

Estudo do efeito da aplicação de biochar na fauna edáfica: teste de comportamento com *Eisenia fetida*

Study of the effect of biochar application on soil fauna: avoidance assay with *Eisenia fetida*

Allycia Ribeiro¹, Paula Rodrigues¹, Henrique Trindade², João Coutinho³ & João Ricardo Sousa^{2,*}

¹ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal

² Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Centro de Investigação e Tecnologias Agroambientais e Biológicas (CITAB), Vila Real, Portugal

³ Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Centro de Química (CQ), Vila Real, Portugal

(*E-mail: jricardo@utad.pt)

<https://doi.org/10.19084/rca.33396>

Recebido/received: 2023.07.31

Aceite/accepted: 2023.11.20

RESUMO

A utilização de subprodutos resultantes do processo de pirólise, como o biochar (BioC), têm revelado interesse na manutenção do ambiente edáfico, especialmente nas respetivas propriedades físico-químicas, menorizando os potenciais efeitos sobre a biologia do solo. Este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes doses de um BioC de origem vegetal no comportamento da espécie *Eisenia fetida*, com base na determinação da percentagem de fuga ou evitamento (% E_{vit}), de um solo-teste (com biochar) comparativamente a um solo-controlo (sem biochar), de modo a estimar os potenciais riscos associados à sua aplicação no solo, de acordo com as normas requeridas para este tipo de teste (ISO 17512-1). Os resultados obtidos revelaram um efeito significativo (p<0,05) da aplicação e dose de BioC no comportamento das minhocas. Em todos os tratamentos com BioC foi observado um evitamento da *E. fetida*, com os valores a variar entre os 33 e 66%. Fatores associados a um aumento dos valores de retenção de água, pH e condutividade elétrica do solo parecem explicar o comportamento das minhocas nos tratamentos com BioC, os quais se revelaram mais intensos para as doses de 15 e 30 t/ha, nas quais os limites de habitabilidade do solo, relativos a 60% de evitamento, foram ultrapassados.

Palavras-chave: Biochar, resíduos, evitamento, *Eisenia fetida*, solo.

ABSTRACT

The use of by-products resulting from the pyrolysis process, such as biochar (BioC), has reveal increasing interest in maintaining edaphic environment, especially in the respective physicochemical properties, minimize the potential effects on biology conditions. This study aimed to evaluate the effect of applying different doses of a plant derived BioC on the behavior of *Eisenia fetida*, based on determining the percentage of escape or avoidance (% E_{vit}) from a test soil (with biochar) compared to a control soil (without biochar), in order to estimate the potential risks to soil application, according to the required guidelines for this typo of test (ISO 17512-1). The results showed a significant effect (p <0.05) of BioC application and dose on the behavior of the earthworms. In all treatments with BioC, avoidance of *E. fetida* was observed, with values ranging from 33 to 66%. Factors associated with an increase in soil water retention, pH, and electrical conductivity seem to explain the behaviour of earthworms in the BioC treatments, with more higher effects for 15 and 30 t/ha doses, where soil habitability limits, relative to 60% avoidance, were exceeded.

Keywords: Biochar, residues, avoidance, *Eisenia fetida*, soil.

