



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MICROBIOLOGIA APLICADA

INFLUÊNCIA DO HERBICIDA GESAPAX NA ATIVIDADE MICROBIANA
DO SOLO E SUA ECOTOXICIDADE

ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada)

2017

**INFLUÊNCIA DO HERBICIDA GESAPAX NA ATIVIDADE MICROBIANA
DO SOLO E SUA ECOTOXICIDADE**

ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Tese apresentada ao Instituto de Biociências
do campus de Rio Claro, Universidade
Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Biológicas (Microbiologia Aplicada)

Rio Claro- SP

Maio - 2017

620.1122 Régo, Ana Paula Justiniano
R467i Influência do herbicida Gesapax na atividade microbiana
do solo e sua ecotoxicidade / Ana Paula Justiniano Régo. -
Rio Claro, 2017
143 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia

1. Biodegradação. 2. Pesticida. 3. Consórcio microbiano.
4. Surfactante. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: INFLUÊNCIA DA AMETRINA NA ATIVIDADE MICROBIANA DO SOLO E EM MEIO LÍQUIDO UTILIZANDO A RESPIROMETRIA E ENSAIOS DE ECOTOXICIDADE

AUTORA: ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO

ORIENTADOR: EDERIO DINO BIDOIA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. MARTA SIVERO GUILHERME PIRES
Faculdade de Tecnologia / UNICAMP

Profa. Dra. DEJANIRA DE FRANCESCHI DE ANGELIS
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Profa. Dra. REGINA TERESA ROSIM MONTEIRO
Laboratório de Ecologia Aplicada / Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Prof. Dr. CARLOS RENATO CORSO
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro

Rio Claro, 16 de maio de 2017

Título alterado para: Influência do herbicida Gesapax na atividade microbiana do solo e sua ecotoxicidade

Dedico à minha família

Meu salvador (Cristo Jesus), pai (João Justiniano) e mãe (Marina Justiniano)

São as estruturas da minha vida!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me concedeu a vida, a alegria, força, família e amigos.

À minha família, principalmente aos meus pais João e Marina por toda a força e incentivo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, pela oportunidade em ser a sua orientada, por cada reunião de orientação, as quais foram valiosas para o meu aperfeiçoamento acadêmico, sempre me motivando a trilhar o caminho científico.

À minha co-orientadora Prof.^aDr.^a. Cassiana Maria Reganhan Coneglian, por toda contribuição científica, sempre me auxiliando e apoiando, concedendo ensinamentos essenciais.

À Universidade Estadual Paulista (Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Bociências, Departamento de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, pelo acolhimento em sua instituição.

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) conceder o espaço do Laboratório de Ecotoxicologia, para que eu pudesse realizar os ensaios finais necessários.

Ao Rodrigo Pimpinato, técnico do laboratório de Ecotoxicologia, (CENA-USP), por sempre me acompanhar nos ensaios cromatográficos.

Ao Prof. Dr. Fernando Dini Andreote, da Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ), Departamento de Solos, por permitir que realizasse ensaios em seu laboratório.

Ao Me. Pedro Avelino Maia de Andrade por me acompanhar nos ensaios no Departamento de Solos, ESALQ.

Aos meus amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente (Elis Marina Turini, Érica Almeida, Gabriela Quiterio, Graziely Santos, Jaqueline Cruz, José Rubens Moraes Júnior, Paulo Renato Matos Lopes, Renato Nallin Montagnolli), por toda amizade, companheirismo e conselhos concedidos.

Agradeço à Capes pela bolsa concedida.

“Em todas estas coisas, porém, somos mais que vencedores, por meio daquele que nos amou” (Romanos 8:37)

RESUMO

O herbicida Gesapax[®] (ingrediente ativo: ametrina) é utilizado em culturas de cana-de-açúcar para o combate a plantas daninhas. Devido as suas propriedades físico-químicas é encontrado com frequência nos corpos hídricos. Ao adicionar surfactantes químicos ao solo contaminado com compostos orgânico, ocorre uma diminuição da tensão superficial entre o contaminante e a fração solúvel do solo, favorecendo a degradação de compostos orgânicos, uma vez que o mesmo fica de maneira biodisponível à microbiota. Dessa forma, neste trabalho teve por objetivo avaliar a influência do herbicida Gesapax na atividade microbiana em amostras de solo, utilizando o surfactante químico Tween 80, como em forma de bioestimulação e adição de consórcio microbiano como forma de bioaumentação, a fim de atuarem como coadjuvantes no processo de metabolização do herbicida. Avaliou-se a atividade microbiana utilizando frascos respirométricos de Bartha e Pramer e utilizando a técnica de colorimetria com DCPIP. Fez-se a análise da biodegradação do herbicida por meio de ensaio de cromatografia (HPLC) em amostras retiradas dos respirometros. Também, avaliou-se a toxicidade do solo com o herbicida através dos organismos testes *Saccharomyces cerevisiae*, sementes de *Lactuca sativa*, *Eruca sativa* e *Cucumis sativus*, e a mutagenicidade em amostras de solo com a *Tradescantia pallida* (coração púrpura). Fez-se também a quantificação de bactérias e fungos do solo, finalizando com ensaio de biologia molecular, a fim de avaliar a perturbação da presença do herbicida no solo para a estrutura microbiana nos tratamentos. A adição de surfactante ao solo contaminado com herbicida, possibilitou grande aumento da atividade microbiana, em comparação ao solo controle. O mesmo ocorreu nos tratamentos com herbicida e consórcio microbiano. O herbicida foi metabolizado na presença do surfactante e consórcio microbiano. Também houve aumento na quantificação da microbiota do solo na presença desses coadjuvantes da biodegradação e nos ensaios ecotoxicológicos, com sementes diminuiu o potencial tóxico do Gesapax para os outros organismos testes. Por fim, nos ensaios moleculares, por meio de métodos independentes de cultivo, possibilitou observar o impacto do herbicida para a comunidade microbiana, causando grande perturbação no solo. No tratamento que continha herbicida e consórcio microbiano e surfactante causou maior diversificação da comunidade, concluindo que as bactérias atuaram como principal responsável na biodegradação do herbicida Gesapax em solo, sendo auxiliada pela utilização do surfactante, que acelerou

a degradação, bioestimulando a microbiota do solo, além de ser viável para aplicação em campo. Portanto, a utilização de surfactante e consórcio microbiano auxiliou intensamente a metabolização do herbicida, diminuindo os riscos ecotoxicológicos provenientes da sua molécula, promovendo a desintoxicação do solo.

Palavras-chave: Gesapax, consórcio microbiano, surfactante, biodegradação

ABSTRACT

The herbicide Gesapax[®] (active ingredient: ametryne) is used in sugarcane crops to combat weeds. Due to its physico-chemical properties it is frequently found in water bodies. By adding chemical surfactants to the soil contaminated with organic compounds, there is a decrease in the surface tension between the contaminant and the soluble fraction of the soil, favoring the degradation of organic compounds, in a bio-available way. Thus, the objective of this work was to evaluate the influence of the Gesapax herbicide on microbial activity in soil samples, using the chemical surfactant Tween 80, as in the form of biostimulation and addition of microbial consortium as a form of bioaugmentation, to act as adjuvants in the process of metabolizing the herbicide. Microbial activity was evaluated using Bartha and Pramer respirometric flasks and using the DCPIP colorimetric technique. The biodegradation of the molecule was analyzed by chromatography assay (HPLC) on samples taken from the respirometers. Soil toxicity with the herbicide was evaluated through the test organisms *Saccharomyces cerevisiae*, seeds of *Lactuca sativa*, *Eruca sativa* and *Cucumis sativus*, mutagenicity in soil samples with *Tradescantia pallida* (purple heart), quantification of bacteria and fungi soil, finishing with molecular biology assay, to evaluate the perturbation of the presence of the herbicide in the soil to the microbial structure in the treatments. The addition of surfactant to the soil contaminated with herbicide, allowed a great increase of the microbial activity, in comparison to the control soil. The same occurred in the treatments with herbicide and microbial consortium. The herbicide was metabolized in the presence of the surfactant and microbial consortium. There was also an increase in the quantification of the soil microbiota in the presence of these biodegradation coadjuvant's and in the ecotoxicological tests, with seeds decreased the toxic potential of the Gesapax for the other test organisms. Finally, in the molecular tests, through independent cultivation methods, it was possible to observe the impact of the herbicide on the microbial community, causing great perturbation in the soil. However, in the treatment that contained herbicide and microbial consortium and surfactant caused a greater diversification of the community, concluding that the bacteria acted as the main responsible in the biodegradation of the herbicide Gesapax in soil, being aided using surfactant, which accelerated the degradation, biostimulating the microbiota of the soil, besides being feasible for field application. Therefore, the use of surfactant and microbial

consortium helped intensively the metabolization of the herbicide, reducing the ecotoxicological risks of its molecule, promoting the detoxification of the soil.

Keywords: Gesapax, microbial consortium, surfactant, biodegradation

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Percentual de área total de cana-de-açúcar e quantidade de cana-de-açúcar por Estado. Estimativa dezembro/2016	19
Figura 2 - Estrutura química da ametrina	20
Figura 3 - Metabólitos formados da degradação do herbicida ametrina no solo.....	36
Figura 4 - Esquema do respirometro de Bartha e Pramer	41
Figura 5 - Estado de oxido-redução do 2,6-diclorofenol-indofenol. Estado I- oxidado; Estado II- reduzido	45
Figura 6 - Montagem e análise do ensaio de extração da ametrina em solo para posterior análise cromatográfica	48
Figura 7 - Produção de CO ₂ acumulado, após 132 dias, com diferentes concentrações de herbicida com adição de surfactante e consórcio microbiano	49
Figura 8 - Ensaio colorimétrico com solo, herbicida, consórcio microbiano e surfactante (600 nm)	66
Figura 9 - Análise cromatográfica antes e após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer.....	58
Figura 10 - Produção acumulada de CO ₂ pelo tempo de incubação de cada tratamento respirometrico.....	63
Figura 11 - <i>T. pallida</i> para ensaio de mutagenicidade ambiental.....	76
Figura 12 – Ensaio de mutagenicidade com <i>T. pallida</i> , na presença de diferentes concentrações de herbicida como também nos tratamentos antes e após o ensaio de biodegradação.....	77
Figura 13 - Preparo da suspensão de <i>S. cerevisiae</i>	77
Figura 14 - Montagem e leitura do ensaio com <i>S. cerevisiae</i>	78
Figura 15 - Célula em formato de tétrade.....	82
Figura 16 – Resultado do ensaio de mutagenicidade com <i>T. pallida</i> , antes e após a contaminação do solo contaminado com o herbicida, 132 dias	83
Figura 17 – Inibição no crescimento da raiz de <i>E. sativa</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida.....	85
Figura 18 - Índice de germinação de <i>E. sativa</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida	86

Figura 19 – Inibição no crescimento da raiz de <i>L. sativa</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida.....	88
Figura 20 - Índice de germinação de <i>L. sativa</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida	88
Figura 21 - Inibição da raiz de <i>C. sativus</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida.....	90
Figura 22 - Índice de germinação de <i>C. sativus</i> na presença de diferentes concentrações do herbicida.....	90
Figura 23 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para a semente de <i>E. sativa</i>	92
Figura 24 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para a semente de <i>L. sativa</i>	95
Figura 25 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para a semente de <i>C. sativus</i>	97
Figura 26 - Amostras de DNA extraídos do solo, contendo tampão de corrida e marcador.....	110
Figura 27 - Aparecimento de amplicons do gene 16S DNAr de bactéria, após a separação por DGGE.....	114
Figura 28 - Análise das coordenadas principais (PCoA) para os tratamentos mais efetivos no processo de biodegradação da molécula do herbicida em solo.....	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características físico-químicas do herbicida ametrina.....	20
Tabela 2 - Classificação dos herbicidas quanto à persistência no ambiente.....	27
Tabela 3 - Umidade, capacidade de retenção de água, massa de solo e volume de líquidos	42
Tabela 4 - Tratamentos utilizados no ensaio de respirometria, em solo arenoso, com aumento gradativo da quantidade de adição de herbicida, surfactante e consórcio microbiano.....	44
Tabela 5 - Tratamentos utilizados no ensaio de colorimetria, em solo arenoso, com adição de herbicida Gesapax (6,25 µg/mL), surfactante e consórcio microbiano	46
Tabela 6 - Valores de CO ₂ acumulado após 132 dias.....	52
Tabela 7 - Porcentagem de decaimento da concentração de DCPIP ao longo do tempo	56
Tabela 8 - Valores obtidos do HPLC no tempo zero e no tempo 132 dias de incubação do solo contaminado com herbicida	60
Tabela 9 - Valores de porcentagens das diminuições na concentração de herbicida antes e após a biodegradação.....	62
Tabela 10 - Valores de Bmax, BmaxT e R ² obtidos do modelo matemático do processo de biodegradação de herbicida	67
Tabela 11 - Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo, após o término do ensaio de respirometria (132 dias). Tempo inicial refere-se logo após a contaminação do solo com o herbicida.....	80
Tabela 12 - Valores de dose resposta (CE50) do herbicida na presença das três espécies de sementes.....	100
Tabela 13 - Ensaio de toxicidade com <i>S. cerevisiae</i> em diferentes concentrações de herbicida Gesapax.....	102
Tabela 14 - Ensaio de toxicidade com <i>S. cerevisiae</i> após o término do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer	103
Tabela 15 - Amostras de solo utilizadas no ensaio de análises moleculares	108
Tabela 16 – Protocolo de reação para a primeira amplificação por PCR.....	111
Tabela 17 - Protocolo de reação para a primeira amplificação por PCR.....	111

LISTA DE ABREVIATURAS

B_{max} Valor máximo de biodegradação previsto

B_{max}T Tempo estimado para o valor máximo de biodegradação previsto

DCPIP 2,6-diclorofenol-indofenol

DGGE Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*)

dNTPs Desoxirribonucleotídeo trifosfato

PCA *Plate Count Agar*

PCoA Análise de coordenadas principais
(*Principal Coordinates Analysis*)

PCR Reação em cadeia de polimerase
(*Polymerase Chain Reaction*)

UFC Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA	18
1.1 Características do herbicida ametrina (Nome comercial: Gesapax).....	19
1.2 Comportamentos dos herbicidas no ambiente	21
1.2.1 Processo de retenção de moléculas de herbicida em frações do solo.....	23
1.2.2 Transformação de moléculas de herbicida no ambiente.....	24
1.2.3 Transporte de moléculas de herbicida no ambiente.....	25
1.3 Surfactantes químicos	30
1.4 <i>B. subtilis</i>	31
2 OBJETIVOS.....	32
2.1 Objetivos gerais	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
CAPÍTULO 1	34
Avaliação da atividade microbiana em solo com aplicação do herbicida Gesapax em solo em diferentes metodologias	34
1. INTRODUÇÃO.....	34
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.2.1 Material.....	38
3.2.1.1 Solo.....	38
3.2.1.2 Determinação da umidade no solo (U)	38
3.2.1.3 Determinação da capacidade máxima de campo (CC).....	38
3.2.1.4 Determinação da quantidade de solo a ser pesada para utilização no ensaio de respirometria	39
3.2.1.5. Determinação do volume de água a ser adicionado em cada respirometro39	
3.2.1.6 Herbicida Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina).....	39
3.2.1.7 Inóculo de <i>B. subtilis</i>	40
3.2.1.8 Ensaio de respirometria	40
3.2.1.9 Solução de surfactante químico Tween 80	41
3.2.2 Métodos	42
3.2.2.1 Umidade, capacidade de retenção de água, massa de solo e volume necessário de líquido	42
3.2.2.2 Análise físico-química do solo	42
3.2.2.3 Inóculo de <i>B. subtilis</i>	42
3.2.2.4 Consórcio microbiano.....	43
3.2.2.5 Respirometria de Bartha e Pramer.....	43
3.2.2.5 Atividade microbiana do solo com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) .. 45	
3.2.2.6 Análise de cromatografia por high performance liquid chromatography (HPLC) em solo antes e após ensaio de respirometria de Bartha e Pramer	46

3.2.2.6.1	Extração do herbicida ametrina do solo	47
3.2.2.7	Modelagem matemática dos ensaios de atividade microbiana com respirometria de Bartha e Pramer	48
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
3.3.1	Respirometria de Bartha e Pramer	49
3.3.3	Ensaio colorimétrico com DCPIP	54
3.3.4	Análise de cromatografia por HPLC da biodegradação de Gesapax em solo, antes e após ensaio de respirometria de Bartha e Pramer	57
3.3.5	Modelagem matemática.....	63
CAPÍTULO 2	69
	Avaliação da ecotoxicidade antes e após a biodegradação do herbicida Gesapax	69
1.	INTRODUÇÃO.....	69
4.1.1	Mutagenicidade para <i>Tradescantia pallida</i>	71
4.1.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	71
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
4.2.1	Material.....	73
4.2.1.1	Meios de cultura	73
4.2.1.1.1	Plate Count Agar (PCA).....	73
4.2.1.1.2	Sabouraud Dextrose Agar.....	73
4.2.1	Soluções.....	73
4.2.1.2.1	Solução salina 0,85%	73
4.2.1.2.2	Solução de sulfato de zinco 0,05 M.....	73
4.2.1.2.3	Solução de Methyl Methanesulfonate	74
4.2.1.2.4	Solução de Carnoy.....	74
4.2.1.2.5	Preparo de pellets de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
4.2.2	Métodos	74
4.2.2.1	Obtenção da fração solúvel do solo em água	74
4.2.2.2	Quantificação de micro-organismos do solo antes e após a biodegradação do herbicida	74
4.2.2.3	Ensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>Eruca sativa</i> , <i>Lactuca sativa</i> e <i>Cucumis sativus</i>	75
4.2.2.4	Ensaio de mutagenicidade com <i>Tradescantia pallida</i>	76
4.2.2.5	Ensaio com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	77
4.2.2.6	Análise estatística	78
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
4.3.1	Quantificação da microbiota após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer	79
4.3.2	Ensaio de mutagenicidade com <i>Tradescantia pallida</i>	82

4.3.3 Ensaio de fitotoxicidade com sementes de <i>Eruca sativa</i> , <i>Lactuca sativa</i> e <i>Cucumis sativus</i> na presença do herbicida Gesapax.....	85
4.3.3.1 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Eruca sativa</i>	85
4.3.3.2 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i>	87
4.3.3.3 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Cucumis sativus</i>	89
4.3.3.4 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i> , <i>Eruca sativa</i> e <i>Cucumis sativus</i> após 132 dias de incubação em frascos respirométricos de Bartha e Pramer.....	91
4.3.3.4.1 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Eruca sativa</i>	91
4.3.3.4.2 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i>	94
4.3.3.4.3 Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Cucumis sativus</i>	97
4.3.3.4.4 Considerações finais do ensaio de fitotoxicidade com sementes	100
4.3.4 Ensaio de toxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	102
4.3.4.1 Ensaio de toxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> com diferentes concentrações de herbicida Gesapax	102
5.3.2.1 Ensaio de toxicidade com <i>Saccharomyces cerevisiae</i> referente ao ensaio de respirometria de Bartha e Pramer	103
CAPÍTULO 3	105
Ensaio com biologia molecular por DGGE em solo contaminado com herbicida Gesapax	105
5.1 INTRODUÇÃO.....	105
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	108
5.2.1 Material.....	108
5.2.2 Métodos	109
5.2.2.1 Extração de DNA das amostras de solo.....	109
5.2.2.2 Amplificação por PCR de genes específicos extraídos dos DNAs das amostras de solo	110
5.2.2.2.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana por meio da técnica de PCR-DGGE	112
5.2.2.2.4 Análise estatística	113
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	114
5.3.1 Análise estatística	115
6. CONCLUSÃO.....	118
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121

1. REVISÃO DE LITERATURA

A propagação do uso intenso de agrotóxicos foi um sinônimo do processo de modernização a partir da década de 1970, tornando-se um modelo de produção agrícola, principalmente em países em desenvolvimento com monoculturas (CONSEA, 2012).

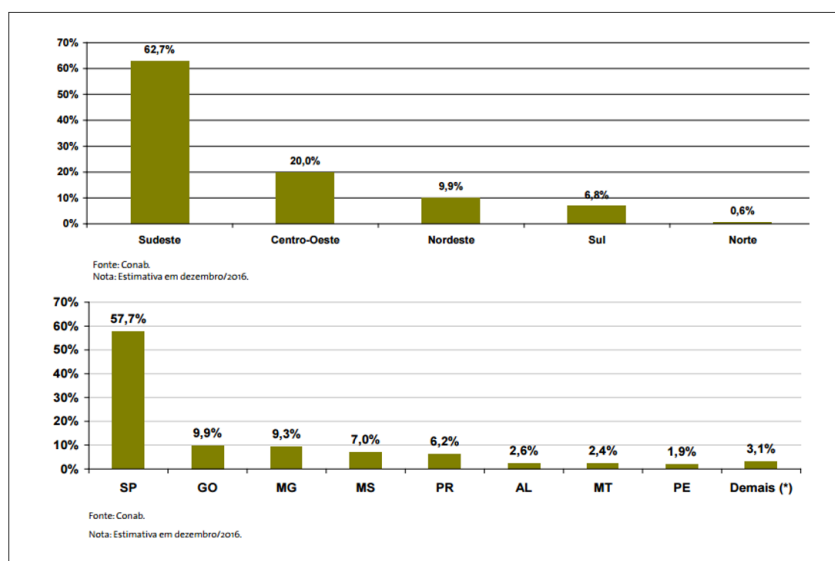
Os agrotóxicos ao serem aplicados atingem as culturas, os trabalhadores rurais como também os consumidores dos produtos agrícolas. Dessa forma, todo o ecossistema juntamente com a cadeia alimentar é afetado por seus potenciais tóxicos, formando um ciclo de envenenamento (ABRASCO, 2015).

O Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos e produtor de cana-de-açúcar do mundo, sendo essencial para o agronegócio brasileiro (CONAB, 2016).

A agroindústria tem se tornado nos últimos tempos, umas das produções mais favoráveis, devido ao esgotamento das jazidas de petróleo e ao seu elevado preço. Além do que, tem ocorrido uma maior conscientização da população em relação ao meio ambiente, decorrente ao uso de combustíveis fósseis, os quais propiciam aumento do aquecimento global juntamente com seus efeitos catastróficos (CONAB, 2016).

Dessa forma, a cana-de-açúcar é um produto promissor (Figura 1), uma vez que é vista como uma das grandes alternativas para o setor de biocombustíveis, em decorrência do aumento da produção de etanol e de seus subprodutos (CONAB, 2016).

Figura 1 - Percentual de área total de cana-de-açúcar e quantidade de cana-de-açúcar por Estado. Estimativa dezembro/2016



(Fonte: CONAB, 2016)

O aumento da demanda internacional por etanol, vindo de fontes renováveis, juntamente com grandes áreas para cultivo e condições de solo e clima favoráveis à plantação, estabelece o Brasil um país promissor para a exportação dessa *commodity* (CONAB, 2016).

O Estado de São Paulo, em 2016, teve maior aumento do cultivo de cana-de-açúcar em todo país. Assim, há a necessidade do aumento da utilização de agrotóxicos, a fim de suprir a necessidade de produção (CONAB, 2016).

O herbicida ametrina é utilizado em cultivo de cana-de-açúcar, principalmente no Estado de São Paulo, tendo sido já detectado em águas superficiais do Estado (LAABS et al., 2001; ARMAS et al., 2007; JACOMINI et al., 2009).

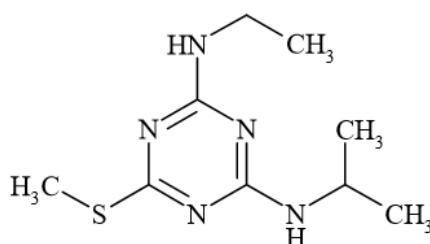
Este herbicida pode ser aplicado às culturas no período de pré emergência, após o corte e pós emergência inicial, após o corte e o aparecimento de plantas infestantes, até mesmo em culturas (SYNGENTA, 2016).

1.1 Características do herbicida ametrina (Nome comercial: Gesapax)

A ametrina ($C_9H_{17}N_5S$) (Figura 2) pertence à família das s-triazinas, constitui um dos cinco herbicidas mais utilizados no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. Trata-se de um herbicida seletivo, sendo aplicado no controle de plantas daninhas, com características

expressas na Tabela 1. Este apresenta capacidade de inibir a fotossíntese e outros processos enzimáticos, sendo absorvido pelas folhas e raízes com translocação no xilema e acumulação nos meristemas apicais e nos cloroplastos (USEPA, 2005).

Figura 2 - Estrutura química da ametrina



(Fonte: USEPA, 2005)

TABELA 1 - Características físico-químicas do herbicida ametrina

Nome comum	Meia Vida (Dias)	Solubilidade (H ₂ O) à 20-25°C (mol/L)	Pressão de vapor Pa	pKa 21°C
Ametrina	70-129	200	1,12x10 ⁻⁴	4,1

(Fonte: Adaptação de RODRIGUES e ALMEIDA, 2011; USEPA, 2005)

A ametrina é ligeiramente solúvel em água, como também na maior parte dos solventes orgânicos tais como acetona, cloreto de metileno, metanol, tolueno, n-octanol e n-hexano, sendo classificada como tóxica (Classe III) para peixes de água doce e invertebrados (GAO et al. 2009; RODRIGUES e ALMEIDA, 2011; USEPA, 2005).

Desde os anos de 1950, os herbicidas triazínicos têm sido utilizados para o controle de ervas daninhas e gramíneas, em diversas culturas, e se tornaram mais eficientes para o manejo de ervas daninhas do que outros herbicidas, como o ALS-inibidores e o glifosato. A atividade residual após aplicação é de oito a dez semanas na maioria das situações de cultivo (USEPA, 2005; VANDERHEYDEN, DEBONGNIE e PUSSEMIER, 1997).

Em 1964, o herbicida ametrina foi registrado para uso de controle de plantas daninhas nos Estados Unidos. É um potente contaminante da água, pois apresenta elevado

potencial de escoamento, média persistência em solo, ocorrendo baixos deslocamentos para as regiões ao seu redor, hidrólise lenta, de baixa a moderada solubilidade em água e a forte adsorção a matéria orgânica (USEPA, 2005).

