a formação dos endósporos por *Bacillus* oferecem oportunidade de uso dessas características na promoção de crescimento vegetal e uma estratégia para a recomendação de produção de inoculantes industriais (BATISTA, 2017). *Bacillus* podem influenciar o crescimento das plantas, aumentar a produção, solubilizar fosfato e potássio e proteger as plantas contra patógenos (IDRISS et al., 2002; WAHYUDI et al., 2011). Há evidências de que 80% dos micro-organismos isolados da rizosfera de diferentes culturas têm a capacidade de produzir auxinas (AIA) usando metabólitos secundários (CHANDRA & SINGH, 2016). Este fito-hormônio promove mudanças no controle do crescimento vegetativo em plantas (GUPTA et al., 2016; CHANDRA & SINGH, 2016) e pode levar ao aumento de volume, ramificação e comprimento da raiz, especialmente nos estágios iniciais de desenvolvimento (CASSÁN et al., 2014) proporcionando, conseqüentemente, maior acesso aos nutrientes do solo e à água. Foram quase 20 anos de estudos e dedicação para que duas cepas identificadas pela Embrapa Milho e Sorgo, *Bacillus megaterium* BRM 119 (isoladas da rizosfera de plantas de milho) e *Bacillus subtilis* BRM2084 (caracterizada como endofítica de milho), dando origem ao primeiro inoculante microbiano de solubilização de fósforo no Brasil, através de uma parceria público-privada da Embrapa e a empresa Bioma. O inoculante BiomaPhos® foi desenvolvido inicialmente para milho, mas já vem trazendo resultados para outras culturas como soja, cana-de-açúcar, feijão, arroz, sorgo, braquiária e café, aumentando a

absorção de fósforo pelas plantas, resultando em incremento na produção de grãos (OLIVEIRA-PAIVA et al., 2020a e 2020b).

Espécies de *Azospirillum* são as RPCPs mais estudada atualmente e têm sido usadas como inoculantes em diferentes partes do mundo em diversas culturas, inclusive no Brasil e seu uso aumentou de forma impressionante no Brasil e na Argentina nos últimos anos (FUKAMI et al., 2018; CASSÁN et al., 2020). Esses micro-organismos são capazes de fixar nitrogênio atmosférico e produzir vários tipos de fito-hormônios, como auxinas, giberelinas, citocininas, etileno, ácido abscísico e ácido salicílico (DE-BASHAN et al., 2010; CASSÁN et al., 2014; FUKAMI et al., 2016; FUKAMI et al., 2017). Os benefícios incluem proteção contra estresses abióticos e bióticos (FUKAMI et al., 2018) e aumento da produtividade (RONDINA et al., 2020). Efeitos da coinoculação com RPCPs também foram observados (FUKAMI et al., 2017, BARBOSA et al., 2021). Além de estimular o crescimento radicular, os fito-hormônios melhoram a arquitetura radicular para absorção de água e nutrientes (FUKAMI et al., 2017; FUKAMI et al., 2018; RONDINA et al., 2020).

Apesar dos grandes avanços obtidos em estudos, as primeiras estirpes comerciais de *Azospirillum* no Brasil tiveram sua eficiência agrônômica confirmada pela Embrapa Soja em 2004 e o primeiro inoculante comercial foi comercializado em 2009. Desde então, dezenas de resultados vêm sendo publicados com as duas principais estirpes, *A. brasilense* Ab-V5 e AbV6, principalmente nas culturas do milho e do trigo, mas também há registro para o arroz. Na safra de 2019/2022 mais de 10,5 milhões de doses de inoculantes contendo *A. brasilense* foram comercializadas para gramíneas no Brasil (SANTOS et al., 2021). Além da inoculação, a coinoculação é uma tecnologia de manejo recentemente recomendada entre diferentes gêneros de RPCPs como *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e *Azospirillum*. A coinoculação apresenta incrementos na nodulação, no crescimento vegetal e na produtividade das culturas agrícolas que respeita a sustentabilidade agrícola, econômica e ambiental (BATISTA et al., 2017).

Considerando o aumento do uso de *Azospirillum* e *Bacillus* como rizobactérias, por outro lado, o amplo uso de agrotóxicos na agricultura moderna pode causar efeitos colaterais prejudiciais aos micro-organismos do solo não-alvo, afetando a biodiversidade, as cadeias alimentares e os ecossistemas terrestres. Pesquisas de campo e de laboratório nas últimas décadas indicaram que a maioria dos agrotóxicos podem apresentar efeitos estimulantes no crescimento da população de micro-organismos do solo, porém outros agrotóxicos podem causar efeitos negativos suprimindo o crescimento e atividade da nitrogenase das bactérias fixadoras de

nitrogênio (ALCÂNTARA NETO et al., 2014; CAMPO et al.; 2009; PEREYRA, 2009; ARAÚJO & ARAÚJO, 2006). Os estudos ecotoxicológicos permitem avaliar o potencial risco ambiental do uso de determinadas substâncias, por meio de testes padronizados capazes de fornecer resultados rápidos sobre os efeitos de substâncias que estão presentes no solo sobre os organismos (ALVES et al., 2013). No âmbito do processo de registro de agrotóxicos, o impacto ecotoxicológico dos agrotóxicos sobre os micro-organismos do solo apresentam abordagens clássicas para quantificar impactos na abundância (massa microbiana), estrutura (análise de ácidos graxos fosfolipídicos, técnicas moleculares, como T-RFLP ou A-RISA) ou atividade (respiração do solo, atividade enzimática) das comunidades microbianas do solo (SRINIVASULU & RANGASWAMY, 2013; ANURADHA et al., 2016; WANG et al., 2016). Mais recentemente os estudos estão utilizando o sequenciamento de DNA de última geração (NGS) e microarranjos de alta densidade (PhyloChip) para avaliação do potencial do efeito toxicológico sobre a diversidade e a composição das comunidades bacterianas do solo (STORCK et al., 2018).

Ensaio utilizando RPCPs ainda são escassos, não havendo protocolos padronizados para a condução, o que demonstra a importância de tal estudo, o qual poderá ser um primeiro passo para a adequação dos protocolos internacionais para a inclusão de RPCPs como referência para os ensaios ecotoxicológicos, incluindo parâmetros de avaliações de toxicidade.

2.6 Uso de agrotóxicos

No Brasil, a produção de agrotóxicos teve início na década de 1940, com a consolidação do setor e foi estabelecida por volta de 1970. Ao mesmo tempo, começou uma série de programas e movimentos que incentivaram o uso e o comércio dos agrotóxicos, como o Sistema Nacional de Crédito Rural (SNCR) e o Programa de Defensivos Agrícolas (LONDRES, 2011).

Baseado na Revolução Verde, o modelo de produção agrícola predominante no Brasil baseia-se no uso intensivo de insumos e técnicas para aumentar a produtividade (EMBRAPA, 2014). Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a venda de agrotóxicos no Brasil cresceu quase 40 vezes nos últimos 20 anos, registrando a venda de 620 mil toneladas de ingrediente ativo em 2019 (IBAMA, 2019). Herbicidas, seguidos de fungicidas e, por fim, inseticidas, foram os mais vendidos. Quanto à classe de perigo para o meio ambiente, 60% dos agrotóxicos vendidos são da classe III

(perigosos), 32,03% da classe II (muito perigosos), e aproximadamente 1% da classe I (altamente perigoso). (IBAMA, 2019).

O uso intensivo de agrotóxicos tem causado preocupação em relação ao destino no meio ambiente, comportamento e os efeitos em organismos não-alvo (DIVELY et al., 2015). A dinâmica dos agrotóxicos no meio ambiente depende de uma série de fatores que afetam a persistência e a mobilidade de substâncias em diferentes compartimentos do ambiente (EMBRAPA, 2008).

A piraclostrobina, molécula de efeito fungicida e de ação sistêmica, princípio ativo do produto comercial Comet®, pertencente ao grupo da estrobilurina. Atua como inibidor da respiração fúngica por meio do transporte de elétrons nas mitocôndrias do citocromo-b e do citocromo-c1, inibindo a formação de ATP (ZHANG et al., 2020). Possui indicação para uso em diversas culturas agrícolas de trigo, milho e arroz e em sistemas florestais que realizam o plantio de pinus e eucalipto.

O fipronil é um inseticida de contato e ingestão, do grupo pirazol, ingrediente ativo do produto comercial Source®. O mecanismo de ação do fipronil age por bloqueio não-competitivo dos canais de cloreto dos receptores específicos do sistema GABA, um dos neurotransmissores responsáveis por efeitos inibitórios no sistema nervoso central e das sinapses neuromusculares (MAGNUSON et al., 2022). Utilizado no tratamento de sementes de arroz, cevada, feijão, milho, pastagens, soja e trigo (AGROFIT, 2022).

O Standak®Top é uma mistura comercial de ingredientes ativos contendo o inseticida fipronil do grupo pirazol, e os fungicidas piraclostrobina do grupo da estrobilurina e tiofanato metílico do grupo do benzimidazol. Segundo a recomendação de uso do fabricante, esse produto é destinado ao tratamento das sementes antes do plantio e estabelecimento da muda a campo, a fim de evitar a infecção por fungos e ataque de pragas no período inicial do desenvolvimento da cultura.

REFERÊNCIAS

- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos e Fitossanitários. Ingredientes ativos > Fipronil.** Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em 23/01/2022.
- ALCÂNTARA NETO, F. et al. Tempo de contato e de combinação de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. **Revista Agro@mbiente**, v. 8, n. 1, p. 149-154. 2014.
- ALTERTHUM, F. Crescimento microbiano. *In*: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p.30-35.
- ALVES, P. R. et al. Earthworm ecotoxicological assessment of pesticides used to treat seeds under tropical conditions. **Chemosphere**, n.90, p.2674–2682. 2013.
- ALVES, P. R. L. et al. Ecotoxicological assessment of Fluazuron: effects on *Folsomia candida* and *Eisenia andrei*. **Environmental Science Pollution Research**, v.26, p.5842-5850. 2019.
- ANURADHA, B.; REKHAPADMINI, A.; and RANGASWAMY, V. Influence of tebuconazole and cooper hydroxide on phosphatase and urease activities in red sandy loam and black clay soils. **Biotech** 6:78. 2016.
- ARAÚJO, A. S. F & ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.973-976. 2006.
- ARBELI, Z. & FUENTES C. L. Improved purification and PCR amplification of DNA from environmental samples. **FEMS Microbiology Letters**, v.272, n.2 p.269-75. 2007.
- BAHADIR, P. S.; LIAQAT, F.; ELTEM, R. Plant growth promoting properties of phosphate solubilizing *Bacillus* species isolated from the Aegean Region of Turkey. **Turkish Journal of Botany**, v.42, n.2, p.183-196. 2018.
- BARBOSA, J. Z. et al. Meta-analysis reveals benefits of co-inoculation of soybean with *Azospirillum brasilense* and *Bradyrhizobium* spp. in Brazil. **Applied Soil Ecology**, v.163. 2021.
- BARSZCZ, L. B. et al. Avaliação ecotoxicológica de efluentes tratados por alagados construídos. **Engenharia Sanitária e Ambiental**. v.24, p.1147-1156. 2019.
- BASILE, A. G. **Desenvolvimento de teste ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae*: toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental**. 2008. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
- BASU, A. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as Green Bioinoculants: Recent Developments, Constraints, and Prospects. **Sustainability**. 2021.

- BATISTA, B. D. **Promoção de crescimento vegetal por *Bacillus* sp. RZ2MS9: dos genes ao campo**. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2017.
- BENEDUZI, A.; AMBROSINI, A.; PASSAGLIA, L. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): their potential as antagonists and biocontrol agents. **Genetics and molecular biology**. v.35, p.1044-1051. 2012.
- BIANCHI, M. de O. et al. Importância de estudos ecotoxicológicos com invertebrados do solo. Embrapa Agrobiologia, 2010. 32 p. (Embrapa Agrobiologia. **Documentos**, 266).
- BJELIĆ, D. et al. Antifungal and plant growth promoting activities of indigenous rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) rhizosphere. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v.49, n.1, p.88-98. 2018.
- BLUM W. E. H. Soil resources - the basis of human society and the environment. **Bodenkultur** 57, p.197–202. 2006.
- BUCH, A. et al. Ecotoxicity of mercury to *Folsomia candida* and *Proisotoma minuta* (Collembola: Isotomidae) in tropical soils: Baseline for ecological risk. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n.127, p.22–29. 2016.
- CAMPO, R. J; ARAUJO, R. S; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v.48, p.154-163. 2009.
- CARNIEL, L. S. C. et al. Are there any risks of the disposal of pesticide effluents in soils? Biobed system meets ecotoxicology ensuring safety to soil fauna. **Ecotoxicology**, v.29, p.1409-1421. 2020.
- CASSÁN, F., VANDERLEYDEN, J. & SPAEPEN, S. Physiological and Agronomical Aspects of Phytohormone Production by Model Plant-Growth-Promoting Rhizobacteria (PGPR) Belonging to the Genus *Azospirillum*. **J Plant Growth Regul**, v.33, p.440–459. 2014.
- CASSÁN, F. et al. Everything you must know about *Azospirillum* and its impact on agriculture and beyond. **Biology and Fertility of Soils**, v.56, p.461-479. 2020.
- CETESB, 2001. Companhia de tecnologia de saneamento ambiental. **Relatório de Estabelecimento de Valores Orientadores para Solos e Águas Subterrâneas no Estado de São Paulo**. São Paulo, Brasil. 2001. 73 p.
- CHANDRA, P. & SINGH, E. Applications and mechanisms of plant growth stimulating rhizobacteria. In: CHOUDHARY, D.; VARMA, A.; TUTEJA, N. **Plant-microbe interaction: an approach to sustainable agriculture**. Switzerland: Springer, 2016. p. 37-62.
- COMET®. Schwarzheide, Alemanha: BASF, The Chemical Company. **Bula de agrotóxico**. file:///C:/Users/cliente/Downloads/Bula+-+Comet%C2%AE.pdf. Acesso em 10/05/2021.
- COTTA, J.; SOARES, G.; NASCIMENTO L. E. Ensaios ecotoxicológicos de solo contaminado por diesel submetido à degradação pela espécie *Eisenia fetida*. **Research, Society and Development**, v.9, n.2. 2020.

- DE-BASHAN, L. E. et al. Growth of quailbush in acidic, metalliferous desert mine tailings: effect of *Azospirillum brasilense* Sp6 on biomass production and rhizosphere community structure. **Microbial Ecology**, v.60, p.915-927. 2010.
- DELGADO-BAQUERIZO, M. et al. Microbial diversity drives multifunctionality in terrestrial ecosystems. **Nat Commun**, v.7. 2016.
- DIVELY, G. P. et al. Assessment of chronic sublethal effects of imidacloprid on honey bee colony health. **PLoS ONE**, v.10, p.1–25. 2015.
- EFSA - European Food Safety Authority. Guidance Document for predicting environmental concentrations of active substances of plant protection products and transformation products of these active substances in soil. **EFSA Journal**. p.115, 2017.
- EMBRAPA. **Panorama da contaminação ambiental por agrotóxicos e nitrato de origem agrícola no Brasil: cenário 1992/2011**. Embrapa Meio Ambiente, Brasil, 2014.
- EMBRAPA. **Pragas iniciais do Milho**. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, Brasil, 2008.
- FONSECA, G. E. et al. Diferentes tipos de matéria orgânica no ensaio de reprodução da minhoca californiana *Eisenia andrei*. **Research, Society and Development**, v.9, n.4. 2020
- FREITAS, T.R. **Efeitos da exposição ao Roundup® e ao Fipronil em biomarcadores bioquímicos em *Oreochromis niloticus* (Linnaeus, 1758)**. 2020. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Centro de Ciências Agroeterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2020.
- FUKAMI, J. et al. Assessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. **AMB Expr**. 2016.
- FUKAMI, J. et al. Phytohormones and induction of plant-stress tolerance and defense genes by seed and foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* cells and metabolites promote maize growth. **AMB Expr**. 2017.
- FUKAMI, J.; CERZINI, P.; HUNGRIA, M. *Azospirillum*: benefits that go far beyond biological nitrogen fixation. **AMB Expr**. 2018.
- GALINDO, F. S. et al. Assessing Forms of Application of *Azospirillum brasilense* Associated with Silicon Use on Wheat. **Agronomy**, v.9. 2019.
- GLICK, B. R. The enhancement of plant growth by free-living. **Can J Microbiol**, v.41, p.109-117. 1995.
- GOSWAMI, D.; THAKKER, J. N. & DHANDHUKIA, P. C.; MORAL, M. T. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **Cogent Food & Agriculture**, 2:1. 2016.
- GRAHAM, E. B. et al. Microbes as engines of ecosystem function: when does community structure enhance predictions of ecosystem processes? **Frontiers in Microbiology** 7: 214, 2016.
- GUPTA, A.; ANNAPURNA, K.; JAITLEY, A. K. Screening of osmo protectants for liquid formulation of *Azospirillum* bio-inoculant. **Int J Serv Technol Manag**, v.5, n.5, p.258-267, 2016.

IBAMA. **Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins**. Brasília, 2019. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-deagrotoxicos>. Acesso em: 8 de maio. 2022.

IDRISS E. E. et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus amyloliquefaciens* FZB45 contributes to its plant-growth-promoting effect. **Microbiology** (Reading). p.2097-2109, 2002.

JHA, C. K. & SARAF, M. Plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. **E3 Journal of Agricultural Research and Development**, 5 (2), p.108–119. 2015.

KARPOUZAS, D. G. et al. Effects of nicosulfuron on the abundance and diversity of arbuscular mycorrhizal fungi used as indicators of pesticide soil microbial toxicity. **Ecological Indicators**, v.39, p.44-53. 2014.

KLOEPPER, J. W. & SCHROTH, M. N. Plant growth promoting rhizobacteria on radishes. *In Proceedings of the 4th International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*, v.2, p.879–882. 1978.

KOSKEY, G. et al. Potential use of beneficial microorganisms for soil amelioration, phytopathogen biocontrol, and sustainable crop production in smallholder agroecosystems. **Front. Sustain. Food Syst**, v.29. 2021

LIU, M. et al. Aptasensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v.130, p.174-184. 2019.

LONDRES, F. **Agrotóxicos no Brasil: uma guia para ação em defesa da vida**. 1. ed. Rio de Janeiro: ASPTA- Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa. 2011.190 p.

MAGNUSON J. T. et al. Dietary Exposure to Bifenthrin and Fipronil Impacts Swimming Performance in Juvenile Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Environ Sci Technol**. v.56, p.5071-5080. 2022.

MALLMANN, G. C. et al. Placing arbuscular mycorrhizal fungi on the risk assessment test battery of plant protection products (PPPs). **Ecotoxicology**. v.27, p.809–818. 2018.

MALLMANN, G. C. **Métodos ecotoxicológicos na avaliação do efeito de agrotóxicos sobre fungos micorrízicos arbusculares**. 2020. Tese (Doutorado em Ciência do Solo) – Centro de Ciências Agroveterinárias, Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2020.

MEENA, R. S. et al. Impact of Agrochemicals on Soil Microbiota and Management: A Review. **Land**, 9, 34. 2020.

MENDES, I. C. et al. Bioindicadores de qualidade de solo: dos laboratórios de pesquisa para o campo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 32, p. 191-209. 2015.

MILOLOZA, M. et al. Ecotoxicological determination of microplastic toxicity on Algae *Chlorella* sp.: response surface modeling approach. **Water Air & Soil Pollut**, 232. 2021.

MOHITE, B. Isolation and characterization of indole acetic acid (IAA) producing bacteria from rhizospheric soil and its effect on plant growth. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.13, n.3, p.638-649. 2013.

NIEMEYER, J.C.; CHELINHO, S.; SOUSA, J.P. Soil ecotoxicology in Latin America: Current research and perspectives. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v.36, p.1795-1810. 2017.

OECD, Organization Economic Cooperation Development., Guidelines for the testing of chemicals. **Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test**. n.217, 2000a, 10p.

OECD, Organization Economic Cooperation Development., Guidelines for the testing of chemicals. **Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation Test**. n.216, 2000b, 10p.

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. M. Viabilidade técnica e econômica do Biomaphos® (Bacillus subtilis CNPMS B2084 e Bacillus megaterium CNPMS B119) nas culturas de milho e soja. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020a. 21 p. (Embrapa Milho e Sorgo. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 210).

OLIVEIRA-PAIVA, C. A. et al. Recomendação agrônômica de cepas de Bacillus subtilis (CNPMS B2084) e Bacillus megaterium (CNPMS B119) na cultura do milho. Sete Lagoas: Embrapa Milho e Sorgo, 2020b. 18 p. (Embrapa Milho e Sorgo. **Circular Técnica**, 260).

PARNELL J. J. et al. From the lab to the farm: an industrial perspective of plant beneficial microorganisms. **Frontiers in Plant Science**, v.7. 2016.

PEDRÓS-ALIÓ C. & MANRUBIA S. The vast unknown microbial biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.113, n.24, p.6585-6587. 2016.

PEREYRA, M. A. et al. Seedlings growth promotion by Azospirillum brasilense under normal and drought conditions remains unaltered in Tebuconazole-treated wheat seeds. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.20-27, 2009.

PHILIPPOT, L. et al. Going back to the roots: the microbial ecology of the rhizosphere. **Nat Rev Microbiol**. p.789-99. 2013.

PUGLISI, E. Response of microbial organisms (Aquatic and Terrestrial) to pesticides. **EFSA Supporting Publications**. v.9, n.11. 2012.

SUARES-ROCHA, P. & UMBUZEIRO, G. A. AOPs são o futuro da ecotoxicologia? **Química Nova**, v.45, n.1, p.132-136. 2022.

ROMDHANE, S. et al. Ecotoxicological impact of the bioherbicide Leptospermone on the microbial community of two arable soils. **Front Microbiol**, v.7. 2016.

RONDINA, A. B. L. et al. Changes in root morphological traits in soybean co-inoculated with Bradyrhizobium spp. and Azospirillum brasilense or treated with A. brasilense exudates. **Biol Fertil Soils**, v.56, p.537-546. 2020.

SAHARAN, B. & NEHRA, V. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: A Critical Review. **Life Science and Medical Research**, v.21, p.1-30. 2011.

SANTOS M. S, NOGUEIRA M. A, HUNGRIA M. Outstanding impact of *Azospirillum brasilense* strains Ab-V5 and Ab-V6 on the Brazilian agriculture: Lessons that farmers are receptive to adopt new microbial inoculants. **Revista Brasileira Ciência do Solo**. 2021.

SANTOS, M.S. et al. The challenge of combining high yields with environmentally friendly bioproducts: A Review on the compatibility of pesticides with microbial inoculants. **Agronomy**, v.11, n.5, 2021.

SCHÄFER, R.B. et al. Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. **Environmental Sciences Europe**, v.31. 2019.

SHAFI, J.; TIAN, H.; JI, M. Bacillus species as versatile weapons for plant pathogens: a review. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v.31, n.3, p.446-459. 2017.

SMITH, P. et al. Biogeochemical cycles and biodiversity as key drivers of ecosystem services provided by soils. **SOIL**, v.1, p.665–685. 2015.

SOURCE®. Schwarzheide, Alemanha: BASF, The Chemical Company. **Bula de agrotóxico**. file:///C:/Users/cliente/Downloads/Bula+-+Standak®Top.pdf. Acesso em 10/05/2021.

SRINIVASULU, M. & RANGASWAMY, V. Influence of insecticides alone and in combination with fungicides on enzyme activities in soils. **Int. J. Environ. Sci. Technol.** v.10, p.341-350. 2013.

STANDAK®TOP. Schwarzheide, Alemanha: BASF, The Chemical Company. **Bula de agrotóxico**. file:///C:/Users/cliente/Downloads/Bula+-+Standak®Top.pdf. Acesso em 10/05/2021.

STORCK, V. et al. Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of chlorpyrifos, isoproturon, or tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. **Frontiers in Microbiology**, v.29. 2018.

THIELE-BRUHN, S. et al. Identification of new microbial functional standards for soil quality assessment. **SOIL**, v.6, p.17–34. 2020.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, BERDELL R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 12. ed. PEARSON, 969p. 2016.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizer. **Plant and Soil**, v. 255, p.571-586. 2003.

WAHYUDI, A. T. et al. Characterization of Bacillus sp. strains isolated from rhizosphere of soybean plants for their use as potential plant growth for promoting Rhizobacteria. **Journal of Microbiology and Antimicrobials** v.3, p.34-40. 2011.

WANG, C. et al. Individual and combined effects of tebuconazole and carbedazim on soil microbial activity. **Eur. J. Soil Biol.**, v.72, p.6-13. 2016.

WANG, L. et al. Birds and plastic pollution: recent advances. **Avian Research**, v.12. 2021.

