

### III-436 - UTILIZAÇÃO DO ENSAIO ECOTOXICOLÓGICO PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO COMPOSTO ORGÂNICO PROVENIENTE DOS RESÍDUOS SÓLIDOS DOMICILIARES

**Luciana Miyoko Massukado<sup>(1)</sup>**

Engenheira civil pela Universidade Federal de São Carlos. Mestre em Engenharia Urbana pela Universidade de São Carlos. Especialista em Educação Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP. Doutora em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP. Docente do curso superior de tecnologia em Agroecologia do Instituto Federal de Brasília – *Campus Planaltina*.

**Maria Edna Tenório Nunes**

Engenheira Agrônoma pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Mestre em Fitopatologia pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz/USP, Doutora em Ciências da Engenharia Ambiental pela Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

**Valdir Schalch**

Engenheiro Químico pela Escola Superior de Química Oswaldo Cruz. Mestre em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo. Doutor em Engenharia Hidráulica e Saneamento pela Universidade de São Paulo. Livre-docente da Escola de Engenharia de São Carlos/USP.

**Endereço<sup>(1)</sup>:** Rodovia DF 128, km 21 Zona Rural CEP: 73380-900 - Brasil - Tel: +55 (61) 3905-5410 - Fax: +55 (61) 3905-5400 - e-mail: [luciana.massukado@ifb.edu.br](mailto:luciana.massukado@ifb.edu.br)

#### RESUMO

No Brasil, a qualidade do composto orgânico proveniente da compostagem de resíduos sólidos domiciliares é avaliada basicamente segundo os critérios das Instruções Normativas nº 23/2005 e 27/2006 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). A primeira estabelece valores mínimos ou máximos para o teor de umidade, nitrogênio total, carbono orgânico, pH, relação C/N e relação CTC/C. A outra apresenta os limites máximos permitidos de contaminantes (Arsênio, Cádmio, Chumbo, Cromo, Mercúrio, Níquel, Selênio, coliformes termotolerantes, ovos viáveis de helmintos e *Salmonella* spp) para fertilizantes orgânicos. Recentemente, a utilização de ensaios ecotoxicológicos como ferramenta complementar para avaliar a qualidade do composto de forma a melhorar as exigências quanto à utilização agrícola desse produto tem se tornado foco de estudos. Assim, o objetivo desta pesquisa foi avaliar a qualidade do composto orgânico produzido em uma Unidade de Compostagem do município de São Carlos/SP, por meio de ensaios ecotoxicológicos com minhocas (*Eisenia andrei*). Para tanto, o teste de toxicidade aguda foi realizado, com a diluição do composto em Solo Artificial Tropical (SAT) para determinação da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>). As análises a que o composto orgânico foi submetido preliminarmente revelaram que o mesmo atendia aos limites de qualidade estabelecidos pelas Instruções Normativas nº 23 e 25 do MAPA. No entanto, os resultados do teste agudo indicaram ecotoxicidade do composto, com taxas significativas ( $p < 0.05$ ) de mortalidade de minhocas a partir da concentração de 16% de composto em SAT. Apesar do ensaio ecotoxicológico não identificar especificamente o que está causando a toxicidade, o mesmo desempenha importante papel de indicador de possível contaminação ambiental. Assim, a partir de uma avaliação integrada entre os parâmetros de qualidade do composto estabelecidos pelas instruções normativas e o teste de toxicidade aguda com minhocas, o presente estudo permitiu destacar a importância da condutividade elétrica do composto como fator de impacto ambiental. Os organismos indicadores (minhocas) mostraram sensibilidade ao composto, com maiores taxas de mortalidade ocorrendo quando os mesmos foram expostos a composto com alta condutividade ( $CE = 7,48 \text{ mS/cm}$ ), decorrente do tipo de resíduo que foi tratado para obtenção do composto. Dessa forma, sugere-se que o nível de condutividade elétrica seja um parâmetro a ser incluído na legislação brasileira para avaliar a qualidade do composto de lixo.

**PALAVRAS-CHAVE:** Composto de lixo, qualidade de composto, ensaio ecotoxicológico, compostagem, *Eisenia andrei*.

## INTRODUÇÃO

A utilização em cultivos agrícolas de resíduos de atividades humanas, depois de submetidos a processo de compostagem, é prática comum em muitos países, como no Brasil, mas sua intensificação tem levado à crescente preocupação com relação a possíveis efeitos ambientais, uma vez que os mesmos podem conter elementos nocivos, como metais pesados.