A biodegradação da ametrina ocorre principalmente por cometabolismo, ou seja, quando o composto orgânico é metabolizado por micro-organismos, mas este não serve como nutriente ou fonte de energia para o cometabolizante, não respondendo em crescimento microbiano (PRATA et al., 2001; RODRIGUES et al., 2010).

Durante a pulverização dos herbicidas sobre as culturas, uma grande quantidade muitas vezes não atinge o seu alvo, sendo transportados para outros compartimentos ambientais. A dissipação do herbicida ametrina no ambiente ocorre através de escoamento superficial, adsorção às partículas do solo, lixiviação, transformação (degradação) e volatilização (MCDONALD et al., 1999; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

1.2 Comportamentos dos herbicidas no ambiente

Após a aplicação do herbicida ele pode sofrer processo de retenção, como adsorção e absorção, processos de transformação, como a degradação biótica e abiótica, e processos de transporte, como a lixiviação, volatilização e escoamento superficial, sendo de extrema importância o conhecimento desses processos, a fim de delinear projetos de monitoramento ambiental (SPADOTTO, MATALLO e GOMES, 2003; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

Os fatores que interferem na mobilidade dos herbicidas no solo são a dose aplicada do composto, sua solubilidade em água, fator de adsorção às partículas do solo, fatores ambientais como a temperatura, quantidade de precipitação após a aplicação do herbicida no solo, a capacidade de drenagem do solo, a sua textura e o teor de matéria orgânica (CRUCIANI et al., 1996; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

Propriedades físico-químicas dos herbicidas como a pressão de vapor (P_v), a solubilidade em água (S) e o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), também são fatores que influenciam no comportamento dos mesmos no solo. A pressão de vapor é a medição da quantidade de pressão requerida à temperatura em que a fase de vapor está em equilíbrio com a fase líquida. Portanto, quanto maior a pressão de vapor de um herbicida, maior será a sua volatilização, resultando em menor contaminação do solo, entretanto poderá causar poluição atmosférica (BARRIGOSI, LANNA e FERREIRA, 2005; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

A solubilidade em água é a quantidade máxima em que um composto orgânico se dissolve em água a certa temperatura e pH. Herbicidas que apresentam alta solubilidade em água, baixa sorção e alta lixiviação são mais propensos a causarem a contaminação dos corpos d'águas (MARTINS, LOPES e ANDRADE, 2013).

O coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) é a medida da lipofilicidade de um composto, como a razão da concentração do mesmo, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol (SILVA e FERREIRA, 2003). Portanto, é a concentração de herbicida presente na fase n-octanol saturada em água e a concentração saturada em água em n-octanol (BARRIGOSI, LANNA e FERREIRA, 2005; CARMO et al., 2013; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O K_{ow} é usado frequentemente como indicador de potencial de bioacumulação de um composto. Os pesticidas com K_{ow} menor que 2,7 possuem baixa bioacumulação, de 2,7 a 3,0 são moderados e maiores que 3,0 altamente bioacumuláveis (SCHULMEYER-KOCH et al., 2012). Herbicidas com coeficiente de partição octanol-água acima de 10.000 possuem maior capacidade de acumulação em organismos (BARRIGOSI, LANNA e FERREIRA, 2005; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

Outro fator que influencia as ações dos herbicidas no ambiente é o solo, que é a camada terrestre na qual existe o desenvolvimento do meio natural, juntamente com propriedades físicas e químicas, tais como pH, capacidade de troca de cátions, teor de matéria orgânica (COSTA, 2004; BERTONI e NETO, 2010).

A matéria orgânica refere-se a restos de plantas e outros organismos, em estado mais ou menos avançado de alteração, os quais tem influência nas propriedades físicas, químicas, biológicas, e no processo de sorção dos herbicidas no solo, sendo controlada pelo tipo da população microbiana e por seu metabolismo, além das condições ambientais (AHMAD et al., 2001; BERTONI e NETO, 2010; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

Um dos principais indicadores da sua qualidade do solo, é a composição de resíduos vegetais e animais em diferentes estágios de decomposição, sendo fonte de energia principalmente na forma de carbono e nitrogênio para toda a comunidade microbiana local, as quais são responsáveis pela decomposição e reciclagem de nutrientes como também a disponibilidade desses nutrientes às plantas (MACHADO e MACHADO, 2009).

O potencial hidrogênionico (pH) do solo possui a capacidade de interferir na estabilidade dos minerais de argila, na capacidade de troca iônica, como também na

degradação biótica e abiótica (ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014). Em áreas de solos de caráter menos ácido, favorecem a biodegradação de herbicidas em sua forma molecular, pois a sorção é maior em condições ácidas. Exemplos desses compostos são os pesticidas bentazon e o clorimuron (SPADOTTO et al., 2003).

1.2.1 Processo de retenção de moléculas de herbicida em frações do solo

A retenção é a capacidade de partículas do solos em evitar a mobilização de moléculas de compostos orgânicos, dividindo-se em absorção (por organismos vivos) e adsorção ou sorção (desaparecimento da molécula), sendo controlado por transformações químicas e biológicas, influenciando no transporte dessas moléculas. A adsorção compreende-se de um processo interfacial, em que ocorre a adesão ou atração entre camadas iônicas ou moleculares em certa superfície (KOSKINEN e HARPER, 1990; PRATA e LAVORENTI, 2000; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

A absorção é a entrada do herbicida nas partículas do solo, o qual pode ser acumulado e metabolizado por uma planta ou um organismo vivo (PRIMO, MENEZES e SILVA, 2011; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O processo de adsorção é a interação da molécula do herbicida (soluto) da fase líquida com a superfície das partículas da fase sólida do solo, afetando a sua biodisponibilidade e persistência dos pesticidas no solo (ANDRADE et al., 2010a; BARIZON, 2004; CORREIA et al., 2007; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

Os fatores que interferem no processo de adsorção são as características físico-químicas dos herbicidas, como também as dos colóides do solo, a constante de dissociação do composto, a sua solubilidade em água, o pH, a temperatura, teor de umidade do solo, e o tipo de formulação do composto do herbicida (ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

A fase reversa da adsorção é denominada de dessorção, em que uma molécula é liberada, ficando em equilíbrio com a solução do solo. O fenômeno conhecido quando a energia de ligação na dessorção é maior que a energia de ligação na sorção, sendo denominada de histerese, a qual resulta na mobilidade da molécula do herbicida (BARIZON, 2004).

O processo de adsorção pode limitar a contaminação dos corpos d'água causada pela presença das moléculas dos herbicidas, contudo pode diminuir a eficiência destes quando são aplicados diretamente no solo, e diminuir a sua degradação, afetando a biodisponibilidade, na qual as moléculas são sequestradas através das interações entre

frações de herbicidas e frações no solo. No entanto, com a adição de teores de matéria orgânica ocorre o favorecimento da degradação desses compostos por micro-organismos que atuam por cometabolismo (BARRIUSO et al., 1997; SUDHARSHAN et al., 2012).

Os fatores relacionados com o processo de sorção de herbicidas ocorrem por forças do tipo pontes de hidrogênio e forças de van der Waals, forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas. Os herbicidas triazínicos utilizam forças eletrostáticas (ANDRADE et al., 2010a; PRATA e LAVORENTI, 2000; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O mecanismo de sorção-dessorção é um dos principais fatores que influenciam no comportamento dos herbicidas no ambiente (MUDHOO e GARG, 2011).

A sorção de triazinas por matéria orgânica e frações do solo mineral envolve mecanismos físicos e químicos devido à coexistência de sítios heterogêneos de sorção em cada componente do solo, e a intensidade de adsorção está relacionada com as características dos herbicidas tais como estrutura química, lipofilicidade e constante de ionização (MUDHOO e GARG, 2011).

1.2.2 Transformação de moléculas de herbicida no ambiente

A transformação do herbicida no ambiente pode ocorrer de forma biótica, a partir da degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade metabólica dos micro-organismos e plantas alóctones ou autóctones, e de forma abiótica, através da ação de componentes físicos do meio ambiente, como fotodegradação e degradação química (RODRIGUES e ALMEIDA, 2011; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

A degradação depende das características do próprio solo e das características físico-químicas da molécula do herbicida. Fatores como a presença de moléculas que contém halogênios ou anéis aromáticos na sua estrutura, solos com altos teores de matéria orgânica, fazem com que os compostos dos herbicidas se tornem mais persistentes no ambiente, pois sofrem processo de sorção (FLORES et al., 2004; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

A biodegradação é o processo onde os micro-organismos se adaptam ao xenobiótico, produzindo enzimas específicas à degradação da molécula, denominada de “fase lenta”, seguida por um período de “enriquecimento”, onde ocorre aumento da população microbiana resultante da utilização do composto como fonte de energia (ALEXANDER, 1999; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012).

Os fatores de crescimento essenciais para a comunidade microbiana são as vitaminas, proteínas tais como as purinas, pirimidinas e os aminoácidos. Estes nutrientes podem ser formados pelos próprios micro-organismos, por resíduos orgânicos e até mesmo por excreções das raízes de vegetais (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

No período em que a degradação do composto está ocorrendo, espera-se o aumento da população microbiana, pois estes são os responsáveis pela transformação dos herbicidas. Isto pode ser averiguado através da estimativa do número populacional de micro-organismos, o qual pode ser realizado mediante a sua quantificação do solo (RÉGO, et al., 2014).

A biodegradação do herbicida atrazina resulta em mais de 15 metabólitos, a hidrólise é um dos principais mecanismos de degradação em que ocorre a formação do metabólito denominado de Hidroxiatrazina (HYA), e também pode ocorrer através da N-desalquilação das cadeias laterais da estrutura resultando na formação de Desethylatrazine (DEA) e Desisopropilatrazina (DIA). O metabólito HYA é o que sofre maior retenção nas partículas do solo, portanto apresenta menor mobilidade. No entanto, os metabólitos DEA e DIA apresentam maior mobilidade nas frações do solo e solubilidade em água. Durante a degradação da atrazina por hidrólise no átomo de carbono, o cloro é substituído por uma hidroxila, e HYA é formada imediatamente em solos ácidos, que possui também efeito herbicida (MUDHOO e GARG, 2011).

1.2.3 Transporte de moléculas de herbicida no ambiente

O processo de transporte determina a movimentação do herbicida no ambiente e pode ser influenciado pelo processo de sorção, volatilização, lixiviação e escoamento superficial (Runoff). Além desses fatores o tipo de material constituinte do solo e sua granulometria, contribuem para o transporte de poluentes, além do tamanho das partículas, e o grau de compactação dos solos. Desse modo, o transporte e mobilidade de poluentes no solo dependem também da forma e tamanho das partículas que o compõem, assim como o seu grau de compactação (COSTA, 2004; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O processo de lixiviação engloba o carreamento das moléculas do herbicida em solução por meio da força gravitacional, em direção as águas subterrâneas, bem como propriedades de sorção e persistência do herbicida, teor de matéria orgânica ou argila presente no solo, a solubilidade da molécula do herbicida e a quantidade de água que se

movimenta no perfil do solo, propriedades físicas do solo, como densidade, porosidade e permeabilidade, influenciam os processos de lixiviação (FONTES et al., 2004; SPADOTTO, 2003; INOUE et al., 2003; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

Em alguns casos nas áreas de plantio direto, o potencial de lixiviação do herbicida é mais elevado, sendo resultante da alta quantidade de macro poros, canais no perfil do solo formados por macrofauna e por raízes, como também da maior quantidade de matéria orgânica peculiar destas áreas e principalmente em áreas em condição de saturação hídrica. Fatores como quantidade da cobertura do solo com palha auxiliam na diminuição da lixiviação (FERRI e VIDAL, 2003; FONTES et al., 2004; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

O escoamento superficial (Runoff) acarreta na movimentação do herbicida ao longo do perfil do solo em declive, com o auxílio da água da chuva ou o vento, em direção aos rios e lagos, favorecendo a contaminação das águas superficiais (SPADOTTO, 2003; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

A volatilização distribui o herbicida que está contido na porção terrestre para a atmosfera, que pode ser mensurado por meio da pressão de vapor (Pva), sendo possível determinar a sua utilidade de aplicação em uma área de clima seco (SILVA e FERREIRA, 2003; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

O uso indiscriminado de herbicidas acarreta na contaminação de águas subterrâneas e superficiais por fontes difusas. Estudos revelam que o herbicida ametrina já foi detectado em águas brasileiras, como rio Corumbataí no interior do Estado de São Paulo (DANTAS et al., 2009; ARMAS et al., 2007).

Nas águas do rio Corumbataí foi detectada a presença do herbicida ametrina no período de 2004 e 2005. Os níveis mais elevados do herbicida ocorreram em períodos de chuvas, não coincidindo com o período de maior de aplicação (ARMAS et al., 2007).

Estudos na região Centro-Oeste do Brasil, que possui intensiva atividade agrícola e mecanizada, na região do Pantanal com abundância de água doce e grande biodiversidade, relatam a presença do herbicida ametrina em águas superficiais e também em amostras de sedimentos, com mais de 12% de detecção. Esse fato foi atribuído ao cultivo regional e intenso de cana-de-açúcar nas imediações da bacia superior do rio São Lourenço (LAABS et al., 2001).

No sul da Flórida, nos Estados Unidos, na década de 90, o herbicida ametrina foi detectado em águas superficiais e em amostras de sedimentos. As concentrações

diminuíam no período de inverno devido à minimização das chuvas (PFEUFFER e RAND, 2004).

Nos anos de 1991 e 1993, estudos foram realizados nas águas do Méléarchez, na ilha de Martinica-França, detectaram a presença de resíduos de herbicidas triazinas em rios, tais como a ametrina e a simazina (KOSKINEN e HARPER, 1990).

Torna-se importante o conhecimento do comportamento dos herbicidas no ambiente, como propriedades físico-químicas do solo e da molécula, taxa de biodegradabilidade e sorção, para estudar o tempo de permanência como também sua disponibilidade no solo, para que desta maneira possa realizar o diagnóstico sobre o risco de contaminação ambiental por seu transporte no ambiente (SILVA et al., 2012).

As avaliações da eficiência, persistência e da magnitude do grau dos impactos causados pelos herbicidas são observadas através do tempo de permanência no solo, assim como da degradação. A persistência de um herbicida está relacionada com a sorção deste a superfície de partículas presentes no solo e sua biodegradação, o qual utiliza micro-organismos do solo para a mineralização do composto orgânico (PATHAK e DIKSHIT, 2012).

O período de tempo em que a substância permanece inalterada é expresso como a *meia vida*, tempo para que a concentração inicial seja reduzida à metade (ANDRADE et al., 2010b; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014). Mediante o fator de persistência no ambiente, os herbicidas podem ser classificados em não persistentes, moderadamente persistentes e persistentes ou recalcitrantes (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação dos herbicidas quanto à persistência no ambiente

Classificação	<i>Meia vida</i>
Não persistentes	Inferior a 3 meses
Moderadamente persistentes	3 a 12 meses
Persistentes ou recalcitrantes	Superior a 12 meses

(Fonte: MOREIRA e SIQUEIRA, 2006)

A alta concentração de um composto herbicida no solo pode tornar um produto biodegradável em persistente, pois irá superar a capacidade de degradação dos micro-organismos, acumulando-se no ambiente. Mais da metade dos estados americanos apresentavam solos contaminados com altas concentrações dos herbicidas triazínicos, decorrente do seu caráter de persistência (DANTAS et al., 2009).

Os efeitos adversos decorrentes da aplicação de herbicidas podem ocorrer na comunidade biótica do solo, com prejuízo aos micro-organismos benéficos, ou podem ocasionar em desequilíbrios nos processos bioquímicos, como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes (TUFFI et al., 2005; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

A qualidade do solo interfere na dinâmica populacional de micro-organismos. Dentre os fatores, o manejo pode comprometer a capacidade de manter-se estável como também de sustentabilidade do sistema ecológico, mas isso pode ser menos severo se for adotado em curto período de tempo. Estes efeitos são percebidos através dos critérios bioquímicos e microbiológicos (RAIJ, 2011; TIRONI et al., 2009; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O solo apresenta um balanço entre as frações líquida, gasosa e sólida. A fração líquida compreende a água e materiais dissolvidos, a fração gasosa compreende os gases atmosféricos e a fração sólida são os minerais, raízes, macro e micro-organismos metabolicamente ativos ou inativos e matéria orgânica. A fração sólida representa cerca de 50% do volume total do solo, dividindo-se em 45% de minerais e de 1 a 5% de matéria orgânica e organismos vivos (ARAÚJO et al., 2008; BERTONI e NETO, 2010; RAIJ, 2011).

Os fatores abióticos limitam a sobrevivência e a atividade dos micro-organismos no solo. Os principais são a temperatura, pH, luminosidade, salinidade, fontes de energia e substratos orgânicos, nutrientes e elementos tóxicos. O pH é um importante determinante para a atividade e desnitrificação dos micro-organismos. Ações como intensa adubação, decomposição da matéria orgânica contribuem para a modificação do pH do solo (ARAÚJO et al., 2008; ZAMBOLIM, SILVA e PICANÇO, 2014).

O potencial hidrogênionico (pH) do solo reflete as condições ambientais do local, sendo que em climas úmidos o pH é ácido em consequência da decomposição da serrapilheira. As atividades humanas contribuem para diminuir o pH do solo através de fertilização incontrolada e a formação de chuva ácida. Em geral o pH varia para a maioria

dos solos brasileiros entre 4,0 e 8,5 (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

Para a microbiota do solo, os valores de pH menores que 5,0 são ideais para as atividades dos fungos, e para as bactérias os valores entre 6,0 e 8,0 permitem melhores atividades (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012). Normalmente as bactérias e os actinomicetos são neutrófilos e basófilos com pH 6,0 e 8,0, e os fungos são acidófilos com valores de pH menores que 5,0. Em solos ácidos ocorrem à toxicidade por manganês e alumínio (ARAÚJO et al., 2008).

A temperatura afeta as reações fisiológicas das células como também das características físico-química do ambiente. As reações microbianas são maiores em temperaturas em torno de 28°C e são inibidas em temperaturas menores que 25°C ou maiores que 35°C (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012).

A descamação de células vegetais e os exsudatos radiculares são o caminho para o transporte de fontes de energia como carbono e nitrogênio aos micro-organismos. Nos exsudatos radiculares encontram-se os compostos aminados, ácidos orgânicos, ácidos graxos e esteróis, fatores de crescimento, açúcares, nucleotídeos, flavononas e enzimas, e compostos miscelâneos (ARAÚJO et al., 2008; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012).

Os gêneros de bactérias predominantes na rizosfera são a *Pseudomonas*, *Achromabactere* *Agrobacterium*. Os fungos micorrizos e patogênicos são influenciados pela rizosfera devido ao número de propágulos. Os principais gêneros são *Fusarium* e *Cylindrocarpon*. Os actinomicetos são menos favorecidos na região rizosférica em relação às bactérias e fungos, devido ao seu crescimento lento e menor competitividade, sendo que os principais gêneros predominantes são *Nocardia* e *Streptomyces* (CARDOSO, TSAI e NEVES, 1992; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012).

Tironi et al. (2009) avaliaram os efeitos de herbicidas ametrina, trifloxysulfuron-sodium e ametrina + trifloxysulfuron-sodium, para a atividade microbiana do solo, nas doses referências de 10, 0,112 e 7,315 + 0,185 mg/dm³ do ingrediente ativo, mediante método respirométrico, durante 15 dias de incubação. Concluíram que a evolução de CO₂ é influenciada pelos herbicidas e doses aplicadas, ocorrendo os maiores efeitos logo após a aplicação do mesmo. Houve diminuição na evolução de CO₂ e biomassa microbiana proporcionalmente ao acréscimo das doses.

Moreno et al. (2007) avaliaram o efeito da aplicação do herbicida atrazina, para a biomassa e respiração microbiana, teor de ATP e atividade de desidrogenase e urease em solo. Concluíram que a variação na atividade microbiana do solo reflete a capacidade dos micro-organismos em responder a aplicação de atrazina em solo semiárido com baixo teor de matéria orgânica. A atividade microbiana aumentou em resposta à adaptação do estresse causado pela alta concentração de herbicida aplicado, bem como, os parâmetros de avaliação aplicados, demonstraram-se sensíveis à presença de atrazina.

O solo é um sistema vivo, dinâmico, aberto e sofre interferências das substâncias orgânicas presentes em suas partículas, uma vez que existem comunidades microbianas que são incapazes de biodegradar algumas moléculas recalcitrantes. Tal percepção é importante para evitar o crescimento da poluição ambiental provenientes das ações antrópicas. Assim, é essencial a utilização de meios coadjuvantes como forma de bioaumentação e bioestimulação da microbiota do solo, a fim de acelerar a desintoxicação do meio (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012; ZAMBOLIM, SILVA e PIKANÇO, 2014).

1.3 Surfactantes químicos

Surfactantes químicos são produtos com a capacidade de alterar as propriedades superficiais e interfaciais de um líquido (BARROS et al., 2007; PRADO et al., 2015). Sua adição pode reduzir a tensão superficial entre o contaminante e a fração solúvel do solo, promovendo a mobilização da fase orgânica residual (SOUZA, PERES e MORAES, 2010).

Eles possuem atividade na superfície da interface entre duas fases tais como ar e água, óleo e água e na superfície de sólidos, possuindo intensa mobilização em baixas tensões interfaciais reduzindo significativamente as forças entre as moléculas do herbicida e a fração do solo (DAVANÇO, PALMU-TANADA e GROSSO, 2007; (GRIPPA et al., 2010).

O surfactante não iônico Tween 80 (Monoleato de sorbitano polioxietileno - $C_{64}H_{124}O_{26}$), são utilizados em sedimentos contaminados por substâncias apolares, resultando na dissolução destas em água, portando possibilitando tratamentos físicos e biológicos. Também são utilizados como aditivos a fim de melhorar o crescimento microbiano e a excreção de algumas enzimas (GRIPPA et al., 2010).

1.4 *B. subtilis*

Diversos tipos de micro-organismos têm sido relatados como sintetizadores de vários tipos de surfactantes, pois possuem as vantagens de ser um agente biodegradável, baixa toxicidade, naturais e serem apropriados para aplicação. Eles podem ser aplicados em alguns processos industriais, tais como produção de fármacos, compostos químicos, cosméticos, como também em processos de biorremediação de ambientes por compostos recalcitrantes ambiental (BANAT et al., 2000; BARROS et al., 2007; QUEIROGA, NASCIMENTO e SERRA, 2003; SINGH, PUROHIT e PARIHA, 2012).

Segundo Barros et al. (2007) “os surfactantes da classe lipopeptídica, são os que apresentam ações mais efetivas. São conhecidos por suas atividades antibióticas, sendo caracterizados aqueles produzidos por *B. subtilis*, incluindo surfactina, iturina, fengicina, liquemisinina, micosubtilisinina e bacilomicina”.

Surfactantes sintetizados por diferentes linhagens de *B. subtilis*, demonstraram eficiência na biorremediação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, na degradação do pesticida endossulfam e de biorremediação de solos altamente contaminados por zinco e cádmio. Desta maneira, podem ser utilizados como agentes solubilizantes e/ou emulsificantes de contaminantes em novas tecnologias de biorremediação (BARROS et al., 2007; MULLIGAN, 2009).

A biorremediação de um local contaminado, está relacionada com a biodisponibilidade da molécula de um composto orgânico aos micro-organismo, ou seja, o grau em que o contaminante está acessível à conversão pelo sistema biológico, em função das propriedades físico-químicas do contaminante e do meio ambiente (SUDHARSHAN et al., 2012).

Em decorrência da persistência do contaminante no ambiente, faz-se necessário a adição de materiais orgânicos ao solo, a fim de promover o aumento da atividade microbiana, proporcionando a aceleração da degradação das moléculas no solo (RÉGO et al., 2014).

Torna-se necessário a utilização de estratégias a fim de auxiliar a atividade microbiana de amostras de solo na presença do herbicida ametrina (Nome comercial: Gesapax), tais como estimulação dos micro-organismos, através de suprimento de nutrientes e, a inoculação de consórcio microbiano enriquecido como forma de bioaugmentação.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar a influência do herbicida Gesapax[®] (Ametrina) na atividade microbiana do solo mediante a utilização de surfactante químico Tween 80 e consórcio microbiano.

2.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos são:

- Utilização de surfactante químico Tween 80 para produzir bioestimulação a comunidade microbiana do solo, a fim de acelerar a biodegradação do herbicida;
- Também a utilização de consórcio microbiano, como forma de bioaugmentação, contendo a mistura de micro-organismos autóctones do solo coletado e adição de *B. subtilis*, a fim de acelerar a biodegradação do herbicida;
- Avaliação da biodegradação do herbicida Gesapax no solo por respirometria comparada com análise de resíduo de ametrina por cromatografia líquida de alta performance (HPLC);
- Avaliação da dinâmica da biodegradação em solo por modelo matemático;
- Correlacionar dados de respirometria em solo e de atividade microbiana pelo método colorimétrico de DCPIP, a fim de concluir sobre os efeitos dos aditivos surfactantes e consórcio microbiano na biodegradação de Gesapax;

- Avaliar a toxicidade do solo com herbicida utilizando os organismos testes como *S. cerevisiae*; sementes de *L. sativa* (alface), de *E. sativa* (rúcula) e de *C. sativus* (pepino), e avaliar a mutagenicidade para *T. pallida* (coração púrpura);
- Avaliação dos micro-organismos do solo pelo plaqueamento de bactérias heterotróficas e fungos, e análise da comunidade microbiana de bactérias por meio da técnica de PCR-DGGE.

CAPÍTULO 1

Avaliação da atividade microbiana em solo com aplicação do herbicida Gesapax em solo em diferentes metodologias

1. INTRODUÇÃO

A ametrina (Nome comercial: Gesapax) é um herbicida com forte potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas em decorrência da sua persistência ambiental, lixiviação e escoamento superficial, o qual pode alterar a comunidade microbiana no solo, provocando desequilíbrio em suas funções no ambiente, como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes, influenciar negativamente na evolução da biomassa no solo, no potencial de solubilização de compostos inorgânicos como também o aumento da quantidade de CO₂ presentes no solo (USEPA, 2005).