INTRODUÇÃO

A exploração sistemática e intensiva de recursos naturais como o caso do solo, tem demonstrado que a respetiva capacidade de fornecer serviços ao ecossistema está cada vez mais dependente de fatores externos (Helming *et al.*, 2018). Subprodutos, derivados da pirólise ou conversão termoquímica da biomassa, com a designação de biocarvão (BioC), têm sido usados com o objetivo de melhorar qualidade do solo e a respetiva funcionalidade ecológica (Beusch, 2021). O elevado interesse agronómico deste tipo de materiais está relacionado com a melhoria da fertilidade do solo, através do aumento da capacidade de retenção de água e nutrientes e na mitigação das emissões de C-CO₂ ou na proteção da matéria orgânica dos processos de oxidação biológica (Lehmann *et al.*, 2006). Tendo em consideração as elevadas potencialidades deste tipo de material, têm sido vários os estudos com o objetivo de produzir informação relativa ao efeito do BioC sobre as características físico-químicas do solo (Zhao *et al.*, 2022). Os estudos sobre a biologia edáfica, nomeadamente ao nível da fauna do solo (Elliston & Oliver, 2020), são ainda muito reduzidos. Apesar da fauna do solo ser um grupo muito diversificado, a maior parte dos estudos relacionados com o efeito do BioC utilizam as minhocas como modelo biológico (Li *et al.*, 2011). As minhocas são organismos globalmente comuns das comunidades do solo, representando entre 40 a 90% da biomassa do solo em determinados ecossistemas (Fragoso *et al.*, 1999), com influência na formação do solo, na decomposição de resíduos orgânicos, respetiva reciclagem ou mineralização e propriedades físicas do solo (Lemtiri *et al.*, 2014). Deste modo, o potencial das minhocas tem sido largamente reconhecido em estudos de ecotoxicologia, fazendo parte de ferramentas de análise de risco associado a fenómenos de aplicação de materiais ao solo, através da análise comportamental

(Elliston & Oliver, 2020). Este tipo de testes, baseados em diretrizes definidas pela Organização Internacional de Padrões (ISO, 2005), estabelecem como *endpoint* ecologicamente mais relevante o comportamento das minhocas. São testes de elevada sensibilidade, de fácil execução e reproduzíveis, permitindo comparações de resultados entre laboratórios e materiais, factos que tornam estas metodologias ideais para uma rápida análise inicial do efeito de substâncias ou materiais emergentes, aplicados de forma deliberada ou acidental ao solo (Li *et al.*, 2011). Tendo em consideração todos estes fatores, relacionados com as potencialidades do BioC na manutenção da funcionalidade do solo e dos reduzidos estudos associados aos efeitos na fauna do solo, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito da aplicação de diferentes doses de um BioC comercial, de origem vegetal, no comportamento da espécie *Eisenia fetida*, de modo a estimar os potenciais riscos associados à sua aplicação/presença no solo e respetiva habitabilidade.

MATERIAIS E MÉTODOS

Biochar

No trabalho foi usado um BioC comercial, obtido a partir de um processo de pirólise de resíduos florestais, cujas características são apresentadas no Quadro 1.

De acordo com a informação disponibilizada pelo fabricante, o BioC apresenta uma densidade aparente de 400 kg m⁻³ e uma granulometria inferior a 10 mm. No caso dos teores totais de metais pesados no BioC (dados não apresentados), os valores obtidos revelaram-se inferiores aos teores máximos admissíveis para matérias fertilizantes, de acordo com o DL 30/2022.

Quadro 1 - Características físico-químicas iniciais do BioC em estudo

CE ^{#1}	pH(H ₂ O) ^{#1}	H ₂ O [#]	Voláteis [*]	N [*]	P [*]	K [*]	Ca [*]	Mg [*]
dS m ⁻¹	-				g kg ⁻¹			
0,17	9,1	98,0	909,0	6,7	0,6	8,9	29,0	2,6

valores referentes à matéria original; 1: H₂O (1:5); * valores referentes à matéria seca

Solo artificial

O solo artificial (Quadro 2), usado como matriz de suporte, foi preparado de acordo com as orientações definidas para o estudo de substâncias químicas (ISO 11268-1).

Cinco tratamentos foram considerados, relativos às doses 0 (BioC0), 5 (BioC5), 10 (BioC10), 15 (BioC15) e 30 t/ha (BioC30). Para cada tratamento foram realizadas 3 repetições, num total de 15 recipientes-teste. Cada recipiente-teste foi separado em duas secções iguais, com auxílio de uma placa divisória

Quadro 2 - Características físico-químicas do solo artificial

pH	Mat. Org.	P ₂ O ₅ ^(*)	K ₂ O ^(*)	CTC _e	Areia	Limo	Argila
-	(g kg ⁻¹)	(mg kg ⁻¹)		(cmol _c kg ⁻¹)		(g kg ⁻¹)	
5,2	64,2	57,0	92,0	11,4	809	74	153