ZHANG, C. et al. Ecotoxicology of strobilurin fungicides. **Science of the total Environment**, v.742. 2020.

ZORTÉA, T. et al. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.166, p.207-214, 2018.

3 CAPÍTULO 1: PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FUNGICIDA E INSETICIDA SOBRE *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 E AbV6

RESUMO

O emprego de micro-organismos tem despertado grande interesse se tornando um campo da biotecnologia cada vez mais estudado e explorado. Os micro-organismos são indicadores sensíveis a poluição ambiental devido à sua rápida resposta aos contaminantes, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório. A rizobactéria promotora de crescimento de plantas *Azospirillum brasilense* tem relevância ambiental, desempenha funções metabólicas, suporta processos fisiológicos e tem importância como inoculante comercial. O uso dos agrotóxicos ajudou a aumentar a produção de alimentos ao longo dos últimos anos. No entanto, os impactos dos agrotóxicos no ecossistema terrestre nos micro-organismos não-alvo são pouco investigados. O uso de testes ecotoxicológicos é de fundamental importância para fornecer informações à análise de toxicidade dos agrotóxicos nos ecossistemas. Neste trabalho foi desenvolvido um protocolo ecotoxicológico para avaliar o efeito de agrotóxicos no crescimento bacteriano e os efeitos das concentrações de inibição nas populações da espécie *Azospirillum brasilense* cepas AbV5 e AbV6. O método foi baseado na diluição em microplacas das concentrações dos ingredientes ativos dos agrotóxicos em meio de cultura DYGs contendo as suspensões bacterianas e incubadas a 30 °C no decorrer de 48 horas. Os resultados mostraram que as cepas AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* apresentaram sensibilidade ao efeito dos agrotóxicos no crescimento bacteriano, apresentando sensibilidade nas primeiras 8 horas de exposição após a contaminação e atingiu sua fase exponencial após 24 horas de incubação. Em 32 horas *A. brasilense* AbV5 e AbV6 apresentaram o início de sua fase de declínio. Na determinação da concentração de inibição os parâmetros número de gerações e a taxa de crescimento instantâneo foram mais sensíveis do que a exposição total. Os resultados mostram que as cepas AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* tem potencial para ampliar o escopo das informações ecotoxicológicas.

Palavras-chave: *Azospirillum*; Bioensaios; Crescimento bacteriano.

3 CHAPTER 1: PROTOCOL FOR ECOTOXICOLOGICAL EVALUATION OF FUNGICIDE AND INSETICIDE ON *Azospirillum brasilense* strains AbV5 E AbV6

ABSTRACT

The use of microorganisms has aroused great interest, becoming in increasingly studied and explored field of biotechnology. Microorganisms are sensitive indicators of environmental pollution due to their rapid response to contaminants, ease of cultivation and maintenance in the laboratory. The plant growth-promoting rhizobacterium *Azospirillum brasilense* has environmental relevance, performs metabolic functions, supports physiological processes and is important as a commercial inoculant. The use of pesticides has helped to increase food production over the last few years. However, the impacts of pesticides on the terrestrial ecosystem on non-target microorganisms are poorly investigated. The use of ecotoxicological tests is of fundamental importance to provide information for the analysis of the toxicity of pesticides in ecosystems. In this work, an ecotoxicological protocol was developed to evaluate the effect of pesticides on bacterial growth and the effects of inhibition concentrations on populations of the species *Azospirillum brasilense* strains AbV5 e AbV6. The method was based on the dilution in microplates of concentrations of the active ingredients of pesticides in DYGs culture medium containing bacterial suspensions and incubated at 30 °C, over 48 hours. The results showed that *A. brasilense* AbV5 e AbV6 were sensitive to the effect of pesticides on bacterial growth, showing sensitivity in the first 8 hours of exposure after contamination and reached its exponential phase after 24 hours of incubation. In 32 hours, *A. brasilense* AbV5 e AbV6 showed the beginning of its decline phase. In determining the inhibition concentration, the parameters number of generations and the instantaneous growth rate were more sensitive than the total exposure. The results show that *A. brasilense* strains AbV5 e AbV6 have a potential to expand the scope of ecotoxicological information.

Keywords: *Azospirillum*; Bacterial growth; Bioassays.

3.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos trabalhos de ecotoxicologia para avaliar os efeitos dos agrotóxicos em micro-organismos do solo utilizam o monitoramento através de técnicas de cultivo, testes bioquímicos e tecnologias moleculares nas comunidades bacterianas ou a utilização de biorepórteres como as bactérias gram-negativa *Escheria coli* e gram-positiva *Staphylococcus spp* (ROMDHANE et al., 2019). Os agrotóxicos utilizados na agricultura interagem com os micro-organismos rizosféricos tanto positivamente como negativamente (KARPOUZAS et al., 2016). No entanto o resultado depende do tipo de agrotóxico usado, sua concentração aplicada no campo e o nível de persistência no solo (CYCÓN et al., 2016; MUNDI et al., 2020). A aplicação excessiva pode provocar efeitos deletérios nos micro-organismos do solo não-alvo podendo causar danos ao DNA, proteínas, oxidação da membrana, na sinalização e na fixação biológica de N₂, na redução de assimilação de fotossintatos, no crescimento celular e na sobrevivência (AHMAD et al., 2012; KAHN et al., 2021).

Nesse contexto, a introdução de novas metodologias adequadas para verificar o efeito prejudicial dos agrotóxicos nos micro-organismos do solo é um passo decisivo para verificar qualquer efeito indesejado com um alto nível de segurança (SCHÄFER et al., 2019). A necessidade de análises simples e rápidas para avaliar os potenciais efeitos dos agrotóxicos sugere a escolha de um grupo chave de micro-organismos de importância ecológica para serem utilizados em testes devido às suas respostas rápidas, baixo custo e facilidade de manuseio.

As Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas do gênero *Azospirillum* estão presentes na rizosfera e podem estar associadas à rizosfera da planta, na colonização externa, ou associadas endofiticamente nos espaços intercelulares das raízes colonizadas. São conhecidas por uma série de mecanismos responsável pelo efeito promotor de crescimento, incluindo a produção de fitohormônios, fixação de nitrogênio, aumento da disponibilidade de água e nutrientes pelas plantas (GALINDO et al., 2019). Também são relatados a redução ao estresse biótico e abiótico, estímulo do crescimento radicular e vegetal e resistência a patógenos (BASU et al., 2021).

Azospirillum é uma das rizobactérias promotoras de crescimento de plantas mais bem estudadas em escala laboratorial e a campo. A espécie *A. brasilense* é utilizada como inoculante comercial para diversas culturas, especialmente milho, trigo e arroz, que são de importância econômica para todo o mundo (MEHNAZ, 2015; ZEFFA et al., 2019). A prática de inoculação com *Azospirillum* fornece uma contribuição direta para aumentar o rendimento das culturas e

aumentar a eficácia no uso dos recursos de produção com benefícios estendidos ao meio ambiente para uma agricultura sustentável (GUPTA et al., 2016; STORCK, et al., 2018; BASU et al., 2021).

Embora a inoculação com *Azospirillum* promova aumentos na produtividade das culturas, podem ser esperadas limitações relacionadas a compatibilidade com os agrotóxicos empregados no tratamento de sementes. Alguns agrotóxicos representam risco para *A. brasilense*, como o efeito tóxico 24 horas após a exposição do agrotóxico Standak Top na sobrevivência de *A. brasilense* no tratamento das sementes de milho (SANTOS et al., 2021) e no tratamento de sementes de trigo com fungicidas após 4 horas da inoculação das sementes (TAKAHASHI et al., 2022). Estudos sobre o impacto de agrotóxicos em *A. brasilense* são necessários para evitar os efeitos negativos sobre a bactéria e sobre os mecanismos de promoção do crescimento das plantas.

O objetivo deste estudo foi estabelecer um protocolo para avaliação dos efeitos da molécula fungicida piraclostrobina (Comet®), do inseticida fipronil (Source®) e da mistura fungicida + inseticida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (Standak Top®) no crescimento de populações de *A. brasilense*, cepas AbV5 e AbV6, por meio de testes ecotoxicológicos em microplacas. As seguintes hipóteses foram estudadas:

1. As populações de RPCPs AbV5 e AbV6 da espécie *Azospirillum brasilense* são sensíveis à presença de agrotóxicos e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente ao intervalo de tempo de exposição que define a fase log de crescimento.
2. Os valores de concentração de inibição do crescimento bacteriano podem ser utilizados para indicar a toxicidade tanto de fungicidas, inseticidas ou ainda de mistura sobre populações de *Azospirillum brasilense* e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente com o tempo de exposição, diferentes leituras do comprimento de onda e aos parâmetros de exposição total, número de gerações e na taxa de crescimento.
3. O inoculante comercial a base de populações de *Azospirillum brasiliense* AbV5 e AbV6 podem ser utilizadas em protocolos ecotoxicológicos padronizados para avaliação do efeito de agrotóxicos em rizobactérias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Micro-organismo estudado

O inoculante comercial de RPCPs utilizado para os testes foi cedido pela empresa Bioma (Fazenda Rio Grande – PR – Brasil). O inoculante formulado com a espécie *A. brasilense* (cepas AbV5 e AbV6), é um inoculante líquido registrado para gramíneas, contendo 4×10^8 células viáveis mL^{-1} .

3.2.2 Produtos avaliados

Os tratamentos consistiram de concentrações das formulações comerciais do fungicida Comet® contendo: Methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy}methyl phenyl} (N-methoxy) carbamate (piraclostrobina) 250 g L^{-1} (25% m/v), do inseticida Source® contendo: (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile (fipronil) 250 g L^{-1} (25%; m/v) e do fungicida + inseticida Standak®Top contendo: Methyl N-{2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yl]oxy}methyl phenyl} (N-methoxy) Carbamate (piraclostrobina) 25 g L^{-1} (2,5%; m/v); Dimethyl 4,4'-(o-phenylene)bis(3-thioallophanate) (tiofanato metílico) 225 g L^{-1} (22,5%; m/v) e (RS)-5-amino-1-(2,6-dichloro- α,α,α -trifluoro-p-tolyl)-4-trifluoromethylsulfinylpyrazole-3-carbonitrile (fipronil) 250 g L^{-1} (25%; m/v).

3.2.3 Teste de toxicidade bacteriana *in vitro*

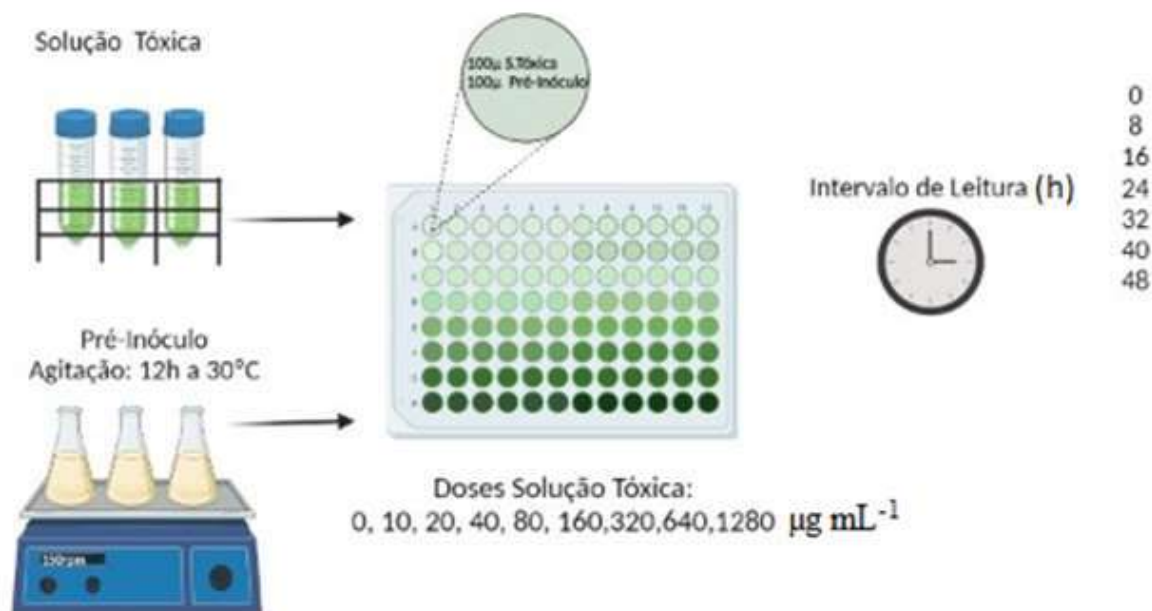
Inicialmente foram realizados testes preliminares de toxicidade para identificar as concentrações a serem utilizadas nos testes definitivos com os agrotóxicos proposta por Crovetto et al. (2017), que determinou a concentração de parabenos em *E. coli* e *S. aureus*, utilizando as seguintes concentrações: 31,25; 62,5; 125; 250; 500 e $1.000 \mu\text{g mL}^{-1}$. Com base nos resultados dos testes preliminares foi estabelecido o intervalo de concentrações de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1.280 e $2.560 \mu\text{g mL}^{-1}$ utilizado nos ensaios definitivos.

Para os ensaios de toxicidade, os procedimentos foram seguidos conforme Crovetto et al. (2017). Soluções tóxicas de cada agrotóxico foram preparadas separadamente em tubos do tipo Falcon de 15 mL, na concentração máxima de $2.560 \mu\text{g mL}^{-1}$ dos ingredientes ativos piraclostrobina, fipronil e da mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (solução estoque), do qual diluições seriadas com água destilada e esterilizada de 1:2 foram realizadas para obter concentrações finais de 10, 20, 40, 80, 160, 320, 640, 1.280 e $2.560 \mu\text{g mL}^{-1}$ e um controle sem contaminação da solução.

Um inóculo inicial foi preparado em frascos contendo 30 mL de meio líquido Dextrose Yeast Glutamato – DYGS com a seguinte composição (por litro: glicose 2 g, ácido málico 2 g, peptona bacteriológica 1,5 g, extrato de levedura 2 g, K_2HPO_4 0,5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,5 g, ácido glutâmico 1,5 g, pH 6,8) e autoclavado a 120 °C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após o resfriamento, em câmara de fluxo, foi adicionado ao meio de cultura 3 mL do inoculante contendo *A. brasilense*. A suspensão bacteriana foi padronizada a partir de uma cultura de 12 horas e foi mantida sob agitação em uma mesa agitadora a 150 rpm, com temperatura controlada a 30 °C, em câmara de germinação tipo D.B.O (Demanda Bioquímica de Oxigênio), até atingir a fase exponencial de crescimento na densidade ótica de 0,04 nas leituras de absorbância de 450, 540 e 690 nm, a qual foi utilizada nos ensaios. A curva de crescimento do *A. brasilense* foi previamente construída estabelecendo o comportamento ao longo do tempo.

Os ensaios foram realizados em microplacas de microtitulação com 96 poços. Para isso um volume de 100 µL do inóculo de *A. brasilense* e 100 µL de solução tóxica foram adicionados e homogeneizados com a pipeta, de modo que a cada 6 poços da placa recebesse uma dose diferente dos agrotóxicos, totalizando 6 repetições. A distribuição das doses de agrotóxicos nas placas seguiu da dose menos concentrada para a dose mais concentrada e foi preenchida uma linha com o meio DYGS estéril para verificar a possível ocorrência de contaminação da microplaca durante o período dos ensaios. Após o preparo dos poços as placas foram seladas com plástico filme e incubadas, a 30 °C, sob agitação a 100 rpm, em câmara de germinação tipo D.B.O. As densidades óticas foram obtidas nas leituras de absorbância de 450, 540 e 690 nm e foram realizadas no leitor de microplacas de absorbância ELx 800 (BioTek Instruments), com intervalo a cada 8 horas, totalizando 48 horas de teste (Figura 1). Com os resultados foram geradas curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação para os diferentes comprimentos de onda.

Figura 1- Esquema experimental mostrando o preparo da solução tóxica e do pré-inóculo, seguido da montagem do teste em microplacas de 96 poços com as doses de agrotóxicos em ordem crescente para a leitura das densidades ópticas de 450, 540 e 690 nm, no intervalo de 0 a 48 horas.



3.2.4 Avaliações

O crescimento bacteriano foi avaliado por densidade ótica utilizando a determinação da absorbância nos comprimentos de onda de 450, 540 e 690 nm.

Antes dos cálculos uma correção foi realizada para reduzir o efeito pelo desenvolvimento da cor do poço causada pelas diferentes doses dos agrotóxicos utilizados. Essa correção foi denominada de exposição total, onde a leitura de absorbância foi descontada da leitura de absorbância correspondente da amostra controle sem inóculo no mesmo intervalo de tempo. Após a correção aos valores negativos foi atribuído o valor de zero.

Além do cálculo da exposição total outras duas formas foram utilizadas para calcular o crescimento microbiano conforme indicado por Crovetto et al. (2017):

$$1) \text{ Taxa instantânea de crescimento (TIC)} = \ln (A_t/A_{t-1})$$

$$2) \text{ Número de gerações (NG)} = \ln (A_t/A_0) \ln 2$$

Onde: A_t = absorbância no tempo t (h); A_{t-1} = absorbância medida no tempo $t-1$ (h), A_0 = absorbância inicial; e t = tempo (h).

A toxicidade foi avaliada por meio da concentração de inibição da espécie *A. brasilense*, utilizando os parâmetros exposição total, número de gerações e taxa de crescimento instantânea.

Os valores destes parâmetros variaram nos diferentes estágios da curva de crescimento. Para eliminar o efeito da variação nas fases lag e estacionária foi utilizado apenas os valores de cada parâmetro na fase exponencial.

3.2.5 Análise estatística

Para cada teste as diferenças entre as doses e o controle em relação ao tempo tiveram os pressupostos de normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade (Testes de Bartlett) verificados. Os valores de exposição total (absorbância) sem contaminação foram determinados por análise de regressão, usando o modelo que melhor se ajustou os dados. As concentrações de inibição foram calculadas levando em consideração as doses de cada tempo de exposição definidos na análise de regressão. As análises foram realizadas pelo Software Statistica 10.0 (STATSOFT, 2011).

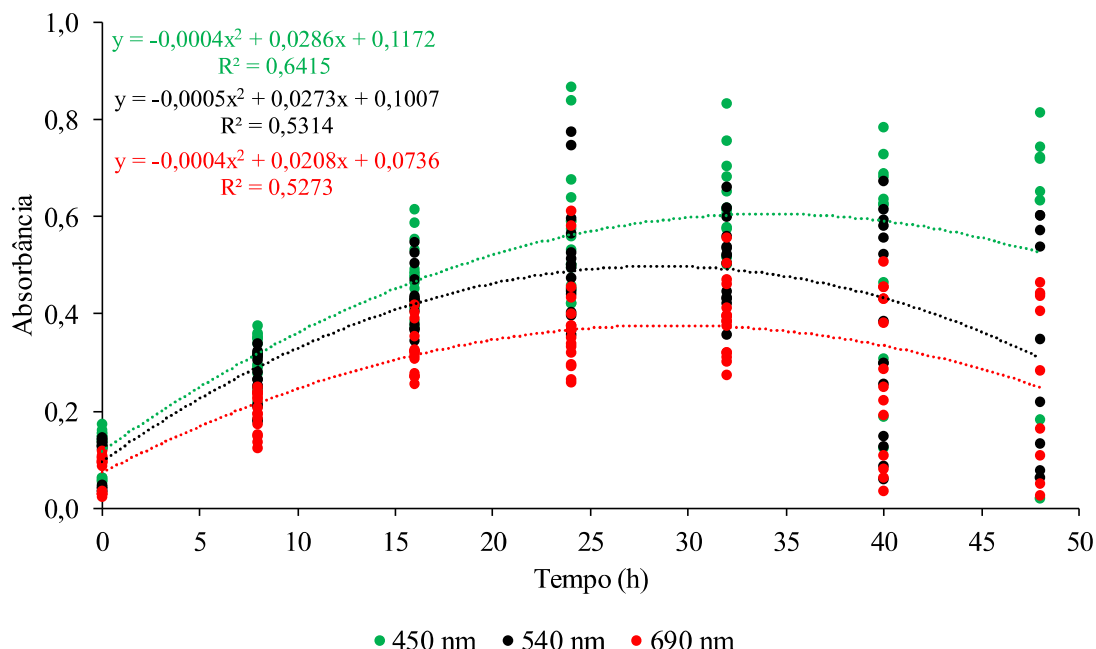
3.3 RESULTADOS

Os ensaios executados simulam uma condição de máxima exposição da bactéria aos agrotóxicos. Durante os testes, o crescimento de *A. brasilense* cepas AbV5 e AbV6 em meio de cultura líquido contaminado com os agrotóxicos apresentaram uma curva de crescimento padrão composta por quatro fases distintas: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de declínio.

A curva de crescimento foi obtida para definição do tempo de incubação definido pela fase log de crescimento. Observa-se que as cepas AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* apresentam a fase log a partir de 8 horas de incubação após inoculação e contaminação com os agrotóxicos, aproxima-se da sua fase de equilíbrio após 24 horas de crescimento e depois de 32 horas de incubação, observa-se um grande declínio nos valores de absorbância (Figura 2).

Os bioensaios de inibição de crescimento apresentaram curva-resposta semelhante para as leituras de absorbância de 450, 540 e 690 nm.

Figura 2 – Curva de crescimento de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 em função do tempo de exposição (h), nas absorvâncias 450, 540 e 690 nm, em meio Dextrose Yeast Glutamato (DYGS), 30 °C, 100 rpm.



Nas Tabelas 1, 2 e 3 estão representados os valores de R^2 , a concentração de inibição e o intervalo de confiança para os agrotóxicos. Os ajustes de todos os modelos aos dados experimentais do crescimento de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 comprovam a boa qualidade das leituras, garantindo precisão nos resultados e na obtenção dos pontos de inibição de crescimento por absorvância com valores de R^2 iguais ou acima de 0,8.

O ingrediente ativo fipronil apresentou o menor valor de concentração de inibição de 343 $\mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo 16 horas e apresenta valores estatisticamente distintos para o parâmetro de exposição total para o ingrediente ativo piraclostrobina e da mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (Tabela 1).

Os resultados do número de gerações mostram que o ingrediente ativo a base de piraclostrobina apresentou concentração média de inibição de crescimento para *A. brasilense* AbV5 e AbV6 no tempo 8 horas de 34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 2).

Na mesma tabela observa-se que para a mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil o tempo foi de 24 horas e a concentração de inibição foi de 148 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Tabela 3 onde foram calculadas a taxa de crescimento instantâneo acompanhou o mesmo comportamento do número gerações para os agrotóxicos.

No APÊNDICE A estão apresentadas as tabelas dos parâmetros exposição total, número de gerações, taxa de crescimento instantâneo de *A. brasilense* AbV5 e AbV6 contemplando todas as concentrações utilizadas, bem como os controles nas absorvâncias de 450, 540 e 690 nm (Tabelas 4 a 20).