Assim como em outras partes do mundo, no Brasil essa preocupação refletiu na publicação de freqüentes instruções normativas para regulamentação do uso de fertilizantes orgânicos. Apesar do avanço significativo, as legislações existentes ainda são insuficientes para garantir a utilização intermitente do composto na agricultura em longo prazo (ABREUJUNIOR et al., 2005), o que pode ser explicado pela complexidade do solo, quando vários elementos se combinam entre si e também com outros organismos. Apenas a caracterização química desses compostos não seria, portanto, suficiente para garantir a integridade ambiental, quando de sua utilização intensiva.

Assim, testes ecotoxicológicos surgem como uma ferramenta promissora na análise de risco ambiental do uso desses compostos. Os testes de ecotoxicidade são empregados para avaliar efeitos adversos de substâncias químicas sobre a biota terrestre e aquática (RÖMBKE & KNACKER, 2003; GARCIA, 2004; EC, 2004; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2006), possibilitando avaliar os impactos dos poluentes sobre diferentes ecossistemas. Desta forma, podem subsidiar a formulação segura de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes gerenciais para enfrentar questões de risco ecotoxicológico potencial e real, geradas pela introdução de agentes químicos no ambiente.

Embora a importância de ensaios ecotoxicológicos para o ambiente terrestre tenha sido reconhecida depois, em relação ao ambiente aquático, destaca-se nas últimas décadas o crescimento da utilização desses testes voltados ao ecossistema solo (YEARDLEY et al., 1996; VERMEULEN et al., 2001; GARCIA, 2004; LUKKARI et al., 2005; EIJSSACKERS et al., 2005; JENSEN et al., 2007; NUNES, 2010; entre outros). O ensaio de toxicidade aguda com minhocas (ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT – OECD, 1984), testado e padronizado internacionalmente, deu início e significou um impulso à Ecotoxicologia Terrestre.

Recentemente, a utilização de ensaios com diferentes espécies edáficas como ferramenta adicional na avaliação da qualidade do composto de lixo, visando seu uso agrícola passou a ser foco de pesquisas (ALVARENGA et al., 2007; MOREIRA et al., 2008).

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar a qualidade de um composto orgânico proveniente de resíduos sólidos domiciliares, por meio de ensaios ecotoxicológicos com um organismo edáfico padrão (*Eisenia andrei*).

## MATERIAIS E MÉTODOS

No ensaio de ecotoxicidade aguda com minhocas foi utilizado o composto orgânico proveniente de um Pátio de Compostagem, localizado no município de São Carlos/SP, que tratava a fração orgânica previamente separada por 60 domicílios. Ressalta-se que o composto atendia a maioria dos padrões estabelecidos pela legislação brasileira, principalmente a Instrução Normativa 27 (MAPA, 2006) que estabelece a concentração máxima de metais pesados ( $Cd < 0.5$ ,  $Pb = 1.3$ ,  $Cr = 17.4$ ,  $As < 0.5$ ,  $Hg < 0.5$ ,  $Se < 0.5$  e  $Ni = 0.8$ , em mg/kg) e presença de organismos patogênicos.

O organismo-teste utilizado foi a minhoca da espécie *Eisenia andrei*, escolhida por ser a espécie padrão recomendada internacionalmente para a realização de ensaios ecotoxicológicos. A mesma apresenta curto ciclo de vida e reprodução intensa (2 a 5 casulos/indivíduo/semana), com juvenis saindo do casulo após 3 a 4 semanas e tornando-se adultas em 7 a 8 semanas (OECD, 1984). Os testes foram conduzidos de acordo com os protocolos OECD 207 (OECD, 1984), ISO 11262-1 (ISO, 1993) e NBR 15537 (ABNT, 2007).

Todos os protocolos citados recomendam a utilização de um solo artificial para a condução dos testes, padronizado pela mistura de areia industrial, caulim e matéria orgânica, na proporção, em peso, de 7:2:1. A matéria orgânica indicada pelos protocolos internacionais (ISO e OECD) é a turfa de esfagno (*sphagnum peat*). Devido à dificuldade de aquisição e utilização da turfa e considerando a recomendação da NBR 15537 (ABNT, 2007) quanto à utilização da fibra de coco como matéria orgânica, optou-se por utilizá-la como

componente da mistura. Essa mistura de areia industrial, caulim e fibra de coco foi denominada por Garcia (2004) como Solo Artificial Tropical (TAS). Após a mistura dos componentes, manualmente, a umidade do TAS foi ajustada para 35% (em relação a seu peso seco) e o pH para  $6,0 \pm 0,5$ , pela adição de carbonato de cálcio, se necessário.