(*) método de Egner-riehm

Neste caso, as *guidelines* definem uma mistura com uma proporção de 70% de areia de quartzo (Ø 0,05-0,2 mm), 20% de caulino, com argila do tipo caulinite superior a 30%, e 10% de turfa esfagno (ISO, 2005). Para a mistura obtida, cujas principais características físico-químicas são apresentadas no Quadro 2, procedeu-se ao ajuste do teor de humidade, equivalente a 50% da capacidade máxima de retenção de água. Igual procedimento corretivo foi seguido para o pH inicial da mistura, cujos resultados (Quadro 2), de acordo com as normas ISO 11268-1 (ISO, 2005), revelaram a necessidade de correção para valores de 6,0±0,5, através da adição de carbonato de cálcio (CaCO₃).

Ensaio de evitamento

Para o ensaio de evitamento foi seguido o protocolo relativo à avaliação da qualidade do solo e efeito de substâncias químicas realizado em compartimentos de duas secções (ISO 17512-1) (ISO, 2005).

(Figura 1) e cada secção foi preenchida por 500 g de solo artificial, com BioC (solo-teste) equivalente à respetiva dose estudada (BioC5, BioC10, BioC15 e BioC30), identificadas com sinal (+), e solo-controlo, sem BioC (BioC0), identificado com o sinal (-). Para a validação do ensaio, cumprindo a obrigatoriedade neste tipo de estudos (ISO, 2005), um teste de controlo duplo foi também incluído, em que o tratamento controlo é comparado entre si.

Preenchidas as secções em cada recipiente-teste, a placa divisória foi retirada e 10 indivíduos adultos, da espécie *E. fetida*, adquiridas comercialmente, previamente selecionados e lavados, com clitelo desenvolvido e peso fresco compreendido entre 300-600 mg (ISO 17512-1) (ISO, 2005), foram colocadas na linha divisória. Todos os recipientes-teste foram fechados, com tampas perfuradas, e colocados a incubar em condições controladas de temperatura (20±2 °C) e fotoperíodo de 8-h de escuro e 16-h de luz, durante um período de 48 horas de exposição, durante o qual as minhocas não foram

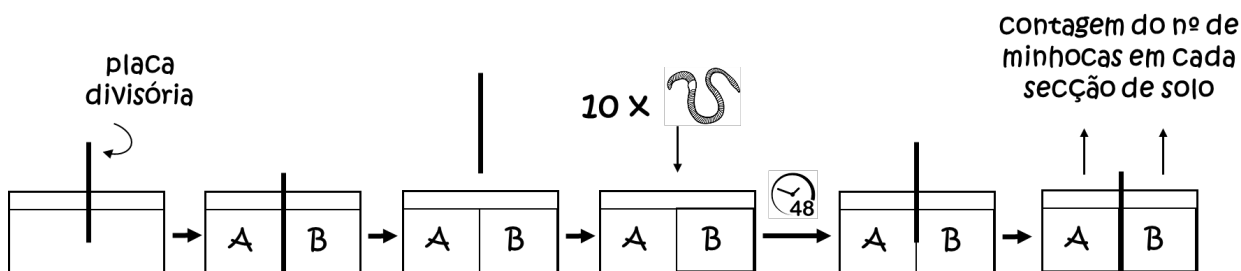


Figura 1 - Esquema do teste de evitamento protocolado aplicado no presente estudo: (i) secção A é relativa ao tratamento controlo (BioC0) e (ii) secção B é relativa ao solo-teste (BioC0, no teste dual, BioC5, BioC10, BioC15 e BioC30).

alimentadas. Após o período de exposição, a placa divisória foi inserida na linha média de cada recipiente-teste e realizada a contagem dos indivíduos em cada secção comparada, solo-controlo e solo-teste, sem e com adição de BioC, respetivamente, para os diferentes tratamentos e repetições estudados (Figura 1). Para efeitos de contagem, indivíduos localizados na linha central ou interface das respetivas secções foram considerados como 0,5 indivíduos. No final do ensaio (2 dias) procedeu-se à avaliação do teor de humidade, pH e condutividade elétrica (CE) do solo nas secções comparadas.