O comportamento dos herbicidas pode ser influenciado pela ação dos micro-organismos. Estes podem possuir a capacidade de metabolizar esses compostos através de suas enzimas e transformá-los em energia e nutrientes para a sua sobrevivência (BEIGEL, CHARMAY e BARRIUSO, 1999). A degradação microbiana dos herbicidas geralmente leva à formação de compostos menos tóxicos, CO₂ e/ou água.

Os principais micro-organismos responsáveis pela degradação de herbicidas no solo são as bactérias e os fungos, sendo mais abundante na camada superficial do solo, o qual diminui com a profundidade (MOURA, et al., 2015).

A biodegradação está relacionada com a biodisponibilidade do composto orgânico, ou seja, é o grau em que o contaminante está acessível à conversão pelo sistema biológico, que está em função das propriedades físico-químicas do contaminante e do meio ambiente (SUDHARSHAN et al., 2012).

As principais vias de degradação dos herbicidas triazínicos são a decloração, desalquilação e oxidação. Os produtos hidroxilados como a hidroxiatrazine apresentam caráter menos ácido do que o composto inicial, com poder herbicida e adsorvem com mais rapidez (STIPICEVICS et al., 2009).

Em meados da década de 1990, as bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. ADP e *Nocardioides* sp. C190 foram isoladas e demonstraram rapidez na degradação de herbicidas triazínicos (SHANER et al., 2010).

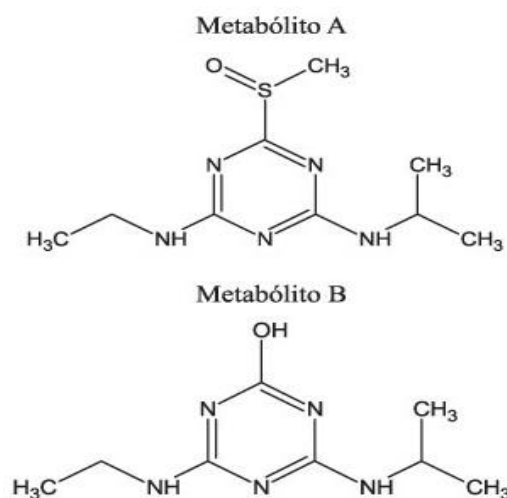
Existe uma variedade de cepas de bactérias envolvidas no processo de degradação das triazinas, a partir da via de hidroxilação seguido pela remoção direta dos grupos alquilamino. No entanto, apenas as bactérias gram-negativas atuam na mineralização completa do anel triazínico, tais como os gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonobacter*, *Chelatobacter* e alguns gêneros ainda não identificados (SATSUMA, 2010).

A enzima AtzA foi encontrada em *Pseudomonas* sp. ADP, com a capacidade de degradar especificamente o herbicida atrazina. Estas enzimas catalisam a primeira etapa da hidroxilação para produzir hidroxilas-triazinas. No entanto, estão distribuídas dentro de um gênero limitado às bactérias gram-positivas degradantes das demais triazinas, como os gêneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e *Nocardioides*. A cepa *Rhodococcus* degrada as triazinas por via N-desalquilação (SATSUMA, 2010).

Severino e Silva (2012) após 120 dias de incubação do herbicida ametrina no solo observaram a formação de dois metabólitos da ametrina.

O metabólito A, denominado como N-ethyl-N'-(1-methylethyl)- 6 (methysulfinyl) -1,3,5- triazine -2,4- diamine e, o metabólito B, denominado como 4-(ethylamino)- 6- [(1-methylethyl) amino]- 1,3,5-triazin-2-ol (Figura 3).

Figura 2 - Metabólitos formados da degradação do herbicida ametrina no solo



(Fonte: SEVERINO e SILVA, 2012)

A fim de acelerar no processo de degradação de contaminantes no solo, tem se utilizado a aplicação de compostos, tais como surfactantes, a fim de estimular a microbiota (BETTIOL et al., 1998; MEDEIROS e LOPES, 2006; SANTOS, 1992; SOUZA e RESENDE, 2003; RÉGO et al., 2014).

Os surfactantes atuam como tensoativos, os quais tem por finalidade aumentar a emulsificação de compostos orgânicos potencializando a sua solubilização, a fim de melhorar a sua biodisponibilidade à microbiota do solo, facilitando a sua biodegradação (MARIANO et al., 2007; PRADO et al., 2015).

Um dos métodos eficazes para a avaliação da atividade microbiana no solo é a respirometria, a qual é definida por Chaui-Berlink e Bicudo (2006) “como termo genérico para designar uma técnica ou um conjunto de técnicas, para a quantificação da respiração aeróbia de organismos vivos intactos, ou seja, é um método de avaliação do processo de biodegradação de resíduos orgânicos, que se baseia na quantificação de O₂ consumido ou CO₂ produzido resultante da degradação da matéria orgânica presente no resíduo”.

O processo de quantificação de CO₂ através da metabolização de fonte de carbono por micro-organismos é um importante recurso na avaliação de sistema biológico como solos contaminados com os mais variados compostos (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Utiliza-se o respirômetro de Bartha e Pramer, o qual é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas, onde ocorrem a biodegradação do composto e

a remoção do CO₂ produzido para a sua quantificação. Este sistema é utilizado para estimar a taxa de respiração no solo ao qual foi adicionado o composto (COSTA, 2009).

O método respirométrico permite analisar a remoção do substrato no ambiente em consequência da demanda biológica de oxigênio necessária para o metabolismo microbiano. A taxa de degradação do substrato é proporcional a taxa de geração de CO₂, portanto o método pode estimar o tempo de estabilização de um composto orgânico presente no solo (BERNARDES, 1999; RÉGO et al., 2014).

A partir da utilização desse método é possível inferir técnicas de manejo como taxas de aplicação e concentração de nutriente. Contudo, é um método que despende de vários dias de análises (RÉGO et al., 2014).

Outro método para análise de contaminante no solo é a colorimetria. O método colorimétrico traz respostas rápidas, sendo baseado na substituição de um mediador de elétrons como oxigênio, sulfatos, entre outros, por um mediador sintético. São processos rápidos e de baixo custo para detectar a atividade microbiana (HANSON et al., 1993; MONTAGNOLLI et al., 2014).

O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é um mediador sintético utilizado para indicar a capacidade dos micro-organismos em degradar hidrocarbonetos. Pode ser utilizado para avaliar a capacidade de culturas puras ou consórcios microbianos em biodegradar compostos orgânicos (HANSON et al., 1993; VAN HAMME et al., 2000; KUBOTA et al., 2008; MONTAGNOLLI et al., 2014).

Dessa forma, é essencial a utilização de ensaios laboratoriais, a fim de compreender os efeitos da contaminação do herbicida em solo a longo prazo e seus efeitos ao ecossistema.

Este capítulo tem por objetivo avaliar a biodegradação do herbicida Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina) em solo, a partir da aplicação de bioaumentadores, tais como consórcio microbiano e a bioestimulação por meio de surfactante, e pelas técnicas de respirometria, colorimetria e cromatografia.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Solo

Utilizou-se solo coletado do *campus* da Unesp, Rio Claro, sem histórico de aplicação de Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina), com características arenosas. Foi coletado a 20,0 cm de profundidade, utilizando-se uma enxada e pá. Peneirou-se o solo, em peneiras de 2 mm de diâmetros, de acordo com CETESB (1984).

2.1.2 Determinação da umidade no solo (U)

Fez-se a determinação da umidade (ABNT, 1999), utilizando placas de Petri e 10,00 g de amostra de solo úmido. A placa de Petri vazia foi previamente pesada (m_p).

A placa mais solo ($m_p + m$) foi seca em estufa, à 105° C, durante 24 horas. Após este tempo, foi deixada em dessecador, até o seu resfriamento de aproximadamente 30 minutos. Após o resfriamento, pesou-se a placa mais solo seco ($m_p + m_s$), e calculou-se o valor da umidade do solo (Equação 1).

$$U = \frac{(m_p+m)-(m_p+m_s)}{(m_p+m_s)-(m_p)} \quad (1)$$

2.1.3 Determinação da capacidade máxima de campo (CC)

Fez-se a determinação da capacidade de campo baseado em ABNT (1999). Para isso utilizou-se solo previamente peneirado e pipetou-se 2,0 mL de água desionizada com pipeta *Pasteur* durante o tempo, cronometrado, de 10 segundos.

Após este tempo, retirou-se o torrão de solo formado e colocou-o em uma placa de Petri, previamente pesada.

Pesou-se o torrão mais a placa de Petri ($m_p + m$) e levado para a estufa de secagem, à 60° C durante 24 horas. Após este período, pesou-se a placa mais solo seco ($m_p + m_s$) e calculou-se o valor da capacidade (Equação 2).

$$CC (\%) = \frac{(m_p+m)-(m_p+m_s)}{(m_p+m_s)-(m_p)} \times 100 \quad (2)$$

2.1.4 Determinação da quantidade de solo a ser pesada para utilização no ensaio de respirometria

Para a determinação da quantidade de solo a ser utilizada, fez-se as pesagens da massa de solo úmido e solo seco, e posteriormente, calculou-se o valor da massa (Equação 3).

$$m = (1 + U) * ms \quad (3)$$

Sendo que:

- m = massa de solo, na umidade atual, a ser utilizada;
- ms = massa de solo seco desejada, g;
- U = umidade atual no solo (kg/kg).

2.1.5 Determinação do volume de água a ser adicionado em cada respirometro

Utilizou-se a capacidade máxima de retenção de água no solo, entre 60 - 70% (Equação 4).

$$Va = \frac{[(0,4-0,6*CRMA)-U]*ms}{100} \quad (4)$$

Sendo que:

- Va = volume de água a ser adicionado ao solo (mL);
- CMRA: capacidade máxima de retenção de água no solo (%);
- U = umidade atual no solo (kg/kg);
- ms = massa de solo seco (g).

2.1.6 Herbicida Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina)

Utilizou-se o herbicida GESAPAX (500 g/L) comercial, com ingrediente ativo ametrina (N-etil-N-(1-metiletil) -6-(metiltio)-1,3,5 triazina- 2,4-diamina), concentrações recomendadas em campo para o cultivo de cana-de-açúcar, sendo:

- 6,25 µg/mL (3L/ha);
- 12,50 µg/mL (6L/ha);

- 125,00 $\mu\text{g/mL}$ (60L/ha).

Calculou-se as concentrações do herbicida, baseado em dados de densidade do solo, volume do frasco de respirometria de Bartha e Pramer, quantidade de herbicida aplicado por hectare. Dados coletados da bula do herbicida comercial.

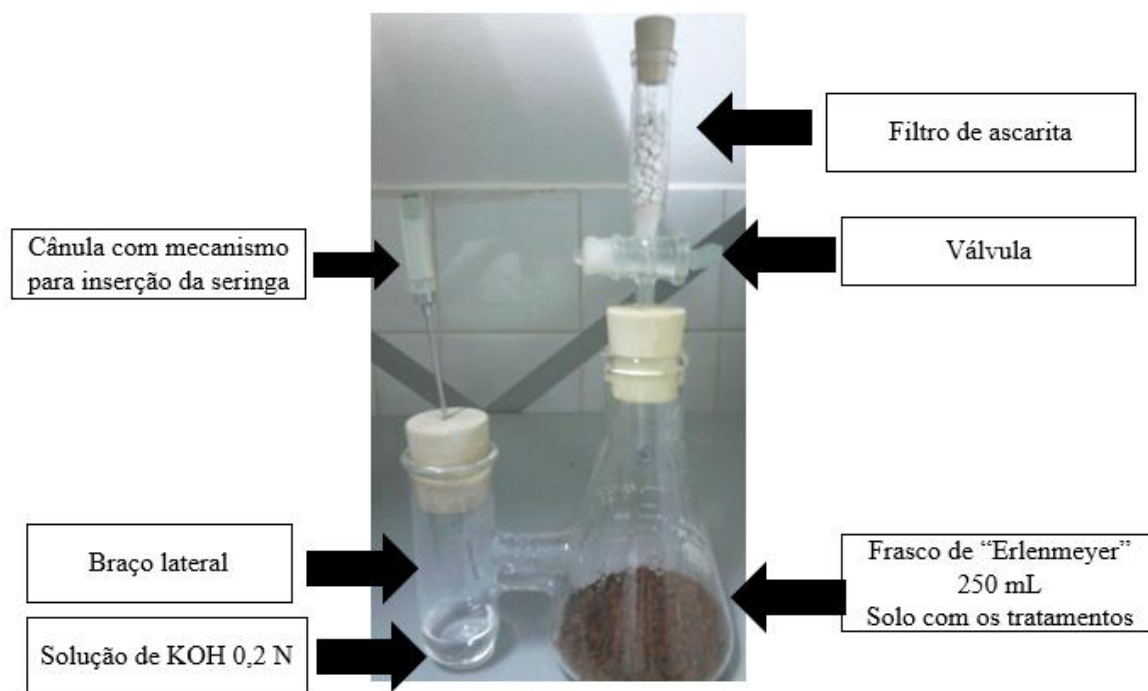
2.1.7 Inóculo de *B. subtilis*

O *B. subtilis* ATCC 6633 foi reativado de uma cultura pura doada da coleção de cultura do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Bioquímica e Microbiologia, UNESP, Rio Claro.

2.1.8 Ensaio de respirometria

O ensaio de respirometria (Bartha e Pramer, 1965) foi realizado baseado na norma técnica ABNT (1999), com respirômetros de Bartha e Pramer (Figura 4) avaliando a geração de CO_2 mg em decorrência do tempo. Os reagentes utilizados para a quantificação de CO_2 foram:

- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 N;
- Solução padrão de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N;
- Solução de carbonato de cálcio (Ca_2CO_3) 0,1 N;
- Solução de cloreto de bário (BaCl_2) 1,0 N;
- Solução indicadora de fenolftaleína;
- Solução indicadora de vermelho-de-metila;
- Água isenta de CO_2 .

Figura 3 - Esquema do respirometro de Bartha e Pramer

(Fonte: Elaborado pela autora)

Os ensaios foram realizados em triplicata. A cada leitura realizada, foi inserido uma cânula para introduzir oxigênio, a fim de promover a recirculação do ar dentro do sistema.

A ABNT (1999) foi cancelada no dia 23 de fevereiro de 2016. Contudo, os ensaios deste trabalho já estavam finalizados. Para tanto, pode substituí-la para norma internacional OECD (2002).

2.1.9 Solução de surfactante químico Tween 80®

Foi utilizado surfactante químico, Synth (lote 100345), como forma de bioestimulação da microbiota do solo, a fim de acelerar o processo de biodegradação do herbicida. Utilizou-se 1% do surfactante, diluído em água desionizada.

2.2 Métodos

2.2.1 Umidade, capacidade de retenção de água, massa de solo e volume necessário de líquido

A Tabela 3 mostra as quantidades de teor de umidade, capacidade de retenção de água e massa necessária de solo em cada respirometro de Bartha e Pramer.

Tabela 3 - Umidade, capacidade de retenção de água, massa de solo e volume de líquidos

Teor de umidade (kg/kg)	Capacidade de campo (%)	Massa de solo necessária (g)	Volume de líquidos (mL)
0,26	21,86	63,00	10,16

(Fonte: Elaborado pela autora)

Com base nesses valores realizou-se a montagem dos respirometros de Bartha e Pramer.

2.2.2 Análise físico-química do solo

Enviou-se as amostras de solo para a realização das análises físico-química do solo, no laboratório do Departamento de Ciência do Solo, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, na Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), na cidade de Piracicaba-SP.

2.2.3 Inóculo de *B. subtilis*

Fez-se sua reativação da cepa de *B. subtilis* em meio caldo nutriente (DIFCO, 2009), durante o período de 24 h a 35°C em incubadora shaker SOLAB sob agitação de 180 rpm.

Após esse período, o meio foi centrifugado com auxílio de uma centrífuga Excelsa Baby I – FANEM, por 5 minutos a 3000 rpm (1,157 g). Descartou-se o sobrenadante, e as células foram ressuspendidas em caldo Bushnell Hass. Fez-se esse processo durante duas vezes.

Para o preparo do caldo nutriente dissolveu-se 8,00 g do reagente em 1000 mL de água desionizada e em seguida o meio foi autoclavado, em autoclave Phoenix.

2.2.4 Consórcio microbiano

Fez-se o enriquecimento do solo com a concentração mais alta do herbicida Gesapax, utilizada no ensaio de respirometria (125,00 µg/mL). Retirou-se 1250,0 µL da concentração (125,00 µg/mL) e adicionou-a em 50,00 g de solo e 100 ml de meio mineral (Bushnell Hass), contidos em frascos de Erlenmeyers de 250 mL. Os frascos foram colocados para incubação a 30° C e agitação constante 180 rpm (Shaker SOLAB) durante 5 dias.

Após esse período, fez-se o plaqueamento até a ordem de 10^{-6} , resultando em $1,2 \times 10^7$ UFC/ g de solo. Utilizou-se solução salina 0,85% de cloreto de sódio, NaCl, para a diluição da amostra. O plaqueamento foi realizado em placas de Petri de vidro, em meio mineral (Bushnell Hass) solidificado com ágar. As placas foram incubadas a 30°C durante 48 horas e observou-se o crescimento das colônias.

Após o crescimento, escolheu-se as colônias morfologicamente diferentes e inoculou-as em 50 mL de meio mineral líquido (Bushnell Hass), sob agitação constante de 150 rpm em mesa agitadora, à 30° C. Após este período, fez-se a mistura com inóculo de *B. subtilis* e posteriormente retirado a alíquota de 3,40 mL para aplicação em solo contidos nos respirometros de Bartha e Pramer.

O caldo Bushnell Haas (BH) foi composto por: 0,20 g/L de sulfato de magnésio, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (CHEMCO P. A.); 0,02 g/L de cloreto de cálcio, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (Vetec P. A.); 1,00 g/L de fosfato dipotássico, K_2HPO_4 (Impex P. A.); 1,00 g/L fosfato mono potássico, KH_2PO_4 (Dinâmica P.A); 1,00 g/L de nitrato de amônia, NH_4NO_3 (VETEC P. A.) e 0,05 g/L de cloreto férrico, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (DINÂMICA P. A.).

2.2.5 Respirometria de Bartha e Pramer

Realizou-se ensaio de respirometria (BARTHA e PRAMER, 1965) com solo arenoso em três diferentes concentrações de herbicida Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina) com adição de surfactante Tween 80 e consórcio microbiano (Tabela 4).

A cada 63,0 g de solo foram utilizados 3,40 mL de inóculo de consórcio microbiano, 3,40 mL de surfactante, 3,40 mL de água desionizada e 78,75 µL de solução de herbicida para a concentração 6,25 µg/mL).

Para a concentração 12,50 µg/mL, adicionou-se 157,5 µL de solução de herbicida, 63,0 g de solo, 3,40 mL de inóculo de consórcio microbiano, 3,40 mL de surfactante e 3,40 mL de água desionizada.

Para a concentração 125,00 µg/mL, adicionou-se 2,90 mL de consórcio microbiano, 2,90 mL de surfactante, 2,90 mL de água desionizada e 1575,0 µL de solução de herbicida.

Tabela 4 - Tratamentos utilizados no ensaio de respirometria, em solo arenoso, com aumento gradativo da quantidade de adição de herbicida, surfactante e consórcio microbiano

Tratamentos	Constituintes
1	Solo controle
2	Controle surfactante
3	Controle consórcio microbiano
4	Controle herbicida 6,25 µg/mL
5	Controle herbicida 12,50 µg/mL
6	Controle herbicida 125,00 µg/mL
7	6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano
8	12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano
9	125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano
10	6,25 µg/mL de herbicida + surfactante
11	12,50 µg/mL de herbicida + surfactante
12	125,00 µg/mL de herbicida + surfactante
13	6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante
14	12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante
15	125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante

(Fonte: Elaborado pela autora)

Mediante o método respirométrico de Bartha e Pramer, o dióxido de carbono (CO₂) gerado durante o processo de respiração microbiana é capturado por uma solução de hidróxido de potássio (KOH) localizada no braço lateral do frasco respirométrico. Fez-se a titulação do KOH residual com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl), após

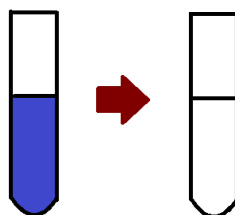
a adição do cloreto de bário (BaCl_2) para precipitar os íons carbonato. Desta maneira, as taxas de produção de CO_2 podem ser calculadas e representadas em função do tempo de incubação. Os ensaios foram conduzidos a temperatura de 28°C , em 5 réplicas.

2.2.6 Atividade microbiana do solo com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP)

O teste colorimétrico com 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) foi realizado utilizando a concentração de 1,000 g/L juntamente, o caldo Bushnell Haas, lido em 600 nm (DIFCO, 2009).

O 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP – VETEC P. A.) é um indicador que altera a sua coloração de incolor para azul quando oxidado em meio líquido. Desta maneira, pode estimar a atividade microbiana através da mudança de coloração do meio (Figura 5), segundo adaptação da metodologia descrita por Bidoia, Montagnolli e Lopes (2010).

Figura 5 - Estado de oxido-redução do 2,6-diclorofenol-indofenol. Estado I- oxidado; Estado II- reduzido



(Fonte: Elaborado pela autora)

O nitrogênio presente na molécula de DCPIP abaixo funciona como um acceptor de elétrons mudando a coloração após esta sofrer redução. A mudança de cor está relacionada com a troca de elétrons, resultante da biodegradação de compostos orgânicos.

A Tabela 5 mostra os tratamentos utilizados no ensaio colorimétrico. O ensaio foi realizado em triplicata.

Tabela 5 - Tratamentos utilizados no ensaio de colorimetria, em solo arenoso, com adição de herbicida Gesapax (6,25 µg/mL), surfactante e consórcio microbiano

Tratamentos	DCPIP	Caldo	Inóculo de	Herbicida	Surfactante	Massa
		Bushnell	consórcio	Gesapax		de solo
		Haas	microbiano			
	(µL)	(mL)	(µL)	(µL)	(µL)	(g)
1	250,00	7,75	-	-	-	1,00
2	250,00	7,50	-	2,30	250,00	1,00
3	250,00	7,50	250,00	2,30	-	1,00
4	250,00	7,50	125,00	2,30	125,00	1,00
5	250,00	7,50	-	-	250,00	1,00
6	250,00	7,50	250,00	-	-	1,00
7	250,00	7,75	-	2,30	-	1,00

(Fonte: Elaborado pela autora)

Os tubos foram acondicionados em estufa a 35°C e a absorbância foi medida em espectrofotômetro Hach Odissey DR-2500 a cada 24 h até que a amostra mudasse de coloração para incolor, até 96 horas. As medições foram realizadas até que o DCPIP seja totalmente reduzido.

Os valores de absorbância obtidos foram inseridos em uma reta padrão, realizada a partir das concentrações de DCPIP, 0,0100 µg/mL, 0,0200 µg/mL, 0,0300 µg/mL, 0,0400 µg/mL e 0,0500 µg/mL, no comprimento de onda estabelecido em 600 nm.

2.2.7 Análise de cromatografia por high performance liquid chromatography (HPLC) em solo antes e após ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

As análises foram realizadas no laboratório de Ecotoxicologia, no Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, sob supervisão do Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo.

O ensaio foi baseado em Prata et al. (2001) e Severino e Silva (2012), com adaptações. Utilizou-se equipamento HPLC UV/DAD, da Agilent Technologies 1200 series, com detector UV=DAD 235,16 nm.

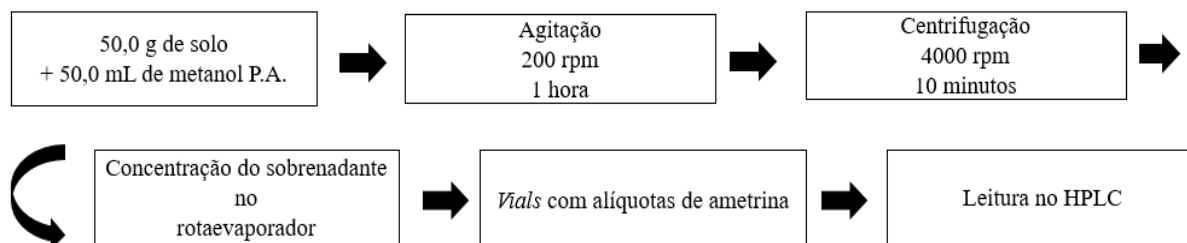
A fase móvel utilizada foi 70% de acetonitrila P. A. (J.T. Baker, lote M11C66) e 30% de água desionizada, em pH 2. O fluxo foi de 1 mL/minuto, com tempo de retenção fixado em 3,088 minutos. Utilizou-se coluna C 18, com dimensão 5/UMX4,6X350 mm, da KROMASIL (Serial nº E 33911, lote 101110).

Injetou-se 20,0 µL do padrão de ametrina (CHEM SERVICE, lote 395-99A), com 99,0 % de pureza, na concentração de 1000,000 µg/mL. Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,013 µg/mL e 0,039 µg/mL.

2.2.7.1 Extração do herbicida ametrina do solo

Abaixo está descrito o passo a passo do ensaio para extração da ametrina no solo e análise em HPLC (Figura 6).

Figura 6 - Montagem e análise do ensaio de extração da ametrina em solo para posterior análise cromatográfica



(Fonte: Elaborado pela autora)

Utilizou-se metanol P. A. (MACRON CHEMICALS, lote K49E05) para a extração de ametrina em solo. Em 50,0 g de solo retirados do respirometro de Bartha e Pramer, adicionou 50,0 mL de metanol e agitou-se em mesa de agitação (TECNAL) durante 1 hora em 200 rpm. Após esse tempo, a amostra foi centrifugada (BECKMAN J2-HS) à 4000 rpm (4,300 g) durante 10 minutos. O sobrenadante formado foi concentrado em rotaevaporador (BUCHI R-215), depois a amostra foi filtrada em membrana PTFE 0,2 µm (AGILENT) e inserida em frascos tipo *vials* próprios para HPLC.