Tabela 1 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro exposição total para *A. brasilense* AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	16	Logístico	0,956	335	267	403
		24	Linear	0,430	765	366	1164
	540	16	Logístico	0,943	330	253	406
		24	Linear	0,386	803	324	1281
	690	16	Logístico	0,964	364	310	418
		24	Linear	0,472	656	345	967
Piraclostrobina	450	16	Hormesis	0,930	750	597	904
		24	Hormesis	0,951	718	646	791
	540	16	Hormesis	0,944	759	641	877
		24	Hormesis	0,937	806	725	888
	690	16	Hormesis	0,899	1128	830	1427
		24	Hormesis	0,909	1086	976	1196
Mistura	450	16	Logístico	0,965	649	223	1076
		24	Logístico	0,929	739	640	838
	540	16	Logístico	0,875	1050	924	1176
		24	Logístico	0,810	1310	1134	1487
	690	16	Linear	0,872	720	618	823
		24	Logístico	0,917	896	779	1013

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil. CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

Tabela 2 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro número de gerações para *A. brasiliense* AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	8	Logístico	0,984	87	74	101
		16	Logístico	0,990	136	122	151
		24	Logístico	0,983	112	95	128
	540	8	Logístico	0,987	34	32	37
		16	Hormesis	0,965	29	23	35
		24	Hormesis	0,893	35	20	49
	690	8	Logístico	0,979	108	88	127
		16	Logístico	0,985	170	150	190
		24	Logístico	0,977	157	131	182
Piraclostrobina	450	8	Logístico	0,987	29	27	32
		16	Hormesis	0,964	25	21	30
		24	Logístico	0,984	30	27	33
	540	8	Logístico	0,987	34	32	37
		16	Hormesis	0,965	29	24	35
		24	Hormesis	0,963	30	23	36
	690	8	Logístico	0,975	39	35	44
		16	Hormesis	0,939	38	27	49
		24	Hormesis	0,937	37	26	48
Mistura	450	8	Hormesis	0,990	231	206	256
		16	Logístico	0,993	133	121	144
		24	Logístico	0,995	151	142	161
	540	8	Hormesis	0,949	115	76	154
		16	Logístico	0,994	134	124	145
		24	Logístico	0,995	150	140	159
	690	8	Hormesis	0,987	137	123	152
		16	Logístico	0,993	125	114	136
		24	Logístico	0,994	143	134	153

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

Tabela 3 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro taxa de crescimento instantânea para *A. brasilense* AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGs contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	8	Logístico	0,984	87	74	101
		16	Logístico	0,978	244	218	271
		24	Sem ajuste				
	540	8	Logístico	0,989	35	33	38
		16	Logístico	0,936	88	61	114
		24	Logístico	0,865	36	20	52
	690	8	Logístico	0,979	108	88	127
		16	Hormesis	0,984	265	241	288
		24	Sem ajuste				
Piraclostrobina	450	8	Logístico	0,989	30	28	32
		16	Logístico	0,939	71	50	93
		24	Logístico	0,884	43	24	63
	540	8	Logístico	0,989	35	33	38
		16	Hormesis	0,941	82	56	107
		24	Logístico	0,820	25	12	39
	690	8	Logístico	0,986	39	36	43
		16	Hormesis	0,933	86	60	113
		24	Hormesis	0,896	32	21	43
Mistura	450	8	Logístico	0,986	152	134	170
		16	Logístico	0,951	97	69	125
		24	Sem ajuste				
	540	8	Logístico	0,987	149	132	165
		16	Logístico	0,962	82	58	105
		24	Hormesis	0,813	190	20	361
	690	8	Hormesis	0,803	43	15	71
		16	Logístico	0,962	63	45	81
		24	Hormesis	0,809	192	21	362

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

3.4 DISCUSSÃO

A curva de crescimento, fornece informações sobre a inibição de crescimento da espécie *A. brasilense* cepas AbV5 e AbV6 no tempo de exposição. Durante o período de incubação a capacidade de suporte de crescimento de *A. brasilense* cepas AbV5 e AbV6 em meio de cultura DYGS foi atingida no período de incubação de 24 horas.

A primeira fase de crescimento bacteriano é a fase lag, um período de adaptação ao meio ambiente ao qual foram expostas, com intensa atividade metabólica e produção de enzimas que são pré-requisitos para a sua divisão (TRABULSI & ALTERTHUM, 2011). Neste estudo, o intervalo de tempo de incubação de 0 a 8 horas representa bem a fase lag da curva de crescimento.

Após 8 horas de adaptação a bactéria inicia a fase log ou de crescimento exponencial, caracterizada pela multiplicação celular até o tempo de exposição de 24 horas. Nesta fase ocorre a divisão celular em velocidade máxima e constante chegando a um ponto em que há carência de nutrientes, e então o número de células em divisão se torna igual ao número de células mortas (ALTERTHUM, 2008), iniciando-se então a fase estacionária.

Ao atingir o período final de exposição 48 horas, pode-se observar um crescimento mais lento devido ao estresse celular causado pela intensa multiplicação na fase anterior. Quando observada, a redução na capacidade de suporte do crescimento na presença dos agrotóxicos pode estar associada à menor eficiência de utilização dos recursos presentes no meio pela bactéria. Em condições de estresse, parte da energia disponível ao organismo é despendida para manter mecanismos celulares e bioquímicos de tolerância ao estressor, em detrimento do crescimento, reduzindo o crescimento microbiano.

Para todos os parâmetros avaliados exposição total, número de gerações e taxa de crescimento instantânea nos ingredientes ativos testados os valores das concentrações de inibição foram observados efeitos negativos no crescimento das cepas AbV5 e AbV6 de *A. brasilense* a partir do tempo de exposição de 16 horas. Diversos autores relatam que o uso de agrotóxicos na agricultura conduz inevitavelmente a exposição de organismos não-alvos, aos efeitos indesejáveis que podem ocorrer em espécies, comunidades ou em ecossistemas como um todo (ALCÂNTARA NETO et al., 2014; CAMPO et al.; 2009; PEREYRA, 2009; ARAÚJO & ARAÚJO, 2006).

Em geral os agrotóxicos contêm moléculas potencialmente tóxicas que podem causar toxicidade às células das bactérias podendo afetar a sobrevivência e o metabolismo celular. A magnitude dos efeitos variou entre os agrotóxicos e isso se deve ao fato de que cada agrotóxico atua de modo distinto no crescimento e no tempo de exposição da rizobactéria promotora de crescimento vegetal *A. brasilense*. Notou-se a seguinte escala decrescente de concentração de inibição dos ingredientes ativos: mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil, seguido do fipronil e piraclostrobina.

A comparação entre os valores dos parâmetros de número de gerações e taxa de crescimento instantânea obtidos pela concentração de inibição observa-se uma mínima diferença entre os comprimentos de onda 450, 540 e 690 nm para os ingredientes ativos piraclostrobina e a mistura piraclostrobina + tiofanato metílico, permitindo mostrar que a concentração de inibição foi quantificada mesmo na baixa concentração dos ingredientes ativos, indicando que os dois parâmetros são um preditor confiável para protocolos em ecotoxicologia. Por outro lado, o parâmetro exposição total observou-se um distanciamento maior entre os valores de concentração de inibição entre os comprimentos de onda.

Embora a bactéria *E. coli* tem sido utilizada como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos nos diferentes ecossistemas devido ao conhecimento aprofundado de sua fisiologia, bioquímica e a facilidade de manipulação genética (EFREMOVA et al., 2015). O uso de *E. coli* não é adequado para todos os estudos de avaliação ecotoxicológica por ser uma bactéria que habita naturalmente o trato intestinal. Em vez disso, é recomendável que o efeito de agrotóxicos seja avaliado para espécies representativas da biota terrestre, vinculando aos conceitos de serviços ecossistêmicos para que, por meio do resultado obtido com o organismo mais sensível, é possível estimar informações com mais segurança na compreensão dos efeitos dos agrotóxicos nos solos.

Além da importância ecológica da RPCPs *A. brasilense*, os ensaios demonstraram resposta de sensibilidade na concentração de inibição promissora para a indicação de organismo-teste ecotoxicológico. Outras características que também devem ser destacadas de *A. brasilense* como organismo-teste são: facilidade de cultivo e adaptação às condições de laboratório, fisiologia, genética e comportamento bem conhecidos, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade nos serviços ecossistêmicos, ampla distribuição e importância comercial.

3.5 CONCLUSÃO

No presente trabalho foram obtidas informações para conhecer o comportamento de *A. brasiliense* em condição de máxima exposição aos agrotóxicos. Os estudos preliminares permitiram uma compreensão básica acerca de algumas das especificidades da espécie. Somente após essa etapa inicial de investigação, foi possível ajustar as condições de crescimento da cultura e definir o tempo de exposição dos ensaios. Por fim, a toxicidade dos ingredientes ativos foi obtida para a espécie através da concentração de inibição, utilizando os tempos de exposição na fase log de crescimento.

Os resultados apresentados demonstraram a viabilidade de aplicação dos ensaios com *A. brasiliense*, que apresentou características favoráveis principalmente pelo crescimento rápido, comportamento estável em condições controladas e sensibilidade frente aos ingredientes ativos avaliados. Não existem outros estudos publicados envolvendo ensaios ecotoxicológicos para a espécie supracitada, de modo que o protocolo desenvolvido neste trabalho pode contribuir com uma expansão de conhecimento nessa área. Assim, considerando que o tema ainda é pouco estudado e a abrangência das pesquisas neste campo de conhecimento são amplas, espera-se que o protocolo proposto possa ser utilizado também como base para trabalhos futuros, visando o aperfeiçoamento dos ensaios de toxicidade com a espécie em questão.

REFERÊNCIAS

- ALTERTHUM, F. Crescimento microbiano. *In*: TRABULSI, L. R. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2008, p.30-35.
- AHMAD, K. et al. Removal of heavy metals (Zn, Cr, Pb, Cd, Cu and Fe) in aqueous media by calcium carbonate as an adsorbent. **International Journal of Chemical and Biochemical Sciences**, v.2, p.48-53. 2012.
- ALCÂNTARA NETO, F. et al. Tempo de contato e de combinação de fungicidas, aditivo e inoculante sobre a sobrevivência de rizóbios e nodulação da soja. **Revista Agro@ambiente**, v.8, n.1, p.149-154. 2014.
- ARAÚJO, A. S. F & ARAÚJO, R. S. Sobrevivência e nodulação do *Rhizobium tropici* em sementes de feijão tratadas com fungicidas. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.973-976. 2006.
- BASU, A. et al. Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR) as green bioinoculants: recent developments, constraints, and prospects. **Sustainability**. 2021.
- CAMPO, R. J.; ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. Nitrogen fixation with the soybean crop in Brazil: Compatibility between seed treatment with fungicides and bradyrhizobial inoculants. **Symbiosis**, v.48, p.154-163. 2009.
- CROVETTO, S. I. et al. Bacterial toxicity testing and antibacterial activity of parabens. **Toxicological & Environmental Chemistry**, 99:5-6, p.858-868. 2017.
- CYCÓN, M.; PIOTROWSKA-SEGET, Z. Pyretroid-Degrading microorganisms and their potential for the bioremediation of contaminated soils: A Review. **Frontiers in Microbiology**. v.7. 2016.
- EFREMOVA, L. V. et al. Toxicity of graphene shells, graphene oxide, and graphene oxide paper evaluated with *Escherichia coli* biotests. **Biomed Res Int**. 2015.
- GALINDO, F. S. et al.; Investigation of *Azospirillum brasilense* inoculation and silicon application on corn yield responses. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**. v.20, p.2406-2418. 2020.
- GUPTA, A.; ANNAPURNA, K.; JAITLEY, A. K. Screening of osmo protectants for liquid formulation of *Azospirillum* bio-inoculant. **Int J Serv Technol Manag**, v.5, n.5, p.258-267, 2016.
- KARPOUZAS, D. G. et al “LOVE TO HATE” pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.23, p.18947–18951. 2016.
- KHAN, N. et al. Insights into the interactions among roots, rhizosphere, and rhizobacteria for improving plant growth and tolerance to abiotic stresses: A Review. **Cells**. 2021.
- MEHNAZ, S. *Azospirillum*: A Biofertilizer for Every Crop. *In*: ARORA, N. K. **Plant Microbes Symbiosis**. New Delhi: Applied Facets. 2015. p.297-314.

- MUNDI, W.; GOSAL, S. K.; & KAUR, J. Effect of pesticides on growth kinetics and plant growth promoting activities of biofertilizer. **The Pharma Innovation Journal**, 9(7), p.442-446. 2020.
- PEREYRA, M.A. et al. Seedlings growth promotion by *Azospirillum brasilense* under normal and drought conditions remains unaltered in Tebuconazole-treated wheat seeds. **European Journal of Soil Biology**, v.45, p.20-27. 2009.
- ROMDHANE, S. et al. Ecotoxicological impact of the bioherbicide Leptospermone on the microbial community of two arable soils. **Front Microbiol**, v.7. 2016.
- SANTOS, M. S. et al. The challenge of combining high yields with environmentally friendly bioproducts: A Review on the compatibility of pesticides with microbial inoculants. **Agronomy**. v.11, n.5:870. 2021.
- SCHÄFER, R.B. et al. Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. **Environmental Sciences Europe**, v.31. 2019.
- STATSOFT. STATISTICA 10.0 (data analysis software system). [s.l]. 2011. Disponível em <<http://www.statsoft.com>>.
- STORCK, V. et al. Lab to field assessment of the ecotoxicological impact of Chlorpyrifos, Isoproturon, or Tebuconazole on the diversity and composition of the soil bacterial community. **Frontiers in Microbiology**, v.9. 2018.
- TAKAHASHI, W. et al. Impact of seed-applied fungicide and insecticide on *Azospirillum brasilense* survival and wheat growth-promoting ability. **Lett Appl Microbiol**. 74: p.604-612. 2022.
- ZEFFA, D. M. et al. *Azospirillum brasilense* promotes increases in growth and nitrogen use efficiency of maize genotypes. **PLoS ONE** 14(4). 2019.

APÊNDICE A

Tabela 4 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.105±0.004	0.208±0.002	0.266±0.005	0.337±0.030	0.381±0.013	0.178±0.062	0.109±0.089	0.119±0.086	0.037±0.023	0.050±0.021
10	0.1107±0.004	0.232±0.003	0.319±0.004	0.388±0.007	0.355±0.042	0.102±0.038	0.023±0.012	0.007±0.004	0.022±0.014	0.077±0.032
20	0.111±0.003	0.273±0.007	0.297±0.059	0.337±0.068	0.292±0.066	0.051±0.033	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.043±0.027
40	0.137±0.012	0.313±0.009#	0.365±0.004	0.354±0.020	0.326±0.055	0.097±0.045	0.049±0.043	0.048±0.025	0.015±0.011	0.022±0.015
80	0.114±0.004	0.318±0.003#	0.393±0.008#	0.388±0.019	0.353±0.044	0.202±0.072	0.102±0.033	0.054±0.035	0.057±0.033	0.090±0.033
160	0.092±0.014	0.275±0.005	0.367±0.009	0.366±0.017	0.313±0.034	0.170±0.077	0.093±0.052	0.068±0.044	0.072±0.041	0.132±0.068
320	0.070±0.020	0.301±0.015	0.368±0.011	0.416±0.010	0.409±0.011	0.382±0.044*	0.155±0.071	0.127±0.056	0.051±0.026	0.055±0.015
640	0.036±0.014#	0.191±0.035	0.260±0.037	0.334±0.028	0.344±0.015	0.337±0.037	0.214±0.041	0.126±0.044	0.074±0.021	0.095±0.024
1280	0.076±0.033	0.119±0.040	0.184±0.033	0.160±0.036*	0.140±0.036*	0.102±0.033	0.063±0.026	0.061±0.022	0.057±0.022	0.062±0.023

continua...

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	0.059±0.027	0.045±0.026	0.050±0.026	0.045±0.024	0.007±0.004	0.000±0.000	0.006±0.004	0.008±0.006	0.000±0.000	
10	0.051±0.028	0.063±0.031	0.051±0.028	0.051±0.031	0.061±0.003	0.138±0.050	0.085±0.043	0.052±0.024	0.095±0.061	
20	0.014±0.014	0.013±0.008	0.015±0.008	0.016±0.011	0.008±0.006	0.019±0.009	0.029±0.018	0.030±0.024	0.035±0.013	
40	0.000±0.000*	0.006±0.004	0.009±0.006	0.009±0.006	0.004±0.004	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.042±0.026	
80	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.006±0.005	0.000±0.000	0.000±0.000	0.018±0.011	0.030±0.020	0.029±0.020	0.040±0.029	
160	0.078±0.039	0.039±0.019	0.038±0.018	0.022±0.011	0.000±0.000	0.065±0.034	0.076±0.043	0.083±0.039*	0.134±0.066	
320	0.086±0.030	0.098±0.044	0.094±0.039	0.092±0.038	0.097±0.037	0.128±0.038	0.115±0.035	0.130±0.050	0.107±0.055	
640	0.087±0.022	0.105±0.027	0.107±0.027	0.093±0.026	0.098±0.027	0.089±0.040	0.109±0.038	0.118±0.031	0.141±0.058	
1280	0.084±0.029	0.101±0.034	0.088±0.029	0.088±0.033	0.095±0.039	0.076±0.027	0.068±0.033	0.112±0.043	0.114±0.049	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 5 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.154±0.005	0.526±0.036	0.223±0.018	0.160±0.040	0.156±0.037	0.021±0.015	0.206±0.037	0.051±0.025	0.051±0.015	0.055±0.018
10	0.155±0.006	0.501±0.005	0.254±0.004	0.178±0.012	0.100±0.011	0.080±0.018*	0.237±0.009	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.083±0.009
20	0.158±0.004	0.435±0.017*	0.210±0.013	0.124±0.005	0.097±0.006	0.050±0.007	0.239±0.011	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.095±0.007
40	0.204±0.024	0.110±0.027*	0.114±0.010*	0.055±0.004	0.091±0.018	0.094±0.009*	0.181±0.034	0.050±0.032	0.000±0.000*	0.074±0.019
80	0.152±0.007	0.000±0.000*	0.122±0.009*	0.069±0.006	0.040±0.002	0.029±0.015	0.104±0.034	0.002±0.001	0.007±0.007*	0.146±0.022*
160	0.081±0.021*	0.000±0.000*	0.102±0.012*	0.044±0.005	0.012±0.005	0.051±0.017	0.070±0.021	0.000±0.000	0.012±0.005*	0.141±0.029*
320	0.027±0.013*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.018±0.005	0.000±0.000#	0.051±0.011	0.000±0.000	0.002±0.002	0.052±0.008	0.096±0.010
640	0.010±0.008*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.005±0.002	0.006±0.004	0.005±0.002	0.031±0.003	0.040±0.002
1280	0.072±0.032*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000	0.000±0.000#	0.000±0.000	0.004±0.002*	0.007±0.002

continua...

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	0.164±0.010	0.058±0.004	0.043±0.007	0.000±0.000	0.009±0.005	0.000±0.000	0.045±0.012	0.000±0.000	0.000±0.000	
10	0.064±0.005	0.039±0.003	0.024±0.005*	0.009±0.003	0.015±0.004	0.041±0.008*	0.015±0.007*	0.000±0.001	0.000±0.000	
20	0.056±0.013	0.029±0.004	0.028±0.006	0.016±0.004*	0.025±0.001*	0.017±0.009	0.002±0.002*	0.000±0.002	0.000±0.000	
40	0.006±0.004#	0.043±0.006	0.029±0.006	0.008±0.002	0.019±0.003	0.041±0.015*	0.000±0.000*	0.000±0.003	0.003±0.003	
80	0.055±0.017	0.019±0.007	0.030±0.004	0.008±0.003	0.007±0.003	0.018±0.009	0.009±0.004*	0.000±0.004	0.000±0.000	
160	0.071±0.005	0.030±0.008	0.015±0.005*	0.001±0.001	0.005±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.005	0.000±0.000	
320	0.047±0.003	0.024±0.004	0.018±0.005*	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.006	0.000±0.000	
640	0.032±0.002#	0.019±0.004#	0.011±0.003*	0.000±0.000	0.006±0.001	0.005±0.003	0.000±0.000*	0.000±0.007	0.000±0.000	
1280	0.013±0.002#	0.001±0.001#	0.001±0.001*	0.001±0.001	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.008	0.000±0.000	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). *Jogo da velha* indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 6 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.105±0.004	0.527±0.038	0.214±0.020	0.193±0.060	0.158±0.035	0.047±0.021	0.229±0.045	0.065±0.034	0.023±0.013	0.068±0.021
10	0.107±0.004	0.504±0.013	0.271±0.006*	0.173±0.012	0.097±0.014	0.086±0.021	0.268±0.015	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.127±0.023
20	0.111±0.003	0.488±0.013	0.229±0.013	0.117±0.007	0.088±0.007	0.054±0.016	0.278±0.029	0.010±0.010	0.000±0.000*	0.159±0.017
40	0.137±0.012	0.246±0.027*	0.119±0.025*	0.035±0.008	0.068±0.017	0.096±0.028	0.244±0.041	0.056±0.037	0.000±0.000*	0.117±0.024
80	0.114±0.004	0.081±0.003*	0.146±0.009*	0.040±0.005	0.019±0.002	0.074±0.040	0.148±0.049	0.015±0.015	0.007±0.007	0.225±0.040*
160	0.092±0.014	0.000±0.000*	0.101±0.022*	0.025±0.007	0.006±0.004#	0.061±0.021	0.092±0.030	0.000±0.000	0.005±0.004	0.214±0.044*
320	0.070±0.020	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.021±0.006	0.000±0.000#	0.101±0.018	0.001±0.001#	0.004±0.004	0.039±0.007	0.119±0.015
640	0.036±0.014#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.001±0.001#	0.022±0.009*	0.011±0.011#	0.003±0.003	0.031±0.008	0.040±0.008
1280	0.076±0.033	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.001±0.001	0.004±0.002	0.014±0.002

continua...

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	0.173±0.020	0.061±0.010	0.050±0.014	0.018±0.008	0.010±0.006	0.000±0.000	0.020±0.007	0.000±0.000	0.003±0.003	
10	0.068±0.008	0.050±0.005	0.026±0.006	0.013±0.004	0.013±0.006	0.035±0.014*	0.007±0.004*	0.000±0.000	0.015±0.008	
20	0.064±0.019	0.030±0.006	0.028±0.008	0.024±0.008	0.025±0.005	0.007±0.005	0.000±0.000	0.000±0.000	0.008±0.007	
40	0.050±0.031#	0.067±0.013	0.036±0.010	0.018±0.007	0.023±0.006	0.035±0.016*	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.011±0.011	
80	0.047±0.020	0.026±0.011	0.025±0.005	0.013±0.004	0.008±0.004	0.005±0.005	0.002±0.002*	0.000±0.000	0.000±0.000	
160	0.080±0.011	0.036±0.012	0.012±0.005	0.008±0.004	0.015±0.008	0.014±0.014	0.000±0.000*	0.002±0.001	0.011±0.006	
320	0.057±0.012	0.028±0.008	0.001±0.001#	0.006±0.002	0.004±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.010±0.010	0.009±0.009	
640	0.037±0.002#	0.027±0.003	0.000±0.000#	0.004±0.002	0.008±0.002	0.000±0.000	0.001±0.001*	0.009±0.006	0.002±0.002	
1280	0.021±0.013#	0.017±0.012*	0.013±0.008	0.010±0.008	0.021±0.017	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.009±0.009	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 7 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.

Dose	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
Piraclostrobina										
0	0.154±0.005	0.759±0.052	1.081±0.032	1.381±0.112	1.606±0.063	0.565±0.011	1.927±0.041	1.968±0.013	2.037±0.016	2.118±0.020
10	0.155±0.006	0.723±0.007	1.100±0.014	1.340±0.016	1.484±0.016*	0.554±0.006	1.951±0.018	1.921±0.020	1.869±0.011	1.987±0.034*
20	0.158±0.004	0.627±0.024*	0.930±0.014*	1.109±0.013	1.249±0.013*	0.463±0.005*	1.684±0.014	1.600±0.016*	1.509±0.003	1.670±0.015*
40	0.204±0.024	0.158±0.038*	0.300±0.053*	0.373±0.057	0.505±0.045*	0.231±0.018*	0.929±0.088	0.933±0.036*	0.781±0.038	0.931±0.057*
80	0.152±0.007	0.000±0.000*	0.086±0.015*	0.186±0.015	0.244±0.013*	0.110±0.013*	0.452±0.013	0.423±0.039*	0.420±0.062	0.670±0.035*
160	0.081±0.021*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.009±0.009*
320	0.027±0.013*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*
640	0.010±0.008*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*
1280	0.072±0.032*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*

continua...

Dose	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
Piraclostrobina										
0	2.364±0.034	2.438±0.026	2.524±0.019	2.535±0.023	2.515±0.020	2.482±0.018	2.568±0.018	2.461±0.048	2.420±0.033	
10	2.072±0.038*	2.140±0.030*	2.175±0.030*	2.179±0.037*	2.198±0.039*	2.273±0.027*	2.245±0.046*	2.187±0.040*	2.148±0.033*	
20	1.751±0.009*	1.784±0.007*	1.834±0.012*	1.856±0.009*	1.886±0.009*	1.917±0.015*	1.855±0.035*	1.819±0.029*	1.572±0.035*	
40	0.950±0.054*	1.025±0.048*	1.076±0.042*	1.092±0.041*	1.125±0.039*	1.176±0.056*	1.175±0.048*	1.074±0.043*	0.973±0.022*	
80	0.732±0.017*	0.759±0.009*	0.791±0.010*	0.801±0.010	0.806±0.014*	0.802±0.039*	0.801±0.041*	0.747±0.044*	0.639±0.063*	
160	0.082±0.024*	0.136±0.017*	0.146±0.022*	0.136±0.030	0.109±0.037*	0.098±0.040*	0.047±0.023*	0.015±0.009*	0.018±0.010*	
320	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 8 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.105±0.004	0.760±0.054	1.069±0.032	1.255±0.085	1.520±0.053	1.611±0.026	1.942±0.054	2.004±0.026	2.024±0.032	2.093±0.027
10	0.107±0.004	0.727±0.019	1.118±0.023	1.367±0.018	1.508±0.013*	1.631±0.026	2.018±0.032	1.942±0.037	1.867±0.023	2.050±0.048
20	0.111±0.003	0.703±0.019	1.033±0.012	1.202±0.010	1.329±0.010*	1.407±0.018*	1.808±0.053	1.712±0.031*	1.546±0.010	1.776±0.026*
40	0.137±0.012	0.355±0.039*	0.526±0.050*	0.577±0.054*	0.675±0.042*	0.813±0.064*	1.165±0.105*	1.111±0.035*	0.937±0.061	1.106±0.065*
80	0.114±0.004	0.117±0.004*	0.328±0.016*	0.386±0.015*	0.414±0.014*	0.520±0.054*	0.714±0.035*	0.623±0.061*	0.606±0.089	0.930±0.072*
160	0.092±0.014	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.013±0.013*	0.040±0.022*	0.020±0.013*	0.023±0.017#	0.229±0.064*
320	0.070±0.020	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*
640	0.036±0.014#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*
1280	0.076±0.033	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*

continua...