A procedência dos materiais e organismos utilizados nos testes foram:

- Areia Normal Brasileira: cedida pelo Instituto de Pesquisas Tecnológicas (IPT). Produzida de acordo com a NBR 7214:82. Identificação 100 – material retido entre as peneiras de abertura nominal de 0,3 mm e 0,15 mm;
- minhocas: compradas da empresa Anhumus Agroambiental (Campinas/SP). Espécie *Eisenia andrei*;
- argila branca (caulim): adquirida comercialmente da empresa Labsynth Produtos para Laboratório Ltda;
- pó de fibra de coco: comprada da empresa Amafibra (Artur Nogueira/SP). O tipo de fibra foi o substrato agrícola Golden Mix T-80.

No caso específico da minhoca, após a sua aquisição elas eram retiradas do substrato de origem e transferidas para o meio de cultivo já preparado no laboratório. Esse substrato de cultivo consiste na mistura de esterco bovino e fibra de coco na proporção de 50:50 (v:v). As minhocas foram mantidas em caixas plásticas com capacidade para 1000 g, sendo alimentadas quinzenalmente com flocos de aveia previamente cozidos em água destilada, ou com esterco bovino seco. As culturas foram mantidas a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob regime de 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Antes de montar o experimento foram definidas as dosagens da substância-teste (composto orgânico de lixo) a serem avaliadas, optando-se por utilizar diluições da substância-teste no TAS nas seguintes proporções (peso seco): 100%, 75%, 50%, 25% e 10%. Além dessas diluições avaliou-se também a diluição da substância-teste correspondente à dose recomendada para aplicação agrícola.

Como as doses recomendadas podem variar de 20 a 120 t/ha.ano, dependendo do teor de nitrogênio no fertilizante, do tipo de solo, do clima e da cultura, adotou-se a dose de 120 t/ha.ano. Este foi considerado o pior cenário, em que uma quantidade muito grande de composto orgânico, proveniente da compostagem de resíduos sólidos urbanos, é adicionada ao solo.

O procedimento para calcular a quantidade, em peso, de substância-teste a ser misturada ao TAS considerou duas situações. A primeira, na qual a dose recomendada foi calculada com base na área do pote onde o experimento seria realizado e, a segunda considerando a densidade do solo. Os resultados da dose recomendada equivalente foram 32% e 8%, respectivamente, considerando a conversão pela área e densidade. No caso de se utilizar duas vezes a dose recomendada os valores obtidos foram 64% (conversão área) e 16% (conversão densidade). Assim, as diluições avaliadas foram 100%, 75%, 64%, 50%, 32%, 25%, 16%, 10% e 8%. A Figura 1 mostra o aspecto do TAS seco e das diferentes diluições de composto no TAS.



**Figura 1. Aspecto do solo artificial (TAS) seco e das diferentes diluições do composto em SAT.**  
**Fonte: Massukado (2008).**

O tratamento controle correspondeu a 100% de TAS. Todos os tratamentos foram avaliados em triplicata. Os ensaios foram conduzidos em potes plásticos redondos contendo, cada um, 500g de substrato seco (diluições do composto no TAS). Os potes plásticos foram identificados com o tratamento e o número da réplica (1, 2 ou 3) e suas tampas perfuradas de modo a permitir a oxigenação do meio.

O preparo das misturas foi realizado manipulando-se do tratamento menos contaminado (100% de TAS) até o mais contaminado (100% de substância-teste). A mistura de TAS, substância-teste e água destilada foi realizada, manualmente, em uma bandeja plástica e depois transferida para os potes de ensaio. A incorporação de água destilada foi feita de forma a ajustar a umidade da mistura para cerca de 50% de sua capacidade máxima de retenção de água.

As minhocas permaneceram em aclimação no TAS por um período de no mínimo 24 horas e antes de serem colocadas nos potes correspondentes a cada tratamento eram lavadas em água destilada, secas em papel de filtro e pesadas (Figura 2). As minhocas utilizadas no ensaio apresentavam clitelo desenvolvido e pesavam entre 200 e 400 mg. Em cada recipiente foram adicionadas 10 minhocas.





**Figura 2:** À esquerda, minhocas aclimatadas no TAS. À direita, 600 minhocas lavadas em água destilada para, em seguida, serem adicionadas aos recipientes com os tratamentos.