2.2.8 Modelagem matemática dos ensaios de atividade microbiana com respirometria de Bartha e Pramer

Fez-se a modelagem matemática a fim de avaliar o processo de biodegradação do herbicida Gesapax. Tal procedimento foi possível a partir dos padrões na distribuição dos dados obtidos na produção acumulada de CO₂ ao longo dos dias. Dessa forma permitiu o aprimoramento do conhecimento da cinética do processo, assim como prever o tempo de degradação e aperfeiçoar as condições de tratamento (LOPES, 2014; MONTAGNOLLI, 2015).

Realizou-se os ajustes das curvas da produção acumulada de CO₂, ao longo de 132 dias de incubação, baseado no modelo de Schimdt et al. (1985) e adaptado por Montagnolli et al. (2009).

$$B = B_{\max}/(1 + \left[\frac{B_{\max}-B_0}{B_0}\right] e^{-rt}) \quad (5)$$

Sendo que:

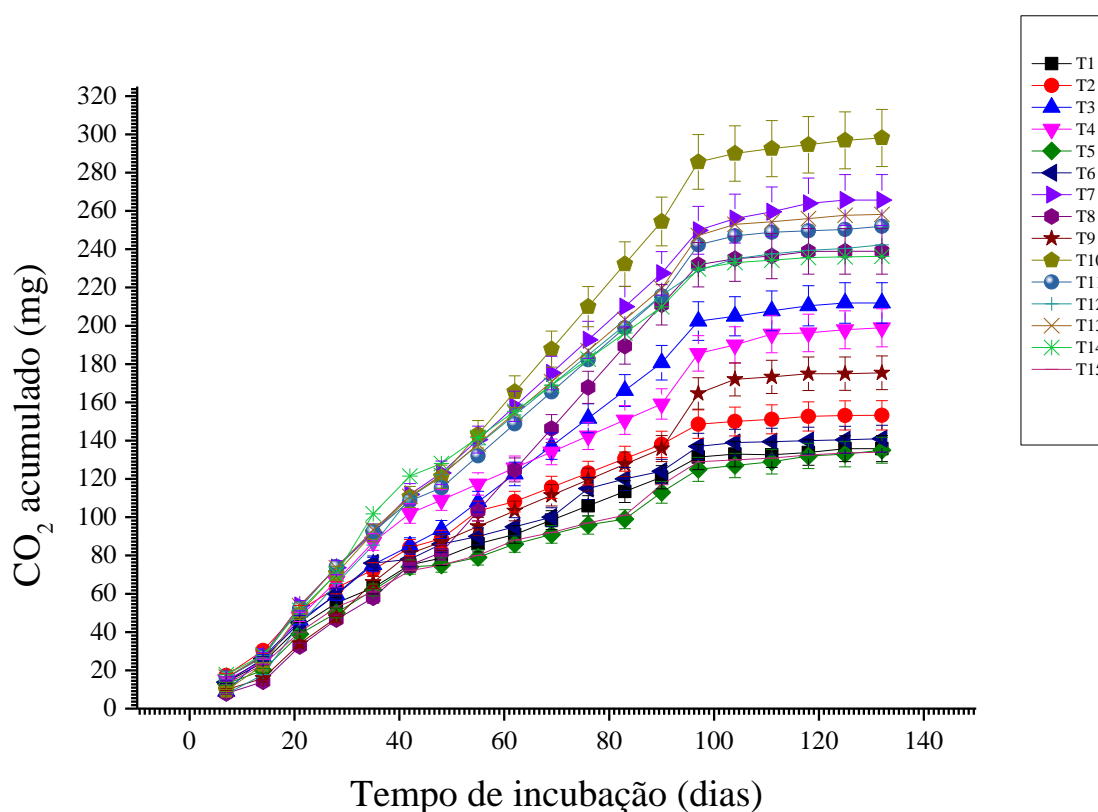
- B = CO₂ produzido;
- B_{max} = máxima produção de CO₂;
- B₀ = produção inicial de CO₂;
- r = taxa máxima de produção específica;
- t = tempo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Respirometria de Bartha e Pramer

Quantificou-se a concentração de CO₂ gerado ao longo de 132 dias de incubação dos respirometros de Bartha e Pramer (Figura 7), com diferentes concentrações do herbicida, com a adição de consórcio microbiano e surfactante.

Figura 7 - Produção de CO₂ acumulado, após 132 dias, com diferentes concentrações de herbicida com adição de surfactante e consórcio microbiano



(T1: Solo controle; T2: Controle surfactante; T3: Controle consórcio microbiano; T4: Controle herbicida (6,25 µg/mL); T5: Controle herbicida (12,50 µg/mL); T6: Controle herbicida (125,00 µg/mL); T7: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; T8: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; T9: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; T10: 6,25 µg/mL de herbicida + surfactante; T11: 12,50 µg/mL de herbicida + surfactante; T12: 125,00 µg/mL de herbicida + surfactante; T13: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante; T14: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante; T15: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante). (Fonte: Elaborado pela autora)

Pode-se observar que até os 20 dias de incubação, houve um período de adaptação da microbiota na presença dos compostos adicionados ao solo, seguido de aumento da produção de CO_2 . Nesse período, observa-se que não houve diferença no acúmulo de CO_2 entre os tratamentos. A partir desse tempo, começou a haver diferenciação entre eles.

Pelo perfil do gráfico, verifica-se ao longo dos dias de incubação, houve um período de adaptação da microbiota frente ao solo contaminado com o herbicida.

No intervalo de 0 até 20 dias, observa-se aumento do acúmulo de CO_2 , depois 20 até 110 dias, um intervalo de diferenciação dos tratamentos, finalizando 110 até 132 dias de período estacionário, ou seja, manutenção da biomassa microbiana.

O processo de biodegradação é um momento de adaptação dos micro-organismos ao herbicida, e de produção de enzimas capazes de degradar a molécula, denominada “fase lag”, seguida por um período de enriquecimento, quando os micro-organismos adaptados multiplicam-se utilizando o substrato como fonte de carbono (ALEXANDER, 1999).

Os tratamentos que mais acumularam CO_2 os que tiveram a presença de surfactante. A adição de surfactante no solo contaminado com Gesapax proporcionou um aumento de 49,81% em comparação ao solo com o herbicida (T1).

Verifica-se que no controle surfactante (T2) acumulou menos CO_2 , 153,23 mg, em comparação aos tratamentos com surfactante e herbicida (T7, T8 e T9), finalizando em 265,70, 238,92 e 175,45 mg. Dessa forma, a presença do surfactante contribuiu para o aumento da atividade microbiana solubilizando o herbicida, ocorrendo o aumento da taxa de CO_2 , e possivelmente 42,32% do acúmulo é proveniente da metabolização da molécula do herbicida, constatando com Reis et al. (2008) os quais concluíram que o herbicida estimulou a taxa respiratória do solo.

Provavelmente o surfactante atuou como agente estimulante da comunidade microbiana autóctone do solo, acelerando o processo de degradação da molécula, reduzindo assim o tempo de biorremediação (PARIA, 2008).

Entre os tratamentos com aumento da concentração do herbicida (T5 e T6), não houve diferença significativa entre eles ($p = 0,023$). Os tratamentos com solo e surfactante ficaram próximos aos tratamentos com solo e herbicida. Isso comprova que o surfactante atuou como coadjuvante na biodegradação do Gesapax, atuando como bioestimulador no processo de metabolização da molécula.

O surfactante é um emulsificador de compostos orgânicos, deixando a molécula do contaminante de forma biodisponível à metabolização da microbiota do solo (MARIANO et al., 2007), favorecendo a biodegradação da molécula do herbicida. São eficazes na dessorção de compostos de difícil degradação, tais como hidrocarbonetos em solo argiloso (PARIA, 2008).

A adição de consórcio microbiano como bioaugmentação, resultou em aumento de 33,52% na atividade microbiana do solo com herbicida. O mesmo ocorreu com a adição da mistura de consórcio microbiano e surfactante em solo com o herbicida, o qual houve um aumento de 29,73%. Os micro-organismos são importantes na metabolização de substâncias de difícil degradação (KAMIDA et al., 2005).

O tratamento com solo, herbicida e consórcio microbiano, acumulou 10,87% de CO₂ em relação ao tratamento com surfactante. A sua presença como forma de bioaugmentação foi fundamental para o aumento da atividade microbiana, mesmo na presença do herbicida.

A mistura de surfactante e consórcio microbiano também foi primordial para a desintoxicação do solo contaminado pelo herbicida. Contudo acumulou 13,40% menos CO₂ do que o tratamento com surfactante (T10) e 2,83% menos em relação ao tratamento contendo solo, herbicida e consórcio microbiano.

Ao longo do tempo, a comunidade microbiana adaptou-se a presença do herbicida no solo. Isto pode ser verificado nos tratamentos com solo e herbicida (T4, T5 e T6) os quais obtiveram aumento no acúmulo de CO₂ após 132 dias de incubação. Nesses tratamentos não haviam bioaugmentação e/ou bioestimulação para a atividade microbiana. Então, dessa forma permaneceram apenas as comunidades resistentes ao herbicida.

A Tabela 6 mostra a quantidade de CO₂ acumulado final, após 132 dias de incubação.

Tabela 6 - Valores de CO₂ acumulado após 132 dias

Tratamentos	CO₂ acumulado (mg)
T1: Solo controle	135,85
T2: Controle surfactante	153,23
T3: Controle consórcio microbiano	211,93
T4: Controle herbicida (6,25 µg/mL)	199,00
T5: Controle herbicida (12,50 µg/mL)	169,00
T6: Controle herbicida (125,00 µg/mL)	133,00
T7: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano	265,70
T8: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano	238,92
T9: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano	175,45
T10: 6,25 µg/mL de herbicida + surfactante	298,13
T11: 12,50 µg/mL de herbicida + surfactante	251,95
T12: 125,00 µg/mL de herbicida + surfactante	242,33
T13: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante	258,17
T14: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante	236,28
T15: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante	134,00

(Fonte: Elaborado pela autora)

A utilização de técnicas baseadas na aplicação de surfactantes, podem resultar no aumento da eficiência do processo de biorremediação do solo contaminado por herbicida Gesapax, possivelmente atuando na solubilidade de compostos orgânicos. O mesmo já foi observado em local contaminado por compostos recalcitrantes, aumentando a sua taxa de degradação (KARANGUNDUZ e KARASULOGLU, 2007; PARIA, 2008).

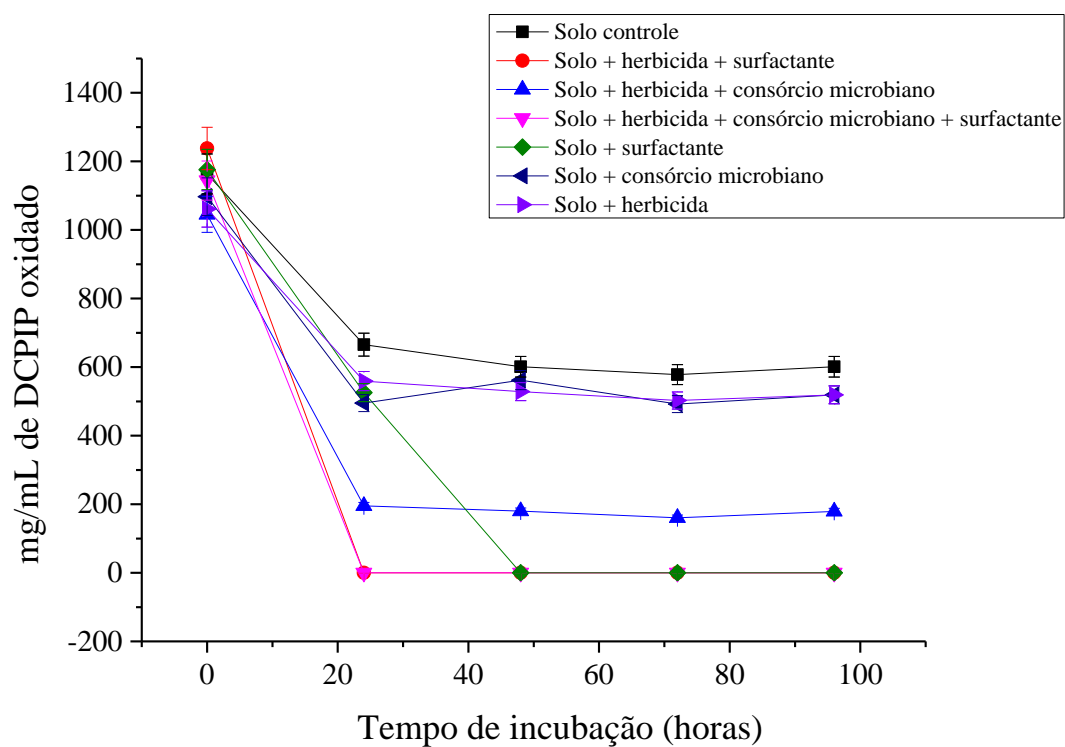
Houve uma interação entre a molécula do herbicida com as moléculas do surfactante, solubilizando-o no solo. Ao estudarem a presença do herbicida DDT no solo, Karangunduz e Karasuloglu (2007) concluíram que o surfactante Tween 80 e SDBS (Sodium dodecylbenzenesulfonate) proporcionaram a solubilização da molécula na forma micelar.

O surfactante foi essencial para o aumento da atividade microbiana, mesmo em solo contaminado com herbicida Gesapax, favorecendo as atividades biológicas no mesmo, auxiliando no processo de degradação realizado pelo consórcio microbiano. Li et al. (2017) concluíram que consórcios microbianos podem ser mais eficazes do que a utilização de estirpes de um único degradador, a fim de produzir a desintoxicação do solo causados por produtos químicos orgânicos.

A compreensão do destino dos herbicidas no ambiental é de extrema importância, a fim de poder criar mecanismos para minimizar os seus efeitos no ambiente. O herbicida possui grande tendência de sofrer lixiviação ao ser influenciado por precipitações pluviais ou irrigações artificiais, resultando em contaminação de águas subterrâneas e até mesmo interferir na eficiência de controle de ervas daninhas (MONQUERO et al., 2008). Assim, a utilização de medidas remediadoras no solo é essencial a fim de reduzir os possíveis estresse à biota do solo.

3.2 Ensaio colorimétrico com DCPIP

A Figura 8 mostra o ensaio colorimétrico, analisado durante 96 horas, com solo contaminado por herbicida, mas com adição de surfactante (bioestimulação) e consórcio microbiano (bioaugmentação).



(Fonte: Elaborado pela autora)

Pode-se observar que do tempo 0 para 24 horas houve um grande caimento na concentração de DCPIP oxidado em todos os tratamentos e que a partir desse tempo ocorreu uma estabilização na oxidação.

O tratamento controle contendo apenas solo foi o que apresentou maior concentração de DCPIP oxidado, uma vez que possuía pouca fonte carbono, pois o solo apresentava composição arenosa.

Os tratamentos que continham solo, Gesapax, surfactante e consórcio microbiano e os tratamentos que possuíam solo e surfactante foram os que apresentaram menor concentração de DCPIP oxidado. Isto se deve a presença do surfactante, que contém fonte de carbono.

O surfactante é uma grande fonte de carbono disponível para o consumo da microbiota. Dessa maneira, ele foi rapidamente metabolizado. O herbicida também é uma fonte de carbono para ser degradado, contudo nem sempre está na forma biodisponível. Dessa forma, ao adicionar herbicida, com surfactante e consórcio microbiano, toda fonte de carbono foi rapidamente biodegradada (PARIA, 2008; KARAGUNDUZ e KARASULOGLU, 2007; BARROS et al., 2007).

Isto foi observado na Figura 7, no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer. Neste ensaio, os tratamentos que mais acumularam CO₂ foram os que possuíam solo, herbicida, surfactante e consórcio microbiano e o que continha solo com surfactante. Dessa forma, pode-se utilizar o ensaio respirométrico e o ensaio de colorimétrico para avaliação da degradação de Gesapax em solo.

O segundo tratamento que apresentou menor concentração de DCPIP oxidado foi que possuía solo com herbicida e consórcio microbiano. Dessa forma, o consórcio microbiano apresenta a capacidade de degradar a molécula do herbicida. Contudo ao adicionar surfactante Tween 80 ao conjunto, a degradação torna-se maior.

O controle surfactante foi o que mais sofreu decaimento ao longo do tempo, em função da sua alta fonte de carbono, que facilitou a oxidação.

O controle consórcio microbiano e o controle herbicida não apresentaram diferenças significativas ($p = 0,091$). No entanto, o ensaio colorimétrico é rápido e provavelmente não houve tempo suficiente para a diferenciação entre os tratamentos.

Não houve diferença significativa entre os tratamentos contendo solo, herbicida e surfactante, com o tratamento com solo, herbicida, consórcio microbiano e surfactante.

O tratamento com surfactante apresentou maior decaimento da concentração de DCPIP, mesmo na presença do herbicida. O mesmo pode ser observado no ensaio respirométrico de Bartha e Pramer (Figura 7).

A partir da Tabela 7, pode -se observar a taxa de decaimento em porcentagem, de cada tratamento, ao longo tempo.

Tabela 7 – Porcentagem (%) de decaimento da concentração de DCPIP ao longo do tempo

Tratamento/ Horas	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
24 horas	42,79	99,99	70,63	99,99	21,00	25,61	15,96
48 horas	9,66	99,98	70,06	99,99	99,97	14,86	12,10
72 horas	3,83	99,99	72,24	99,99	99,99	13,63	13,07
96 horas	3,96	99,99	70,19	99,99	99,99	6,50	13,63

T1: Solo controle; T2: Solo + herbicida + surfactante; T3: Solo + herbicida + consórcio microbiano; T4: Solo + herbicida + surfactante + consórcio microbiano; T5: Controle surfactante; T6: Controle consórcio microbiano; T7: Solo + herbicida) (Fonte: Elaborado pela autora)

O tratamento com solo, herbicida, consórcio microbiano e surfactante (T4) obteve alta porcentagem de decaimento após as 42 horas. O tratamento com solo e surfactante (T5) já apresentou 99,99% de redução após as 24 horas.

O solo controle obteve baixas oxidações da concentração de DCPIP, uma vez que o solo era arenoso, com baixo teor de matéria orgânica.

Observando o tratamento com solo e herbicida (T7), houve baixas porcentagens de decaimento. Isto provavelmente é devido a sua geometria molecular que é de difícil degradação e persistente no ambiente (FARRÉ et al., 2002).

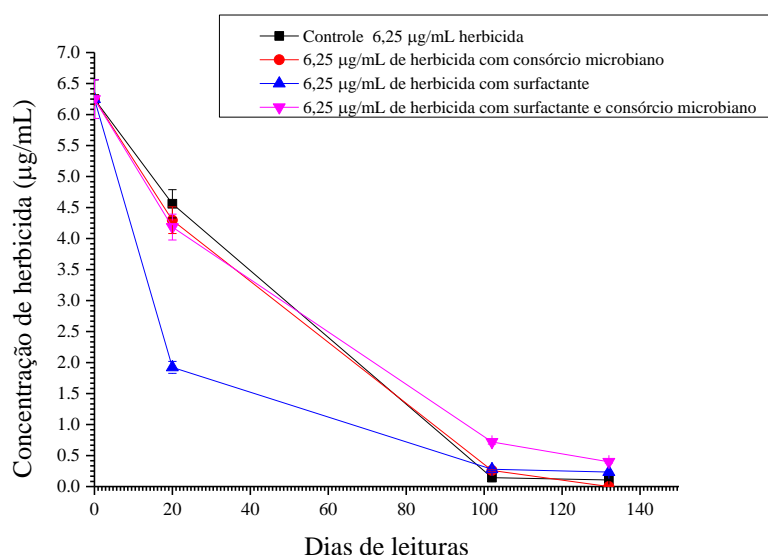
3.3 Análise de cromatografia por HPLC da biodegradação de Gesapax em solo, antes e após ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

O tempo de retenção para quantificação da ametrina em amostras de solo, foi fixado em 3,088 minutos. O termo utilizado “antes do ensaio de respirometria”, pode ser observado pelo tempo zero dias.

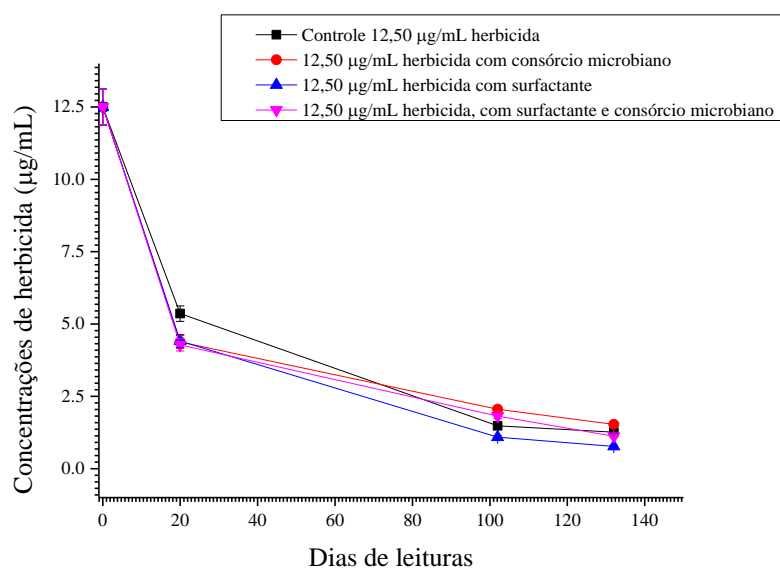
A Figura 9 mostra os resultados obtidos no ensaio de cromatografia (HPLC), em solo contaminado com herbicida após 132 dias de incubação, separados em diferentes concentrações. A Tabela 8 mostra todos os dados obtidos ao longo dos dias de leituras.

Fez-se as análises cromatográficas antes e após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer. A cada período algumas amostras de solo contidas nos respirometros foram utilizadas para a cromatografia, a fim de observar o decaimento da concentração de herbicida, ao longo dos dias, bem como avaliar a eficiência do surfactante, como bioestimulador e o consórcio microbiano, como bioaumentação.

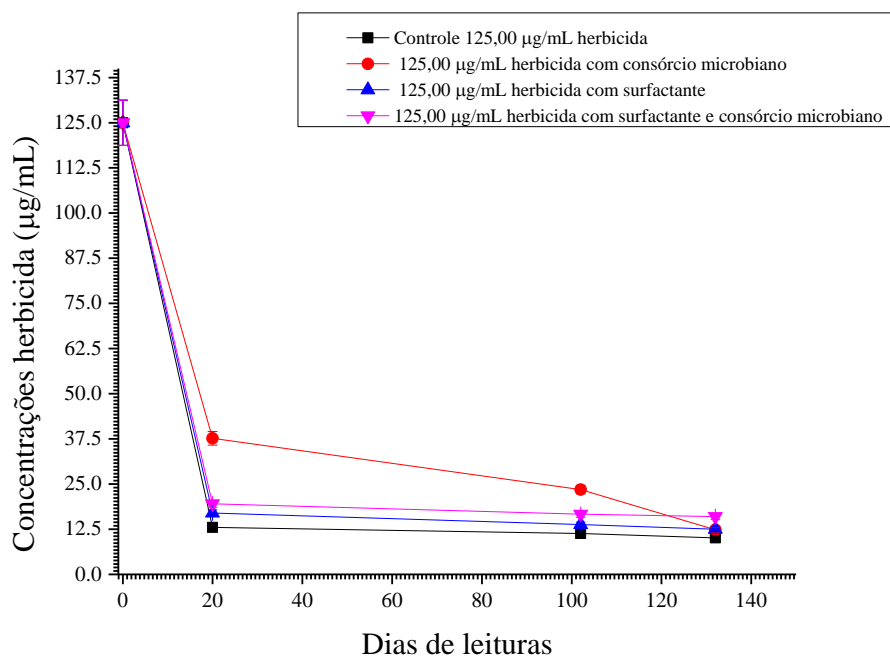
Figura 9 - Análise cromatográfica antes (tempo 0 dias), e após (tempo 132 dias) o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer. Figura (a) expressa os resultados obtidos apenas com a concentração 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida; Figura (b) expressa os resultados obtidos apenas com a concentração 12,50 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida; Figura (c) expressa os resultados obtidos apenas com a concentração 125,00 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida; Figura (d) expressa os resultados obtidos com todas as concentrações 6,25, 12,50 e 125,00 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida



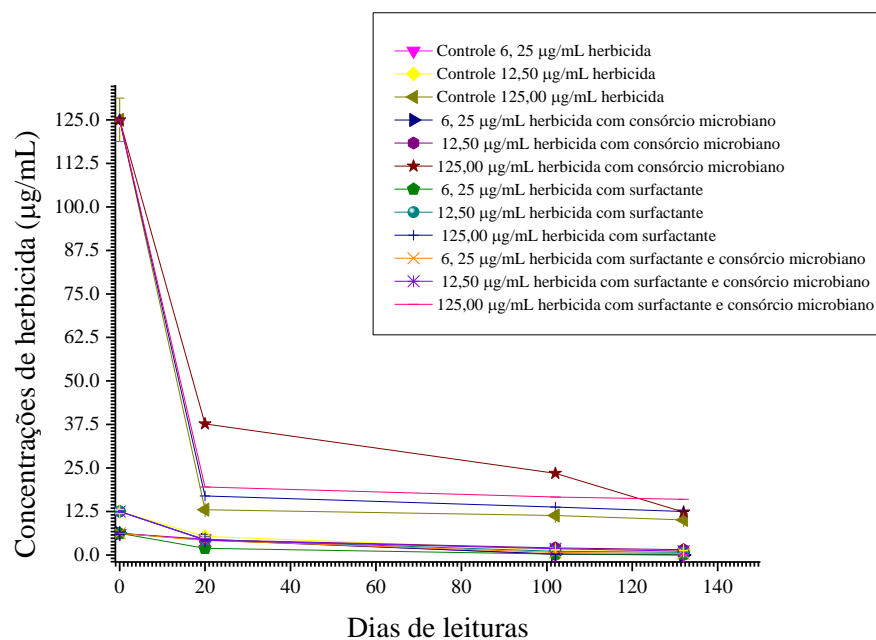
(a) Concentração 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida. (Fonte: Elaborado pela autora)



(b) Concentração 12,50 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida. (Fonte: Elaborado pela autora)



(c) Concentração 125,00 µg/mL de herbicida. (Fonte: Elaborado pela autora)



(d) Concentrações 6,25, 12,50 e 125,00 µg/mL de herbicida. (Fonte: Elaborado pela autora)

Tabela 8 - Valores obtidos do HPLC no tempo zero e no tempo 132 dias de incubação do solo contaminado com herbicida

	0 dias	20 dias	102 dias	132 dias
Tratamentos	µg/mL	µg/mL	µg/mL	µg/mL
Solo controle	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle surfactante	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle consórcio microbiano	0,00	0,00	0,00	0,00
Controle herbicida 6,25 µg/mL	6,05	4,56	0,14	0,10
Controle herbicida 12,50 µg/mL	12,24	5,36	1,48	1,86
Controle herbicida 125,00 µg/mL	124,86	12,99	11,34	10,08
6,25 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano	6,05	4,29	0,26	0,00
12,50 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano	12,24	4,38	2,05	1,53
125,00 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano	124,86	37,67	23,47	12,33
6,25 µg/mL do herbicida + surfactante	6,05	1,92	0,28	0,23
12,50 µg/mL do herbicida + surfactante	12,24	4,4	1,09	0,77
125,00 µg/mL do herbicida + surfactante	124,86	16,98	13,79	12,50
6,25 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano + surfactante	6,05	4,18	0,72	0,39
12,50 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano + surfactante	12,24	4,28	1,82	1,12
125,00 µg/mL do herbicida + consórcio microbiano + surfactante	124,86	19,52	16,65	15,99

(Fonte: Elaborado pela autora)

Ao longo do tempo, todos os tratamentos obtiveram redução na concentração de herbicida. Foi realizado teste estatístico após 20 dias de incubação, e grande parcela da herbicida foi degradado. O surfactante agiu de forma eficaz durante o processo de metabolização, reduzindo a concentração em 69,28% para o tratamento com 6,25 µg/mL e 64,80% para o tratamento com 12,50 µg/mL.