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	2.342±0.053	2.429±0.052	2.501±0.044	2.523±0.037	2.519±0.029	2.461±0.025	2.488±0.031	2.421±0.058	2.352±0.094	
10	2.148±0.050*	2.221±0.050*	2.257±0.050*	2.266±0.058*	2.280±0.061*	2.329±0.049	2.255±0.072*	2.168±0.060*	2.163±0.039*	
20	1.868±0.021*	1.911±0.019*	1.951±0.021*	1.986±0.023*	2.019±0.025*	1.995±0.041*	1.908±0.047*	1.826±0.051*	1.731±0.046*	
40	1.163±0.056*	1.259±0.048*	1.311±0.041*	1.337±0.043*	1.370±0.041*	1.394±0.071*	1.279±0.089*	1.152±0.076*	1.141±0.031*	
80	0.998±0.045*	1.029±0.027*	1.064±0.023*	1.080±0.021*	1.083±0.027*	1.026±0.046*	0.980±0.046*	0.911±0.049*	0.830±0.071*	
160	0.329±0.078*	0.366±0.082*	0.363±0.078*	0.359±0.075*	0.354±0.069*	0.271±0.067*	0.181±0.052*	0.148±0.044*	0.134±0.044*	
320	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 9 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
0	0.145±0.003	0.360±0.005	0.472±0.005	0.504±0.024	0.491±0.021	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.006±0.003	0.005±0.003	
10	0.124±0.002	0.328±0.007	0.453±0.004	0.325±0.021*	0.022±0.014*	0.296±0.046*	0.359±0.035*	0.389±0.022#	0.390±0.021#	0.373±0.031*	
20	0.129±0.003	0.289±0.006	0.422±0.011	0.177±0.009*	0.000±0.000*	0.409±0.024*	0.450±0.026*	0.412±0.021#	0.444±0.017#	0.390±0.019*	
40	0.117±0.001	0.230±0.007	0.370±0.005	0.115±0.013*	0.000±0.000*	0.458±0.024*	0.390±0.033*	0.362±0.038#	0.420±0.047#	0.374±0.031*	
80	0.110±0.003	0.215±0.006	0.354±0.014	0.064±0.021*	0.000±0.000*	0.357±0.043*	0.391±0.040*	0.424±0.032#	0.402±0.031#	0.305±0.029*	
160	0.094±0.015	0.181±0.022	0.346±0.014	0.117±0.023*	0.000±0.000*	0.296±0.026*	0.298±0.042*	0.256±0.023	0.178±0.032	0.190±0.032*	
320	0.103±0.010	0.107±0.005#	0.226±0.004#	0.134±0.010*	0.024±0.024*	0.177±0.012*	0.100±0.032	0.063±0.012	0.021±0.090	0.000±0.000	
640	0.040±0.028#	0.080±0.025#	0.182±0.029#	0.174±0.017*	0.089±0.014*	0.104±0.012	0.062±0.026	0.054±0.033	0.087±0.038	0.053±0.035	
1280	0.029±0.018#	0.026±0.026#	0.013±0.008#	0.043±0.020*	0.012±0.006*	0.076±0.018	0.036±0.018	0.113±0.032	0.084±0.029	0.120±0.033*	
continua...											
Dose Fipronil	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
0	0.017±0.011	0.032±0.020	0.057±0.029	0.060±0.032	0.077±0.037	0.072±0.030	0.072±0.030	0.096±0.040	0.070±0.029	0.099±0.047	
10	0.402±0.027*	0.337±0.028*	0.318±0.037*	0.301±0.024*	0.273±0.025*	0.255±0.027	0.255±0.027	0.285±0.052	0.232±0.040*	0.237±0.039*	
20	0.416±0.023*	0.391±0.022*	0.372±0.024*	0.323±0.018*	0.297±0.016*	0.313±0.021#	0.313±0.021#	0.313±0.021	0.309±0.021*	0.319±0.026*	
40	0.383±0.032*	0.341±0.020*	0.297±0.009*	0.288±0.009*	0.260±0.014*	0.252±0.023	0.262±0.033	0.238±0.041	0.275±0.036*	0.293±0.036*	
80	0.385±0.022*	0.381±0.031*	0.402±0.034*	0.387±0.025*	0.337±0.021*	0.324±0.016#	0.324±0.016#	0.309±0.012	0.301±0.016*	0.309±0.017*	
160	0.212±0.047*	0.217±0.047*	0.154±0.051	0.144±0.054	0.138±0.049	0.133±0.044	0.192±0.047	0.164±0.055	0.127±0.053	0.129±0.053	
320	0.000±0.000	0.048±0.008	0.041±0.013	0.093±0.016	0.105±0.013	0.135±0.031	0.135±0.031	0.103±0.029	0.096±0.032	0.072±0.026	
640	0.095±0.040	0.099±0.040	0.061±0.038	0.098±0.044	0.037±0.025	0.084±0.047	0.084±0.047	0.073±0.046	0.062±0.037	0.053±0.032	
1280	0.152±0.037*	0.082±0.035	0.060±0.030	0.052±0.026	0.014±0.011	0.028±0.028	0.024±0.021	0.020±0.012	0.010±0.010	0.008±0.008*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 10 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.099±0.002	0.237±0.004	0.328±0.009	0.309±0.027	0.255±0.052	0.187±0.079	0.175±0.081	0.149±0.077	0.134±0.088	0.019±0.014
10	0.086±0.002	0.219±0.004	0.306±0.003	0.194±0.017*	0.006±0.004*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
20	0.088±0.002	0.209±0.012	0.298±0.011	0.124±0.008*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
40	0.081±0.001	0.161±0.004	0.252±0.006	0.062±0.012*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
80	0.071±0.002	0.142±0.004	0.244±0.009	0.033±0.011*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
160	0.054±0.014#	0.131±0.016	0.266±0.018	0.101±0.018*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
320	0.069±0.007	0.095±0.003#	0.166±0.002#	0.104±0.010*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
640	0.054±0.031	0.057±0.018#	0.102±0.020#	0.099±0.010*	0.009±0.005*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000
1280	0.047±0.024#	0.000±0.000#	0.002±0.001#	0.019±0.009*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.020±0.014	0.015±0.015

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.016±0.010	0.026±0.018	0.041±0.029	0.042±0.029	0.044±0.007	0.044±0.007	0.044±0.029
10	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
20	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
40	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
80	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
160	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
320	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
640	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000
1280	0.023±0.023	0.028±0.020	0.050±0.025*	0.054±0.026*	0.079±0.038*	0.101±0.045*	0.106±0.045*	0.101±0.047*	0.101±0.046*	0.101±0.046*

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 11 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
0	0.145±0.035	0.680±0.020	0.273±0.019	0.079±0.023	0.058±0.023	0.062±0.025	0.322±0.031	0.030±0.008	0.088±0.014	0.053±0.005	
10	0.127±0.033	0.672±0.016	0.272±0.009	0.112±0.033	0.032±0.020	0.062±0.012	0.314±0.062	0.129±0.032	0.079±0.020	0.054±0.014	
20	0.129±0.035	0.548±0.014*	0.305±0.006	0.067±0.017	0.000±0.000*	0.096±0.037	0.279±0.008	0.152±0.020	0.088±0.025	0.049±0.017	
40	0.118±0.016	0.444±0.012*	0.296±0.006	0.047±0.016	0.000±0.000*	0.116±0.051	0.231±0.025	0.170±0.015#	0.066±0.009	0.052±0.019	
80	0.106±0.004	0.394±0.007*	0.249±0.013	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.026±0.016	0.203±0.022	0.204±0.010#	0.102±0.013	0.102±0.008*	
160	0.078±0.020#	0.267±0.010*	0.203±0.006	0.006±0.005*	0.004±0.004*	0.003±0.003	0.118±0.012	0.076±0.013	0.066±0.017	0.017±0.004	
320	0.098±0.009	0.084±0.008*	0.110±0.004	0.006±0.006	0.027±0.009	0.034±0.010	0.129±0.024	0.074±0.018	0.067±0.014	0.004±0.004*	
640	0.075±0.004	0.000±0.000*	0.014±0.002	0.006±0.007*	0.015±0.006	0.032±0.008	0.057±0.008#	0.059±0.014	0.029±0.008	0.018±0.007	
1280	0.051±0.026#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.006±0.008*	0.006±0.004*	0.000±0.000	0.049±0.008#	0.025±0.007	0.020±0.006*	0.002±0.001*	continua...

Dose Fipronil	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
0	0.039±0.009	0.024±0.010	0.025±0.003	0.015±0.005	0.016±0.005	0.021±0.011	0.044±0.009	0.000±0.000	0.000±0.000	0.003±0.001	
10	0.030±0.005	0.049±0.012	0.057±0.013*	0.035±0.007	0.016±0.005	0.022±0.008	0.034±0.008*	0.012±0.002	0.000±0.000	0.002±0.002	
20	0.038±0.011	0.036±0.008	0.083±0.006*	0.046±0.004*	0.026±0.002	0.011±0.004	0.005±0.002*	0.012±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	
40	0.037±0.004	0.074±0.022*	0.069±0.008*	0.043±0.007*	0.040±0.008	0.017±0.005	0.009±0.004*	0.025±0.007*	0.000±0.000	0.001±0.001	
80	0.008±0.006*	0.014±0.006	0.053±0.004	0.042±0.006*	0.035±0.009	0.018±0.005	0.014±0.002*	0.010±0.001	0.000±0.000	0.002±0.001	
160	0.026±0.010	0.010±0.005	0.041±0.006	0.028±0.006	0.035±0.006	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.023±0.003*	0.000±0.000	0.006±0.001	
320	0.013±0.004	0.004±0.003	0.014±0.005	0.017±0.005	0.022±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.033±0.004*	0.000±0.000	0.027±0.009*	
640	0.012±0.005	0.000±0.000	0.018±0.006	0.011±0.002	0.041±0.009*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.037±0.005*	0.000±0.000	0.013±0.0012	
1280	0.000±0.000*	0.027±0.007	0.018±0.010	0.024±0.003	0.010±0.005	0.020±0.005	0.011±0.005*	0.002±0.001	0.001±0.000*	0.005±0.001	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 12 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.099±0.002	0.703±0.021	0.285±0.017	0.070±0.020	0.037±0.025	0.132±0.065	0.300±0.065	0.051±0.030	0.096±0.016	0.042±0.010
10	0.086±0.002	0.687±0.016	0.284±0.007	0.048±0.022	0.013±0.008	0.088±0.043	0.331±0.065	0.157±0.036	0.084±0.022	0.058±0.014
20	0.088±0.002	0.598±0.030*	0.298±0.018	0.053±0.014	0.000±0.000	0.088±0.036	0.278±0.022	0.205±0.041	0.091±0.028	0.044±0.018
40	0.081±0.001	0.469±0.011*	0.300±0.010	0.037±0.015	0.009±0.009	0.112±0.047	0.231±0.024	0.194±0.017#	0.060±0.016	0.033±0.016
80	0.071±0.002	0.438±0.014*	0.278±0.014	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.036±0.022	0.188±0.020	0.199±0.017#	0.107±0.016	0.083±0.011*
160	0.054±0.014#	0.332±0.014*	0.227±0.005	0.037±0.021	0.017±0.017	0.009±0.009	0.133±0.028	0.103±0.029	0.083±0.029	0.004±0.003
320	0.069±0.007	0.155±0.014*	0.120±0.003	0.045±0.011	0.006±0.004	0.055±0.049	0.136±0.030	0.083±0.022	0.077±0.023	0.005±0.003
640	0.054±0.031	0.000±0.000*	0.035±0.004	0.025±0.007	0.003±0.003	0.038±0.017	0.084±0.015#	0.071±0.065	0.030±0.011	0.002±0.001
1280	0.047±0.024#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.002±0.002	0.001±0.001	0.070±0.009#	0.039±0.007	0.036±0.009	0.002±0.002

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	0.036±0.011	0.023±0.010	0.026±0.005	0.017±0.006	0.014±0.005	0.035±0.014	0.044±0.009	0.002±0.002	0.000±0.000	
10	0.023±0.005	0.041±0.010	0.059±0.015	0.027±0.007	0.023±0.006	0.026±0.009	0.036±0.007*	0.003±0.001	0.000±0.000	
20	0.026±0.013	0.038±0.013	0.092±0.011*	0.040±0.005	0.026±0.004	0.011±0.004	0.017±0.005*	0.006±0.002	0.000±0.000	
40	0.037±0.005	0.072±0.018*	0.084±0.015*	0.043±0.007*	0.042±0.012	0.030±0.008	0.016±0.006*	0.013±0.005	0.000±0.000	
80	0.013±0.007	0.026±0.009	0.066±0.006*	0.042±0.007	0.038±0.012	0.017±0.008	0.019±0.003*	0.002±0.001	0.000±0.000	
160	0.025±0.010	0.020±0.007	0.058±0.008	0.029±0.009	0.035±0.008	0.000±0.000*	0.002±0.002*	0.009±0.002	0.000±0.000	
320	0.010±0.003	0.018±0.009	0.025±0.006	0.020±0.003	0.014±0.003	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.027±0.003#	0.000±0.000	
640	0.010±0.006	0.007±0.003	0.023±0.007	0.013±0.006	0.035±0.011	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.025±0.007#	0.000±0.000	
1280	0.004±0.003*	0.022±0.005	0.021±0.011	0.026±0.009	0.020±0.009	0.011±0.005	0.012±0.006	0.005±0.003	0.001±0.001*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 13 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.145 $\pm$ 0.035	0.982 $\pm$ 0.029	1.376 $\pm$ 0.044	1.482 $\pm$ 0.041	1.556 $\pm$ 0.047	1.654 $\pm$ 0.136	2.034 $\pm$ 0.064	2.110 $\pm$ 0.035	2.236 $\pm$ 0.028	2.313 $\pm$ 0.034
10	0.127 $\pm$ 0.033	0.970 $\pm$ 0.024	1.362 $\pm$ 0.024	1.457 $\pm$ 0.055	1.127 $\pm$ 1,123*	1.277 $\pm$ 0.109*	1.730 $\pm$ 0.083*	1.917 $\pm$ 0.047*	2.030 $\pm$ 0.037*	2.102 $\pm$ 0.044*
20	0.129 $\pm$ 0.035	0.791 $\pm$ 0.020*	1.245 $\pm$ 0.023*	1.324 $\pm$ 0.038*	1.062 $\pm$ 0.054*	1.113 $\pm$ 0.055*	1.487 $\pm$ 0.058*	1.753 $\pm$ 0.043*	1.881 $\pm$ 0.019*	1.948 $\pm$ 0.026*
40	0.118 $\pm$ 0.016	0.640 $\pm$ 0.018*	1.079 $\pm$ 0.008*	1.117 $\pm$ 0.034*	0.804 $\pm$ 0.065*	0.958 $\pm$ 0.045*	1.406 $\pm$ 0.043*	1.650 $\pm$ 0.022*	1.678 $\pm$ 0.070*	1.780 $\pm$ 0.024*
80	0.106 $\pm$ 0.004	0.569 $\pm$ 0.010*	0.915 $\pm$ 0.010*	0.839 $\pm$ 0.022*	0.635 $\pm$ 0.076*	0.670 $\pm$ 0.105*	0.963 $\pm$ 0.074*	1.238 $\pm$ 0.066*	1.385 $\pm$ 0.062*	1.533 $\pm$ 0.053*
160	0.078 $\pm$ 0.020#	0.386 $\pm$ 0.015*	0.679 $\pm$ 0.017*	0.684 $\pm$ 0.040*	0.692 $\pm$ 0.048*	0.731 $\pm$ 0.021*	0.840 $\pm$ 0.046*	1.036 $\pm$ 0.061*	1.162 $\pm$ 0.049*	1.187 $\pm$ 0.047*
320	0.098 $\pm$ 0.009	0.121 $\pm$ 0.012*	0.281 $\pm$ 0.014*	0.343 $\pm$ 0.020*	0.374 $\pm$ 0.022*	0.408 $\pm$ 0.017*	0.691 $\pm$ 0.054*	0.768 $\pm$ 0.040*	0.865 $\pm$ 0.030*	0.867 $\pm$ 0.022*
640	0.075 $\pm$ 0.004	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.067 $\pm$ 0.026*	0.137 $\pm$ 0.046*	0.164 $\pm$ 0.054*	0.182 $\pm$ 0.059*
1280	0.051 $\pm$ 0.026#	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	2.412 $\pm$ 0.022	2.452 $\pm$ 0.016	2.445 $\pm$ 0.039	2.500 $\pm$ 0.025	2.484 $\pm$ 0.042	2.505 $\pm$ 0.039	2.545 $\pm$ 0.020	2.570 $\pm$ 0.035	2.502 $\pm$ 0.027	2.559 $\pm$ 0.038
10	2.146 $\pm$ 0.046*	2.213 $\pm$ 0.052*	2.295 $\pm$ 0.050	2.384 $\pm$ 0.033	2.379 $\pm$ 0.058	2.388 $\pm$ 0.064	2.436 $\pm$ 0.063	2.4445 $\pm$ 0.067	2.423 $\pm$ 0.071	2.415 $\pm$ 0.073
20	2.003 $\pm$ 0.032*	2.069 $\pm$ 0.037*	2.178 $\pm$ 0.031*	2.238 $\pm$ 0.025*	2.275 $\pm$ 0.026*	2.286 $\pm$ 0.028*	2.297 $\pm$ 0.027*	2.311 $\pm$ 0.028*	2.302 $\pm$ 0.030*	2.271 $\pm$ 0.038*
40	1.829 $\pm$ 0.022*	1.951 $\pm$ 0.033*	2.057 $\pm$ 0.029*	2.112 $\pm$ 0.025*	2.161 $\pm$ 0.024*	2.180 $\pm$ 0.027*	2.155 $\pm$ 0.040*	2.161 $\pm$ 0.044*	2.173 $\pm$ 0.049*	2.159 $\pm$ 0.046*
80	1.548 $\pm$ 0.045*	1.579 $\pm$ 0.049*	1.655 $\pm$ 0.050*	1.716 $\pm$ 0.042*	1.766 $\pm$ 0.038*	1.791 $\pm$ 0.035*	1.812 $\pm$ 0.035*	1.827 $\pm$ 0.034*	1.818 $\pm$ 0.037*	1.817 $\pm$ 0.038*
160	1.216 $\pm$ 0.051*	1.230 $\pm$ 0.046*	1.290 $\pm$ 0.043*	1.330 $\pm$ 0.041*	1.381 $\pm$ 0.039*	1.371 $\pm$ 0.041*	1.356 $\pm$ 0.042*	1.354 $\pm$ 0.027*	1.336 $\pm$ 0.027*	1.346 $\pm$ 0.028*
320	0.903 $\pm$ 0.015*	0.899 $\pm$ 0.019*	0.917 $\pm$ 0.025*	0.913 $\pm$ 0.014*	0.961 $\pm$ 0.022*	0.917 $\pm$ 0.040*	0.883 $\pm$ 0.044*	0.939 $\pm$ 0.041*	0.910 $\pm$ 0.047*	0.949 $\pm$ 0.038*
640	0.192 $\pm$ 0.064*	0.190 $\pm$ 0.062*	0.209 $\pm$ 0.057*	0.229 $\pm$ 0.058*	0.288 $\pm$ 0.054*	0.242 $\pm$ 0.063*	0.208 $\pm$ 0.060*	0.262 $\pm$ 0.059*	0.243 $\pm$ 0.054*	0.266 $\pm$ 0.057*
1280	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*	0.000 $\pm$ 0.000*

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). $\pm$ erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 14 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.099±0.002	1.014±0.031	1.425±0.045	1.508±0.038	1.446±0.077	1.635±0.156	2.055±0.084	2.113±0.046	2.251±0.042	2.311±0.049
10	0.086±0.002	0.991±0.023	1.400±0.024	1.450±0.047	1.050±0.122*	1.173±0.126*	1.650±0.098*	1.876±0.055*	1.987±0.048*	2.056±0.058*
20	0.088±0.002	0.862±0.043*	1.291±0.024*	1.341±0.036*	0.995±0.054*	1.016±0.065*	1.417±0.064*	1.712±0.046*	1.844±0.021*	1.892±0.025*
40	0.081±0.001	0.676±0.016*	1.109±0.025*	1.155±0.033*	0.842±0.091*	0.959±0.078*	1.293±0.066*	1.572±0.059*	1.655±0.079*	1.664±0.054*
80	0.071±0.002	0.632±0.020*	1.033±0.036*	0.972±0.046*	0.653±0.072*	0.652±0.100*	0.923±0.074*	1.209±0.071*	1.364±0.065*	1.483±0.058*
160	0.054±0.014#	0.480±0.021*	0.807±0.020*	0.843±0.045*	0.827±0.056*	0.772±0.049*	0.964±0.073*	1.113±0.066*	1.232±0.054*	1.223±0.048*
320	0.069±0.007	0.224±0.020*	0.397±0.022*	0.462±0.023*	0.450±0.028*	0.518±0.094*	0.714±0.074*	0.834±0.063*	0.945±0.044*	0.920±0.037*
640	0.054±0.031	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.068±0.023*	0.145±0.048*	0.165±0.053*	0.154±0.050*
1280	0.047±0.024#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	2.374±0.043	2.397±0.050	2.434±0.050	2.456±0.050	2.473±0.054	2.515±0.045	2.579±0.037	2.567±0.044	2.550±0.050	
10	2.090±0.060*	2.148±0.059*	2.226±0.063*	2.265±0.056*	2.298±0.062	2.318±0.070*	2.370±0.073*	2.370±0.075*	2.355±0.079	
20	1.948±0.030*	2.002±0.037*	2.134±0.033*	2.192±0.030*	2.229±0.031*	2.245±0.031*	2.269±0.032*	2.277±0.031*	2.262±0.032*	
40	1.717±0.053*	1.821±0.073*	1.942±0.080*	2.004±0.075*	2.064±0.061*	2.102±0.056*	2.125±0.051*	2.140±0.057*	2.122±0.061*	
80	1.493±0.048*	1.528±0.051*	1.623±0.054*	1.684±0.047*	1.737±0.036*	1.757±0.030*	1.784±0.030*	1.785±0.029*	1.779±0.031*	
160	1.248±0.051*	1.268±0.047*	1.352±0.046*	1.394±0.046*	1.444±0.045*	1.420±0.049*	1.415±0.048*	1.427±0.050*	1.409±0.050*	
320	0.931±0.040*	0.952±0.030*	0.988±0.032*	1.016±0.030*	1.036±0.031*	0.978±0.049*	0.956±0.049*	0.994±0.049*	0.969±0.055*	
640	0.162±0.053*	0.166±0.054*	0.187±0.050*	0.204±0.055*	0.252±0.053*	0.202±0.057*	0.176±0.052*	0.207±0.055*	0.198±0.052*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 15 – Valores do parâmetro posição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorbância 450 nm.

Dose Standak	Tempo									
	top	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h
0		0.060±0.001	0.244±0.014	0.531±0.019	0.699±0.051	0.695±0.038	0.691±0.024	0.743±0.038	0.744±0.038	0.831±0.019
20		0.013±0.003*	0.282±0.010	0.534±0.019	0.731±0.017	0.930±0.066*	0.856±0.040*	0.919±0.024*	0.951±0.037*	0.935±0.019
40		0.000±0.000*	0.264±0.007	0.582±0.036	0.871±0.024*	0.854±0.020*	0.841±0.044*	0.928±0.029*	0.928±0.029*	0.910±0.022
80		0.000±0.000*	0.257±0.007	0.529±0.009	0.826±0.019*	0.923±0.016*	0.814±0.016*	0.876±0.009*	0.898±0.023*	0.947±0.022*
160		0.000±0.000*	0.188±0.030*	0.487±0.032	0.734±0.027	0.772±0.034	0.733±0.033	0.662±0.069	0.708±0.072	0.802±0.052
320		0.000±0.000*	0.214±0.010	0.536±0.015	0.656±0.031	0.468±0.016*	0.446±0.032*	0.357±0.039*	0.426±0.076*	0.347±0.049*
640		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.292±0.019	0.503±0.010*	0.257±0.021*	0.229±0.025*	0.173±0.026*	0.173±0.026*	0.147±0.021*
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.094±0.033*	0.013±0.007*	0.009±0.007*	0.000±0.000*	0.005±0.005*	0.000±0.000*
2560		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*

continua...