Análise estatística

Em cada tratamento foi determinada a percentagem de evitamento (% E_{vit}), de acordo com a equação de Busch *et al.* (2012) ($\%E_{vit}=[n_c-n_t]/N*100$), em que n_c , n_t e N são relativos ao número de minhocas no solo-controlo, solo-teste e total de minhocas por recipiente-teste, respetivamente. Valores positivos (+) indiciam evitamento enquanto valores negativos (-) uma não resposta ou atração à presença de BioC (ISO, 2005). Os dados obtidos foram sujeitos a uma análise de normalidade e homogeneidade, pelos testes de Shapiro-Wilk e Barlett, respetivamente, seguido de uma ANOVA a um fator e do teste de Tukey, para um $\alpha=0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após 48 horas de exposição, os resultados obtidos indicaram ausência de mortalidade das minhocas nos diferentes tratamentos estudados, cumprindo-se um dos pressupostos de validação da metodologia seguida (ISO, 2005). Acresce, também, que no caso do teste de duplo controlo ou dual (Figura 2), as minhocas não revelaram preferência significativa ($p>0,05$) entre as secções comparadas, apresentando uma distribuição média de 50%, respeitando assim o intervalo de valores normativos (40 a 60 %) para este tipo de tratamento. Os valores negativos observados no tratamento controlo, são indicadores da preferência das minhocas para condições de ausência de BioC (Figura 2).

Nos tratamentos com BioC, observa-se uma tendência oposta, com os valores positivos a revelar um comportamento de fuga, com os resultados a

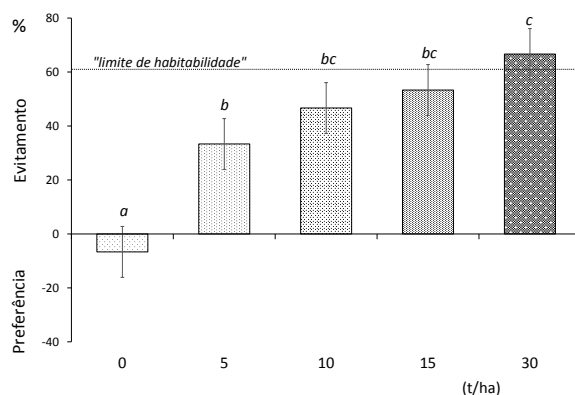


Figura 2 - Percentagem (%) de evitamento/preferência no teste de comportamento em solo artificial com *E. fetida* nos tratamentos estudados, sem (0 t/ha) e com BioC (5, 10, 15 e 30 t/ha).

(Barras relativas a cada tratamento, seguidas da mesma letra não diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, para 5% de probabilidade; barras verticais indicam erro padrão (n=3).

revelarem-se dependentes da dose aplicada, com a percentagem de evitamento a variar entre os 33 e 66 % (Figura 2). Nos tratamentos com BioC, somente nas doses mais elevadas, superiores a 10 t/ha, é que se observa uma redução significativa da habitabilidade do solo, mais evidente para a dose máxima estudada (30 t/ha), na qual o valor do limite de habitabilidade do solo (60% de evitamento) é visivelmente ultrapassado (Figura 2). Estes resultados indiciam efeitos negativos ao nível da biologia do solo, através da indução de um comportamento de fuga para condições de ausência de BioC (solo-controlo), tendência também observada por vários autores (Elliston & Oliver, 2020). Os elevados valores da superfície específica e capacidade de troca iónica deste tipo de materiais (Beush, 2021) promovem uma diminuição significativa dos teores gravimétricos de água no solo (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2019), tal como observado no presente trabalho nos tratamentos com BioC comparativamente ao grupo controlo (0 t/ha) (Figura 3.i).