A adição de consórcio microbiano também foi essencial para a biodegradação da molécula, chegando a 0,00 µg/mL, após 132 dias, para a concentração 6,25 µg/mL. No entanto, nos 20 primeiros dias de ensaio, o surfactante foi o que auxiliou mais na biodegradação, chegando em 1,92 µg/mL e com o consórcio microbiano 4,29 µg/mL, observados para 6,25 µg/mL.

Dessa forma, nos primeiros dias de incubação, o surfactante provavelmente deixou a molécula do herbicida de forma biodisponível à microbiota, facilitando a biodegradação. O mesmo foi observado nos ensaios colorimétricos, no período de 24 horas.

Após os 20 dias de incubação, para a segunda concentração do herbicida (12,50 µg/mL), não houve diferenças significativas entre a adição de surfactante e a adição de consórcio microbiano. Aos 102 dias, ocorreu 75,28% de redução na concentração, no tratamento com herbicida e surfactante e no tratamento com herbicida e consórcio microbiano resultou em 53,19%. Finalizando aos 132 dias, com apenas 0,77 µg/mL, no tratamento com adição de surfactante e herbicida, uma diminuição de 93,84%.

Ao avaliar a terceira concentração do herbicida (125,00 µg/mL), pode-se perceber que ao adicionar surfactante e consórcio microbiano a biodegradação foi menor (19,529 µg/mL) em relação ao tratamento com surfactante (16,98 µg/mL), após 20 dias de ensaio. Provavelmente, a microbiota do solo preferiu metabolizar o surfactante presente e posteriormente o herbicida, uma vez que a sua concentração estava 10 vezes acima da segunda concentração aplicada em campo. O mesmo ocorreu para 102 dias e os 132 dias de incubação.

Tanto o consórcio microbiano quanto o surfactante auxiliaram na metabolização da molécula, mesmo diante do aumento de concentrações do herbicida aplicado ao solo, que podem ser observadas as diminuições na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores em porcentagem das reduções na concentração de herbicida após a sua biodegradação

Concentração	6,25 µg/mL	12,50 µg/mL	125,00 µg/mL
Surfactante	96,32%	87,76%	90,13 %
Consórcio microbiano	99%	93,84%	90,00%
Surfactante + Consórcio microbiano	93,61%	91,04%	87,20%

(Fonte: Elaborado pela autora)

A utilização de surfactante influenciou positivamente a biodegradação do herbicida, em todas as concentrações utilizadas, que possibilitou a aceleração da metabolização. Provavelmente, houve uma desorção do herbicida ao longo dos dias de ensaio, deixando o herbicida Gesapax de forma biodisponível à microbiota autóctone do solo, que se adaptaram com a presença do contaminante, o qual podem ser vistas pelos tratamentos contendo consórcio microbiano.

O mesmo foi observado por Rodriguez-Cruz, Sanchez-Martin e Sanchez-Camazano (2006), o qual concluíram que o surfactante auxiliou no aumento da desorção da molécula da atrazina em solo, mesmo após um período de envelhecimento do herbicida no solo arenoso.

Para o ensaio de biodegradação, foram utilizados 63,00 g de solo, colocadas em respirometros de Bartha e Pramer, com 79,50 cm², equivalente à 7,95x10⁻⁷ ha, em campo. Para cada frasco utilizou-se 1,00 mL da solução de 1% de surfactante químico, suficientes para o intenso auxílio na metabolização do Gesapax.

Cada frasco de 500,00 mL de surfactante é suficiente para aplicação de quase 40 hectares de campo e possui baixo preço no mercado atualmente. Assim, a utilização desse produto poderá diminuir danos ao ambiente.

O solo utilizado para este ensaio apresentou características arenosas (Tabela 9), aumentando a chance de contaminação por lixiviação. Dellamatrice e Monteiro (2014) concluíram que há uma maior preocupação de contaminação em solos arenosos, pois dessa forma, os herbicidas triazínicos podem ser detectados frequentemente em águas, devido à sua mobilidade e persistência.

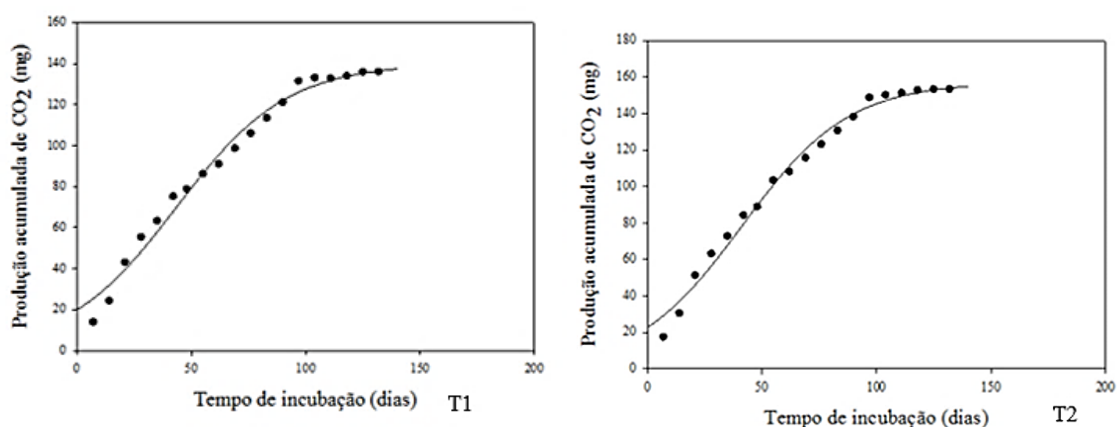
Este risco é aumento com o período de plantio da cana-de-açúcar, o qual é realizado entre os meses de janeiro e março, pelo sistema de ano-e-meio (cana de 18 meses), pois nesse período há boas condições de temperatura e umidade, possibilitando bom crescimento (ROSSETO e SANTIAGO, 2016), uma vez que possui a característica de aumento do índice pluviométrico, elevando assim o risco de contaminação do ecossistema aquático (ARMAS et al., 2007).

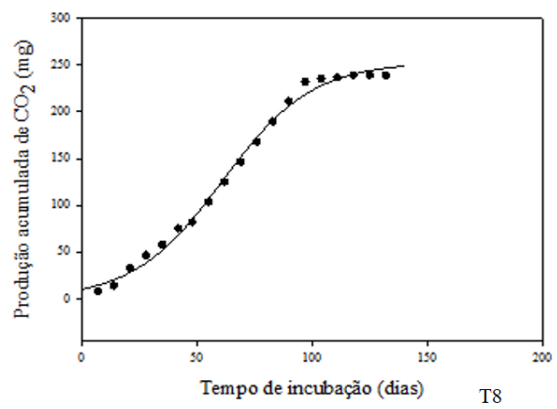
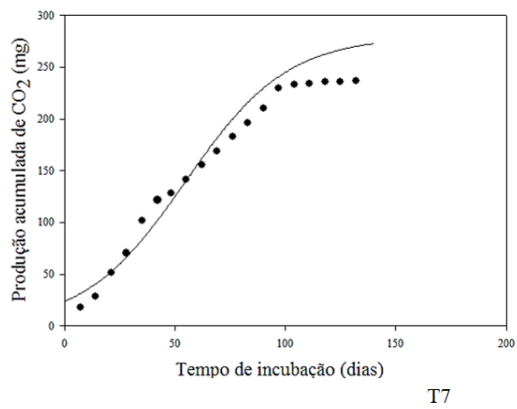
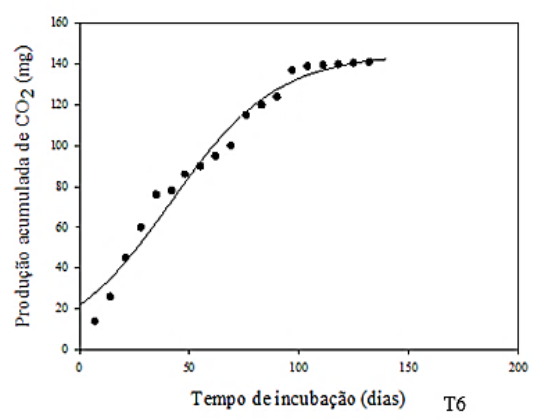
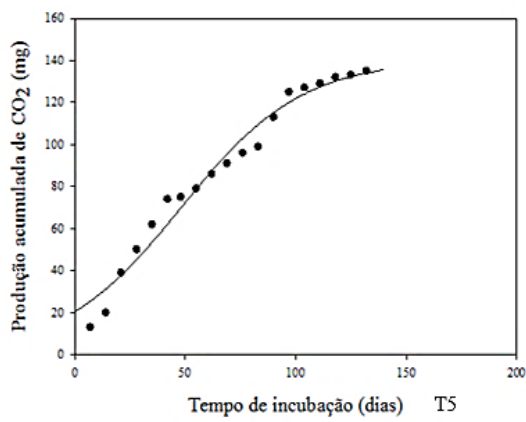
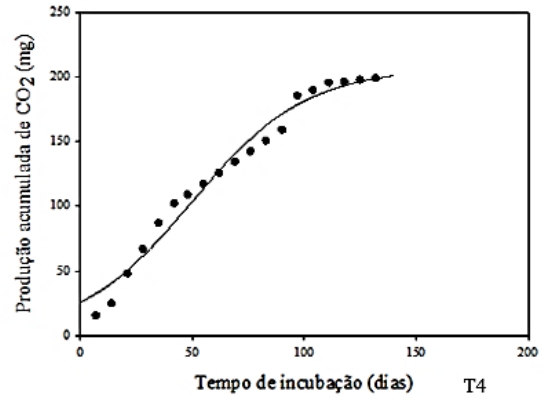
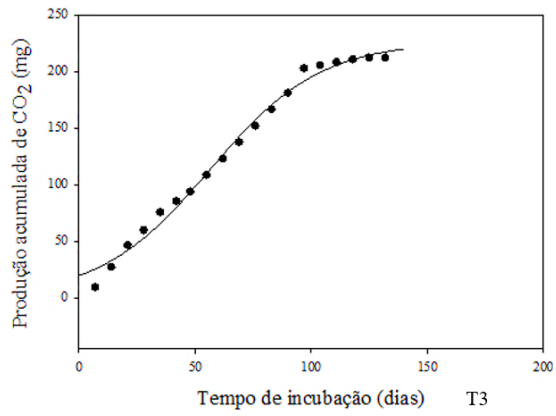
Desse modo, as aplicações de surfactante, com o auxílio do consórcio microbiano, foram fundamentais para aceleração da biodegradação do herbicida no solo, principalmente aos 20 dias da aplicação, uma vez que herbicida Gesapax (Ingrediente ativo: ametrina) é moderadamente solúvel em água, existindo grande risco de lixiviação, evitando assim o contato com as águas superficiais e/ou subterrâneas, diminuindo riscos de contaminação para o ecossistema aquático, tais como sedimentos, organismos bivalves e água (DANTAS et al., 2009; ARMAS et al., 2007; JACOMINI et al., 2009).

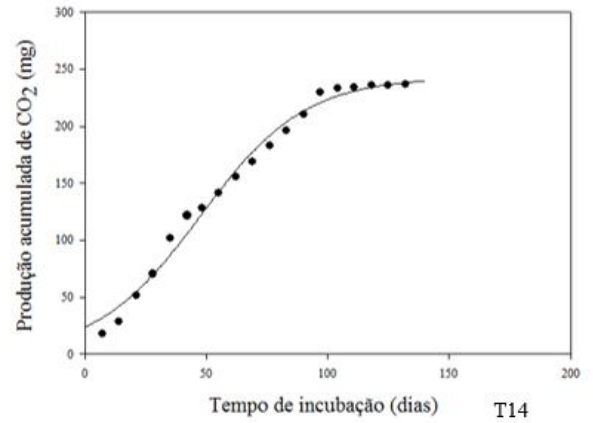
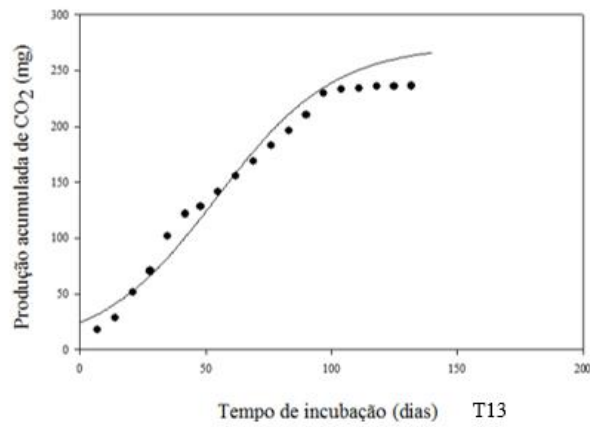
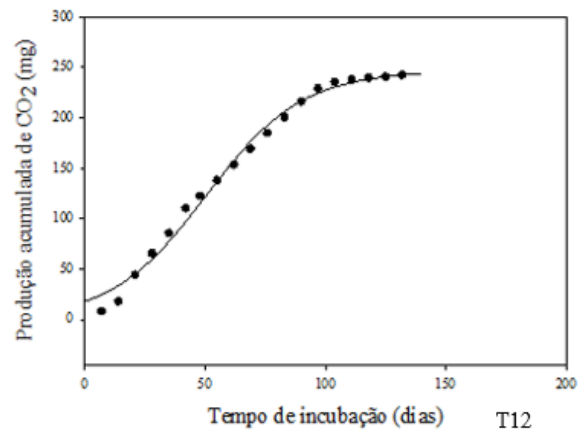
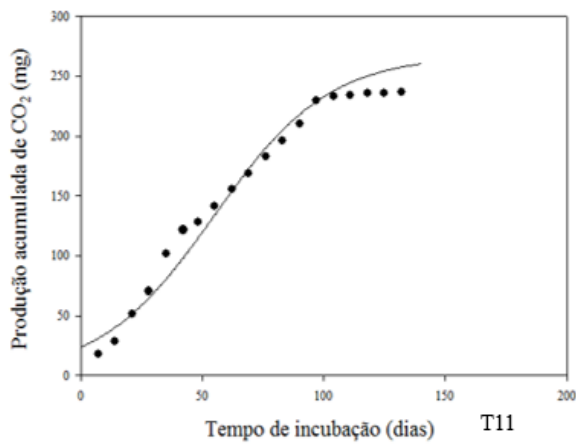
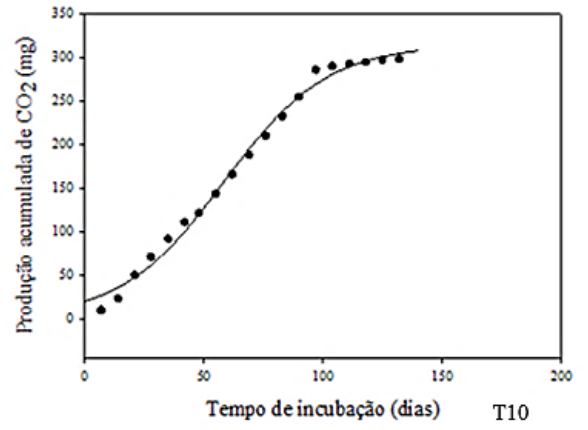
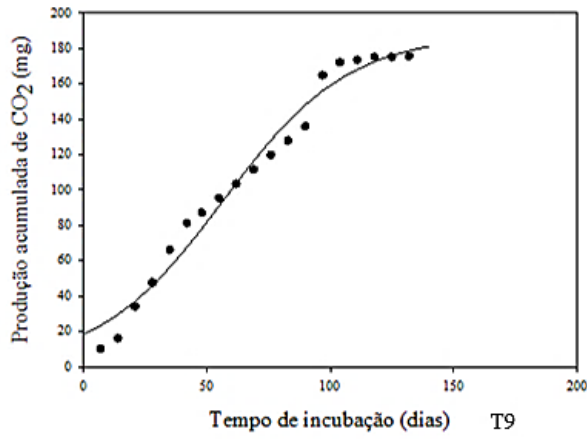
3.4 Modelagem matemática

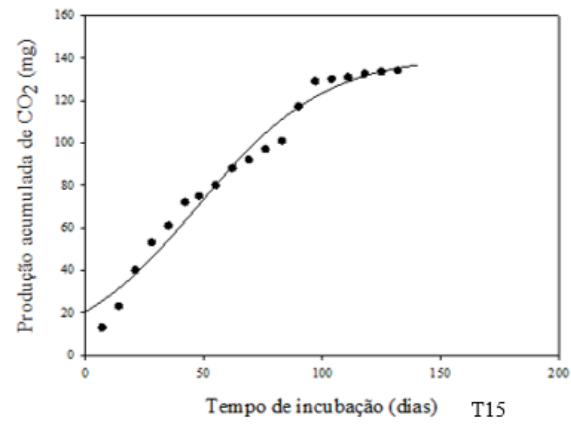
Os ajustes dos dados ao modelo foram observados pelo índice de correlação (R^2), obtido em cada curva (Figura 10). A partir disso foi possível prever o comportamento cinético esperável para cada tratamento utilizados no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer, no decorrer do processo de biodegradação do herbicida (Tabela 10).

Figura 10 - Produção acumulada de CO_2 pelo tempo de incubação de cada tratamento respirométrico









(Fonte: Elaborado pela autora)

Tabela 9 - Valores de Bmax (máxima produção de CO₂), BmaxT (máxima produção de CO₂ pelo tempo) e R² obtidos do modelo matemático do processo de biodegradação do herbicida

Tratamentos	Bmax (mg CO₂)	BmaxT (132 dias)	R²
Solo controle	139,90	138	0,9895
Controle herbicida 6,25 µg/mL (T4)	206,23	143	0,9750
Controle herbicida 12,50 µg/mL (T5)	135,40	145	0,9713
Controle herbicida 125,00 µg/mL (T6)	142,81	147	0,9737
6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T7)	271,88	136	0,9930
12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T8)	144,91	138	0,9950
125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T9)	181,06	143	0,9766
6,25 µg/mL de herbicida + surfactante (T10)	306,92	139	0,9925
12,50 µg/mL de herbicida + surfactante (T11)	259,61	140	0,9895
125,00 µg/mL de herbicida + surfactante (T12)	243,69	142	0,9907
6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (13)	268,33	139	0,9912
12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (14)	244,62	138	0,9878
125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (15)	138,24	141	0,9746

(Fonte: Elaborado pela autora)

O tempo de incubação foi expandido para 200 dias, sendo um valor superior aos 132 dias utilizados nas coletas de dados, a fim de prever a cinética de biodegradação.

Após 20 dias houve um aumento expressivo de CO₂, podendo ser relacionado com degradação da molécula do herbicida, pois o mesmo foi observado no ensaio cromatográfico (Figura 10).

Pode-se observar que após 100 dias de incubação, houve uma tendência de desaceleração na degradação. Por este motivo, não se optou por um modelo linear e sim logístico, a fim de adequar-se aos dados com maior precisão.

Por meio do modelo de cinética de biodegradação, pode-se constatar também, a eficácia da adição de surfactante e consórcio microbiano em solo contaminado com o herbicida Gesapax, pois auxiliaram no processo de aceleração da desintoxicação do solo, contribuindo para o melhor desenvolvimento das comunidades microbianas autóctones.

A aceleração da desintoxicação pode ser observada pela quantidade máxima de dias, em relação a quantidade máxima de CO₂ produzido.

Ao adicionar surfactante ao solo contaminado com Gesapax, a quantidade necessária para a metabolização do herbicida é menor e com maior produção de CO₂. O mesmo ocorreu com a adição de consórcio microbiano ao solo contaminado com o herbicida.

Assim, o modelo matemático foi adequado para o tipo de contaminação do solo com o herbicida, podendo averiguar o tempo de degradação, diante dos diferentes tipos de tratamentos.

CAPÍTULO 2

Avaliação da ecotoxicidade antes e após a biodegradação do herbicida Gesapax

1. INTRODUÇÃO

Toxicidade é a propriedade inerente de um agente químico em produzir efeitos deletérios tais como, agudos, subletais, letais e crônicos sobre um organismo (DONALDSON e POLAND, 2013).

A liberação de um composto tóxico, xenobiótico, no ambiente significa a sua liberação em um compartimento ambiental e posterior repartição entre esses compartimentos, o qual poderá atuar em movimentos e reações dentro desses compartimentos atingindo a biota numa concentração suficiente para causar um efeito (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

O processo de bioacumulação exprime a transferência dos contaminantes presentes nos compartimentos ambientais a um organismo, em que as concentrações observadas são superiores às do meio.

Através do ar, água, solo e sedimento os xenobióticos são absorvidos pela biota. Processos biológicos como ecologia alimentar, fisiologia e bioquímica das espécies influenciam na bioacumulação (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

O conhecimento do grau de toxicidade das substâncias químicas permite estabelecer limites para o seu uso protegendo o meio ambiente (KLAASSEN e WATKINS, 2012; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os peixes foram os primeiros organismos-testes relatados nos anos de 1920. A partir de então, as pesquisas foram intensificando-se em decorrência do aumento do número de agentes químicos e surgiu a necessidade de padronização dos testes, definindo os métodos de análises (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

O princípio para todos os testes de toxicidade é semelhante, embora alguns detalhes específicos possam diferir com a utilização de diferentes organismos-testes, e o essencial é requerer condições ambientais adequadas de pH, temperatura, oxigênio dissolvido, dureza da água, fotoperíodo e duração dos testes.

De acordo com ZAGATTO e BERTOLETTI (2008), os ensaios de toxicidade podem ser classificados da seguinte maneira:

- Toxicidade aguda: ensaios de curto período de duração, afetando apenas parte do ciclo de vida do organismo-teste. A mortalidade e a imobilidade são os parâmetros analisados neste teste;
- Toxicidade crônica: ensaios com período maior de duração, exposição ao agente analisado, a qual afeta todo o ciclo de vida do organismo-teste, avaliando-se parâmetros subletais.

Os resultados dos testes de toxicidade são analisados estatisticamente e expressos em unidades numéricas como CL50 (Concentração Letal: concentração real da amostra que causa efeitos agudos a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio), CE50 (Concentração Efetiva: concentrações reais da amostra que causa efeitos agudos a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio), e CENO (Concentração de Efeito Não Observado), denominados de *end point*, ou seja, dose resposta (KLAASSEN e WATKINS, 2012; ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008). Ensaios de toxicidade são ferramentas essenciais em ensaios de biodegradação para avaliar se o composto orgânico degradado teve a sua toxicidade diminuída ou aumentada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Os agrotóxicos são substâncias que possuem várias vias de absorção, alvo, metabolização e toxicidade. A problemática é preocupante pois, o processo de produção agrícola é baseado no modelo de *commódities*. Dessa forma, cada ingrediente ativo possui diferentes potenciais de toxicidade, deixando a população exposta a variados xenobióticos ao mesmo tempo (COLEMAN et al., 2002; CONSEA, 2012). Podem entrar no organismo por absorção na pele, ingestão e inalação da substância. Os efeitos decorrentes podem ser agudos ou crônicos.

Os efeitos agudos são aqueles resultantes da intoxicação por altas dosagens em uma curta exposição de tempo. Os efeitos crônicos são decorrentes de doses diárias das substâncias, por um longo período de tempo (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

1.1 Mutagenicidade para *Tradescantia pallida*

A *T. pallida* tem sido utilizada como forma de biomonitoramento ambiental (TEIXEIRA e BARBÉRIO, 2012).

Inicialmente foi utilizada por Ma (1981) em ensaios envolvendo a ação genética e compostos químicos, sendo classificado como sensível para detecção de compostos mutagênicos no ar (MA, 1981; MA, 1983).

Todas as partes da planta de *T. pallida* podem ser utilizadas em avaliações ambientais, sendo o ensaio de micronúcleos o mais utilizado (MIELLI, 2008).

Este ensaio é bastante sensível e adequado para a detecção de contaminantes. Os micronúcleos são formados a partir da célula dos grãos de pólen serem expostas ao contaminante. Tais micronúcleos são resultantes de porções cromossômicas, que se perderam durante a divisão celular, não sendo incluídos no núcleo da nova célula formada, permanecendo no citoplasma (LEITE, ZANDONATO e FLUMINHAN, 2013).

Muitas vezes, os fatores ambientais agem nas alterações cromossômicas, podendo ligar o aparecimento de danos estruturais de aneuploidia, com a ação de contaminantes ambientais (MA, 1983; LEITE, ZANDONATO e FLUMINHAN, 2013).