Dose Standak	Tempo									
	top	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h
0		0.834±0.028	0.807±0.012	0.862±0.013	0.867±0.014	0.871±0.012	0.885±0.014	0.887±0.005	0.877±0.005	0.852±0.012
20		0.931±0.014	0.924±0.025	0.941±0.020	0.916±0.023	0.906±0.017	0.920±0.015	0.879±0.010	0.880±0.012	0.827±0.025
40		0.940±0.036	0.947±0.038	0.934±0.031	0.972±0.039	0.911±0.033	0.966±0.044	0.836±0.041	0.862±0.039	0.882±0.034
80		0.957±0.018*	0.955±0.023	0.978±0.016*	0.951±0.019	0.969±0.014	0.966±0.011	0.928±0.007	0.947±0.008	0.926±0.010
160		0.836±0.053	0.780±0.060	0.783±0.052	0.734±0.047*	0.790±0.052	0.809±0.044	0.755±0.043	0.769±0.048	0.687±0.046
320		0.318±0.054*	0.431±0.085*	0.409±0.050*	0.379±0.060*	0.467±0.032*	0.472±0.039*	0.406±0.045	0.472±0.056	0.381±0.051
640		0.135±0.014*	0.170±0.020*	0.215±0.023*	0.118±0.047*	0.207±0.021*	0.186±0.020*	0.100±0.023	0.124±0.017	0.049±0.011
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#
2560		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 16 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorbância 690 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.030±0.003	0.162±0.016	0.371±0.016	0.478±0.040	0.463±0.026	0.445±0.017	0.454±0.016	0.471±0.021	0.506±0.018	
20	0.000±0.000*	0.188±0.010	0.364±0.014	0.520±0.021	0.646±0.056*	0.513±0.036	0.560±0.030	0.597±0.030	0.585±0.022	
40	0.000±0.000*	0.167±0.004	0.386±0.029	0.610±0.017*	0.598±0.016*	0.528±0.035	0.594±0.019*	0.592±0.028	0.586±0.032	
80	0.000±0.000*	0.156±0.005	0.355±0.008	0.599±0.032*	0.662±0.010*	0.499±0.033	0.513±0.028	0.577±0.026	0.604±0.023	
160	0.000±0.000*	0.103±0.022*	0.310±0.036	0.477±0.033	0.547±0.025	0.456±0.037	0.459±0.050	0.428±0.054	0.450±0.056	
320	0.000±0.000*	0.135±0.019	0.440±0.020	0.501±0.027	0.345±0.020*	0.300±0.027*	0.325±0.045*	0.270±0.065*	0.272±0.074*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.276±0.017*	0.467±0.015	0.176±0.019*	0.119±0.029*	0.104±0.025*	0.078±0.024*	0.064±0.021*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.099±0.036*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

continua...

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	128h	136h	144h	
0	0.522±0.011	0.510±0.008	0.534±0.011	0.542±0.012	0.537±0.013	0.543±0.013	0.511±0.019	0.525±0.017	0.511±0.019	
20	0.572±0.016	0.550±0.015	0.556±0.012	0.541±0.013	0.532±0.012	0.529±0.015	0.465±0.022	0.492±0.018	0.465±0.022	
40	0.581±0.035	0.589±0.038	0.594±0.042	0.576±0.047	0.579±0.045	0.574±0.046	0.469±0.031	0.532±0.039	0.504±0.043	
80	0.604±0.021	0.612±0.019	0.625±0.023	0.610±0.025	0.620±0.021	0.613±0.021	0.560±0.027	0.575±0.026	0.560±0.027	
160	0.479±0.053	0.480±0.049	0.492±0.048	0.458±0.047	0.463±0.044	0.450±0.041	0.402±0.032*	0.435±0.035	0.402±0.032*	
320	0.192±0.052*	0.216±0.054*	0.241±0.053*	0.209±0.049*	0.295±0.046*	0.290±0.047*	0.192±0.050*	0.288±0.047*	0.219±0.049*	
640	0.035±0.013*	0.053±0.018*	0.063±0.017*	0.025±0.015*	0.045±0.015*	0.031±0.014*	0.000±0.000*	0.008±0.008*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). $\pm$ erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 17 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Standak	Tempo									
	top	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h
0		0.060±0.001	1.012±0.041	0.658±0.053	0.227±0.037	0.001±0.001	0.047±0.020	0.031±0.012	0.022±0.014	0.057±0.013
20		0.013±0.003*	1.149±0.029*	0.460±0.018	0.285±0.007	0.189±0.063	0.000±0.000*	0.063±0.020	0.055±0.020	0.028±0.014
40		0.000±0.000*	0.953±0.020	0.500±0.042	0.309±0.033*	0.004±0.004	0.004±0.004*	0.082±0.021*	0.011±0.007	0.015±0.007
80		0.000±0.000*	0.795±0.032*	0.376±0.006	0.297±0.014	0.052±0.013	0.000±0.000*	0.044±0.018	0.061±0.020	0.042±0.008
160		0.000±0.000*	0.534±0.014*	0.203±0.011	0.165±0.014	0.077±0.022	0.000±0.000*	0.039±0.018	0.000±0.000	0.036±0.014
320		0.000±0.000*	0.255±0.018*	0.169±0.006	0.002±0.001*	0.000±0.000	0.007±0.007*	0.002±0.002	0.000±0.000	0.012±0.005
640		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.073±0.002#	0.011±0.002*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000	0.002±0.001
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.012±0.004#	0.001±0.001*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000#
2560		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.001±0.001	0.000±0.000#

continua...

Dose Standak	Tempo									
	top	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h
0		0.042±0.012	0.014±0.013	0.042±0.009	0.007±0.003	0.011±0.006	0.009±0.004	0.006±0.003	0.004±0.004	0.000±0.000
20		0.012±0.008*	0.017±0.010	0.014±0.008*	0.000±0.000*	0.001±0.001	0.005±0.002	0.000±0.000*	0.011±0.005	0.000±0.000
40		0.009±0.004*	0.015±0.006	0.010±0.004*	0.002±0.002	0.006±0.004	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.004±0.003	0.000±0.000
80		0.006±0.004	0.016±0.005	0.018±0.007	0.001±0.001*	0.005±0.004	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.006±0.004	0.003±0.003
160		0.027±0.010	0.013±0.008	0.022±0.012	0.000±0.000*	0.006±0.005	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.007±0.006	0.000±0.000
320		0.012±0.007	0.023±0.011	0.019±0.007	0.005±0.003	0.017±0.010	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.005±0.002	0.002±0.002
640		0.000±0.000*	0.022±0.007#	0.015±0.006	0.000±0.000*	0.006±0.003	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.004±0.003	0.005±0.004
1280		0.000±0.000*	0.011±0.006	0.008±0.003*	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.027±0.007*	0.007±0.002
2560		0.000±0.000*	0.00±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.001±0.001	0.003±0.001*	0.006±0.003	0.019±0.008	0.000±0.000

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). *Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). # erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 18 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.030±0.003	1.087±0.059	0.733±0.054	0.227±0.043	0.077±0.050	0.038±0.021	0.041±0.017	0.043±0.020	0.068±0.030	
20	0.000±0.000*	1.169±0.021	0.477±0.016	0.293±0.013	0.195±0.070*	0.000±0.000*	0.083±0.046	0.069±0.025	0.018±0.009*	
40	0.000±0.000*	1.004±0.028	0.510±0.046	0.356±0.057	0.016±0.011	0.000±0.000*	0.102±0.032	0.025±0.018	0.014±0.006*	
80	0.000±0.000*	0.791±0.033	0.373±0.005	0.330±0.031	0.094±0.032	0.000±0.000*	0.035±0.018	0.092±0.037	0.035±0.012	
160	0.000±0.000*	0.505±0.025	0.231±0.021	0.168±0.015	0.092±0.026	0.000±0.000*	0.034±0.017	0.012±0.012	0.035±0.015	
320	0.000±0.000*	0.259±0.017	0.179±0.008	0.008±0.007	0.000±0.000	0.002±0.002*	0.028±0.026	0.003±0.002*	0.013±0.005*	
640	0.000±0.000*	0.001±0.001#	0.086±0.002#	0.034±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.004±0.002*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.022±0.005#	0.001±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.002±0.001*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.002	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

continua...

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	0.040±0.014	0.002±0.002	0.061±0.005	0.004±0.003	0.016±0.008	0.016±0.006	0.003±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	
20	0.007±0.005*	0.006±0.004	0.011±0.002*	0.000±0.000	0.002±0.001	0.005±0.003*	0.000±0.000*	0.013±0.005	0.000±0.000	
40	0.005±0.004*	0.010±0.003	0.021±0.004*	0.000±0.000	0.007±0.003	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.012±0.005	0.000±0.000	
80	0.011±0.008*	0.010±0.004	0.013±0.005*	0.000±0.000	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.010±0.003	0.000±0.000	
160	0.038±0.016	0.003±0.002	0.020±0.009*	0.000±0.000	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.012±0.004	0.000±0.000	
320	0.009±0.006*	0.019±0.007	0.028±0.006*	0.006±0.003	0.029±0.013	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.017±0.005	0.000±0.000	
640	0.000±0.000*	0.038±0.004#	0.034±0.006*	0.000±0.000	0.015±0.006	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.002±0.002	0.011±0.006*	
1280	0.000±0.000*	0.024±0.006	0.028±0.004*	0.000±0.000	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.028±0.008*	0.020±0.006*	
2560	0.000±0.000*	0.001±0.001	0.000±0.000*	0.005±0.003	0.008±0.003	0.009±0.003	0.002±0.001	0.025±0.005*	0.000±0.000	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). *Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). # erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 19 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.060±0.001	1.497±0.057	2.626±0.059	2.953±0.093	2.936±0.090	2.914±0.071	2.955±0.061	3.009±0.066	3.108±0.065	
20	0.013±0.003*	1.686±0.031*	2.374±0.037*	2.797±0.053	3.055±0.120	2.800±0.096	2.920±0.073	3.005±0.064	2.986±0.049	
40	0.000±0.000*	1.448±0.040	2.184±0.078*	2.699±0.029*	2.678±0.045*	2.530±0.075*	2.677±0.037*	2.675±0.029*	2.667±0.035*	
80	0.000±0.000*	1.108±0.043*	1.680±0.053*	2.155±0.077*	2.267±0.039*	1.964±0.095*	1.944±0.073*	2.119±0.073*	2.169±0.074*	
160	0.000±0.000*	0.758±0.025*	1.062±0.052*	1.303±0.047*	1.419±0.047*	1.259±0.059*	1.238±0.087*	1.181±0.098*	1.211±0.117*	
320	0.000±0.000*	0.353±0.018*	0.632±0.025*	0.621±0.031*	0.382±0.029*	0.305±0.050*	0.314±0.078*	0.208±0.102*	0.221±0.109*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.059±0.016*	0.109±0.017*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

continua...

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	3.161±0.048	3.147±0.047	3.208±0.053	3.225±0.051	3.220±0.056	3.235±0.053	3.227±0.055	3.201±0.065	3.168±0.077	
20	2.965±0.036	2.933±0.037	2.946±0.032*	2.928±0.032*	2.906±0.038*	2.905±0.041*	2.849±0.045*	2.830±0.060*	2,760±0.077*	
40	2.657±0.042*	2.648±0.046*	2.689±0.054*	2.664±0.061*	2.662±0.059*	2.651±0.062*	2.589±0.066*	2.567±0.058*	2.515±0.065*	
80	2.171±0.065*	2.194±0.063*	2.218±0.067*	2.211±0.067*	2.207±0.066*	2.196±0.064*	2.147±0.061*	2.127±0.061*	2.103±0.066*	
160	1.260±0.113*	1.268±0.108*	1.293±0.102*	1.261±0.108*	1.246±0.099*	1.225±0.096*	1.196±0.096*	1.193±0.091*	1.148±0.089*	
320	0.218±0.107*	0.239±0.097*	0.252±0.095*	0.239±0.090*	0.241±0.079*	0.239±0.078*	0.191±0.074*	0.251±0.080*	0.169±0.072*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições.
Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 20– Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *A. brasiliense* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Standak	Tempo										
	top	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0		0.030±0.003	1.378±0.041	2.493±0.049	2.821±0.090	2.830±0.083	2.804±0.042	2.859±0.038	2.959±0.072	3.121±0.039	
20		0.000±0.000*	1.515±0.029	2.284±0.018	2.695±0.019	3.006±0.104	2.861±0.091	3.070±0.034*	3.115±0.038*	3.080±0.038	
40		0.000±0.000*	1.319±0.020	2.086±0.071	2.644±0.036	2.588±0.028*	2.566±0.069*	2.687±0.026*	2.734±0.023*	2.746±0.019*	
80		0.000±0.000*	1.161±0.032	1.689±0.049	2.148±0.066	2.240±0.038*	2.098±0.056*	2.135±0.039*	2.201±0.059*	2.262±0.061*	
160		0.000±0.000*	0.901±0.014	1.056±0.051	1.318±0.033	1.407±0.050*	1.268±0.065*	1.294±0.083*	1.347±0.061*	1.403±0.057*	
320		0.000±0.000*	0.597±0.011	0.571±0.012	0.585±0.036	0.308±0.018*	0.290±0.048*	0.226±0.046*	0.091±0.040*	0.093±0.047*	
640		0.000±0.000*	0.327±0.008	0.049±0.009#	0.070±0.011#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280		0.000±0.000*	0.250±0.006#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560		0.000±0.000*	0.233±0.002#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

continua...

Dose Standak	Tempo										
	top	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0		3.173±0.026	3.104±0.027	3.192±0.024	3.178±0.016	3.210±0.019	3.231±0.017	3.208±0.009	3.198±0.012	3.214±0.022	
20		3.079±0.028	3.053±0.045	3.080±0.037	3.058±0.036	3.042±0.032*	3.041±0.037*	2.990±0.038*	2.996±0.044*	2.981±0.041*	
40		2.734±0.013*	2.742±0.007*	2.769±0.013*	2.733±0.013*	2.740±0.012*	2.725±0.017*	2.653±0.024*	2.691±0.030*	2.618±0.020*	
80		2.276±0.053*	2.284±0.049*	2.312±0.052*	2.295±0.050*	2.297±0.049*	2.278±0.048*	2.235±0.045*	2.229±0.050*	2.208±0.065*	
160		1.440±0.068*	1.356±0.099*	1.400±0.085*	1.368±0.091*	1.365±0.087*	1.343±0.086*	1.310±0.088*	1.332±0.084*	1.287±0.085*	
320		0.102±0.053*	0.142±0.049*	0.181±0.055*	0.179±0.059*	0.216±0.051*	0.217±0.053*	0.162±0.055*	0.291±0.092*	0.167±0.054*	
640		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). *Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

4 CAPÍTULO 2: PROTOCOLO PARA AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DE FUNGICIDA E INSETICIDA SOBRE RIZOBACTÉRIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*

RESUMO

Nas últimas décadas, ficou claro que os agrotóxicos representam um desafio ambiental global devido à sua presença crescente nos diversos ecossistemas. Os micro-organismos são indicadores sensíveis a poluição ambiental devido ao seu tempo de geração muito curto e resposta rápida a poluentes químicos, alta reprodutibilidade, facilidade de cultivo e manutenção em laboratório. O gênero *Bacillus* exibe uma ampla gama de habilidades fisiológicas que lhes permitem viver em todos os ambientes naturais, *B. megaterium* e *B. subtilis* suportam várias funções do ecossistema e desempenham um papel fundamental não apenas nos ciclos biogeoquímicos, mas também em uma ampla gama de serviços ecossistêmicos. Nosso objetivo foi desenvolver um protocolo ecotoxicológico para avaliar o efeito de sensibilidade dos agrotóxicos no crescimento bacteriano e os efeitos das concentrações de inibição nas populações do gênero *Bacillus* (*B. megaterium* e *B. subtilis*). O método foi baseado na diluição em microplacas das concentrações dos ingredientes ativos dos agrotóxicos em meio de cultura LB contendo as suspensões bacterianas e incubadas ao longo de 48 horas de incubação a 30 °C. Os resultados mostraram que *B. megaterium* e *B. subtilis* são sensíveis ao efeito dos agrotóxicos no crescimento bacteriano atingindo a fase exponencial em 15 horas de incubação após a contaminação. Os dados de crescimento bacteriano permitiram calcular as concentrações de inibição média que variaram de 61 a 216 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os parâmetros número de gerações e a taxa de crescimento instantâneo. Os resultados mostram que *B. megaterium* e *B. subtilis* fornecem informações ecotoxicológicas para monitorar a qualidade do meio ambiente.

Palavras-chave: *Bacillus*; Bioensaios; Crescimento bacteriano.

4 CHAPTER 2: Protocol for ecotoxicological evaluation of fungicide and insecticide on phosphate solubilizing Rhizobacteria *Bacillus megaterium* and *Bacillus subtilis*

ABSTRACT

In recent decades, it has become clear that pesticides represent a global environmental challenge due to their increasing present in diverse ecosystems. Microorganisms are sensitive indicators of environmental pollution due to their very short generation time and rapid response to chemical pollutants, high reproducibility, ease of cultivation and maintenance in the laboratory. The genus *Bacillus* exhibits a wide range of physiological abilities that allow them to live in all natural environments, *B. megaterium* e *B. subtilis* support multiple ecosystem functions and play a key role not only in biogeochemical cycles but also in a wide range of ecosystems services. Our objective was to develop an ecotoxicological protocol to evaluate the effect of pesticide sensitivity on bacterial growth and the effects of inhibition concentrations on populations of the genus *Bacillus* (*B. megaterium* e *B. subtilis*). The method was based on the dilution in microplates of the concentrations of the active ingredients of the pesticides in LB culture medium containing the bacterial suspensions and incubated over 48 hours of incubation at 30 °C. The results showed that *B. megaterium* and *B. subtilis* are sensitive to the effect of pesticides on bacterial growth, reaching the exponential phase within 15 hours of incubation after contamination. The bacterial growth data allowed calculating the mean inhibition concentrations that varied from 61 a 216 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for the parameters number of generations and instantaneous growth rate. The results show that *B. megaterium* and *B. subtilis* provide ecotoxicological information to monitor the quality of the environment.

Keywords: Bacillus; Bioassays; Bacterial growth.

4.1 INTRODUÇÃO

A maioria dos trabalhos de ecotoxicologia para avaliar os efeitos dos agrotóxicos em micro-organismos do solo utilizam o monitoramento através de técnicas dependentes de cultivo, testes bioquímicos como a atividade de transformação de nitrogênio e carbono ou tecnologias envolvendo DNA em eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE), sequenciamento de próxima geração (NGS) nas comunidades bacterianas (ROMDHANE et al., 2019).

Recentemente a Autoridade Europeia para a Segurança dos Alimentos (EFSA) recomendou o uso de metodologias moleculares em comunidades microbianas, mas destaca as dificuldades de interpretar os resultados complexos para fins regulatórios (VISCHETTI et al., 2020). A necessidade de introduzir metodologias de análises simples, rápidas, de baixo custo e facilidade de manuseio para avaliar os potenciais efeitos dos agrotóxicos baseado na inibição do crescimento através de um bioteste com RPCPs podem revelar um potencial de informações nas investigações.

O uso dos agrotóxicos para os ganhos de rendimentos desejados controlando pragas e doenças podem ter efeitos colaterais às diversas formas de vida e aos ecossistemas (SCHÄFER et al., 2019). Os agrotóxicos interagem com os micro-organismos rizosféricos tanto positivamente e negativamente (KARPOUZAS et al., 2016). O comportamento do agrotóxico no solo depende das características do solo, do manejo do solo, das propriedades físico-químicas do agrotóxico e das condições climáticas (BERNARDINO, 2021). A aplicação excessiva pode provocar efeitos deletérios nos micro-organismos do solo não-alvo podendo causar danos ao DNA, proteínas, oxidação da membrana, na sinalização e na fixação biológica de N₂, na redução de assimilação de fotossintatos, no crescimento celular e na sobrevivência (KAHN et al., 2021).

Rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RCPs) estimulam o crescimento das plantas por meio de mecanismos diretos e indiretos. Mecanismos diretos incluem a ciclagem da matéria orgânica, fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização do fósforo e potássio, produção de sideróforos e produção de hormônios de crescimento. Os mecanismos indiretos compreendem a desintoxicação de poluentes, tolerância ao estresse e agentes de biocontrole (LEONCIO & BOTELHO et al., 2017; MUNDI et al., 2020).

Bactérias como *Bacillus* spp., incluindo as espécies *Bacillus megaterium* e *B. subtilis* são comumente encontradas no solo atuando principalmente como RPCPs. Uma das características mais importantes é a sua capacidade de formar esporos e sobreviver no solo aumentando a sua capacidade de resistir em condições desfavoráveis (HASHEM et al., 2019). São um dos micro-organismos mais estudados como biodefensivos e inoculante microbiológicos. Recentemente vem sendo utilizado em tratamentos de sementes ou aplicações diretas no solo auxiliando no crescimento de plantas devido à fixação de nitrogênio, solubilização de fósforo e potássio, síntese de fitormônios, melhoria das condições do solo e capacidade de controlar patógenos (CHAGAS JUNIOR et al., 2021).

O objetivo deste estudo foi estabelecer protocolo par avaliação dos efeitos da molécula fungicida piraclostrobina (Comet®), do inseticida fipronil (Source®) e da mistura fungicida + inseticida piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil (Standak Top®) no crescimento do gênero *Bacillus* por meio de testes ecotoxicológicos em microplacas. As seguintes hipóteses foram estudadas:

1. As populações de RPCPs do gênero *Bacillus* são sensíveis à presença de agrotóxicos e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente ao intervalo de tempo de exposição que define a fase log de crescimento.
2. Os valores de concentração de inibição do crescimento bacteriano podem ser utilizados para indicar a toxicidade tanto de fungicidas, inseticidas ou ainda de mistura sobre populações de *Bacillus* e sua sensibilidade correlaciona-se positivamente com o tempo de exposição, diferentes leituras do comprimento de onda e aos parâmetros de exposição total, número de gerações e na taxa de crescimento.
3. O inoculante comercial a base de populações de RPCPs do gênero *Bacillus* podem ser utilizados em protocolos ecotoxicológicos padronizados para avaliação do efeito de agrotóxicos em rizobactérias.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

Nesse capítulo os produtos avaliados, os testes de toxicidade bacteriana *in vitro*, características avaliadas e análise estatística, seguiram exatamente como descrito no Capítulo 2, nos itens 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4 e 3.2.5, respectivamente. Especificidades de cada item desse capítulo são descritos abaixo.

4.2.1 Microrganismo estudado

O inoculante comercial de RPCPs utilizado para os testes foi cedido pela empresa Bioma (Fazenda Rio Grande – PR – Brasil). O inoculante formulado com a espécie *Bacillus megaterium* BRM 119 e *Bacillus subtilis* BRM2084, é um inoculante líquido registrado para milho e soja, contendo 4×10^9 células viáveis⁻¹.

4.2.3 Teste de toxicidade bacteriana *in vitro*

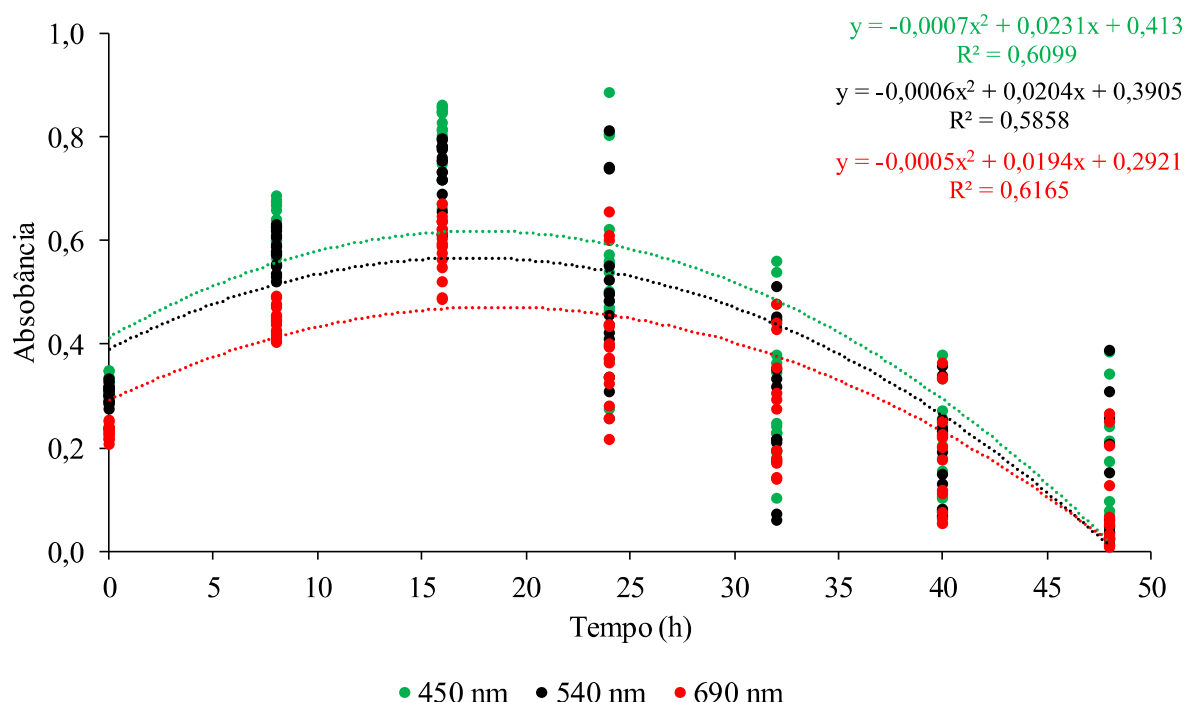
O inóculo inicial foi preparado em frascos contendo 30 mL de meio líquido Luria Bertani - LB (por litro: triptona 10 g; extrato de levedura 2 g; cloreto de sódio 6 g, pH 7,0) e autoclavado a 120 °C, 1 atm de pressão, durante 20 minutos. Após o resfriamento, em câmara de fluxo, foi adicionado ao meio de cultura 3 mL do inoculante contendo as espécies *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis*.