**Fonte:** Luciana M. Massukado, 2008

Os recipientes foram distribuídos aleatoriamente sobre a bancada do laboratório na qual permaneceram por 14 dias, sob temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , em fotoperíodo de 12 horas de luz e 12 horas de escuro. Terminado esse período, realizou-se a contagem e pesagem das minhocas vivas em cada um dos potes.

O cálculo da concentração letal média (CL50), aquela capaz de causar efeito letal em 50% dos organismos, com limites de confiança de 95% foi calculada pelo método Trimmed-Spearman-Kärber.

## RESULTADOS

O ensaio de toxicidade aguda para o composto proveniente da Unidade de Compostagem revelou uma CL50 equivalente a uma dosagem de  $13,25 \pm 5\%$  de composto de lixo, com intervalos de confiança de 95%. A Tabela 01 apresenta os resultados da contagem dos organismos.

**Tabela 01:** Resultados do Teste de Toxicidade Aguda do composto de lixo produzido na Unidade de Compostagem, São Carlos, 2008.

<b>Composto de Lixo – Pátio de Compostagem (27/05/2008)</b>			
<b>Tratamentos</b>	<b>Réplicas</b>	<b>Número de organismos mortos</b>	
		<b>1ª leitura (03/06/2008)</b>	<b>2ª leitura (10/06/2008)</b>
<b>Controle</b>	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
<b>8%</b>	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
<b>10%</b>	1	0	0
	2	0	0
	3	0	0
<b>16%</b>	1	10	10
	2	7	8
	3	9	9
<b>25%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
<b>32%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
<b>50%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
<b>64%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
<b>75%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
<b>100%</b>	1	10	10
	2	10	10
	3	10	10
		LC <sub>50</sub> (%)	13,25%
		Intervalo de confiança	12,60% - 13,93%

As minhocas ficaram extremamente agitadas ao serem introduzidas no recipiente que continha 100% de composto da Unidade de Compostagem, resultando na morte de todas em 15 minutos. Nos recipientes com concentrações entre 25% e 75% na primeira leitura (7 dias), as minhocas já estavam mortas e em estado de decomposição, verificado pela presença de fungos.

Analisando esse resultado verifica-se que a diluição de 8% (conversão pela densidade), correspondente a aplicação da dose recomendada de 120 t/ha de composto está abaixo da CL50. A situação torna-se preocupante quando o resultado é analisado sob o ponto de vista da conversão pela área na qual a dose recomendada, ou seja, diluição de 32% esteve acima do limite estabelecido para CL50.

A condutividade elétrica do composto orgânico proveniente do pátio de compostagem (7,48 mS/cm) parece ter sido o parâmetro que influenciou a alta taxa de mortalidade do organismo-teste no presente estudo.

Resultado semelhante foi obtido por Alvarenga et al. (2006), que realizaram estudo sobre as características químicas e ecotoxicológicas de composto proveniente de três diferentes tipos de resíduos orgânicos biodegradáveis – lodo de esgoto, composto de lixo proveniente da coleta misturada e composto de resíduos de poda – considerando seu uso na agricultura. As concentrações testadas foram 100%, 75%, 50% e 25%. Os resultados obtidos mostraram que o lodo de esgoto apresentou índice elevado de Zn e significativa mortalidade para o teste agudo com minhocas (CL50 = 59,1%). O composto de lixo apresentou os maiores efeitos tóxico no teste agudo (CL50 = 21,4%) sendo que a concentração de metais pesados e a alta condutividade elétrica (5,69 mS/cm) foram considerados os responsáveis por sua maior toxicidade. Para o composto de resíduos de

poda não foi calculada concentração letal, pois a mortalidade não foi superior a 50% em nenhum dos tratamentos.

KLAR (1988) afirma que as culturas respondem diferentemente aos valores de condutividade elétrica, sendo que os efeitos da salinidade para as plantas são negligenciáveis entre 0 e 2 mS/cm; 2 a 4 mS/cm pode ocorrer restrição do desenvolvimento de algumas culturas; de 4 a 8 mS/cm muitas culturas diminuem a produção e de 8 a 16 mS/cm só algumas plantas produzem satisfatoriamente. Com relação ao uso do composto de lixo no solo, Silva et al. (2002) recomendam a manutenção da condutividade abaixo de 4 dS/m

Para investigar melhor a relação entre condutividade elétrica e toxicidade realizou-se a determinação desse parâmetro somente para os tratamentos que apresentaram sobreviventes, ou seja, diluições de 8%, 10% e 16% (Tabela 02).