Esta maior redução de água do solo na presença de BioC, promoveu condições desfavoráveis de habitabilidade do solo, potenciando fenómenos de dessecação das minhocas com o conseqüente aumento da percentagem de evitamento (Figura 2). O efeito da redução hídrica do meio poderá, igualmente, exercer uma influência sobre a consistência do solo (Chan & Barchia, 2007), aumentando o grau de

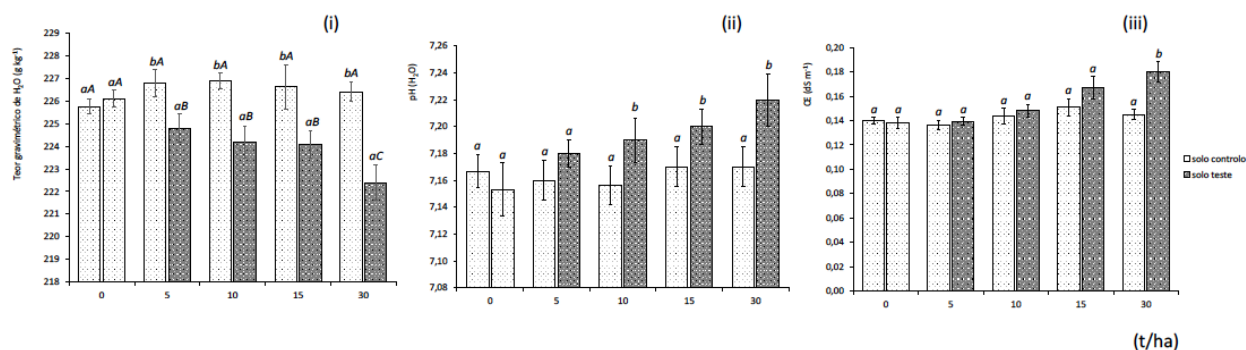


Figura 3 - Teor médio de H_2O ($g\ kg^{-1}$) (i), pH (ii) e CE (iii), nas respetivas secções, solo-controlo e solo-teste, nos tratamentos estudados, sem (0 t/ha) e com BioC (5, 10, 15 e 30 t/ha), no final do período de exposição (48-h) no ensaio de comportamento com *Eisenia fetida*.

Barras relativas a cada tratamento, seguidas da mesma letra minúscula e maiúscula, não diferem significativamente entre si, pelo teste de t-Student e Tukey, para 5% de probabilidade, para cada secção intra- e entre tratamentos, respetivamente; barras verticais indicam erro padrão (n=3).

resistência à quebra ou esboroamento dos agregados, limitando quer os processos de ingestão como digestão de solo pelas minhocas, comparativamente ao solo sem BioC. Alterações ao nível das condições químicas, nomeadamente de pH (Figura 3.ii) e condutividade elétrica (CE) do solo (Figura 3.iii), com aumento dos respetivos valores, poderão também ajudar a explicar o evitamento das minhocas na presença de BioC. O efeito alcalinizante observado poderá exercer uma redução da disponibilidade de determinados nutrientes, como o fósforo, ou alterações no pH interno das minhocas (Sanchez-Hernandez *et al.*, 2019), sendo estes efeitos mais notados para doses mais elevadas de BioC (Figura 3.ii), potenciando maiores valores de evitamento (Figura 2). Por sua vez, a presença de sais de cálcio e magnésio (Quadro 1), responsáveis pelo aumento da condutividade elétrica do solo, poderão originar condições menos favoráveis às minhocas, que se revelaram mais significativas apenas para as doses mais elevadas testadas (30 t/ha) (Figura 3.iii).

CONCLUSÕES

A aplicação deste tipo de BioC, apesar dos benefícios para as propriedades físico-químicas do solo, apresenta potenciais riscos para a biologia do solo, os quais deverão ser ponderados, nomeadamente em termos da dose a aplicar, com o risco de uma maior redução da habitabilidade do solo devido a condições desfavoráveis de humidade, pH e condutividade elétrica, especialmente para valores superiores a 10 t/ha.

AGRADECIMENTOS

Financiamento: Este trabalho foi financiado no âmbito do Projeto de I&D&I SoilRec4+Health, n.º da operação NORTE-01-0145-FEDER-000083, co-financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) através do NORTE 2020 (Programa Operacional Regional do Norte 2014/2020).