4.3 RESULTADOS

Na figura 3 são apresentados os resultados do crescimento celular através da absorbância em função do tempo. Pode-se observar que as absorbâncias apresentaram de modo geral comportamento semelhantes.

A curva de crescimento foi obtida para definição do tempo de incubação definido pela fase log de crescimento. Observa-se que *B. subtilis* e *B. megaterium* apresentaram a fase log a partir de 8 horas de incubação após inoculação e contaminação com os agrotóxicos atingindo sua fase estacionária após 15 horas de crescimento e a partir das 24 horas de incubação apresenta redução no crescimento à medida que se aproxima da fase estacionária (Figura 3).

Figura 3 – Curva de crescimento de *Bacillus* em função do tempo de exposição (h), nas absorvâncias 450, 540 e 690 nm em meio Luria Bertani (LB), 30 °C, 100 rpm.



O ingrediente ativo fipronil e a mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil apresentaram os menores valores de média de concentração de inibição de $286 \mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo 8 horas e apresenta valores estatisticamente distintos para o parâmetro de exposição total para o ingrediente ativo piraclostrobina (Tabela 21).

Todos os ingredientes ativos apresentaram valores de concentração semelhantes independente do tempo de exposição de 8, 16 e 24 horas, e a leitura dos comprimentos de onda 450, 540 e 690 nm para *B. subtilis* e *B. megaterium* (Tabela 22).

Na Tabela 6 onde foram calculadas a taxa de crescimento instantâneo não foi possível ajustar o modelo de regressão no tempo 24 horas após a exposição para os ingredientes ativos testados. O valor médio de concentração de inibição para ingrediente ativo fipronil foi de $217 \mu\text{g mL}^{-1}$ no tempo 8 horas e $73 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o tempo 16 horas. Observa-se que houve comportamento semelhante dos resultados para o ingrediente ativo piraclostrobina, com valores médios de 72 e $43 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os tempos de exposição de 8 e 16 horas respectivamente.

Os valores para a mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil apontam que a concentração de inibição foi similar para os tempos de exposição 8 e 16 horas e as leituras de comprimento de onda de 450, 540 e 690 nm (Tabela 23).

No APÊNDICE B estão apresentadas as tabelas dos parâmetros exposição total, número de gerações, taxa de crescimento instantâneo de *B. subtilis* e *B. megaterium* contemplando todas as concentrações utilizadas, bem como os controles nas absorvâncias de 450, 540 e 690 nm (Tabelas 24 a 41).

Tabela 21 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro exposição total para *Bacillus* em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	8	Hormesis	0,989	265	245	285
		16	Logístico	0,876	1203	483	1922
	540	8	Hormesis	0,977	267	238	295
		16	sem ajuste				
	690	8	Hormesis	0,986	320	295	345
		16	sem ajuste				
	450	8	Hormesis	0,990	670	636	704
		16	Gompertz	0,768	566	nc	nc
Piraclostrobina	540	8	Hormesis	0,987	818	774	862
		16	Logístico	0,730	>1280	nc	nc
	690	8	Hormesis	0,973	1152	1071	1234
		16	sem ajuste				
	450	8	Hormesis	0,984	270	244	295
		16	Logístico	0,964	421	354	487
Mistura	540	8	Logístico	0,977	279	248	310
		16	Logístico	0,952	432	348	516
	690	8	Logístico	0,960	318	273	363
		16	Logístico	0,901	619	459	778

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil. CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

Tabela 22 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro número de gerações para *Bacillus* em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	8	Hormesis	0,995	216	204	228
		16	Logístico	0,938	73	46	100
		24	Sem ajuste				
	540	8	Hormesis	0,996	203	189	217
		16	Logístico	0,904	81	43	120
		24	Sem ajuste				
	690	8	Hormesis	0,994	231	217	245
		16	Logístico	0,886	64	30	99
		24	Sem ajuste				
Piraclostrobina	450	8	Logístico	0,993	68	64	73
		16	Logístico	0,944	52	36	67
		24	Sem ajuste				
	540	8	Logístico	0,991	81	76	85
		16	Logístico	0,946	36	23	48
		24	Sem ajuste				
	690	8	Hormesis	0,947	68	47	89
		16	Logístico	0,946	40	26	54
		24	Sem ajuste				
Mistura	450	8	Logístico	0,993	126	118	135
		16	Logístico	0,979	132	114	150
		24	Sem ajuste				
	540	8	Logístico	0,993	132	123	141
		16	Logístico	0,973	131	110	153
		24	Sem ajuste				
	690	8	Logístico	0,991	134	124	145
		16	Logístico	0,976	132	110	154
		24	Sem ajuste				

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

Tabela 23 – Valores de Concentração de inibição (CI) e limite de confiança superior e inferior para o parâmetro taxa de crescimento instantânea para *Bacillus* em meio de cultura LB contaminado com Fipronil, Piraclostrobina e Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil.

Ingrediente ativo	CO (nm)	Tempo (h)	Modelo	R ²	CI (µg mL ⁻¹)	Lo. Conf	Up. Conf
Fipronil	450	8	Logístico	0,991	216	202	230
		16	Logístico	0,982	173	150	196
		24	Logístico	0,978	214	183	246
	540	8	Logístico	0,991	206	192	220
		16	Logístico	0,977	175	149	202
		24	Logístico	0,975	240	202	277
	690	8	Logístico	0,991	231	216	245
		16	Logístico	0,973	179	149	208
		24	Hormesis	0,987	292	193	392
Piraclostrobina	450	8	Logístico	0,985	68	63	74
		16	Logístico	0,973	72	63	80
		24	Logístico	0,978	92	83	100
	540	8	Logístico	0,981	81	75	86
		16	Logístico	0,982	81	74	89
		24	Logístico	0,979	103	93	114
	690	8	Logístico	0,978	93	85	101
		16	Logístico	0,986	88	79	96
		24	Logístico	0,980	126	114	138
Mistura	450	8	Logístico	0,985	126	115	137
		16	Logístico	0,990	129	118	139
		24	Logístico	0,985	126	114	137
	540	8	Logístico	0,991	133	124	143
		16	Logístico	0,989	134	123	146
		24	Logístico	0,987	134	122	145
	690	8	Logístico	0,985	132	121	143
		16	Logístico	0,984	132	119	145
		24	Logístico	0,983	132	120	144

Mistura - piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil CO – Comprimento de onda. Lo. Conf – Limite de confiança inferior. Up. Conf – Limite de confiança superior.

4.4 DISCUSSÃO

Observamos que a curva de crescimento das espécies *B. subtilis* e *B. megaterium* foram significativamente afetadas pela presença dos agrotóxicos. O período de 15 horas foi o tempo máximo que as RPCPs *B. megaterium* e *B. subtilis* puderam suportar o crescimento em meio de cultura LB contaminado.

Os testes realizados apresentaram perfil que reflete as quatro fases do crescimento bacteriano: fase lag, log, estacionária e declínio comprovando que pode ser combinado com os estados fisiológicos dos sistemas microbianos (TRUSHIN, 2003).

Durante as primeiras 8 horas de incubação as espécies *B. megaterium* e *B. subtilis* encontravam-se na fase lag da curva de crescimento. Esta fase corresponde ao período inicial de ajuste ao novo ambiente em que o número de células sofre pequenas variações devido ao fato de que as bactérias não se reproduzem imediatamente após o contato com o meio.

Após 8 horas de adaptação da fase lag até 15 horas de exposição as espécies *B. megaterium* e *B. subtilis* apresentaram um crescimento exponencial, período em que as células iniciam seu processo de divisão celular intenso por fissão binária atingindo um tempo de geração constante e corresponde ao período de maior atividade metabólica das células. O gênero *Bacillus* apresentou redução na fase log nos testes (Figura 3). Logo, a provável redução do crescimento deste gênero pode ser devido a exposição dos ingredientes ativos.

A queda brusca na curva de crescimento a partir de 24 horas de exposição é justificada pelo esgotamento dos nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano. Nesse período o número de células mortas excede o número de células novas. Notou-se nos testes que todos os ingredientes ativos apresentam toxicidade para o gênero *Bacillus* nos parâmetros avaliados exposição total, número de gerações e taxa de crescimento instantânea nos ingredientes ativos testados os valores das concentrações de inibição a partir do tempo de exposição de 8 horas. A piraclostrobina seguida da mistura piraclostrobina + tiofanato metílico + fipronil apresentaram as menores concentrações de inibição seguido do fipronil.

Para os parâmetros número de gerações e taxa de crescimento instantânea é possível observar nas diferentes faixas espectrais dos comprimentos de onda 450, 540 e 690 nm a mesma concentração de inibição dos ingredientes ativos, mostrando que não existe diferença nas

leituras entre os comprimentos de onda e sim da concentração de inibição entre os ingredientes ativos.

Muitas espécies são utilizadas como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos, a *E. coli* tem sido utilizada como organismo teste a nível de bactéria pela facilidade das diversas características que apresenta, porém expressa aspectos parciais da qualidade do solo por ser uma enterobactéria e não ocorrer naturalmente no solo. As RPCPs *B. megaterium* e *B. subtilis* utilizadas nos testes estão envolvidas nos serviços ecossistêmicos e podem detectar informações mais realista dos efeitos dos agrotóxicos nos solos e construir uma base de informações para atender o banco de dados na ecotoxicologia terrestre.

A utilização do gênero *Bacillus* na agricultura além da importância ecológica da RPCPs, os ensaios demonstraram resposta de sensibilidade na concentração de inibição promissora para a indicação de organismo-teste ecotoxicológico. Outras características que também devem ser destacadas de *B. megaterium* e *B. subtilis* são: amplamente distribuídas em todo mundo, sendo o solo o seu principal habitat, facilidade de cultivo e adaptação às condições de laboratório, fisiologia, genética e comportamento bem conhecidos, uniformidade e estabilidade genética nas populações, representatividade nos serviços ecossistêmicos e importância comercial.

4.5 CONCLUSÃO

Este estudo demonstra a viabilidade do uso do gênero *Bacillus* (*B. megaterium* + *B. subtilis*) como micro-organismo teste para pesquisas ecotoxicológicas. Seu perfil enquadra-se como uma RPCPs abundante no solo, fácil cultivo no laboratório e de alta importância econômica. Além disso, demonstra excelente padrão de resposta quando exposto aos agrotóxicos.

A busca de novas espécies com representação local e de novos testes que visem processos ecológicos ainda não contemplados nos atuais protocolos é algo que, sem dúvida, contribuirá para o aumento da relevância da mensuração dos impactos ambientais dos agrotóxicos de um modo geral. É necessário, no entanto, um longo trabalho de padronização e validação das novas espécies e testes, além, de uma ponderação entre custo e eficiência de resultados gerados por novos protocolos.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Considerando as condições aplicadas e apresentadas, as RPCPs, *A. brasilense* e as espécies *B. megaterium* e *B. subtilis* são promissoras para serem exploradas para testes de avaliação de agrotóxicos e apoiar sua padronização e uso em protocolos regulatórios.

O gênero *Bacillus* foi mais sensível à presença de agrotóxicos do método in vivo, entendido como um protocolo a nível de low tier.

Métodos de avaliação em níveis complexidade para completar os resultados podem ser desenvolvidos. A utilização de solo artificial tropical e de solo natural como substrato teste utilizando as populações de RPCPs da espécie *Azospirillum brasilense* e do gênero *Bacillus* (*B. megaterium* + *B. subtilis*), como organismos-teste são promissores para uma avaliação intermediária (intermediate tier) entre os protocolos em laboratório e os experimentos que simulam condições de semi- campo (higher tier) do tipo *Terrestrial Model Ecosystems* (TMEs) para avaliações mais complexas.

REFERÊNCIAS

- BERNARDINO, M. M. et al. Ecotoxicity of imidacloprid to soil invertebrates in two tropical soils with contrasting texture. **Environmental Science and Pollution Research**, v.28, n.22, p.27655-27665, 2021.
- CHAGAS JUNIOR, A. F. et al. *Bacillus* sp. como promotor de crescimento em soja. **Revista Ciênicas Agrárias**, v.44, p. 170-179. 2021.
- HASHEM, A.; TABASSUM, B.; FATHI ABD ALLAH, E. *Bacillus subtilis*: A plant-growth promoting rhizobacterium that also impacts biotic stress. **J Biol Sci.** 26(6): p.1291-1297. 2019.
- KARPOUZAS, D. G. et al. “LOVE TO HATE” pesticides: felicity or curse for the soil microbial community? An FP7 IAPP Marie Curie project aiming to establish tools for the assessment of the mechanisms controlling the interactions of pesticides with soil microorganisms. **Environmental Science and Pollution Research International**, v.23, p.18947–18951. 2016.
- KHAN, N. et al. Insights into the interactions among roots, rhizosphere, and rhizobacteria for improving plant growth and tolerance to abiotic stresses: A review. *Cells*. v.10. 2021.
- LEONCIO, M. R. & BOTELHO, G. R. Isolation and characterization of plant growth promoting bacteria isolated from garlic (*Allium sativum*). **Scentia Agraria** v.18, p.95-106, 2017.
- MUNDI, W.; GOSAL, S. K.; KAUR, J. Effect of pesticides on growth kinetics and plant growth promoting activities of biofertilizer. **The Pharma Innovation Journal**, v.9, n.5, p.442-446. 2020.
- ROMDHANE, S. et al. Ecotoxicological impact of the bioherbicide Leptospermone on the microbial community of two arable soils. **Front Microbiol**, v.7. 2016.
- SCHÄFER, R.B. et al. Future pesticide risk assessment: narrowing the gap between intention and reality. **Environmental Sciences Europe**, v.31. 2019.
- TRUSHIN, M. V. Studies on distant regulation of bacterial growth and light emission. **Microbiology**, v.149, n.2, p.363-368. 2003.
- VISCHETTI, C. et al. Sub-Lethal Effects of Pesticides on the DNA of Soil Organisms as Early Ecotoxicological Biomarkers. **Front Microbiol.** v.11. 2020.

APÊNDICE B

Tabela 24 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorbância 450 nm.

Dose	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
Piraclostrobina											
0	0.322±0.004	0.597±0.024	0.407±0.009	0.485±0.029	0.614±0.012	0.343±0.092	0.043±0.016	0.000±0.000	0.000±0.000	0.001±0.001	
20	0.290±0.007*	0.636±0.007	0.476±0.003*	0.582±0.008	0.609±0.023	0.176±0.062	0.232±0.017*	0.212±0.029*	0.141±0.018*	0.225±0.035#	
40	0.283±0.007*	0.664±0.013*	0.534±0.009*	0.617±0.011	0.552±0.054	0.093±0.055	0.175±0.026*	0.182±0.031*	0.195±0.037*	0.206±0.033	
80	0.257±0.005*	0.657±0.006*	0.536±0.006*	0.566±0.007	0.592±0.036	0.127±0.074	0.326±0.027*	0.303±0.009*	0.235±0.021*	0.239±0.020#	
160	0.240±0.008*	0.632±0.010	0.582±0.011*	0.639±0.009	0.652±0.022	0.412±0.097	0.347±0.017*	0.329±0.015*	0.233±0.005*	0.225±0.012#	
320	0.112±0.013*	0.552±0.010	0.516±0.016*	0.576±0.010	0.487±0.052	0.189±0.105	0.399±0.009*	0.300±0.020*	0.223±0.022*	0.147±0.019	
640	0.046±0.005*	0.345±0.008*	0.475±0.013*	0.549±0.019	0.583±0.010	0.487±0.058	0.342±0.021*	0.320±0.025*	0.239±0.024*	0.187±0.015	
1280	0.010±0.007*	0.108±0.013*	0.267±0.037*	0.352±0.031	0.370±0.016	0.383±0.024	0.164±0.022*	0.167±0.007*	0.173±0.007*	0.151±0.100	
2560	0.027±0.007*	0.042±0.013*	0.083±0.022*	0.064±0.026*	0.048±0.020*	0.032±0.016*	0.255±0.020*	0.129±0.019*	0.128±0.019*	0.086±0.041	
											continua...
Dose	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
Piraclostrobina											
0	0.007±0.003	0.001±0.001	0.039±0.024	0.010±0.010	0.058±0.036	0.075±0.043	0.056±0.037	0.091±0.038	0.094±0.031	0.151±0.060	
20	0.127±0.029	0.072±0.021	0.009±0.006	0.018±0.008	0.007±0.006	0.014±0.009	0.021±0.010	0.019±0.019	0.024±0.014	0.068±0.039	
40	0.216±0.033#	0.172±0.057	0.086±0.052	0.057±0.048	0.047±0.039	0.061±0.043	0.024±0.024	0.000±0.000	0.032±0.032	0.046±0.046	
80	0.250±0.018#	0.243±0.022#	0.235±0.014#	0.210±0.014#	0.213±0.039*	0.218±0.045*	0.179±0.036*	0.108±0.050	0.151±0.056	0.183±0.054	
160	0.226±0.012#	0.198±0.019#	0.182±0.016	0.172±0.017	0.152±0.026	0.162±0.028	0.157±0.032	0.102±0.011	0.099±0.025	0.084±0.025	
320	0.133±0.022	0.126±0.026	0.119±0.030	0.115±0.031	0.118±0.041	0.134±0.043	0.113±0.035	0.049±0.034	0.035±0.014	0.016±0.011	
640	0.144±0.018	0.086±0.022	0.073±0.022	0.056±0.014	0.066±0.025	0.060±0.030	0.035±0.016	0.035±0.034	0.053±0.048	0.055±0.043	
1280	0.137±0.074	0.142±0.014	0.125±0.022	0.172±0.043	0.164±0.021	0.148±0.019	0.146±0.015	0.231±0.037*	0.143±0.028	0.127±0.049	
2560	0.056±0.023	0.132±0.045	0.071±0.037	0.098±0.046	0.108±0.046	0.115±0.046	0.137±0.047	0.259±0.027*	0.177±0.045	0.206±0.072	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 25 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorbância 690 nm.

Dose	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
Piraclostrobina											
0	0.234±0.002	0.435±0.012	0.566±0.030	0.280±0.031	0.183±0.089	0.114±0.050	0.021±0.012	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
20	0.211±0.004*	0.458±0.005	0.358±0.018*	0.281±0.036	0.182±0.040	0.218±0.022	0.226±0.028*	0.152±0.037*	0.131±0.033*	0.165±0.037*	
40	0.210±0.004*	0.488±0.013*	0.309±0.040*	0.220±0.026	0.190±0.054	0.239±0.057	0.172±0.051*	0.170±0.056*	0.133±0.050*	0.147±0.050*	
80	0.201±0.003*	0.488±0.005*	0.286±0.015*	0.355±0.018	0.406±0.022	0.442±0.023*	0.324±0.024*	0.325±0.009*	0.288±0.026*	0.307±0.030*	
160	0.214±0.004	0.487±0.006*	0.331±0.014*	0.269±0.028	0.339±0.045	0.478±0.017*	0.403±0.020*	0.372±0.020*	0.286±0.014*	0.295±0.018*	
320	0.152±0.007*	0.472±0.007	0.443±0.039*	0.234±0.029	0.261±0.088	0.477±0.029*	0.443±0.016*	0.375±0.026*	0.293±0.032*	0.273±0.032*	
640	0.106±0.006*	0.388±0.007*	0.453±0.032*	0.218±0.039	0.240±0.088	0.389±0.045*	0.373±0.041*	0.356±0.047*	0.274±0.039*	0.226±0.038*	
1280	0.027±0.011*	0.197±0.015*	0.296±0.015*	0.411±0.033*	0.250±0.047	0.251±0.035	0.191±0.023*	0.211±0.017*	0.195±0.019*	0.156±0.019*	
2560	0.032±0.004*	0.063±0.011*	0.096±0.016*	0.190±0.015	0.219±0.026	0.199±0.033	0.192±0.041*	0.124±0.028*	0.125±0.030*	0.110±0.034	
											continua...

Dose	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
Piraclostrobina											
0	0.019±0.018	0.005±0.003	0.027±0.015	0.048±0.048	0.046±0.030	0.065±0.036	0.077±0.018	0.044±0.028	0.076±0.033	0.128±0.060	
20	0.088±0.030	0.057±0.023	0.025±0.022	0.019±0.016	0.013±0.013	0.021±0.015	0.025±0.040	0.021±0.011	0.017±0.009	0.056±0.028	
40	0.156±0.051*	0.125±0.062	0.120±0.063	0.075±0.047	0.044±0.034	0.057±0.041	0.061±0.044	0.000±0.000	0.039±0.036	0.053±0.048	
80	0.325±0.028*	0.322±0.030#	0.318±0.032	0.262±0.027*	0.255±0.044*	0.266±0.051*	0.268±0.056*	0.145±0.064	0.198±0.062	0.237±0.061	
160	0.308±0.020*	0.302±0.020#	0.290±0.018*	0.270±0.020*	0.269±0.033*	0.282±0.035*	0.288±0.040*	0.212±0.019*	0.200±0.028	0.182±0.032	
320	0.266±0.036*	0.268±0.040#	0.263±0.043*	0.233±0.031*	0.218±0.045*	0.231±0.045*	0.237±0.043*	0.101±0.044	0.075±0.023	0.044±0.027	
640	0.189±0.039*	0.169±0.036	0.154±0.028	0.154±0.026	0.123±0.024	0.116±0.030	0.117±0.025	0.049±0.046	0.064±0.047	0.065±0.045	
1280	0.136±0.020	0.126±0.024	0.098±0.021	0.130±0.038	0.131±0.023	0.114±0.017	0.171±0.048	0.182±0.044	0.163±0.027	0.140±0.046	
2560	0.077±0.030	0.115±0.038	0.110±0.040	0.101±0.038	0.110±0.038	0.117±0.040	0.119±0.040	0.286±0.019*	0.186±0.044*	0.229±0.068	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Logo da unha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$), ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 26 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorbância 450 nm.

Dose	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
Piraclostrobina											
0	0.322±0.004	0.536±0.024	0.327±0.015	0.114±0.009	0.011±0.006	0.036±0.012	0.008±0.003	0.066±0.006	0.040±0.010	0.000±0.000	
20	0.290±0.007*	0.532±0.010	0.197±0.026	0.124±0.037	0.029±0.010	0.050±0.020	0.035±0.013*	0.083±0.002	0.056±0.010	0.013±0.006*	
40	0.283±0.007*	0.432±0.018	0.212±0.024	0.111±0.021	0.034±0.005	0.042±0.008	0.042±0.007*	0.084±0.010	0.024±0.005	0.007±0.006	
80	0.257±0.005*	0.221±0.009*	0.135±0.016	0.216±0.015*	0.088±0.024*	0.017±0.006	0.017±0.003	0.040±0.002	0.018±0.002	0.002±0.002	
160	0.240±0.008*	0.000±0.000*	0.055±0.015	0.141±0.037	0.061±0.028	0.078±0.032	0.005±0.002	0.027±0.005	0.018±0.005	0.001±0.001	
320	0.112±0.013*	0.000±0.000*	0.021±0.007#	0.011±0.003*	0.085±0.019*	0.106±0.015*	0.007±0.002	0.016±0.002	0.019±0.002	0.006±0.001	
640	0.046±0.005*	0.000±0.000*	0.001±0.001#	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.153±0.005*	0.018±0.006	0.016±0.004	0.003±0.001	0.002±0.001	
1280	0.010±0.007*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.002±0.002	0.063±0.021	0.000±0.000	0.010±0.005	0.004±0.002	0.001±0.001	
2560	0.027±0.007*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.004±0.002	0.016±0.006	0.021±0.007	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.005±0.003	

continua...