1.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Desde os primeiros sinais de civilização, cepas de leveduras já eram utilizadas para a fabricação de vinho. Contudo, apenas no século XIX, por meio dos estudos de *Pasteur*, pode identificar a levedura *S. cerevisiae* como o principal responsável pela

transformação do açúcar em etanol e dióxido de carbono, ao longo do processo de produção do vinho (PRETORIUS, 2000).

A origem de *S. cerevisiae* existem algumas controvérsias, pois alguns dizem que a origem foi como habitante “natural” de frutos, outros dizem que foi originado por meio da hibridização de outras espécies de *Saccharomyces*, e posteriormente selecionada e por fim com a evolução do genoma (MORTIMER e POLSINELLI, 1999).

O organismo teste *S. cerevisiae* representa um modelo eucariótico amplamente utilizado e consolidado. É uma ferramenta experimental importante para diversos campos biotecnológicos, pois é relativamente simples, crescimento rápido e viável economicamente em condições laboratoriais. Também grande faixa de pH e força iônica, geralmente encontradas em análises ambientais, e possui a possibilidade de diminuição de ensaios com animais, pois a levedura foi proposta para a utilização em análises ambientais (BRACONI, BERNARDINI e SANTUCCI, 2016).

Contudo, por possuir vias metabólicas distintas, nem sempre é possível a comparação com células humanas, bem como a dificuldade em identificar efeitos adversos sistêmicos (BRACONI, BERNARDINI e SANTUCCI, 2016; RUMLOVA e DELEZALOVA, 2012).

Assim, a utilização da levedura em estudos toxicológicos, permite a avaliação dos efeitos de xenobióticos diante da perspectiva ambiental (BRACONI, BERNARDINI e SANTUCCI, 2016).

Este capítulo teve por objetivo avaliar os possíveis potenciais tóxicos do herbicida Gesapax para diferentes tipos de organismos teste, bem como o efeito dos tratamentos do solo contaminado pelo herbicida, após a utilização de processos de bioestimulação e bioaugmentação.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

2.1.1 Meios de cultura

Para a contagem de unidades formadoras de colônias, utilizou-se amostras de solo dos tratamentos retirados dos respirometros de Bartha e Pramer.

2.1.1.1 Plate Count Agar (PCA)

Para a contagem de unidades formadoras de colônias, utilizou-se amostras de solo dos tratamentos retirados dos respirometros de Bartha e Pramer.

Utilizou-se 23,50 g de PCA (DIFCO- lote 5187416), dissolvidos em 1,0 L de água desionizada, para a quantificação de bactérias heterotróficas. O meio foi aquecido para total dissolução e depois esterilizado durante 15 minutos em autoclave, Phoenix, para posterior uso.

2.1.1.2 Sabouraud Dextrose Agar

Utilizou-se o meio sabouraud dextrose agar (Acumedia- lote 105588B), para a contagem de unidades formadoras de colônias de fungos. Pesou-se 63,50 g do meio, dissolvidos em 1,0 L de água desionizada. Adicionou-se 0,400 g de cloranfenicol levogiro antibacteriano, a fim de fazer a contagem de fungos totais. O meio foi aquecido para total dissolução e depois esterilizado durante 15 minutos em autoclave, Phoenix, para posterior uso.

2.1.2 Soluções

2.1.2.1 Solução salina 0,85%

Utilizou-se a solução salina na concentração de 0,85% (m/v), para realizar as diluições do solo para a contagem de unidades formadoras de colônias. Pesou-se 0,85 g de NaCl dissolvidos 100 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada em balão de volumétrico de 100 mL.

2.1.2.2 Solução de sulfato de zinco 0,05 M

Pesou-se 3,60 g de sulfato de zinco ($ZnSO_4$, Synth) e dissolveu-se em 250 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada em balão de volumétrico de 250 mL.

2.1.2.3 Solução de Methyl Methanesulfonate

Utilizou-se como controle positivo 0,77 μ L de Methyl Methanesulfonate (Sigma-Aldrich- lote MKBH9900V) em 100,0 mL de água desionizada. A solução foi homogeneizada em balão de volumétrico de 250 mL.

2.1.2.4 Solução de Carnoy

A solução Carnoy foi preparada com 300,0 mL de álcool etílico P. A. (Êxodo científica, lote AE11896RA) e 100,0 mL de ácido acético P. A. (Dinâmica, lote 57043). A solução foi utilizada logo após o preparo.

2.1.2.5 Preparo de pellets de *Saccharomyces cerevisiae*

Realizou-se ensaio de toxicidade aguda com o organismo *S. cerevisiae*, proveniente do fermento biológico Fleischman Royal (lote 01/08) de uso comercial.

2.2 Métodos

2.2.1 Obtenção da fração solúvel do solo em água

Pesou-se 50,0 g de solo, em frasco de 250 mL e adicionou-se 50,0 mL de água desionizada, sendo estes mantidos em mesa de agitação à 200 rpm durante 1 hora. Após esse período, os frascos ficaram em repouso por 30 min e utilizado apenas o sobrenadante. Fez-se a análise cromatográfica da fração e verificou-se que o herbicida foi extraído do solo.

2.2.2 Quantificação de micro-organismos do solo antes e após a biodegradação do herbicida

Realizou-se a diluição da fração solúvel do solo (item 2.2.1) até a diluição 10^{-6} , retirando a alíquota de 1mL. As diluições 10^{-4} , 10^{-5} e 10^{-6} foram colocadas nas placas de Petri, na alíquota de 1mL, e depois adicionou-se os meios de culturas. As placas foram incubadas durante 48 horas a $35,5^{\circ}\text{C}$ para as bactérias heterotróficas, e para fungos foram incubados durante 72 horas a 28°C , baseado em Cetesb (1986).

Após o período de incubação realizou-se a leitura das unidades de colônias formadoras por grama de solo (UFC/g solo).

O ensaio foi realizado para todas as amostras de solo retiradas dos tratamentos contidos em respirometros.

2.2.3 Ensaio de fitotoxicidade com sementes de *Eruca sativa*, *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus*

Analisou-se a fração solúvel das amostras do solo (item 2.2.1) retirados dos respirometros de Bartha e Pramer, e concentrações do herbicida Gesapax 6,25, 12,50, 125,00, 250,00, 500,00 e 1000,00 µg/mL.

Como organismo-teste, utilizou-se as sementes de *L. sativa* (alface) da ISLA PAK sem defensivos lote 32469-S2, *E. sativa* (rúcula) da ISLA PAK sem defensivos lote 32791-S2 e *C. sativus* (pepino) da ISLA PAK sem defensivos lote 32486-S2.

O ensaio de fitotoxicidade com sementes foi realizado segundo Morales (2004). Realizou-se o ensaio em triplicata, em placas de Petri contendo 20 sementes dispostas equidistantes na superfície do filtro de papel e 3,00 mL de fração solúvel de amostras de solo contaminado. As placas foram incubadas em incubadora DBO da MARCONI, MA 403, na ausência de luz, a 22°C durante 120 h.

Para os ensaios de sensibilidade, foram utilizados 3,00 mL de solução de sulfato de zinco 0,05 M para controle positivo (Synth), e 3,00 mL de água desionizada como controle negativo.

Ao final de cada ensaio, foram medidos os comprimentos das raízes das sementes germinadas. Foi avaliada a porcentagem de inibição no crescimento da raiz, por meio da equação 6:

$$\% \text{ Inibição} = \frac{(\text{Média do controle negativo} - \text{Média do tratamento})}{\text{Média do controle negativo}} \times 100 \quad (6)$$

O índice de germinação (IG) foi avaliado conforme a equação 7 abaixo:

$$\text{IG} = \frac{\% \text{ germinação} \times \% \text{ comprimento da raiz}}{100} \quad (7)$$

2.2.4 Ensaio de mutagenicidade com *Tradescantia pallida*

Coletou-se 10 plantas de *T. pallida* antes do estágio de inflorescência, para cada tratamento no canteiro do Jardim Experimental do Instituto de Biociência, UNESP, no campus de Rio Claro, SP (Figura 11). O ensaio foi baseado em Rodrigues et al., 2015.

Figura 11 - *T. pallida* para ensaio de mutagenicidade ambiental



(Fonte: Elaborado pela autora)

Para a realização do ensaio, utilizou-se a fração solúvel do solo (descrito no item 4.2.2.1), como também com a concentração de 125,00 µg/mL de herbicida.

As plantas foram conduzidas ao laboratório, e colocadas em béquer de 250,0 mL, contendo 100,0 mL do contaminante, em duplicata e com aeradores (Figura 12).

Após 8 horas de exposição, retirou-se as plantas do contaminante e colocou-as em água desionizada para recuperação e aeração constante.

Após 24 horas de recuperação, fez-se a colheita dos botões florais e fixou-os em solução carnoy. Após esse período fez-se a contagem de tétrades e de micronúcleo. As células foram coradas com carmim 0,2%. Contabilizou-se os micronúcleos presentes em cada tétrade.

Figura 12 - Ensaio de mutagenicidade com *T. pallida*, na presença de diferentes concentrações de herbicida Gesapax como também nas amostras retiradas dos tratamentos contidos nos respirometros de Bartha e Pramer



(Fonte: Elaborado pela autora)

2.2.5 Ensaio com *Saccharomyces cerevisiae*

Utilizou-se 1 tablete de 50,00 g de fermento e suspendeu-se em 100,0 mL de água desionizada. Com o auxílio de uma centrífuga Excelsa Baby I – FANEM, por 5 min a 6000 rpm (2,314 g), centrifugou-se a mistura durante duas vezes, a fim de retirar as impurezas dos *pellets* formado (Figura 13). O processo de centrifugação foi repetido três vezes. O ensaio foi baseado em Régis e Bidoia (2001).

Figura 13 - Preparo da suspensão de *S. cerevisiae* para ensaio de ecotoxicidade

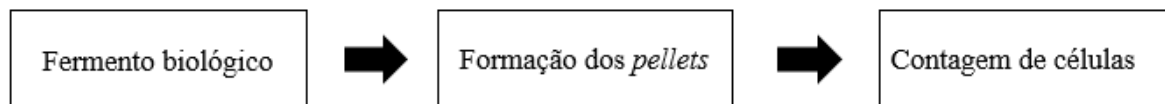


(Fonte: Elaborado pela autora)

Em tubos de ensaio, adicionou-se 1,0 mL da suspensão de *S. cerevisiae* e 9,0 mL das amostras a serem analisadas. Agitou-se os tubos e incubou-os em BOD da SOLAB durante 120 horas à 28°C. Após esse período, analisou-se a viabilidade celular, mediante a contagem das células, coradas com eritrosina em câmara de Neubauer utilizando um

microscópio Axioskop 40 – ZEISS (Figura 14). Fez-se a contagem das células vivas (cor verde) e as células mortas (cor avermelhada).

Figura 14 - Montagem e leitura do ensaio com *S. cerevisiae*



(Fonte: Elaborado pela autora)

Utilizou-se a fórmula a seguir para o cálculo da porcentagem de viabilidade celular (Equação 8).

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{células vivas} \times 100}{\text{células totais}} \quad (8)$$

2.2.6 Análise estatística

Fez-se as análises estatísticas dos resultados obtidos, por meio do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando como diferença significativa $p \leq 0,05$, a fim de avaliar os diferentes tipos de tratamentos, uma vez que os dados não possuem distribuição normal. As análises foram realizadas no software BioEstat 5.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Quantificação da microbiota após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Fez-se a quantificação de bactérias heterotróficas e fungos antes (tempo 0 dias) e após a contaminação do solo (132 dias) com o herbicida Gesapax (Tabela 11), avaliadas em unidades formadoras de colônias por grama de solo.

Tabela 11 - Quantificação de bactérias heterotróficas e fungos do solo, após o término do ensaio de respirometria (132 dias). Tempo inicial refere-se logo após a contaminação do solo com o herbicida

Grupo microbiano Tratamentos	Bactérias heterotróficas n° UFC/mL 10⁵	Fungos totais n° UFC/mL 10⁴
6,25 µg/mL tempo inicial	5,5	<10 ⁴
12,50 µg/mL tempo inicial	3,8	<10 ⁴
125,00 µg/mL tempo inicial	2,4	<10 ⁴
Solo controle (T1)	30,0	1
Controle surfactante (T2)	32,0	10
Controle consórcio microbiano (T3)	35,0	<10 ⁴
Controle herbicida [6,25 µg/mL] (T4)	10,5	1
Controle herbicida [12,50 µg/mL] (T5)	9,9	2
Controle herbicida [125,00 µg/mL] (T6)	8,7	<10 ⁴
6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T7)	16,9	<10 ⁴
12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T8)	14,5	<10 ⁴
125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano (T9)	12,0	<10 ⁴
6,25 µg/mL de herbicida + surfactante (T10)	18,0	10
12,50 µg/mL de herbicida + surfactante (T11)	13,7	8
125,00 µg/mL de herbicida + surfactante (T12)	10,8	5
6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (T13)	12,0	6
12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (T14)	11,1	4
125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante (T15)	10,5	<10 ⁴

(Fonte: Elaborado pela autora)

Os resultados foram obtidos após 132 dias de incubação, em que parte da molécula do herbicida havia sido degradado. Então, provavelmente, os baixos valores da quantificação, podem ser decorrentes do envelhecimento da microbiota, restando apenas biomassa microbiana. O mesmo pôde ser observado no ensaio de respirometria de Bartha e Pramer (Figura 7) e no ensaio cromatográfico (Figuras 9).

Ao adicionar consórcio microbiano e surfactante, houve um aumento de 54,16%, para a concentração de 6,25 µg/mL, em relação ao tempo inicial. O mesmo ocorreu para a concentração 12,50 µg/mL, finalizando com aumento de 65,76%, corroborando com os dados obtidos no ensaio de respirometria, o qual houve aumento na atividade microbiana quantificado pelo aumento de CO₂ e por meio do ensaio cromatográfico, que ocorreu redução na concentração de herbicida ao longo do tempo, favorecendo o metabolismo microbiano.

A presença do surfactante favoreceu o crescimento de fungos, propiciando fonte de carbono para seu desenvolvimento.

Nos tratamentos em geral, não houve grande quantidade de formação de colônias de fungos para a diluição utilizada. Dessa forma, a pouca formação de colônias de fungos foi decorrente da faixa de diluição utilizada no ensaio.

Em meados da década de 1990, as bactérias do gênero *Pseudomonas* sp. ADP e *Nocardioides* sp. C190 foram isoladas e demonstraram rapidez na degradação de herbicidas triazínicos (SHANER et al., 2010).

Existe uma variedade de cepas de bactérias envolvidas no processo de degradação das triazinas, a partir da via de hidroxilação seguido pela remoção direta dos grupos alquilamino. No entanto, apenas as bactérias gram-negativas atuam na mineralização completa do anel triazínico, tais como os gêneros *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Pseudomonobacter*, *Chelatobacter* e alguns gêneros ainda não identificados (SATSUMA, 2010).

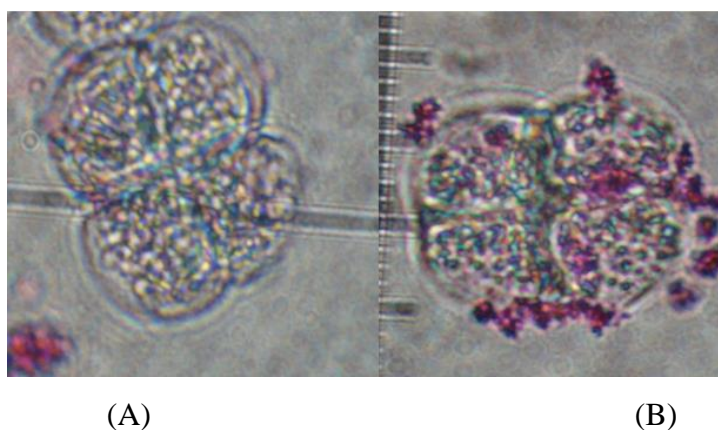
Os fungos apareceram em pequenas quantidades, para a diluição 10⁴. Houve aumento em sua quantificação em tratamentos com adição de surfactante, o qual provavelmente, serviu como fonte de carbono para o seu metabolismo diante do Gesapax.

Portanto, tais resultados corroboram com a literatura, a qual diz que a degradação do herbicida Gesapax ocorre principalmente por ação bacteriana (RÉGO et al., 2014; SATSUMA, 2010; SHANER et al., 2010)

3.2 Ensaio de mutagenicidade com *Tradescantia pallida*

A Figura 15 mostra o aparecimento de célula no estágio de tétrade, corada com carmim, para posterior contagem celular.

Figura 15 - Célula de *T. pallida* em estágio de tétrade



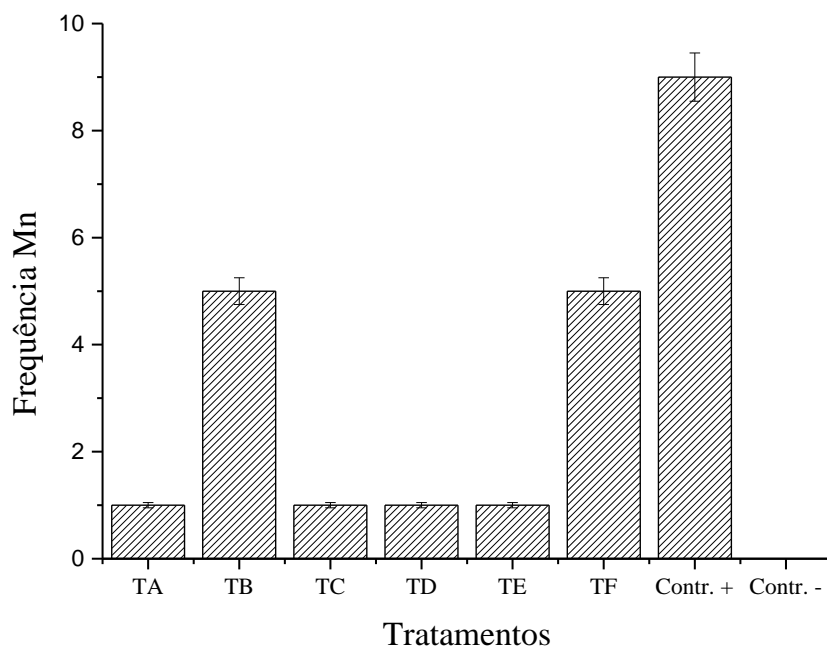
(A) Célula em forma de tétrade, com o aparecimento de um micronúcleo (B). (Fonte: Elaborado pela autora)

Após o encontro do estágio da divisão celular em formato de tétrade (A), fez-se a contagem do aparecimento de micronúcleos (B) em cada tétrade.

Pode-se observar que houve a formação de micronúcleos ao deixar a *T. pallida* em exposição ao herbicida. Dessa forma, possivelmente houve erros na replicação do DNA durante a duplicação celular, na fase de prófase I da meiose, ocorrendo o aparecimento de efeitos mutagênicos na forma de micronúcleos (LEITE, ZANDONATO e FLUMINHAN, 2013; RODRIGUES, 1997).

A Figura 16 mostra a frequência de micronúcleos avaliados no ensaio de mutagenicidade com *T. pallida* antes e após a incubação do solo contaminado com herbicida, bem como com o herbicida sem diluição.

Figura 16 – Resultado do ensaio de mutagenicidade com *T. pallida*, antes e após a incubação do solo contaminado com o herbicida, 132 dias



(TA: Solo controle; TB: Solo + herbicida (125,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$); TC: Solo + consórcio microbiano; TD: Solo + herbicida (125,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$) + surfactante; TE: solo + surfactante; TF: herbicida puro (125,00 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Controle (+) trifluralina; Controle (-) água desionizada). Mn refere-se aos micronúcleos. (Fonte: Elaborado pela autora)

A técnica de contagem de micronúcleo apresentou-se de forma simples e rápida para obtenção dos resultados, devido ao elevado número de células (SILVA et al., 2013). Contudo, a coleta das flores deve ser muito bem observada, a fim de encontrar os botões corretos, ainda em estágio de tétrade.

O ensaio com *T. pallida* para avaliação do potencial mutagênico do herbicida Gesapax foi rápido, de fácil obtenção e baixo custo. A planta possui fácil adaptação em qualquer ambiente, como já observado por Teixeira e Barbério (2012), e demonstrou-se bastante sensível a presença do herbicida.

O herbicida Gesapax, após 132 dias, causou interferência mutagênica na *T. pallida*, tanto em aplicação no solo quanto sem diluição, constituindo a maior frequência de aparecimento de micronúcleo.

Contudo, com a aplicação de surfactante e consórcio microbiano diminuiu o efeito mutagênico, assemelhando-se ao solo controle, o qual não havia aplicação de herbicida. O mesmo efeito ocorreu nos ensaios de avaliação de biodegradação e de fitotoxicidade.

Mesmo misturada ao solo, o herbicida causou mutagenicidade semelhante ao herbicida sem diluição, uma vez que o ensaio com *T. pallida* é bastante sensível à presença de contaminante (TEIXEIRA e BARBÉRIO, 2012).

Dessa forma mesmo após 132 dias de incubação, para o ensaio de respirometria, o herbicida Gesapax causou efeitos mutagênicos na planta. Tais respostas são preocupantes, pois podem provocar danos em células germinativas e somáticas, que podem resultar em doenças hereditárias (DEARFIELD, 1998; TEIXEIRA e BARBÉRIO, 2012).

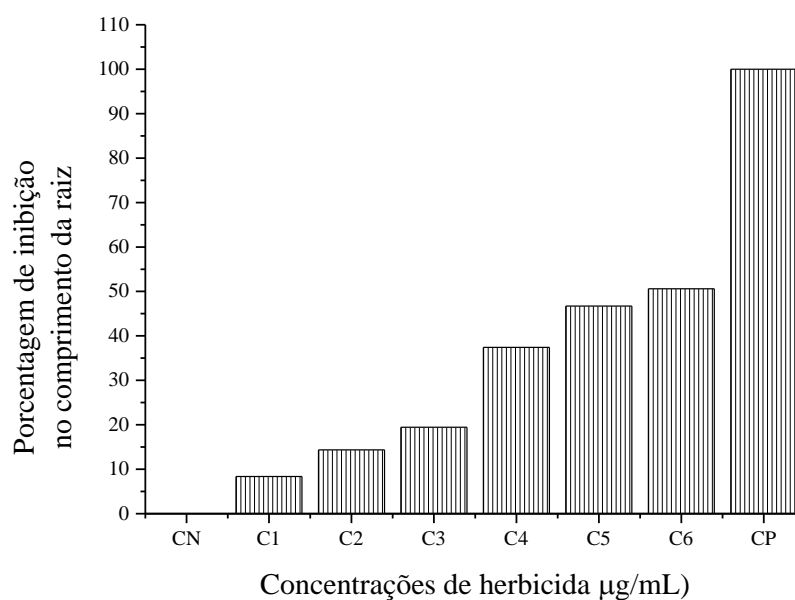
Portanto, a necessidade da avaliação das propriedades mutagênicas para compostos orgânicos, torna-se cada mais imprescindível, a fim de empregar medidas para a biorremediação de áreas contaminadas (MIELLI, 2008).

3.3 Ensaios de fitotoxicidade com sementes de *Eruca sativa*, *Lactuca sativa* e *Cucumis sativus* na presença do herbicida Gesapax

3.3.1 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Eruca sativa*

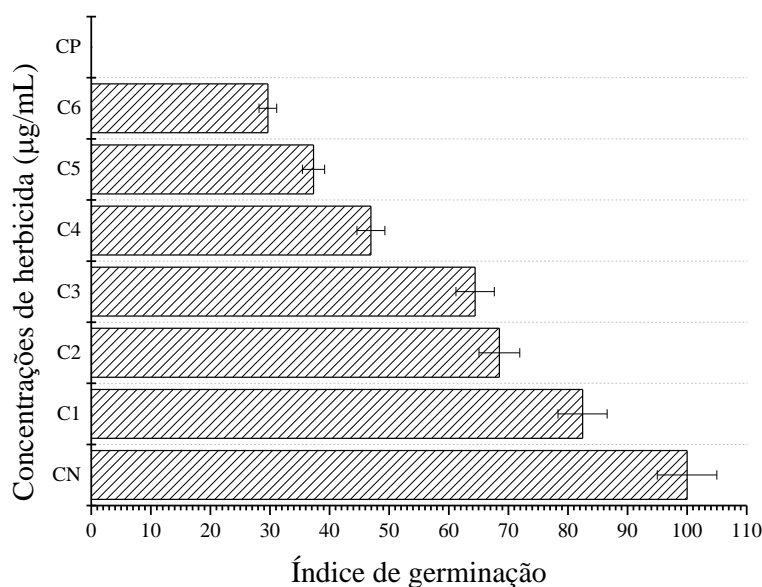
Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *E. sativa*, até a concentração 1000,00 $\mu\text{g/mL}$, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 17) na presença do herbicida, e o índice de germinação (Figura 18).

Figura 17 - Inibição no crescimento raiz de *E. sativa* na presença de diferentes concentrações do herbicida Gesapax



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 $\mu\text{g/mL}$; C2: 12,50 $\mu\text{g/mL}$; C3: 125,00 $\mu\text{g/mL}$; C4: 250,00 $\mu\text{g/mL}$; C5: 500,00 $\mu\text{g/mL}$; C6: 1000,00 $\mu\text{g/mL}$; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

Figura 18 - Índice de germinação de *E. sativa* na presença de diferentes concentrações do herbicida



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 µg/mL; C2: 12,50 µg/mL; C3: 125,00 µg/mL; C4: 250,00 µg/mL; C5: 500,00 µg/mL; C6: 1000,00 µg/mL; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

Para as concentrações utilizadas no ensaio de biodegradação (C1, C2 e C3), demonstraram início de toxicidade para a semente, inibindo quase 20% da população de sementes (C1), interferindo em seu desenvolvimento, observado pelo índice de germinação. As concentrações 6,25 µg/mL e 125,00 µg/mL são diferentes significativamente ($p = 0,042$).

Com o aumento das concentrações do herbicida houve maior aparecimento de diferenças significativas entre as concentrações ($p \leq 0,05$).