Agradecimento: João Ricardo Sousa, agradece a colaboração do CITAB/UTAD, no âmbito do projeto SoilRec4+Health - Soil recover for a healthy food and quality of life

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Beusch, C. (2021) - Biochar as a soil ameliorant: how biochar properties benefit soil fertility – a review. *Journal of Geoscience and Environment Protection*, vol. 9, p. 28-46. <https://doi.org/10.4236/gep.2021.910003>
- Busch, D.; Kammann, C.; Grünhage, L. and Müller, C. (2012) - Simple biotoxicity tests for evaluation of carbonaceous soil additives: Establishment and reproducibility of four test procedures. *Journal of Environmental Quality*, vol. 41, n. 4, p. 1023-1032. <https://doi.org/10.2134/jeq2011.0122>
- Chan, K.Y. and Barchia, I. (2007) - Soil compaction controls the abundance, biomass and distribution of earthworms in a single dairy farm in south-eastern Australia. *Soil and Tillage Research*, vol. 94, n. 1, p. 75-82. <https://doi.org/10.1016/j.still.2006.07.006>
- Elliston, T. and Oliver, I.W. (2020) - Ecotoxicological assessments of biochar additions to soil employing earthworm species *Eisenia fetida* and *Lumbricus terrestris*. *Environmental Science and Pollution Research*, vol. 27, p. 33410–33418. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04542-2>
- Fragoso, C.; Kanyonyo, J.; Moreno, A.; Senapati, B.K.; Blanchart, E. and Rodriguez, C. (1999) - A survey of tropical earthworms: taxonomy, biogeography and environmental plasticity. In: Lavelle, P.; Brussaard, L. and Hendrix, P. (Eds.) - *Earthworm Management in Tropical Agroecosystems*. Wallingford, CABI, p 27-55.
- Helming, K.; Daedlow, K.; Paul, C.; Techen, A.-K.; Bartke, S.; Bartkowski, B.; Kaiser, D.; Wollschläger, U. and Vogel, H.-J. (2018) - Managing soil functions for a sustainable bioeconomy – Assessment framework and state of the art. *Land Degradation and Development*, vol. 29, n. 9, p. 3112-3126. <https://doi.org/10.1002/ldr.3066>
- ISO (2005) - *Soil quality. Avoidance test for determining the quality of soils and effects of chemicals on behaviour. Part I: Test with earthworms (Eisenia fetida and Eisenia andrei)*. ISO 17512-1. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- Lehmann, J.; Gaunt, J. and Rondon, M. (2006) - Bio-char sequestration in terrestrial ecosystems – a review. *Mitigation and Adaptation Strategies Global Change*, vol. 11, p. 403-427. <https://doi.org/10.1007/s11027-005-9006-5>
- Lemtiri, A.; Colinet, G.; Alabi, T.; Cluzeau, D.; Zirbes, L.; Haubruge, É. and Francis, F. (2014) - Impacts of earthworms on soil components and dynamics. A review. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement*, vol. 18, n. 1, p. 121-133.
- Li, D.; Hockaday, W.C.; Masiello, C.A. and Alvarez, P.J.J. (2011) - Earthworm avoidance of biochar can be mitigated by wetting. *Soil Biology and Biochemistry*, vol. 43, n. 8, p. 1732-1737. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.04.019>
- Sanchez-Hernandez, J.C.; Ríos, J.M.; Attademo, A.M.; Malcevski, A. and Caresa, X.A. (2019) - Assessing biochar impact on earthworms: Implications for soil quality promotion. *Journal of Hazardous Materials*, vol. 336, p. 582-591. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.12.032>
- Zhao, Y.; Wang, X.; Yao, G.; Lin, Z.; Xu, L.; Jiang, Y.; Jin, Z.; Shan, S. and Ping, L. (2020) - Advances in the Effects of Biochar on Microbial Ecological Function in Soil and Crop Quality. *Sustainability*, vol. 14, n. 16, art. 10411. <https://doi.org/10.3390/su141610411>