Dose	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
Piraclostrobina											
0	0.103±0.011	0.035±0.003	0.008±0.002	0.000±0.000	0.057±0.015	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.057±0.009	0.000±0.000	
20	0.012±0.005*	0.008±0.003*	0.000±0.000*	0.008±0.006	0.059±0.016	0.003±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.049±0.014	0.003±0.002	
40	0.012±0.003*	0.003±0.001*	0.000±0.000*	0.002±0.002	0.010±0.005	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.029±0.014	0.004±0.003	
80	0.004±0.002*	0.008±0.002*	0.005±0.002	0.003±0.003	0.024±0.008	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.018±0.009	0.011±0.004	
160	0.002±0.001*	0.010±0.001*	0.006±0.001	0.011±0.004	0.017±0.006	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.031±0.007	0.009±0.004	
320	0.005±0.001*	0.011±0.001*	0.006±0.002	0.005±0.003	0.002±0.001	0.003±0.001	0.001±0.000	0.000±0.000	0.014±0.006	0.007±0.003	
640	0.003±0.001*	0.009±0.002*	0.005±0.002	0.012±0.005	0.000±0.000#	0.001±0.000	0.002±0.001	0.002±0.002	0.007±0.004#	0.003±0.001#	
1280	0.001±0.001*	0.017±0.002*	0.001±0.000*	0.035±0.012*	0.000±0.000#	0.006±0.002	0.004±0.002*	0.000±0.000	0.027±0.004	0.000±0.000	
2560	0.002±0.001*	0.016±0.004*	0.002±0.001*	0.001±0.000	0.000±0.000#	0.000±0.000	0.000±0.000	0.013±0.004*	0.003±0.001#	0.002±0.002#	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 27 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.234±0.002	0.560±0.026	0.373±0.019	0.104±0.015	0.018±0.009	0.042±0.014	0.022±0.007	0.091±0.008	0.052±0.012	0.000±0.000
20	0.211±0.004*	0.594±0.012	0.200±0.035*	0.132±0.044	0.046±0.015	0.071±0.033	0.051±0.020	0.095±0.006	0.068±0.010	0.023±0.012
40	0.210±0.004*	0.533±0.021	0.228±0.031*	0.100±0.030	0.045±0.007	0.050±0.013	0.060±0.010	0.103±0.012	0.032±0.007	0.010±0.007
80	0.201±0.003*	0.358±0.012*	0.146±0.020*	0.274±0.019*	0.133±0.034*	0.014±0.006	0.022±0.004	0.056±0.005	0.027±0.004	0.004±0.002
160	0.214±0.004	0.072±0.009*	0.097±0.032*	0.183±0.047	0.144±0.054*	0.107±0.039	0.009±0.002	0.038±0.008	0.025±0.003	0.001±0.001
320	0.152±0.007*	0.000±0.000*	0.045±0.012*	0.014±0.004	0.131±0.023*	0.181±0.026*	0.032±0.011	0.023±0.004	0.025±0.003	0.009±0.001
640	0.106±0.006*	0.000±0.000*	0.011±0.010*	0.027±0.027	0.006±0.004	0.200±0.041*	0.041±0.012	0.024±0.007	0.006±0.004	0.006±0.002
1280	0.027±0.011*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.019±0.005	0.004±0.004	0.096±0.031	0.025±0.018	0.036±0.017	0.002±0.002#	0.005±0.002
2560	0.032±0.004*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.009±0.004	0.015±0.007	0.036±0.010	0.000±0.000#	0.004±0.003#	0.009±0.004

continua...

Dose Piraclostrobina	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	
0	0.112±0.019	0.038±0.004	0.006±0.003	0.009±0.009	0.078±0.016	0.001±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.076±0.012	
20	0.012±0.006	0.005±0.003#	0.001±0.001	0.014±0.011	0.073±0.021	0.004±0.004	0.002±0.002	0.000±0.000	0.054±0.019	
40	0.019±0.005	0.001±0.001#	0.000±0.000	0.003±0.003	0.024±0.011	0.001±0.001	0.000±0.000	0.003±0.003	0.039±0.019	
80	0.014±0.010	0.002±0.002#	0.003±0.002	0.005±0.005	0.039±0.011	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.020±0.010	
160	0.002±0.002#	0.006±0.002	0.005±0.001	0.007±0.004	0.039±0.009	0.001±0.000	0.009±0.003	0.000±0.000	0.031±0.007	
320	0.011±0.002	0.010±0.002	0.005±0.002	0.004±0.002	0.016±0.007	0.000±0.000	0.009±0.002	0.000±0.000	0.010±0.003#	
640	0.010±0.003	0.009±0.003	0.006±0.002	0.024±0.012	0.001±0.001#	0.001±0.001	0.011±0.004	0.000±0.000	0.016±0.008	
1280	0.010±0.002	0.016±0.004	0.003±0.002	0.030±0.008	0.019±0.012	0.009±0.003*	0.017±0.007*	0.000±0.000	0.039±0.005	
2560	0.000±0.000#	0.047±0.012	0.007±0.002	0.005±0.002	0.000±0.000#	0.000±0.000	0.001±0.001	0.010±0.003*	0.009±0.004#	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 28 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 450 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h	
0	0.322±0.004	0.773±0.035	1.202±0.042	1.366±0.042	1.372±0.053	1.422±0.039	1.436±0.035	1.509±0.020	1.589±0.027	1.524±0.023	
20	0.290±0.007*	0.767±0.015	1.052±0.033*	1.230±0.051*	1.273±0.055	1.345±0.032	1.419±0.020	1.508±0.030	1.589±0.028	1.588±0.018*	
40	0.283±0.007*	0.623±0.026*	0.929±0.049*	1.043±0.017*	1.105±0.021*	1.171±0.023	1.236±0.021*	1.386±0.023*	1.441±0.017*	1.460±0.017*	
80	0.257±0.005*	0.318±0.013*	0.535±0.006*	0.825±0.035*	0.952±0.021*	0.975±0.014	1.009±0.009*	1.063±0.008*	1.092±0.006*	1.096±0.005*	
160	0.240±0.008*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.103±0.043*	0.272±0.075*	0.453±0.018	0.458±0.020*	0.491±0.017*	0.513±0.011*	0.512±0.010*	
320	0.112±0.013*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.001±0.001*	0.006±0.004*	0.035±0.005*	0.045±0.006*	
640	0.046±0.005*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.010±0.007*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.027±0.007*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
continua...											
Dose Piraclostrobina	Tempo										
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h	
0	1.655±0.021	1.689±0.012	1.694±0.015	1.689±0.037	1.771±0.032	1.764±0.040	1.742±0.045	1.604±0.054	1.687±0.045	1.630±0.074	
20	1.604±0.029	1.630±0.018*	1.585±0.013*	1.544±0.025*	1.618±0.014*	1.608±0.024*	1.594±0.030*	1.476±0.029*	1.556±0.032*	1.530±0.053	
40	1.482±0.022*	1.437±0.026*	1.425±0.028*	1.367±0.049*	1.335±0.024*	1.349±0.040*	1.327±0.045*	1.217±0.031*	1.255±0.040*	1.250±0.054*	
80	1.096±0.005*	1.106±0.009*	1.124±0.014*	1.139±0.014*	1.168±0.014*	1.137±0.025*	1.127±0.026*	1.049±0.056*	1.069±0.044*	1.089±0.046*	
160	0.511±0.010*	0.526±0.010*	0.534±0.011*	0.550±0.013	0.568±0.013*	0.572±0.013*	0.571±0.013*	0.489±0.028*	0.533±0.025*	0.566±0.025*	
320	0.052±0.006*	0.070±0.007*	0.079±0.008*	0.075±0.021	0.100±0.012*	0.106±0.013*	0.108±0.012*	0.017±0.010*	0.023±0.009*	0.029±0.012*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). $\pm$ erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 29 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Piraclostrobina, absorvância 690 nm.

Dose Piraclostrobina	Tempo											
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h		
0	0.234±0.002	0.808±0.038	1.297±0.051	1.446±0.054	1.447±0.066	1.502±0.049	1.533±0.043	1.665±0.036	1.740±0.037	1.652±0.033		
20	0.211±0.004*	0.857±0.017	1.146±0.045*	1.324±0.069	1.390±0.078	1.493±0.041	1.567±0.039	1.705±0.041	1.802±0.032	1.816±0.034*		
40	0.210±0.004*	0.769±0.031	1.098±0.064*	1.243±0.074	1.308±0.069	1.380±0.064	1.466±0.058	1.614±0.045	1.661±0.045	1.665±0.041		
80	0.201±0.003*	0.516±0.017*	0.726±0.029*	1.121±0.044*	1.313±0.032	1.331±0.026*	1.363±0.023*	1.443±0.017*	1.483±0.018*	1.476±0.013*		
160	0.2114±0.004	0.104±0.013*	0.223±0.054*	0.488±0.115*	0.684±0.089*	0.839±0.040*	0.853±0.039*	0.907±0.029*	0.941±0.020*	0.935±0.017*		
320	0.152±0.007*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.048±0.026*	0.287±0.013*	0.334±0.010*	0.366±0.013*	0.402046752	0.415±0.014*		
640	0.106±0.006*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
1280	0.027±0.011*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
2560	0.032±0.004*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		

Dose Piraclostrobina	Tempo											
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h		
0	1.814±0.034	1.870±0.032	1.863±0.030	1.822±0.048	1.935±0.047	1.915±0.057	1.884±0.061	1.699±0.060	1.809±0.054	1.742±0.080		
20	1.801±0.034	1.786±0.037	1.724±0.036*	1.634±0.067*	1.740±0.054*	1.712±0.063*	1.676±0.076*	1.527±0.070	1.605±0.079*	1.570±0.085		
40	1.690±0.034*	1.648±0.039*	1.621±0.045*	1.516±0.082*	1.517±0.058*	1.483±0.065*	1.448±0.071*	1.326±0.055*	1.380±0.062*	1.370±0.069*		
80	1.490±0.017*	1.487±0.020*	1.482±0.021*	1.446±0.024*	1.496±0.028*	1.466±0.037*	1.453±0.042*	1.330±0.074*	1.349±0.060*	1.375±0.063*		
160	0.937±0.016*	0.946±0.017*	0.953±0.018*	0.949±0.030*	1.006±0.023*	1.006±0.023*	1.019±0.021*	0.907±0.042*	0.952±0.035*	0.937±0.056*		
320	0.430±0.015*	0.445±0.017*	0.452±0.018*	0.440±0.025*	0.461±0.023*	0.457±0.023*	0.469±0.023*	0.350±0.011*	0.324±0.025*	0.280±0.061*		
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		

continua...

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 30 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.339±0.003	0.667±0.008	0.836±0.010	0.536±0.003	0.313±0.050	0.260±0.043	0.271±0.040	0.256±0.034	0.195±0.044	0.122±0.031
20	0.331±0.003	0.675±0.003	0.761±0.010	0.488±0.019	0.251±0.029	0.284±0.053	0.370±0.060	0.336±0.062	0.262±0.066	0.164±0.036
40	0.343±0.002	0.688±0.004	0.732±0.010	0.440±0.004*	0.220±0.016	0.108±0.027	0.204±0.078	0.184±0.085	0.256±0.103	0.296±0.0116
80	0.352±0.005	0.645±0.008	0.592±0.011	0.389±0.013*	0.266±0.034	0.207±0.035	0.343±0.070	0.347±0.074	0.447±0.091	0.335±0.099
160	0.352±0.003	0.555±0.007*	0.478±0.019#	0.355±0.021*	0.323±0.052	0.498±0.060*	0.636±0.050*	0.687±0.057*	0.682±0.061*	0.716±0.054#
320	0.232±0.020	0.228±0.009*	0.609±0.008	0.549±0.012	0.418±0.015	0.386±0.074	0.402±0.138	0.612±0.158*	0.486±0.165	0.583±0.180
640	0.077±0.012	0.071±0.013*	0.423±0.004#	0.327±0.016*	0.441±0.030*	0.426±0.040	0.364±0.064	0.254±0.048	0.259±0.081	0.142±0.037
1280	0.130±0.024	0.104±0.011*	0.471±0.029#	0.390±0.034*	0.515±0.015*	0.443±0.047	0.374±0.051	0.326±0.049	0.288±0.081	0.248±0.080
2560	0.033±0.005#	0.112±0.012*	0.439±0.030#	0.488±0.031	0.550±0.025*	0.453±0.042*	0.397±0.051	0.275±0.046	0.277±0.039	0.214±0.037

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.188±0.039	0.228±0.055	0.236±0.074	0.335±0.084	0.251±0.080	0.262±0.070	0.221±0.071	0.277±0.054	0.306±0.033	0.272±0.036
20	0.218±0.064	0.162±0.046	0.128±0.030	0.166±0.047	0.090±0.038	0.109±0.039	0.115±0.040	0.083±0.036*	0.133±0.043*	0.123±0.045
40	0.231±0.108	0.247±0.121	0.284±0.130	0.142±0.095	0.215±0.094	0.197±0.075	0.142±0.060	0.128±0.053	0.128±0.060*	0.140±0.063
80	0.381±0.103	0.354±0.100	0.266±0.075	0.186±0.073	0.240±0.088	0.187±0.078	0.081±0.056	0.052±0.028*	0.016±0.012*	0.068±0.068*
160	0.602±0.089	0.579±0.088*	0.630±0.067*	0.473±0.106	0.329±0.110	0.232±0.105	0.073±0.057	0.055±0.055*	0.085±0.054*	0.016±0.016*
320	0.475±0.167	0.437±0.141	0.361±0.121	0.287±0.047	0.313±0.060	0.259±0.055	0.226±0.039	0.236±0.034	0.248±0.033	0.206±0.019
640	0.219±0.079	0.167±0.067	0.074±0.024	0.105±0.020	0.148±0.046	0.162±0.061	0.095±0.018	0.105±0.018*	0.108±0.025*	0.102±0.046
1280	0.193±0.069	0.130±0.050	0.072±0.030	0.048±0.014	0.034±0.016	0.042±0.036	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*
2560	0.202±0.047	0.188±0.043	0.153±0.032	0.203±0.020	0.293±0.019	0.289±0.039	0.262±0.030	0.308±0.029	0.345±0.022	0.289±0.040

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 31 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorbância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.244±0.002	0.472±0.009	0.613±0.010	0.425±0.041	0.264±0.046	0.249±0.046	0.216±0.045	0.210±0.049	0.198±0.054	0.168±0.053
20	0.243±0.003	0.494±0.006	0.570±0.010	0.387±0.020	0.243±0.035	0.226±0.052	0.304±0.053	0.273±0.061	0.265±0.054	0.219±0.047
40	0.254±0.003	0.511±0.006	0.563±0.009	0.328±0.013	0.158±0.014	0.104±0.030*	0.217±0.064	0.205±0.077	0.207±0.077	0.196±0.080
80	0.256±0.005	0.491±0.007	0.460±0.015	0.319±0.028	0.206±0.034	0.218±0.069	0.360±0.087	0.362±0.088	0.390±0.082	0.355±0.092
160	0.267±0.005	0.443±0.010	0.363±0.033#	0.343±0.053	0.316±0.071	0.389±0.073	0.497±0.070	0.546±0.070*	0.580±0.059*	0.555±0.077
320	0.209±0.014	0.212±0.013*	0.489±0.014	0.464±0.023	0.382±0.045	0.399±0.087	0.449±0.114	0.494±0.124*	0.464±0.132*	0.487±0.135*
640	0.106±0.012*	0.081±0.012*	0.352±0.006#	0.280±0.013*	0.369±0.029	0.358±0.040	0.361±0.054	0.337±0.061	0.314±0.065	0.288±0.054
1280	0.138±0.034*	0.076±0.014*	0.403±0.026#	0.394±0.034	0.428±0.009*	0.408±0.034	0.390±0.032	0.359±0.043	0.304±0.057	0.255±0.057
2560	0.068±0.020*	0.067±0.014*	0.478±0.033	0.408±0.033	0.448±0.034*	0.392±0.043	0.361±0.047	0.307±0.035	0.273±0.036	0.231±0.033

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.211±0.051	0.228±0.055	0.267±0.064	0.244±0.081	0.202±0.078	0.197±0.067	0.192±0.063	0.171±0.060	0.203±0.050	0.206±0.042
20	0.211±0.049	0.154±0.039	0.159±0.042	0.125±0.047	0.091±0.039	0.102±0.039	0.109±0.039	0.087±0.041	0.124±0.042	0.119±0.045
40	0.184±0.083	0.213±0.096	0.203±0.093	0.153±0.080	0.136±0.069	0.104±0.051	0.092±0.044	0.073±0.036	0.073±0.041	0.047±0.029
80	0.333±0.096	0.321±0.096	0.293±0.092	0.187±0.084	0.165±0.074	0.129±0.054	0.0970.048	0.079±0.037	0.080±0.028	0.060±0.028
160	0.529±0.081*	0.522±0.081*	0.499±0.087*	0.345±0.112	0.285±0.107	0.227±0.106	0.180±0.09	0.135±0.074	0.118±0.072	0.076±0.048
320	0.462±0.136	0.432±0.116	0.419±0.103*	0.334±0.067	0.313±0.058	0.292±0.063	0.306±0.052	0.296±0.049	0.306±0.049	0.290±0.049
640	0.289±0.059	0.246±0.049	0.207±0.040*	0.216±0.041	0.212±0.034	0.232±0.042	0.243±0.052	0.248±0.052	0.258±0.057	0.282±0.083
1280	0.243±0.054	0.191±0.039	0.164±0.040	0.089±0.015	0.085±0.016	0.083±0.035	0.074±0.048*	0.057±0.039	0.052±0.044	0.024±0.014*
2560	0.197±0.039	0.191±0.039	0.198±0.039	0.278±0.033	0.317±0.021	0.344±0.034*	0.359±0.039*	0.399±0.049*	0.391±0.032*	0.321±0.033

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 32 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.339±0.003	0.547±0.011	0.329±0.017	0.002±0.002	0.015±0.007	0.062±0.022	0.005±0.003	0.065±0.005	0.018±0.003	0.022±0.003
20	0.331±0.003	0.567±0.005	0.240±0.003	0.037±0.015	0.018±0.009	0.073±0.027	0.011±0.004	0.045±0.006*	0.020±0.005	0.011±0.002
40	0.343±0.002	0.530±0.009	0.205±0.010	0.026±0.008	0.003±0.002	0.032±0.002	0.000±0.000	0.041±0.003*	0.005±0.003	0.021±0.005
80	0.352±0.005	0.470±0.006*	0.162±0.009	0.038±0.009	0.009±0.004	0.020±0.008	0.004±0.003	0.035±0.002*	0.015±0.004	0.024±0.006
160	0.352±0.003	0.373±0.005*	0.075±0.009#	0.063±0.018	0.035±0.015	0.012±0.006	0.005±0.003	0.030±0.003*	0.026±0.003	0.020±0.003
320	0.232±0.020	0.171±0.006*	0.139±0.014	0.076±0.008#	0.026±0.011	0.015±0.006	0.000±0.000	0.008±0.004*	0.006±0.004	0.008±0.002
640	0.077±0.012	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.071±0.021	0.145±0.021#	0.042±0.012	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.002±0.001*	0.003±0.001#
1280	0.130±0.024	0.000±0.000*	0.002±0.002#	0.082±0.018#	0.116±0.009#	0.006±0.005*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.012±0.002	0.010±0.001
2560	0.033±0.005#	0.000±0.000*	0.026±0.009#	0.025±0.009	0.006±0.003	0.009±0.004	0.003±0.002	0.008±0.003*	0.016±0.007	0.017±0.004

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.056±0.004	0.062±0.025	0.028±0.002	0.030±0.004	0.000±0.000	0.012±0.004	0.002±0.002	0.003±0.003	0.012±0.005	0.001±0.001
20	0.032±0.003*	0.028±0.009	0.031±0.009	0.014±0.005	0.001±0.001	0.016±0.007	0.003±0.002	0.000±0.000	0.027±0.009*	0.008±0.004*
40	0.030±0.002*	0.048±0.011	0.027±0.003	0.049±0.018	0.034±0.016*	0.006±0.004	0.005±0.002	0.011±0.003*	0.016±0.005	0.003±0.002
80	0.030±0.004*	0.021±0.005	0.021±0.007	0.027±0.014	0.017±0.004	0.003±0.001	0.003±0.002	0.007±0.002	0.013±0.004	0.004±0.002
160	0.021±0.006*	0.036±0.006	0.024±0.003	0.025±0.008	0.001±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.001±0.001	0.001±0.001	0.000±0.000
320	0.007±0.001*	0.011±0.004*	0.011±0.002	0.021±0.006	0.007±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	0.003±0.001	0.001±0.001	0.000±0.000
640	0.003±0.001*	0.015±0.005*	0.007±0.000	0.023±0.006	0.009±0.001	0.003±0.001	0.000±0.000	0.010±0.000	0.002±0.001	0.000±0.000
1280	0.000±0.000*	0.017±0.002*	0.004±0.001#	0.001±0.001	0.004±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	0.002±0.001	0.001±0.001	0.000±0.000
2560	0.004±0.002*	0.017±0.005*	0.012±0.002	0.000±0.000	0.003±0.002	0.004±0.001	0.000±0.000	0.010±0.001*	0.001±0.001	0.000±0.000

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 33 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.244±0.002	0.581±0.015	0.363±0.020	0.000±0.000	0.019±0.011	0.093±0.037	0.014±0.012	0.097±0.007	0.008±0.004	0.026±0.004
20	0.243±0.003	0.602±0.006	0.269±0.009*	0.039±0.019	0.025±0.017	0.120±0.037	0.012±0.012	0.065±0.007	0.014±0.006	0.020±0.009
40	0.254±0.003	0.575±0.012	0.218±0.015*	0.006±0.005	0.000±0.000	0.047±0.004	0.013±0.013	0.056±0.005	0.010±0.007	0.028±0.006
80	0.256±0.005	0.511±0.008*	0.174±0.015*	0.021±0.008	0.009±0.005	0.033±0.009	0.015±0.012	0.052±0.004	0.026±0.013	0.032±0.008
160	0.267±0.005	0.417±0.006*	0.057±0.015*	0.076±0.020*	0.008±0.005	0.026±0.009	0.008±0.005	0.047±0.005	0.028±0.003	0.025±0.006
320	0.209±0.014	0.191±0.005*	0.167±0.018*	0.093±0.009*	0.010±0.006	0.032±0.010	0.008±0.005	0.021±0.006#	0.015±0.006	0.018±0.005
640	0.106±0.012*	0.004±0.004*	0.013±0.013*	0.119±0.024*	0.180±0.020*	0.062±0.009	0.006±0.004	0.005±0.001#	0.006±0.003	0.008±0.001#
1280	0.138±0.034*	0.000±0.000*	0.007±0.006*	0.134±0.019*	0.085±0.019*	0.018±0.002*	0.009±0.002	0.011±0.002#	0.009±0.002	0.010±0.002
2560	0.068±0.020*	0.000±0.000*	0.023±0.012*	0.014±0.006	0.026±0.007	0.014±0.007*	0.010±0.003	0.008±0.003#	0.006±0.002	0.007±0.002#

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.068±0.008	0.060±0.027	0.030±0.005	0.007±0.004	0.001±0.001	0.003±0.003	0.006±0.004	0.008±0.007	0.014±0.007	1.003±0.003
20	0.042±0.007	0.032±0.014	0.025±0.008	0.002±0.002	0.000±0.000	0.014±0.008	0.005±0.003	0.006±0.005	0.038±0.016	1.002±0.001
40	0.034±0.008	0.068±0.016	0.024±0.003	0.023±0.011	0.006±0.004	0.000±0.000	0.001±0.001	0.002±0.002	0.016±0.007	1.001±0.001
80	0.038±0.005	0.036±0.010	0.018±0.007	0.017±0.012	0.016±0.015	0.006±0.004	0.000±0.000	0.004±0.003	0.014±0.005	1.002±0.001
160	0.027±0.008	0.043±0.009	0.020±0.005	0.010±0.005	0.002±0.005	0.003±0.003	0.000±0.000	0.001±0.001	0.002±0.001	1.001±0.001
320	0.009±0.003	0.009±0.004	0.006±0.002	0.006±0.003	0.005±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.001±0.001	0.001±0.001	1.000±0.000
640	0.002±0.001#	0.009±0.004	0.001±0.001#	0.008±0.004	0.004±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	0.001±0.001	0.002±0.002	1.000±0.000
1280	0.000±0.000#	0.007±0.002	0.000±0.000#	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	1.000±0.000
2560	0.000±0.000#	0.005±0.002	0.005±0.003	0.001±0.001	0.003±0.002	0.001±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.004±0.003	1.000±0.000