O herbicida Gesapax mesmo em baixas concentrações causou inibição no crescimento da raiz de *E. sativa*. Ao ser avaliada pelo parâmetro de inibição no crescimento, a concentração de 250,00 µg/mL resultou em aproximadamente 40% de inibição e a concentração de 500,00 µg/mL inibiu quase a metade do crescimento das sementes, sendo grande agente tóxico para sementes de *E. sativa*.

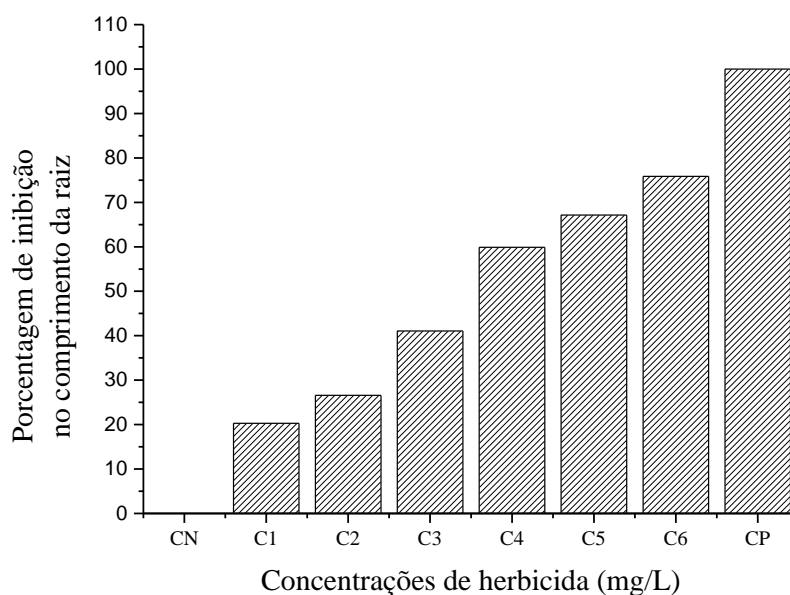
Para a análise do índice de germinação, verificou-se que também houve uma diminuição gradual. A partir da concentração 250,00 µg/mL do herbicida, metade das sementes sofreram interferências em seu desenvolvimento, findando-se com a maior de concentração avaliada, 1000,00 µg/mL, que causou 33,33% de fitotoxicidade para a semente.

Dessa forma, a semente de *E. sativa* mostrou-se sensível à presença do herbicida. O aumento de inibição no crescimento da raiz demonstrou o efeito tóxico do Gesapax ao desenvolvimento da semente.

3.3.2 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Lactuca sativa*

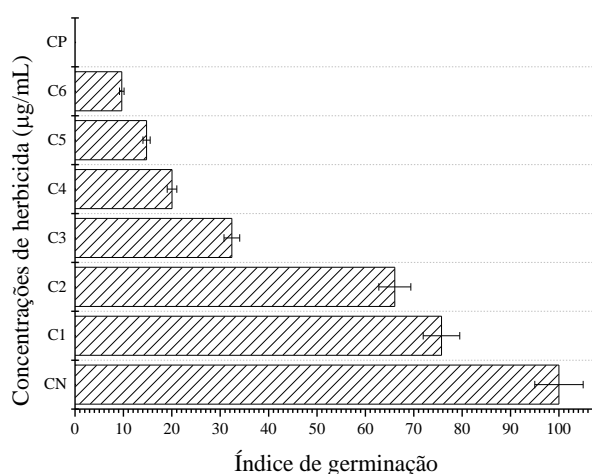
Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa*, até a concentração de 1000,00 µg/mL, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 19) e o índice de germinação na presença do herbicida Gesapax (Figura 20).

Figura 19 - Inibição no crescimento da raiz de *L. sativa* na presença de diferentes concentrações de herbicida



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 $\mu\text{g/mL}$; C2: 12,50 $\mu\text{g/mL}$; C3: 125,00 $\mu\text{g/mL}$; C4: 250,00 $\mu\text{g/mL}$; C5: 500,00 $\mu\text{g/mL}$; C6: 1000,00 $\mu\text{g/mL}$; CP: Controle positivo).
(Fonte: Elaborado pela autora)

Figura 20 - Índice de germinação de *L. sativa* na presença de diferentes concentrações de herbicida



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 $\mu\text{g/mL}$; C2: 12,50 $\mu\text{g/mL}$; C3: 125,00 $\mu\text{g/mL}$; C4: 250,00 $\mu\text{g/mL}$; C5: 500,00 $\mu\text{g/mL}$; C6: 1000,00 $\mu\text{g/mL}$; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

Ao longo do aumento das concentrações ocorreu diminuição no crescimento da raiz, mas de forma menos acentuada ao longo da aplicação do herbicida.

Com relação as concentrações utilizadas no ensaio de biodegradação (C1, C2 e C3), demonstraram início de toxicidade à semente, resultando em quase 50% de inibição no crescimento.

Para o parâmetro índice de germinação, as sementes foram afetadas pela presença do herbicida, principalmente a concentração 125,00 µg/mL, causando diminuição em seu desenvolvimento.

As concentrações 6,25 µg/mL e 125,00 µg/mL são diferentes significativamente ($p = 0,002$). O mesmo ocorreu para a semente de *E. sativa*. Dessa forma, a semente de *L. sativa* foi bastante sensível ao herbicida com o aumento das suas concentrações.

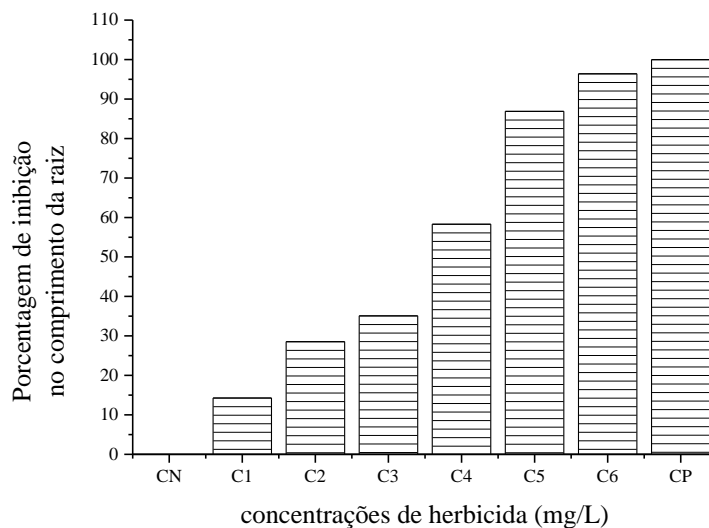
A partir do parâmetro porcentagem de inibição, pode-se observar que mesmo na mais baixa concentração utilizada na agricultura, 6,25 µg/mL, o herbicida Gesapax causou 20,28% de inibição no crescimento da raiz. Com o aumento das concentrações ocorreram-se maiores inibições no desenvolvimento e evolução de *L. sativa*.

Dessa maneira, o herbicida Gesapax em concentrações que são aplicadas em campo, causou intensa interferência ao desenvolvimento da semente.

3.3.3 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Cucumis sativus*

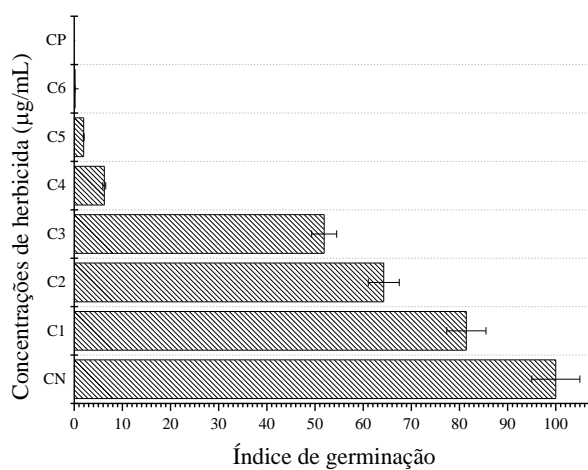
Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *C. sativus*, até a concentração de 1000 µg/mL, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 21) e o índice de germinação na presença do herbicida (Figura 22).

Figura 21 - Inibição no crescimento da raiz de *C. sativus* na presença de diferentes concentrações do herbicida Gesapax



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 $\mu\text{g/mL}$; C2: 12,50 $\mu\text{g/mL}$; C3: 125,00 $\mu\text{g/mL}$; C4: 250,00 $\mu\text{g/mL}$; C5: 500,00 $\mu\text{g/mL}$; C6: 1000,00 $\mu\text{g/mL}$; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

Figura 22 - Índice de germinação de *C. sativus* na presença de diferentes concentrações de herbicida



(CN: Controle negativo; C1: 6,25 $\mu\text{g/mL}$; C2: 12,50 $\mu\text{g/mL}$; C3: 125,00 $\mu\text{g/mL}$; C4: 250,00 $\mu\text{g/mL}$; C5: 500,00 $\mu\text{g/mL}$; C6: 1000,00 $\mu\text{g/mL}$; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

C. sativus apresentou sensibilidade ao herbicida com o aumento das concentrações, sofrendo restrições ao seu crescimento.

As concentrações 6,25, 12,50 e 125,00 µg/mL, utilizadas no ensaio de biodegradação, resultaram em início de toxicidade a semente, dificultando o seu desenvolvimento.

Ao observar a porcentagem de inibição (Figura 21) verifica-se que, a concentração 1000 mg/L produziu efeito tóxico próximo ao controle positivo.

Mesmo nas concentrações iniciais (6,25 µg/mL) o herbicida produziu interferências ao crescimento, inibindo quase 20% das sementes de *C. sativus*.

O parâmetro índice de germinação mostrou maior sensibilidade que a semente de *C. sativus* sofreu na presença do herbicida Gesapax, afetando intensamente o desenvolvimento natural da semente.

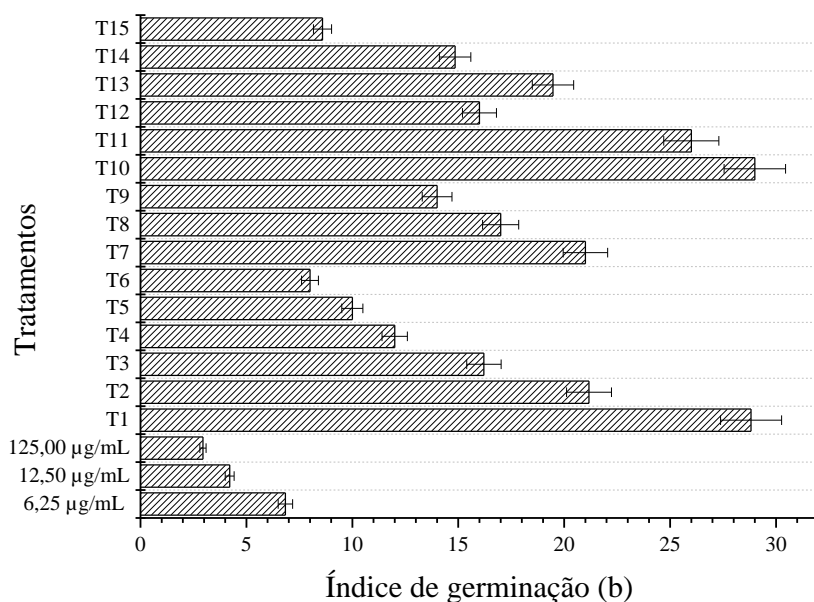
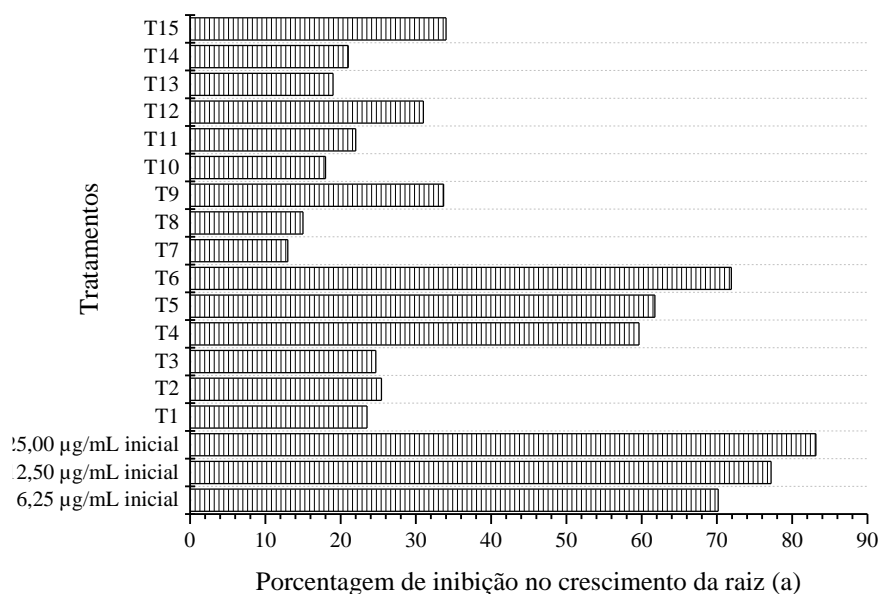
Entre as concentrações 6,25 µg/mL e 12,50 µg/mL houve um aumento de 20,88% de redução no índice de germinação. O mesmo foi próximo para 12,50 µg/mL e 125,00 µg/mL, resultando em 19,25% de redução. Dessa forma, o herbicida Gesapax causou elevada toxicidade para as sementes de *C. sativus*.

3.4 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Lactuca sativa*, *Eruca sativa* e *Cucumis sativus* após 132 dias de incubação em frascos respirométricos de Bartha e Pramer

3.4.1 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Eruca sativa*

Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *E. sativa* e fração solúvel do solo incubado, após 132 dias do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 23 a) e o índice de germinação na presença do herbicida Gesapax (Figura 23 b).

Figura 23 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para a semente de *E. sativa*



(a) porcentagem de inibição no crescimento da semente e índice de germinação (b) CN: Controle negativo (água desionizada); T1: Solo controle; T2: Controle surfactante; T3: Controle consórcio microbiano; T4: Controle herbicida (6,25 µg/mL); T5: Controle herbicida (12,50 µg/mL); T6: Controle herbicida (125,00 µg/mL); T7: 6,25 µg/mL de

herbicida com consórcio microbiano; T8: 12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T9: 125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T10: 6,25 µg/mL de herbicida com surfactante; T11: 12,50 µg/mL de herbicida com surfactante; T12: 125,00 µg/mL de herbicida com surfactante; T13: 6,25 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T14: 12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T15: 125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

O herbicida causou interferência no crescimento da raiz de *E. sativa*, mesmo no tempo inicial de aplicação. Com o aumento das concentrações do herbicida, o crescimento sofreu diminuição gradativamente.

O solo controle produziu pouco efeito negativo à *E. sativa*, resultando um decréscimo de 17,64% em relação ao controle negativo.

Não houve diferenças significativas entre o controle surfactante e o controle consórcio microbiano, apenas entre controle solo com controle surfactante e controle solo com controle consórcio microbiano.

Adição de consórcio microbiano foi crucial para a diminuição da porcentagem de inibição no crescimento da raiz. Inicialmente, o herbicida Gesapax acarretou em 70,17% de inibição. Contudo, após a aplicação de consórcio microbiano, avaliados após 132 dias, a inibição foi de 12,98%, para a concentração 6,25 µg/mL. O mesmo pode ser observado para as concentrações 12,50 e 125,00 µg/mL.

A utilização de surfactante em solo contaminado por Gesapax também provocou diminuições na inibição do crescimento, contudo foram menos expressivas do que com a adição com consórcio microbiano.

Ao adicionar surfactante, houve uma redução de 74,35%, para a concentração 6,25 µg/mL. Mesmo para a maior concentração do herbicida, 125,00 µg/mL, houve 59,11% de redução na toxicidade entre o tempo inicial de aplicação e final após 132 dias.

A aplicação conjunta de consórcio microbiano e surfactante, também influenciaram para a diminuição na porcentagem de inibição do crescimento da raiz. No entanto, os valores obtidos foram menores em relação aos tratamentos com apenas herbicida e consórcio microbiano, ocorrendo decréscimo de 72,92%, em relação à concentração 6,25 µg/mL.

O parâmetro índice de germinação de sementes foi importante para a avaliação da influência do herbicida Gesapax no solo. Observa-se que com o aumento das

concentrações nos tratamentos o índice foi menor. Dessa forma, este parâmetro foi sensível à presença de Gesapax e aos tratamentos utilizados para a biodegradação da molécula.

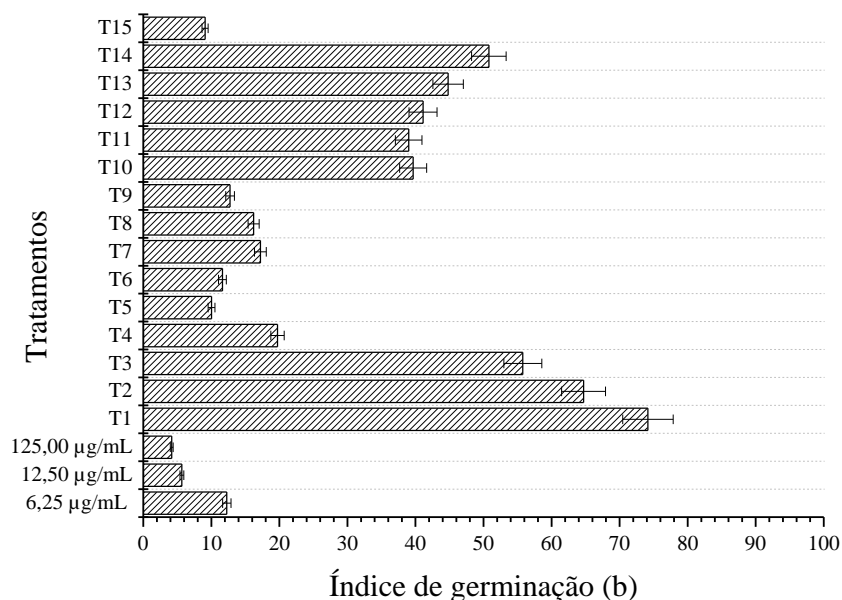
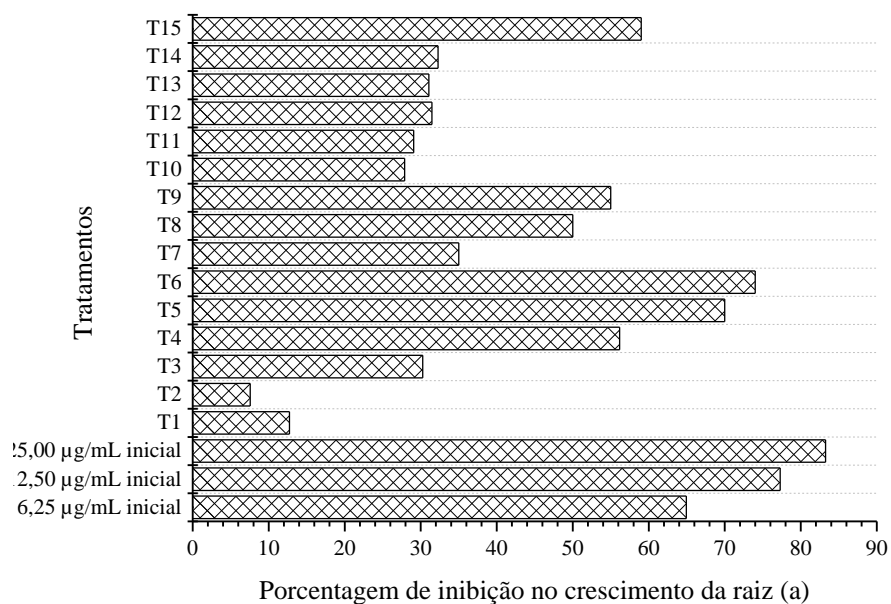
Observou-se diferença significativa ($p = 0,003$) entre o tratamento contendo solo, herbicida e consórcio microbiano e o tratamento com solo, herbicida e surfactante. Assim, para a semente de *E. sativa* o consórcio microbiano atuou de forma mais efetiva.

Portanto, a adição de consórcio microbiano foi essencial para o aumento do crescimento da raiz de *E. sativa*. O surfactante também obteve bom resultado, contudo com menor expressividade.

3.4.2 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Lactuca sativa*

Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa*, após o ensaio de respirometria de Bartha e Pramer, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 24 a) e o índice de germinação na presença do herbicida Gesapax (Figura 24 b).

Figura 24 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para semente de *L. sativa*



(a) porcentagem de inibição no crescimento da semente e índice de germinação (b) CN: Controle negativo (água desionizada); T1: Solo controle; T2: Controle surfactante; T3: Controle consórcio microbiano; T4: Controle herbicida (6,25 µg/mL); T5: Controle herbicida (12,50 µg/mL); T6: Controle herbicida (125,00 µg/mL); T7: 6,25 µg/mL de

herbicida com consórcio microbiano; T8: 12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T9: 125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T10: 6,25 µg/mL de herbicida com surfactante; T11: 12,50 µg/mL de herbicida com surfactante; T12: 125,00 µg/mL de herbicida com surfactante; T13: 6,25 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T14: 12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T15: 125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

O surfactante contribuiu para o crescimento da raiz, mesmo na presença do herbicida. Para a concentração 12,50 µg/mL não houve diferença significativa aos tratamentos com solo, herbicida e surfactante, e o tratamento com solo, herbicida e mistura de consórcio microbiano e surfactante.

Os tratamentos contendo consórcio microbiano (T7, T8, T9), favoreceram o crescimento da raiz, mas em menor expressividade, em comparação aos tratamentos contendo surfactante e aos tratamentos contendo solo, herbicida e mistura de consórcio microbiano e surfactante.

O herbicida aplicado no tempo inicial, causou perturbação ao crescimento da raiz de *L. sativa*. Contudo, ao final de 132 dias, a sua fitotoxicidade foi diminuída em uma pequena parcela em 13,50% em relação ao tratamento com solo e herbicida, na concentração 6,25 µg/mL. Nas concentrações 12,50 µg/mL e 125,00 µg/mL pode-se observar também este decréscimo do seu potencial tóxico para a semente.

Isso pode ser decorrente da presença de micro-organismos que se adaptaram com a presença do herbicida, ao longo do tempo, metabolizando parte da sua molécula (Figuras 7 e 9), reduzindo assim a sua fitotoxicidade para a *L. sativa*.

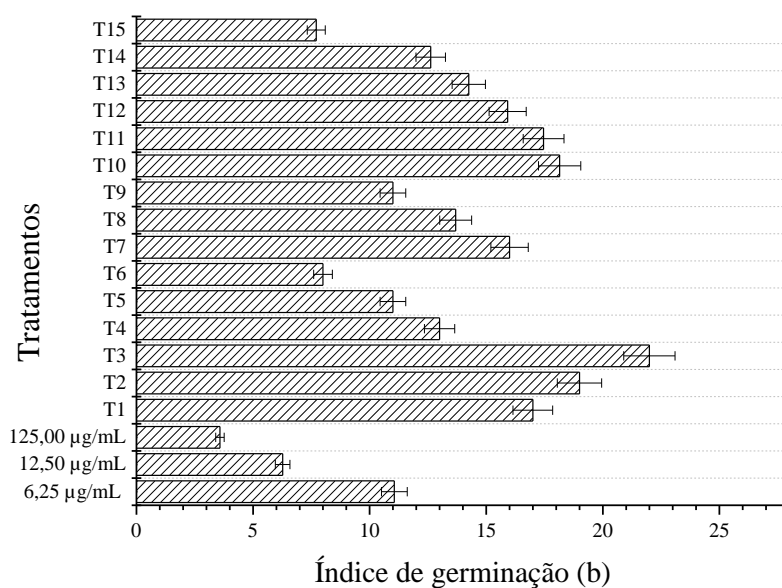
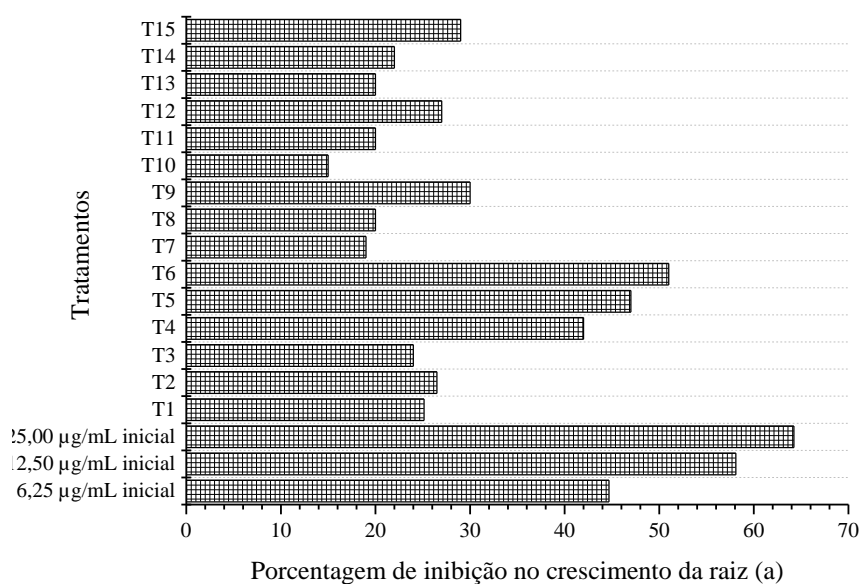
Entretanto, ao adicionar surfactante, a diminuição na inibição foi mais expressiva, totalizando em 57,06% para 6,25 µg/mL, 62,37% para 12,50 µg/mL e 62,20% para 125,00 µg/mL. Efeitos parecidos ocorreram nos tratamentos contendo solo, herbicida e misturas de consórcio microbiano e surfactante.

Dessa maneira, a aplicação de surfactante e a utilização de consórcio microbiano foram essenciais para o desenvolvimento da raiz, sendo que a bioestimulação por surfactante atuou de forma mais ativa.

3.4.3 Ensaio de fitotoxicidade com semente de *Cucumis sativus*

Fez-se o ensaio de fitotoxicidade utilizando sementes de *C. sativus*, após 132 dias de incubação, avaliando a porcentagem de inibição no crescimento da raiz (Figura 25 a) e o índice de germinação na presença do herbicida (Figura 25 b).