**Tabela 02: Determinação da condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) dos tratamentos que tiveram sobreviventes. Extrato solo-água 1:5 (m:v)**

Tratamento	Condutividade elétrica ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ )
8%	1081
10%	1278
16%	1901

A partir da Tabela 02, pode-se observar que a concentração de 16% do composto do Pátio de Compostagem, no qual ainda houve sobreviventes, apresentou condutividade elétrica próxima ao valor recomendado por Abreu et al (2005). Portanto, infere-se que existe uma relação entre a toxicidade do composto e a sua condutividade elétrica.

Como o primeiro teste de toxicidade aguda com composto proveniente do Pátio resultou em 100% de mortes a partir da concentração de 25%, decidiu-se realizar outro teste com diluições menores, a fim de encontrar um valor mais preciso de CL50. As novas concentrações testadas foram 4%, 8%, 12%, 16%, 20% e 24%. Em termos de dose recomendada isso significa aplicações de 60, 120, 180, 240, 300 e 360 t/ha, no caso da conversão pela densidade e, de 14, 30, 45, 60, 75 e 90 t/ha, para conversão pela área.

A análise de todos os tratamentos, realizada com o auxílio do programa Trimmed Spearman-Kärber, resultou um valor estimado de CL50 equivalente a uma dosagem de  $16,25 \pm 5\%$  de composto de lixo, com intervalos de confiança de 95% para o segundo teste agudo.

Ao final dos ensaios, realizou-se a pesagem das minhocas para verificar o ganho ou perda de biomassa com relação ao início do teste. A Tabela 3 apresenta somente o peso inicial e final para os tratamentos que não tiveram 100% de mortalidade.

**Tabela 3: Pesagem das minhocas ao final do teste de toxicidade aguda para analisar a variação na biomassa.**

Tratamento	Peso médio minhocas (mg)		
	Unidade de Compostagem		
	Início	fim	variação %
Controle	246.0	201.0	-18
4%	257.0	299.3	16*
8%	244.0	327.3	34*
12%	247.0	273.4	11
16%	239.0	186.2	-22
20%	238.0	135.0	-43
24%	242.0	---	---

\* apresentou diferença estatística significativa

O resultado da aplicação do teste de Dunnet mostrou que os tratamentos 4% e 8%, levaram a aumento significativo no peso das minhocas ( $p < 0.01$ ), enquanto os tratamentos 12%, 16% e 20%, não resultaram em alterações significativas no peso dos organismos, quando comparados ao controle.

Apesar da CL50 ser igual a uma concentração de 16,25% de composto de lixo no TAS, ressalta-se que este resultado deve ser analisado com cautela, uma vez que a perda de peso da minhoca a partir da concentração de 16% foi de 22%. Assim, é possível que essa concentração possa ter efeitos subletais adversos para a espécie *Eisenia andrei*. Mais testes, envolvendo outros parâmetros, como efeitos na reprodução, são recomendáveis.

## CONCLUSÕES

Apesar do composto produzido na Unidade de Compostagem se enquadrar nos padrões de qualidade estabelecidos pela legislação brasileira, os resultados do ensaio agudo realizado com minhocas da espécie *Eisenia andrei* indicaram ecotoxicidade do composto. A partir desse teste, infere-se que somente a avaliação dos parâmetros físicos, químicos e microbiológicos do composto de lixo pode não ser suficiente para assegurar a sua qualidade para ser utilizado na agricultura.

A análise ecotoxicológica, por meio de ensaio agudo com minhocas (*Eisenia andrei*) indicou ecotoxicidade do composto, com taxas de mortalidade significativas ( $p < 0,01$ ) a partir da concentração de 16% de composto em solo artificial tropical. Portanto, esse ensaio mostrou-se eficiente para complementar o diagnóstico final sobre a qualidade do composto.