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Logo da autora, 2022.

significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 34 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.339±0.003	0.790±0.016	1.260±0.018	1.257±0.051	1.262±0.017	1.394±0.035	1.438±0.053	1.532±0.051	1.553±0.053	1.584±0.051
20	0.331±0.003	0.818±0.007	1.173±0.008	1.214±0.034	1.249±0.034	1.387±0.048	1.394±0.059	1.459±0.056	1.488±0.056	1.513±0.053
40	0.343±0.002	0.764±0.014	1.046±0.009*	1.095±0.011	1.105±0.006*	1.160±0.005	1.146±0.008	1.200±0.008	1.206±0.009	1.233±0.012
80	0.352±0.005	0.678±0.009	0.911±0.011*	0.966±0.021	1.002±0.024*	1.012±0.018	1.020±0.010	1.072±0.010	1.105±0.008	1.141±0.018
160	0.352±0.003	0.538±0.008*	0.651±0.018*	0.725±0.017	0.761±0.026*	0.779±0.026	0.803±0.042	0.810±0.032	0.847±0.030	0.870±0.032
320	0.232±0.020	0.246±0.008*	0.446±0.022*	0.562±0.028	0.616±0.024*	0.636±0.016	0.623±0.020	0.644±0.010	0.661±0.017	0.657±0.026
640	0.077±0.012	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.058±0.025#	0.281±0.020*	0.340±0.023#	0.305±0.022#	0.293±0.020#	0.290±0.019#	0.299±0.020#
1280	0.130±0.024	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.004±0.004#	0.081±0.010*	0.073±0.004#	0.073±0.006#	0.066±0.007#	0.084±0.008#	0.096±0.008#
2560	0.033±0.005#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.00#

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	1.658±0.044	1.763±0.011	0.041±0.003	0.051±0.009	1.825±0.021	1.836±0.019	1.839±0.007	1.836±0.017	0.871±0.018	1.764±0.054
20	1.565±0.049	1.606±0.040*	0.036±0.004	0.019±0.008	1.644±0.048	1.648±0.068	1.647±0.075	1.640±0.076	0.806±0.041	1.677±0.079
40	1.266±0.011*	1.359±0.023*	0.039±0.004	0.071±0.026	1.512±0.052	1.519±0.063	1.523±0.068	1.539±0.070	0.749±0.035	1.547±0.068
80	1.189±0.021*	1.226±0.021*	0.030±0.010	0.071±0.036	1.379±0.065	1.384±0.075	1.381±0.080	1.391±0.081	0.677±0.040	1.402±0.077
160	0.903±0.032*	0.990±0.037*	0.035±0.004	0.027±0.009	1.031±0.028	1.011±0.035	0.988±0.036	1.023±0.050	0.487±0.023	0.984±0.032
320	0.667±0.027*	0.682±0.033*	0.015±0.003	0.031±0.009	0.736±0.044#	0.727±0.045#	0.717±0.045#	0.719±0.045#	0.344±0.021	0.687±0.037
640	0.304±0.020*	0.329±0.016*	0.010±0.001	0.040±0.007	0.395±0.019#	0.397±0.018#	0.388±0.018#	0.402±0.019#	0.192±0.011#	0.377±0.034#
1280	0.069±0.013*	0.093±0.010*	0.006±0.002#	0.005±0.004	0.095±0.009#	0.077±0.011#	0.050±0.007#	0.052±0.010#	0.015±0.006#	0.006±0.006#
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.017±0.003	0.003±0.003#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000#

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 35 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Fipronil	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	72h
0	0.244±0.002	1.356±0.008	1.526±0.032	1.515±0.032	1.533±0.022	1.595±0.026	1.595±0.029	1.637±0.086	1.640±0.027	1.652±0.026
20	0.243±0.003	1.367±0.003	1.502±0.011	1.509±0.011	1.543±0.024	1.587±0.025	1.590±0.028	1.619±0.085	1.625±0.026	1.634±0.024
40	0.254±0.003	1.352±0.007*	1.464±0.011*	1.459±0.011	1.459±0.002*	1.484±0.003*	1.484±0.007*	1.511±0.024*	1.514±0.012*	1.527±0.013*
80	0.256±0.005	1.318±0.004*	1.410±0.020*	1.425±0.020*	1.440±0.016*	1.463±0.021*	1.466±0.021*	1.492±0.058*	1.504±0.017*	1.520±0.017*
160	0.267±0.005	1.266±0.003*	1.318±0.054*	1.369±0.054*	1.381±0.031*	1.385±0.021*	1.382±0.025*	1.407±0.075*	1.421±0.025*	1.433±0.026*
320	0.209±0.014	1.130±0.003*	1.241±0.031*	1.297±0.031*	1.309±0.017*	1.327±0.013*	1.327±0.015*	1.339±0.036*	1.345±0.015*	1.354±0.014*
640	0.106±0.012*	1.003±0.003*	1.000±0.000*	1.041±0.000*	1.141±0.023*	1.174±0.024*	1.177±0.021*	1.180±0.049*	1.183±0.019*	1.188±0.019*
1280	0.138±0.034*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.002±0.002*	1.005±0.005*	1.008±0.006*	1.015±0.013*	1.021±0.007*	1.027±0.007*
2560	0.068±0.020*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*

continua...

Dose Fipronil	Tempo									
	80h	88h	96h	104h	112h	120h	128h	136h	144h	152h
0	0.068±0.008	1.707±0.011	1.720±0.010	1.719±0.008	1.704±0.006	1.699±0.008	1.691±0.012	1.681±0.019	1.683±0.023	1.666±0.031
20	0.042±0.007*	1.665±0.016	1.675±0.013	1.663±0.016	1.650±0.020	1.645±0.028	1.643±0.031	1.636±0.030	1.651±0.034	1.647±0.031
40	0.034±0.008*	1.574±0.012*	1.584±0.013*	1.586±0.015*	1.585±0.018*	1.575±0.021*	1.571±0.023*	1.571±0.023*	1.575±0.026*	1.564±0.024*
80	0.038±0.005*	1.554±0.015*	1.561±0.014*	1.563±0.018*	1.569±0.019*	1.566±0.023*	1.562±0.024*	1.562±0.024*	1.567±0.025*	1.557±0.024*
160	0.027±0.008*	1.469±0.021*	1.478±0.020*	1.479±0.021*	1.475±0.020*	1.466±0.024*	1.452±0.026*	1.440±0.022*	1.437±0.022*	1.417±0.014*
320	0.009±0.003*	1.362±0.017*	1.365±0.018*	1.362±0.022*	1.362±0.024*	1.352±0.026*	1.343±0.027*	1.337±0.025*	1.332±0.024*	1.316±0.021*
640	0.002±0.001*	1.193±0.019*	1.192±0.020*	1.194±0.023*	1.197±0.023*	1.189±0.024*	1.183±0.026*	1.181±0.027*	1.175±0.029*	1.156±0.036*
1280	0.000±0.000*	1.028±0.007*	1.025±0.006*	1.014±0.004*	1.011±0.004*	1.001±0.001*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*
2560	0.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*	1.000±0.000*

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p < 0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 36 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorbância 450 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.304±0.005	0.604±0.009	0.813±0.013	0.662±0.077	0.344±0.056	0.238±0.083	0.045±0.012	0.038±0.017	0.049±0.022	
20	0.294±0.004	0.583±0.009	0.764±0.017	0.452±0.086*	0.261±0.033	0.163±0.049	0.066±0.034	0.011±0.011	0.005±0.005	
40	0.290±0.003	0.618±0.007	0.869±0.022	0.581±0.050	0.491±0.014	0.303±0.060	0.116±0.047	0.010±0.010	0.018±0.012	
80	0.279±0.018	0.582±0.015	0.791±0.012	0.621±0.039	0.322±0.033	0.191±0.037	0.072±0.021	0.019±0.012	0.000±0.000	
160	0.290±0.012	0.490±0.005	0.664±0.018	0.513±0.068	0.270±0.040	0.119±0.026	0.063±0.021	0.003±0.003	0.008±0.008	
320	0.230±0.015	0.195±0.026	0.451±0.054	0.367±0.027*	0.249±0.042	0.122±0.033	0.107±0.034	0.056±0.024	0.042±0.022	
640	0.038±0.012#	0.103±0.011#	0.293±0.009	0.285±0.029*	0.221±0.012	0.178±0.014	0.184±0.016*	0.138±0.011*	0.121±0.009*	
1280	0.004±0.002#	0.080±0.018#	0.208±0.012#	0.261±0.032*	0.216±0.013	0.213±0.018	0.247±0.024*	0.229±0.015*	0.194±0.011*	
2560	0.001±0.001#	0.124±0.021#	0.167±0.014#	0.157±0.021*	0.101±0.018#	0.087±0.022	0.089±0.021	0.100±0.021*	0.107±0.018*	
continua...										

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	0.080±0.036	0.005±0.003	0.017±0.008	0.014±0.010	0.000±0.000	0.010±0.010	0.007±0.007	0.000±0.000	0.000±0.000	
20	0.021±0.015	0.002±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
40	0.090±0.069	0.069±0.027	0.033±0.020	0.050±0.028	0.002±0.002	0.032±0.031	0.029±0.029	0.000±0.000	0.000±0.000	
80	0.021±0.021	0.024±0.018	0.007±0.007	0.021±0.015	0.000±0.000	0.09±0.009	0.001±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	
160	0.017±0.014	0.019±0.012	0.000±0.000	0.008±0.008	0.026±0.017	0.017±0.013	0.021±0.013	0.000±0.000	0.016±0.013	
320	0.025±0.014	0.010±0.007	0.000±0.000	0.000±0.000	0.004±0.004	0.006±0.004	0.006±0.004	0.000±0.000	0.010±0.006	
640	0.082±0.007	0.050±0.017	0.016±0.008	0.070±0.011	0.103±0.016	0.031±0.012	0.028±0.016	0.020±0.011	0.108±0.021*	
1280	0.147±0.014	0.166±0.034*	0.087±0.010*	0.087±0.029	0.099±0.032	0.090±0.025*	0.112±0.038*	0.069±0.038*	0.185±0.070*	
2560	0.152±0.026	0.133±0.031*	0.152±0.027*	0.137±0.044	0.201±0.042#	0.095±0.040*	0.158±0.042*	0.081±0.029*	0.081±0.047	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 37 – Valores do parâmetro exposição total ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorbância 690 nm.

Dose Standak		Tempo								
top	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.220±0.003	0.430±0.007	0.610±0.015	0.487±0.062	0.241±0.052	0.150±0.048	0.045±0.006	0.039±0.19	0.081±0.037	
20	0.215±0.002	0.425±0.007	0.567±0.015	0.353±0.066	0.294±0.078	0.171±0.038	0.104±0.034	0.007±0.007	0.014±0.013	
40	0.213±0.003	0.486±0.010	0.678±0.015	0.446±0.040	0.443±0.026*	0.227±0.026	0.099±0.048	0.012±0.012	0.087±0.074	
80	0.202±0.009	0.465±0.012	0.640±0.014	0.497±0.030	0.295±0.035	0.193±0.040	0.036±0.017	0.000±0.000	0.000±0.000	
160	0.229±0.011	0.408±0.007	0.547±0.016	0.413±0.059	0.190±0.044	0.066±0.015	0.025±0.014	0.000±0.000	0.000±0.000	
320	0.230±0.011	0.216±0.050*	0.345±0.041*	0.305±0.026*	0.185±0.050	0.116±0.028	0.056±0.028	0.038±0.017	0.019±0.012	
640	0.040±0.013*	0.099±0.013*	0.291±0.010*	0.260±0.029*	0.224±0.009	0.143±0.016	0.150±0.028*	0.108±0.008	0.067±0.009	
1280	0.000±0.000*	0.070±0.019*	0.271±0.010*	0.357±0.027	0.284±0.027	0.266±0.021*	0.291±0.025*	0.254±0.020*	0.190±0.012*	
2560	0.000±0.000*	0.183±0.046*	0.229±0.024*	0.296±0.049*	0.187±0.042	0.099±0.045	0.203±0.045*	0.183±0.049*	0.171±0.051*	
continua...										
Dose Standak		Tempo								
top	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	0.072±0.029	0.005±0.005	0.010±0.005	0.003±0.002	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
20	0.011±0.008	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
40	0.075±0.062	0.029±0.014	0.022±0.011	0.011±0.007	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
80	0.000±0.000	0.001±0.001	0.004±0.004	0.004±0.004	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
160	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.0200.009	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.027±0.015	
320	0.004±0.004	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
640	0.023±0.007	0.010±0.007	0.010±0.010	0.044±0.019	0.068±0.023	0.013±0.012	0.028±0.019	0.026±0.020	0.051±0.019	
1280	0.132±0.034	0.149±0.054	0.091±0.034	0.117±0.037	0.103±0.041	0.099±0.040	0.124±0.050	0.128±0.054	0.129±0.055	
2560	0.274±0.066*	0.267±0.079	0.261±0.075	0.303±0.100*	0.356±0.101*	0.195±0.075*	0.339±0.095*	0.232±0.093*	0.229±0.109*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). $\pm$ erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 38 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.304±0.005	0.571±0.010	0.318±0.013	0.048±0.023	0.051±0.016	0.045±0.018	0.020±0.005	0.039±0.010	0.014±0.004	
20	0.294±0.004	0.520±0.018*	0.262±0.012*	0.066±0.010	0.037±0.008	0.023±0.005	0.025±0.008	0.030±0.012	0.027±0.004*	
40	0.290±0.003	0.548±0.009	0.286±0.018	0.101±0.007*	0.024±0.006*	0.000±0.000#	0.011±0.005	0.000±0.000#	0.026±0.002	
80	0.279±0.018	0.405±0.008*	0.205±0.011*	0.056±0.003	0.002±0.002*	0.010±0.004	0.003±0.002*	0.005±0.003	0.025±0.007	
160	0.290±0.012	0.216±0.000*	0.131±0.007*	0.006±0.003*	0.000±0.000*	0.009±0.004	0.015±0.005	0.000±0.000#	0.006±0.002	
320	0.230±0.015	0.000±0.000*	0.041±0.009*	0.001±0.001*	0.000±0.000*	0.015±0.003	0.023±0.003	0.016±0.007	0.006±0.002	
640	0.038±0.012#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.005±0.001	0.024±0.002	0.011±0.004	0.004±0.002	
1280	0.004±0.002#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.001±0.001*	0.000±0.000*	0.002±0.001#	0.013±0.000	0.003±0.001	0.004±0.001	
2560	0.001±0.001#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.001±0.001#	0.006±0.001	0.002±0.001	0.008±0.002	
continua...										

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	0.017±0.003	0.104±0.005	0.023±0.002	0.003±0.001	0.001±0.001	0.003±0.001	0.004±0.002	0.000±0.000	0.137±0.012	
20	0.015±0.006	0.062±0.014	0.009±0.005	0.001±0.001	0.000±0.000	0.004±0.004	0.004±0.002	0.000±0.000	0.082±0.019	
40	0.014±0.005	0.101±0.012	0.016±0.008	0.007±0.002	0.001±0.001	0.014±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.068±0.016	
80	0.027±0.010	0.063±0.014	0.020±0.005	0.013±0.003*	0.021±0.007	0.023±0.006*	0.008±0.002	0.000±0.000	0.081±0.005	
160	0.009±0.004	0.052±0.005	0.023±0.006	0.026±0.003*	0.029±0.002	0.024±0.002*	0.022±0.001*	0.000±0.000	0.032±0.008	
320	0.000±0.000	0.020±0.007	0.001±0.001*	0.027±0.002*	0.040±0.002#	0.023±0.001*	0.011±0.001*	0.000±0.000	0.034±0.009	
640	0.000±0.000#	0.015±0.006	0.005±0.004	0.006±0.004	0.017±0.002	0.017±0.003*	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000#	
1280	0.000±0.000#	0.000±0.000#	0.000±0.000*	0.005±0.003	0.001±0.000	0.011±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000#	
2560	0.010±0.001	0.000±0.000#	0.001±0.000*	0.001±0.001	0.000±0.000	0.001±0.001	0.000±0.000	0.003±0.002*	0.001±0.000#	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 39 – Valores do parâmetro TCI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Standak		Tempo									
		0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	top	0.220±0.003	0.597±0.013	0.365±0.015	0.000±0.000	0.062±0.022	0.060±0.020	0.022±0.007	0.055±0.013	0.010±0.003	
20		0.215±0.002	0.539±0.019*	0.287±0.015*	0.068±0.014	0.054±0.014	0.033±0.008	0.026±0.011	0.058±0.011	0.025±0.004*	
40		0.213±0.003	0.601±0.011	0.287±0.013*	0.108±0.008*	0.053±0.026	0.000±0.000*	0.015±0.007	0.000±0.000*	0.025±0.005*	
80		0.202±0.009	0.429±0.023*	0.236±0.012*	0.058±0.006	0.003±0.003*	0.011±0.003	0.000±0.000#	0.004±0.004	0.020±0.008	
160		0.229±0.011	0.222±0.018*	0.154±0.009*	0.006±0.004	0.000±0.000*	0.008±0.004	0.010±0.004	0.001±0.001	0.001±0.001	
320		0.230±0.011	0.007±0.007*	0.041±0.010*	0.001±0.000	0.000±0.000*	0.014±0.003	0.019±0.002	0.010±0.007	0.001±0.001	
640		0.040±0.013*	0.000±0.000*	0.001±0.001*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.006±0.001	0.027±0.002	0.012±0.005	0.001±0.000	
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.001±0.001*	0.019±0.001	0.005±0.002	0.001±0.001	
2560		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.005±0.002	0.001±0.001	0.003±0.002	
continua...											

Dose Standak		Tempo									
		72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	top	0.018±0.004	0.120±0.014	0.028±0.002	0.005±0.004	0.000±0.000	0.003±0.002	0.001±0.004	0.000±0.000	0.000±0.000	
20		0.017±0.007	0.092±0.021	0.008±0.006	0.000±0.000	0.000±0.000	0.003±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
40		0.011±0.004	0.110±0.014	0.007±0.005	0.007±0.003	0.002±0.002	0.012±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
80		0.020±0.010	0.063±0.017*	0.021±0.006	0.017±0.004	0.015±0.007*	0.027±0.008*	0.004±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	
160		0.007±0.004	0.049±0.014*	0.027±0.007	0.031±0.003*	0.032±0.003*	0.026±0.006*	0.026±0.002*	0.000±0.000	0.000±0.000	
320		0.000±0.000*	0.014±0.006*	0.003±0.003	0.034±0.002*	0.040±0.006*	0.028±0.003*	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	
640		0.000±0.000*	0.008±0.004*	0.006±0.004	0.011±0.005	0.011±0.004	0.020±0.005*	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
1280		0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.012±0.005	0.000±0.000	0.011±0.003	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	
2560		0.015±0.003	0.000±0.000*	0.002±0.001	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	0.000±0.000	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 40 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 450 nm.

Dose Standak top	Tempo										
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h		
0	0.304±0.005	0.824±0.015	1.253±0.040	1.307±0.053	1.371±0.062	1.514±0.021	1.503±0.028	1.581±0.016	1.605±0.019		
20	0.294±0.004	0.750±0.025*	1.250±0.019*	1.241±0.035	1.333±0.022	1.353±0.037*	1.387±0.035*	1.450±0.043*	1.489±0.041*		
40	0.290±0.003	0.791±0.013	1.204±0.030	1.372±0.023	1.442±0.026	1.331±0.009*	1.388±0.036*	1.356±0.045*	1.398±0.042*		
80	0.279±0.018	0.584±0.012*	0.882±0.021*	0.953±0.046*	0.942±0.041*	0.965±0.043*	0.921±0.031*	0.936±0.048*	0.972±0.049*		
160	0.290±0.012	0.312±0.012*	0.508±0.008*	0.504±0.014*	0.471±0.017*	0.463±0.028*	0.511±0.024*	0.509±0.021*	0.514±0.023*		
320	0.230±0.015	0.000±0.000*	0.054±0.022*	0.040±0.015*	0.000±0.000*	0.017±0.011*	0.038±0.015*	0.033±0.009*	0.037±0.010*		
640	0.038±0.012#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
1280	0.004±0.002#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
2560	0.001±0.001#	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
continua...											

Dose Standak top	Tempo										
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h		
0	1.627±0.018	1.763±0.013	1.796±0.015	1.800±0.016	1.780±0.022	1.787±0.022	1.790±0.022	1.585±0.039	1.764±0.030		
20	1.520±0.031*	1.632±0.014*	1.653±0.022*	1.652±0.022*	1.639±0.028*	1.609±0.023*	1.627±0.040*	1.405±0.050*	1.523±0.0540*		
40	1.419±0.039*	1.591±0.016*	1.583±0.026*	1.594±0.023*	1.571±0.011*	1.590±0.010*	1.581±0.006*	1.365±0.023*	1.463±0.035*		
80	1.053±0.037*	1.101±0.050*	1.128±0.051*	1.151±0.048*	1.181±0.044*	1.215±0.040*	1.229±0.036*	1.051±0.043*	1.155±0.038*		
160	0.506±0.027*	0.582±0.008*	0.587±0.017*	0.625±0.017*	0.670±0.016*	0.694±0.021*	0.725±0.022*	0.676±0.022*	0.754±0.014*		
320	0.036±0.010*	0.073±0.018*	0.067±0.012*	0.097±0.008*	0.164±0.011*	0.197±0.010*	0.210±0.010*	0.125±0.022*	0.172±0.014*		
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*		

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). Jogo da velha indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Kruskal-Wallis ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

Tabela 41 – Valores do parâmetro NG ($\mu\text{g mL}^{-1}$) para *Bacillus* contaminado com Mistura Piraclostrobina + Tiofanato metílico + Fipronil, absorvância 690 nm.

Dose Standak top	Tempo									
	0h	8h	16h	24h	32h	40h	48h	56h	64h	
0	0.220±0.003	0.861±0.019	1.352±0.047	1.389±0.061	1.464±0.071	1.607±0.049	1.641±0.023	1.736±0.027	1.746±0.032	
20	0.215±0.002	0.778±0.027*	1.192±0.033*	1.313±0.037	1.391±0.037	1.455±0.045*	1.509±0.043	1.578±0.049*	1.614±0.049	
40	0.213±0.003	0.867±0.016	1.308±0.033	1.491±0.027	1.567±0.034	1.493±0.040	1.521±0.052	1.485±0.064*	1.521±0.060*	
80	0.202±0.009	0.619±0.033*	0.944±0.043*	1.054±0.063*	1.027±0.056*	1.053±0.060*	1.023±0.067*	0.998±0.065*	1.025±0.066*	
160	0.229±0.011	0.320±0.026*	0.534±0.033*	0.533±0.030*	0.489±0.033*	0.499±0.037*	0.510±0.042*	0.510±0.041*	0.507±0.040*	
320	0.230±0.011	0.011±0.011*	0.061±0.027*	0.040±0.018*	0.011±0.010*	0.016±0.011*	0.028±0.016*	0.023±0.016*	0.023±0.017*	
640	0.040±0.013*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

continua...

Dose Standak top	Tempo									
	72h	80h	88h	96h	104h	112h	120h	136h	144h	
0	1.772±0.028	1.945±0.016	1.981±0.021	1.986±0.015	1.962±0.015	1.958±0.012	1.947±0.017	1.640±0.062	1.874±0.048	
20	1.650±0.039	1.783±0.021*	1.804±0.031*	1.791±0.033*	1.746±0.042*	1.732±0.050*	1.698±0.058*	1.381±0.071*	1.512±0.074*	
40	1.544±0.056*	1.702±0.048*	1.723±0.042*	1.732±0.038*	1.707±0.034*	1.724±0.033*	1.696±0.030*	1.334±0.033*	1.445±0.049*	
80	1.067±0.070*	1.159±0.068*	1.189±0.073*	1.213±0.070*	1.230±0.065*	1.268±0.059*	1.273±0.055*	0.990±0.058*	1.108±0.057*	
160	0.521±0.036*	0.586±0.018*	0.626±0.018*	0.671±0.020*	0.717±0.019*	0.749±0.026*	0.787±0.028*	0.649±0.029*	0.741±0.029*	
320	0.020±0.015*	0.034±0.021*	0.023±0.014*	0.060±0.020*	0.117±0.017*	0.157±0.016*	0.150±0.015*	0.031±0.018*	0.052±0.017*	
640	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
1280	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	
2560	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	0.000±0.000*	

Asteriscos indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle pelo Teste de Dunnett ($p<0,05$). ± erro padrão. Os dados são médias das repetições. Fonte: Produção da autora, 2022.