A alta condutividade elétrica ( $CE = 7,45 \text{ mS/cm}$ ) do composto proveniente da Unidade de Compostagem parece ter sido a responsável por sua toxicidade. Dessa forma, sugere-se que o nível de condutividade elétrica seja melhor estudada a fim de que este parâmetro possa ser incluído na legislação brasileira para avaliar a qualidade do composto de lixo. Para este estudo foi identificado um valor limite de  $2 \text{ mS/cm}$ , que está de acordo com o valor recomendado por Klar (1988).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABREU JUNIOR., C. H.; MURAOKA, T. LAVORANTE A. F. & ALVAREZ, V. F. C. Condutividade elétrica, reação do solo e acidez potencial em solos adubados com composto de lixo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 635-647, 2000.
2. ABREU JUNIOR, C.H.; BOARETTO, A.E.; MURAOKA, T.; KIEHL, J.C. Uso agrícola de resíduos orgânicos potencialmente poluentes: propriedades químicas do solo e produção vegetal. **Tópicos Ciência do Solo**, 4:391-470, 2005
3. ALVARENGA, P.; PALMA, P.; GONÇALVES, A. P.; FERNANDES, R. M.; CUNHA-QUEDA, A. C.; DUARTE, E.; VALLINI, G. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. **Environmental International**, v.33, p.505-513, 2007.
4. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). **NBR 15537**: Ecotoxicologia terrestre: Ecotoxicidade aguda: Método de ensaios com minhocas. Rio de Janeiro, 2007.
5. EIJSACKERS, H.; BENEKEC, P.; MABOETAC, M.; LOUWD, J.P.E.; REINECKEC, A.J. The implications of copper fungicide usage in vineyards for earthworm activity and resulting sustainable soil quality. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 62, p. 99-111, 2005.
6. ENVIRONMENTAL CANADA (EC). Environmental Technology Centre. Biological Test Method: Tests for Toxicity of Contaminated Soil to Earthworms (*Eisenia andrei*, *Eisenia fetida* or *Lumbricus terrestris*). EPS 1/RM/43. 2004 (with 2007 amendments). 184p. Ottawa, Ontário, Canadá.
7. GARCIA, M. **Effects of pesticides on soil fauna: development of ecotoxicological test methods for tropical regions**. 2004, 291 f. Tese (Doutorado) – Hohen Landwirtschaftlichen Fakultät, Universidade de Bonn.
8. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION (ISO). **ISO 11262-1**. Soil quality: effects of pollutants on earthworms (*Eisenis fetida*). Part 2: Determination of acute toxicity using soil substrate. Genebra: ISO. 1993.
9. JENSEN, J.; DIAO, X.; SCOTT-FORDSMAND, J.J. Sub-lethal toxicity of the antiparasitic abamectin on earthworms and the application of neutral red retention time as a biomarker. **Chemosphere**, v.68, p.744-750, 2007.



10. LUKKARI, T.; AATSINKI, M.; VÄISÄNEN, A.; HAIMI, J. Toxicity of copper and zinc assessed with tree different earthworm tests. **Applied Soil Ecology**, v.30, p 133-146, 2005.
11. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). **Instrução Normativa nº 23** - aprova as definições e normas sobre as especificações e as garantias, as tolerâncias, o registro, a embalagem e a rotulagem dos Fertilizantes Orgânicos simples, mistos, compostos, organominerais e biofertilizantes destinados à Agricultura. 2005. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=13025>. Acesso em: nov de 2006
12. MOREIRA, R.; SOUSA, J.P.; CANHOTO, C. Biological Testing of a digested sewage sludge and derived composts. **Bioresource Technology** (2008), doi: 10.1016/j.biortech.2008.02.046
13. NUNES, M.E.T. **Avaliação dos efeitos de agrotóxicos sobre a fauna edáfica por meio de ensaios ecotoxicológicos com *Eisenia Andrei* (Annelida, Oligochaeta) e com comunidade natural de solo.** Tese (doutorado). 2010. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental. Escola de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo. São Carlos, SP.
14. ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). **Guideline for Testing of Chemicals n. 207: Earthworm Acute Toxicity Test.** Paris: OECD. 1984.
15. RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic ecotoxicology: methods and application.** London, Hemisphere Publishing Corporation, 666 p. 1995.
16. RÖMBKE, J.; KNACKER, T. **Standardisation of terrestrial ecotoxicological effect methods: an example of successful international co-operation.** J. Soils & Sediments, v. 3, n. 4, p. 237-238, 2003.
17. VERMEULEN, L.A.; REINECKE, A.J.; REINECKE, S.A. Evaluation of the fungicide manganese-zinc ethylene bis (dithiocarbamate) (Mancozeb) for sublethal and acute toxicity to *Eisenia fetida* (Oligochaeta). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.48, p. 183-189, 2001.
18. YEARDLEY, R.B.; LAZORCHAK, J.M.; GAST, L.C. The potential of an earthworm avoidance test for evaluation of hazardous waste sites. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n.0, p. 1532-1537, 1996.
19. ZAGATTO, P.A. Ecotoxicologia. In: ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. (Eds). **Ecotoxicologia Aquática: princípios e aplicações.** São Carlos, RiMa, p. 1-12. 2006.