Figura 25 - Porcentagem de inibição no crescimento da raiz da semente de plântulas e índice de germinação para a semente *C. sativus*



(a) porcentagem de inibição no crescimento da semente e índice de germinação (b) CN: Controle negativo (água desionizada); T1: Solo controle; T2: Controle surfactante; T3: Controle consórcio microbiano; T4: Controle herbicida (6,25 µg/mL); T5: Controle herbicida (12,50 µg/mL); T6: Controle herbicida (125,00 µg/mL); T7: 6,25 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T8: 12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T9: 125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano; T10: 6,25 µg/mL

de herbicida com surfactante; T11: 12,50 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida com surfactante; T12: 125,00 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida com surfactante; T13: 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T14: 12,50 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; T15: 125,00 $\mu\text{g/mL}$ de herbicida com consórcio microbiano e surfactante; CP: Controle positivo). (Fonte: Elaborado pela autora)

O herbicida Gesapax no tempo inicial resultou em grande interferência à semente, causando aumentos de 74,92%, para a concentração 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 133,44% para a concentração 12,50 $\mu\text{g/mL}$ e 158,23% para a concentração 125,00 $\mu\text{g/mL}$, em comparação ao solo controle.

No entanto, ao longo tempo, provavelmente houve a formação de microorganismos adaptados à presença do herbicida Gesapax, resultando em aumento do crescimento, no qual pode-se ver a sua atuação nos tratamentos controle herbicida após 132 dias, em que obtiveram diminuição na inibição do crescimento.

Contudo, a redução da inibição foi mais acentuada nos tratamentos contendo adição de consórcio microbiano e/ou surfactante, favorecendo a manutenção da semente na presença do herbicida.

Ao avaliar o parâmetro porcentagem de inibição, verifica-se que ao adicionar consórcio microbiano ao solo contaminado por herbicida Gesapax, não houve diminuição e sim um acréscimo de 8,04% na inibição. Possivelmente, ao metabolizar o herbicida, o consórcio microbiano liberou enzimas as quais prejudicaram a manutenção da semente.

O mesmo pode ser observado nos tratamentos com herbicida e adição conjunta de consórcio microbiano e surfactante, os quais houveram reduções pequenas na inibição.

No entanto, a adição de surfactante favoreceu a diminuição da inibição em 38,76%, para a concentração 6,25 $\mu\text{g/mL}$, 48,08% para a concentração 12,50 $\mu\text{g/mL}$ e 43,47% para a concentração 12,50 $\mu\text{g/mL}$.

O surfactante ao atuar como bioestimulação na biodegradação do herbicida Gesapax, beneficiou o decréscimo da inibição para o crescimento da raiz.

Assim, a adição de surfactante e ação conjunta de consórcio microbiano e surfactante auxiliaram na manutenção da semente de *C. sativus*.

3.5 Considerações finais do ensaio de fitotoxicidade com sementes

Os dados foram coletados após 132 dias de incubação do solo, sendo que a concentração do herbicida sofreu diminuição. Portanto, os resultados podem ser referentes a presença de interferentes do próprio ou o surgimento de metabólitos, os quais podem ser mais tóxicos do que o originou.

As áreas médias das placas de Petri e papéis de filtro utilizados nos ensaios são próximas às áreas médias dos respirometros de Bartha e Pramer. Assim, pode-se correlacionar os dados obtidos nos ensaios de biodegradação, afirmando que o surfactante possuiu capacidade para diminuir a toxicidade do herbicida no solo para sementes.

Dessa forma, em escala maior, como hectares, a fitotoxicidade do herbicida pode ser diminuída com a aplicação de surfactante no solo contaminado.

As três espécies utilizadas nos ensaios de fitotoxicidade com sementes, demonstraram sensibilidade ao herbicida, tanto na fração solúvel quanto na forma líquida (sem diluição).

Foi realizado a análise estatística para avaliação da dose resposta das sementes ao herbicida (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da concentração efetiva (CE50) do herbicida na presença das três espécies de sementes

Sementes	CE50 (µg/mL)
<i>L. sativa</i>	129,71
<i>E. sativa</i>	144,14
<i>C. sativus</i>	160,52

(Fonte: Elaborado pela autora)

Pode-se observar que a semente de *L. sativa* apresentou maior sensibilidade ao herbicida, obtendo o menor valor de concentração efetiva, a qual inibiu metade do número de sementes (CE50).

A semente de *L. sativa* é bastante utilizada em ensaios de fitotoxicidade para diversos compostos, por ser uma semente que proporciona maior sensibilidade aos compostos e de fácil manuseio (SILVA et al., 2016).

Já semente de *E. sativa*, também apresentou respostas à presença do herbicida Gesapax, contudo, o seu manuseio foi mais difícil, pois as raízes são muito finas e podem quebrar durante o manuseio, dificultando o ensaio.

C. sativus apresentou maior resistência a presença do herbicida, resultando em um valor de CE50 maior. Contudo, o seu manuseio foi relativamente fácil, as raízes são mais espessas, não ocorrendo o perigo de quebrar durante a leitura.

Em estudos de fitotoxicidade USEPA (2005), concluíram que a semente de *L. sativa* é mais sensível a presença do herbicida do que em comparação a semente de *C. sativus*, possuindo valor de *endpoint* CE50 menor.

Silva et al. (2016) concluíram que a semente de *C. sativus* não é uma variável precisa para a detecção da presença de herbicida, uma vez que pode causar sintomas de intoxicação sem ao menos afetar o crescimento da planta.

As três espécies de sementes utilizadas no ensaio, mostraram sensibilidade ao herbicida, mas recomenda-se a utilização de sementes de *L. sativa* para a realização de ensaios de fitotoxicidade, pois é um bioindicador mais sensível a atividade vegetativa (USEPA, 2005).

3.6 Ensaio de toxicidade com *Saccharomyces cerevisiae*

3.6.1 Ensaio de toxicidade com *Saccharomyces cerevisiae* com diferentes concentrações de herbicida Gesapax

Os ensaios de toxicidade com *S. cerevisiae* foram realizados com diferentes concentrações de herbicida Gesapax, a fim de avaliar o potencial tóxico do herbicida para o organismo teste, após 72 horas de exposição (Tabela 13).

Tabela 13 - Ensaio de toxicidade com *S. cerevisiae* em diferentes concentrações de herbicida Gesapax. (CN: Controle negativo)

Concentrações de herbicida Gesapax g/L	Nº células vivas- 10 ⁷ células/mL	% de viabilidade celular
CN	5,30	100,00
1,00	3,03	93,82
10,00	1,20	82,15
25,00	1,04	80,30
50,00	0,90	78,78
75,00	0,75	75,08
100,00	0,64	69,53

(Fonte: Elaborado pela autora)

Durante as análises foi necessário aumentar as concentrações, a fim de encontrar a concentração efetiva (CE50). Gaytán et al. (2013), observaram essa deficiência no ensaio de toxicidade com *S. cerevisiae*, no qual foram necessárias concentrações elevada de pesticida, a fim de avaliar os efeitos tóxicos, devido à resistência à inúmeros compostos.

Com relação ao número de células vivas, obteve-se CE50 de 20,19 g/L. O herbicida Gesapax dificultou o desenvolvimento da *S. cerevisiae* com o aumento das suas concentrações. A quantidade celular de *S. cerevisiae* sofreu diminuição com o aumento das concentrações de herbicida. Em relação ao controle negativo, ocorreu diminuição de

42,83% para a concentração de 1,0 g/L, quase 50% de interferência. O mesmo ocorreu para a viabilidade celular.

3.6.2 Ensaio de toxicidade com *S. cerevisiae* referente ao ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Avaliou-se a toxicidade dos tratamentos do solo contaminado com herbicida Gesapax, antes e após o processo de biodegradação, utilizando o organismo teste *S. cerevisiae* (Tabela 14).

Tabela 14 - Ensaio de toxicidade do solo com *S. cerevisiae* após o término do ensaio de respirometria de Bartha e Pramer

Tratamentos	Nº células vivas 10 ⁶ células/mL	% de viabilidade
6,25 µg/mL tempo inicial	5,55	20,74
12,50 µg/mL tempo inicial	4,59	17,15
125,00 µg/mL tempo inicial	3,33	12,44
Solo controle	10,40	38,00
Controle surfactante	10,00	37,00
Controle consórcio microbiano	11,3	42,24
Controle herbicida [6,25 µg/mL]	8,37	31,29
Controle herbicida [12,50 µg/mL]	7,25	27,10
Controle herbicida [125,00 µg/mL]	5,66	21,16
6,25 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano	6,68	24,97
12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano	5,58	20,85
125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano	9,58	35,81
6,25 µg/mL de herbicida com surfactante	19,58	73,19
12,50 µg/mL de herbicida com surfactante	8,33	31,14
125,00 µg/mL de herbicida com surfactante	5,25	19,62
6,25 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante	12,10	45,23
12,50 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante	10,00	37,38
125,00 µg/mL de herbicida com consórcio microbiano e surfactante	4,65	17,38

(Fonte: Elaborado pela autora)

Observa-se que a viabilidade celular diminuiu após o processo de degradação do herbicida. Um dos fatores pode ser a presença de metabólitos resultantes da degradação da molécula, os quais possivelmente são mais tóxicos à *S. cerevisiae* do que o próprio herbicida sem estar presente no solo. Dessa forma, mostra o grande potencial de toxicidade que o herbicida apresenta, mesmo após a sua metabolização. No entanto, neste trabalho não foi possível realizar a quantificação dos metabólitos decorrentes da biodegradação do herbicida.

Para a concentração 6,25 µg/mL o surfactante foi essencial para o aumento da viabilidade celular, resultando em 71,66% de aumento em relação ao tempo inicial e 57,25% de aumento em comparação ao solo com herbicida (T4).

Contudo, para a concentração 12,50 µg/mL de herbicida, a adição da mistura de consórcio microbiano e surfactante foi fundamental para o aumento da atividade celular de *S. cerevisiae*, derivando em aumento de 62,08% comparado ao solo contaminado no tempo inicial, e 40,00% ao solo com herbicida após 132 dias.

É importante ressaltar que nos tratamentos controle herbicida 6,25 µg/mL), controle herbicida 12,50 µg/mL), e controle herbicida 125,00 µg/mL, não houve adição de surfactante e consórcio microbiano, mesmo assim, após 132 dias de incubação do solo, houve um aumento na viabilidade celular. Isto foi observado nos ensaios ecotoxicológicos anteriores. Possivelmente, o herbicida foi degradado ao longo do tempo por micro-organismos que se adaptaram a sua presença no solo.

No tratamento com solo, 6,25 µg/mL de herbicida e surfactante resultou em 73,19% de viabilidade celular. Assim, o surfactante foi essencial para acelerar a diminuição do potencial tóxico do herbicida Gesapax para o organismo teste.

A *S. cerevisiae* apresentou-se menos sensível ao herbicida do que em relação aos outros ensaios ecotoxicológicos realizados. Foi um ensaio mais complexo e demorado, pois o organismo demonstrou-se menos sensível ao herbicida.

No entanto, o ensaio de toxicidade com *S. cerevisiae* pode-se ser utilizado de forma preliminar, para amostras ambientais, e posteriormente ser complementado com ensaios mais complexos (GIL et al., 2015).

CAPÍTULO 3

Ensaio com biologia molecular por DGGE em solo contaminado com herbicida Gesapax

1. INTRODUÇÃO

As comunidades microbianas podem estar associadas a vários componentes do ambiente, tais como água, ar, solo, animais e plantas. Estão longe de serem exploradas e conhecidas e constituem-se uma base importante da diversidade genética. Além da diversidade entre as espécies, existem também a diversidade intraespecífica (ANDREOTE, AZEVEDO e ARAÚJO, 2009).

O genoma bacteriano pode ser analisado pelo número total de genes presentes em cepas, os quais podem ser divididos em dois grupos, núcleo composto por genes encontrados em 95% das cepas e o grupo auxiliar, presente em um máximo de 5% de estirpes, responsáveis por adaptações de espécies em diferentes ambientes (KONSTANTINIDIS, HAICHAR e TIEDJE, 2006).

Devido à sua elevada capacidade de reprodução, por causa do seu curto ciclo de vida e altas taxas de propagação celular, faz a diversidade bacteriana não ser estática.

Dessa forma, resulta em alto grau de adaptação às mudanças ambientais (ABBY e DAUBIN, 2007).

O acesso mais comum à comunidade microbiana é por meio do isolamento em meios de culturas. Apesar de ser um método simples, é difícil fazer a representação microbiana em uma placa de cultura, apenas uma pequena parcela poderá ser acessada, em meio a comunidade microbiana total no ambiente (RASCHE, et al., 2005).

Dessa forma, pode-se aplicar técnicas de análises de nucleotídeos (DNA ou RNA), os quais podem ser extraídos de amostras ambientais e que são capazes de acessar e de analisar a diversidade microbiana. Para isso, a extração do DNA é o primeiro passo para a análise. Deve-se possibilitar rendimentos representativos, pureza e integridade da comunidade indígena, a fim de permitir à amplificação da reação em cadeia polimerase (PCR) (RANJARD, POLY e NAZARET, 2000).

Existem métodos diretos e indiretos para a extração de DNA a partir de amostras de solo. Os métodos indiretos realizam a separação celular. Resultam em quantidade menor de DNA, no entanto o produto é mais puro. Já os métodos diretos, são encontrados em kits de extração, processam a amostra por um todo, não separando as células das amostras. Produzem maior quantidade de DNA, no entanto no produto pode conter contaminantes ambientais, tais como ácidos húmicos (ANDREOTE, AZEVEDO e ARAÚJO, 2009).

Em geral, o gene 16S rRNA é o mais importante na ecologia microbiana, por ele a diversidade pode ser avaliada em vários ambientes, revelam-se uma parte considerada em abordagens dependentes de culturas (ANDREOTE, AZEVEDO e ARAÚJO, 2009).

Para realizar a quantificação de grupos alvos em uma certa amostra ambiental, pode-se utilizar a técnica de PCR, a fim de amplificar e detectar e estimar sequências específicas de ácidos nucleicos, a partir de marcadores específicos (DUBEY et al., 2006; LOWS, RADEMAKER e BRUIJN, 1999). Além disso, existem várias técnicas para a identificação microbiana, tais como:

- T-RFLP: Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição;
- SSCP: Polimorfismo de conformação de cadeia simples;
- TGGE: Eletroforese em gel de gradiente de temperatura;
- DGGE: Eletroforese em gel de gradiente desnaturante.

A técnica de DGGE, é utilizada para representações e comparações de comunidades microbianas em diversos ambientes. O gel de DGGE permite a separação

de amplicons, baseado em números semelhantes de nucleotídeos e nas diferenças de composição. Possui alta resolução e possibilita o processamento rápido de várias amostras. Assim, a utilização de técnicas microbiologia molecular permite a avaliação das comunidades microbianas de forma independente (MUYZER, WAAL e UITTERLINDEN, 1993; RANJARD, POLY e NAZARET, 2000).

Nesta última parte do trabalho, fez-se a avaliação da alteração na diversidade da comunidade microbiana, em solo contaminado com herbicida Gesapax, antes e após a aplicação de misturas de surfactante com consórcio microbiano, por meio da técnica PCR-DGGE.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

Fez-se as análises moleculares para avaliação da diversidade microbiana antes e após o processo de biodegradação do herbicida, utilizando solo oriundo da incubação em frascos respirométricos de Bartha e Pramer (Tabela 15).

Tabela 15 - Amostras de solo utilizadas no ensaio de análises moleculares

Amostras de solo (Tempo final, após 132 dias)	Amostras de solo (Tempo inicial, 0 dias)
T1 solo controle	T16 Herbicida [6,25 µg/mL]
T2 Controle surfactante	T17 Herbicida [12,50 µg/mL]
T3 Controle consórcio microbiano	T18 Herbicida [125,00 µg/mL]
T4 Controle herbicida [6,25 µg/mL]	
T5 Controle herbicida [12,50 µg/mL]	
T6 Controle herbicida [125,00 µg/mL]	
T7 [6,25 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano	
T8 [12,50 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano	
T9 [125,00 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano	
T10 [6,25 µg/mL] de herbicida mais surfactante	
T11 [12,50 µg/mL] de herbicida mais surfactante	
T12 [125,00 µg/mL] de herbicida mais surfactante	
T13 [6,25 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano mais surfactante	
T14 [12,50 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano mais surfactante	
T15 [125,00 µg/mL] de herbicida mais consórcio microbiano mais surfactante	

(Fonte: Elaborado pela autora)

2.2 Métodos

Os ensaios de análises moleculares foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular, situado no Departamento de Ciências do Solo, na Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo (ESALQ-USP), na cidade de Piracicaba-SP, sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Dini Andreote.

2.2.1 Extração de DNA das amostras de solo

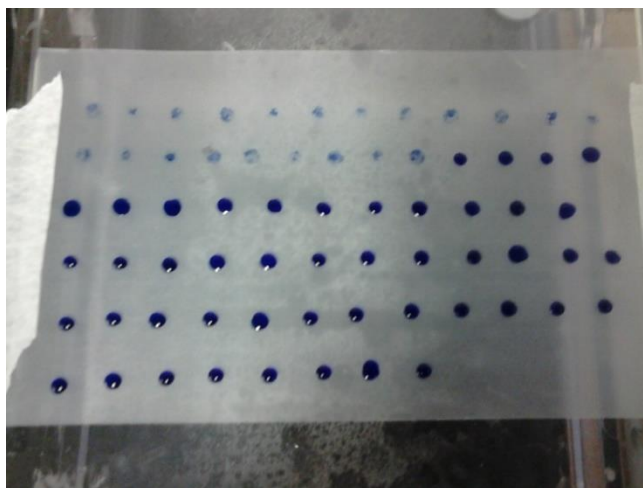
As extrações de DNA das amostras de solo foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, a partir do kit comercial *PowerSoil*[®] DNA Isolation (MoBio Laboratories Inc., Carlsbad, CA, EUA), a partir de 0,400 g de solo de cada amostra a ser analisada dos tratamentos retirados dos respirometros de Bartha e Pramer.

As extrações foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose (KASVI, lote A7016-15), a 1,5% (m/v) em tampão TAE (400 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA) e corado com GelRed (Biotium Inc., Hayward, CA).

Para o preparo do gel pesou-se 1,50 g de agarose em forma de pó e adicionou-se 100 mL de água desionizada. Fez-se a homogeneização e a mistura foi aquecida em micro-ondas, durante 3 minutos, até que a mistura ficasse translúcida. Após este preparo, esperou-se que a mistura esfriasse um pouco e ela foi transferida para um suporte específico para a análise de eletroforese. Após o endurecimento do gel, este foi colocado dentro da cuba de corrida (BIO-RAD) e as alíquotas formadas das amostras foram injetadas nos pocinhos do gel. Injetou-se, portanto, 6 µL de alíquota da amostra.

Utilizou-se campo elétrico de 120 V, para a corrida das amostras no gel, durante cerca de 30 minutos (Figura 26). Em cada se 5 µL de amostra de DNA extraído, empregou-se 1 µL de LB (tampão de corrida), e utilizou-se 6 µL de marcador padrão DNA Ladder gene ruler 1 KB, (Thermo Scientific # SM 0311, lote # 00217528), para posteriormente o gel ser observado e fotografado em luz UV.

Figura 26 - Amostras de DNA extraídos do solo, contendo tampão de corrida e marcador



(Fonte: Elaborado pela autora)

Após a corrida, o gel foi retirado da cuba e colocado em solução de brometo, durante 15 minutos, para fazer a coração do gel. Após esta fase, o gel foi colocado em luz UV para a leitura das bandas.

2.2.2 Amplificação por PCR de genes específicos extraídos dos DNAs das amostras de solo

Após a extração de DNA fez-se à amplificação dos genes específicos, por meio da técnica de PCR, seguida por DGGE, a fim de comparar a estrutura das comunidades bacterianas em função dos tratamentos utilizado no ensaio de respirometria do solo contaminado com o herbicida. Os *primers* utilizados foram: 1492R, 27F, 1387-R e 968-GC, para o gene alvo 16S DNAr (LANE et al., 1991; HEUER et al., 1997).

A primeira reação ocorreu com desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 30 segundos, a 94°C 1 minuto a 63°C, 1 minuto a 72°C, com uma prolongação final de 10 minutos a 72°C, finalizando em 25,0 µL de produto de PCR (Tabela 15). Os *primers* utilizados foram 1492R e 27F.

Este ensaio foi baseado com adaptações de Haichar et al. (2008). Os DNAs extraídos das amostras de solo foram submetidos a reações de amplificação por PCR a partir de termociclador (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems) e protocolos descritos nas Tabelas 16 e 17.

Tabela 16 - Protocolo de reação para a primeira amplificação por PCR

Reagente	Alíquota (µL)
Água Mili-Q	84,90
PCR Buffer (1X)	150,0
MgCl ₂ 3,75 mM	225,0
BSA 100,00%	75,0
dNTPs (0,20 mM)	120,0
<i>Forward primer</i> (0,20 pmol/µL)	3,0
<i>Reverse primer</i> (0,20 pmol/µL)	3,0
Taq-Polimerase (0,05 U/ µL)	15,0

(Fonte: Elaborado pela autora)

Utilizou-se 24 µL de amostra de DNA extraído e 1 µL ds reagentes preparados (Tabela 16), em tubos de ependorf de 500,0 µL. Estes tubos foram transferidos para o termociclador. Após esse período, realizou-se novamente a análise de eletroforese a fim de verificar se as bandas foram amplificadas. Após a confirmação das bandas amplificadas, fez-se a segunda reação de PCR (Tabela 17).

Tabela 17 - Protocolo de reação para a segunda amplificação por PCR

Reagente	Alíquota (µL)
Água Mili-Q	2016,0
PCR Buffer (1X)	300,0
MgCl ₂ 3,75 mM	300,0
BSA 100,00%	30,0
dNTPs (0,20 mM)	240,0
<i>Forward primer</i> (0,20 pmol/µL)	12,0
<i>Reverse primer</i> (0,20 pmol/µL)	12,0
Taq-Polimerase (0,05 U/ µL)	30,0

(Fonte: Elaborado pela autora)

Utilizou-se 49 μL de amostra e 1 μL do mix preparado, em tubos de ependorf de 500 μL . Estes tubos foram transferidos para o termociclador.

A segunda reação utilizou os *primers* 1387R e 968-GC. Iniciou-se com desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C; seguida de 35 ciclos de 1 minutos a 94°C, 1 minuto a 56°C, 2 minutos a 72° C; com uma prolongação de 10 minutos a 72°C; finalizando em 50 μL de produto de PCR.

Após esse período, realizou-se novamente a análise de eletroforese a fim de verificar se as bandas foram amplificadas. Após a confirmação das bandas amplificadas, iniciou-se o ensaio de DGGE.

2.2.3 Análise da estrutura da comunidade microbiana por meio da técnica de PCR-DGGE

Realizou-se as análises da estrutura da comunidade microbiana, por meio de *phorU2 system* (Ingeny, Leiden, Holanda) com gradiente de desnaturação de 45-65% em um gel de poliacrilamida 6,0%, para bactérias.

Para a preparação do gel, fez-se os respectivos gradientes de 65% (High) e 45% (Low), por meio da mistura das soluções A (6,0% de acrilamida) e a solução B (8,0% de acrilamida, 5,6 M de ureia e 32% de formamida deionizada), e em cada uma das soluções continha 75 μL de persulfato de amônia 20% (APS) e 12 μL de TEMED.

Com o auxílio de uma bomba misturadora, fez-se a montagem do gel. Após 50 minutos, o stacking gel foi formado, por meio de 7 mL da solução A, 45 μL de APS 20% e 10 μL de TEMED, esperando mais 60 minutos para a sua polimerização.

Aplicou-se 8,0 μL do produto de PCR juntamente com 3,0 μL de tampão de carregamento, sob as condições da eletroforese de 60°C durante 16 horas a 90 V, na presença de tampão TAE 0,5 X.

Após esse período, o gel de poliacrilamida com as amostras amplificadas foi corado com SYBR-gold (Invitrogen, Breda, Holanda) em TAE 0,5 x no escuro durante 120 minutos. Depois, observou-se as imagens formadas, as quais foram usadas para conversão em matrizes de bandas com o software Image Quant TL unidimensional - Amersham Biosciences, Amersham, UK, v.2003 (MCCAIG et al., 2001).

2.2.4 Análise estatística

Utilizou-se os *softwares* PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001) e CANOCO 4.5 (Biometris, Wageningen, Holanda) para a análise dos dados. Como matriz de similaridade, utilizou-se o algoritmo de Bray Curtis e Euclidiano para matrizes de DGGE.

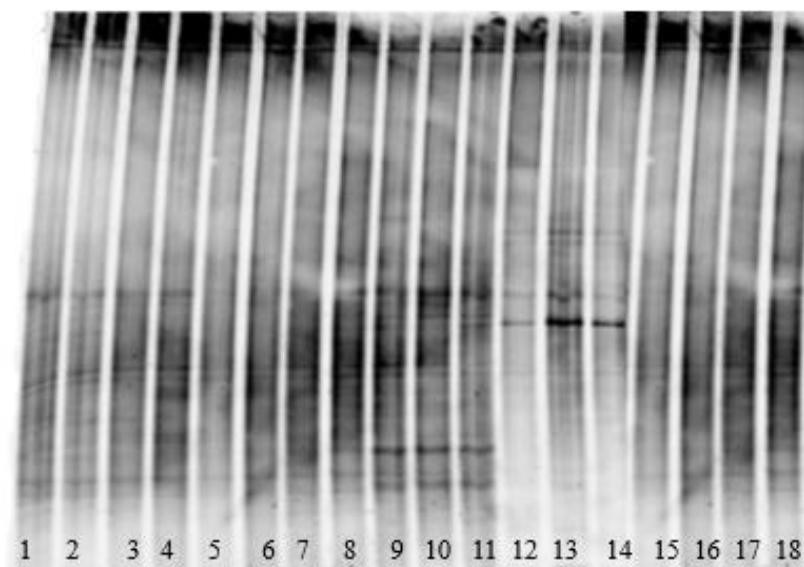
Fez-se os métodos multivariados de Análise de Coordenadas Principais (*Principal Coordinates Analysis*, PCoA), a fim de avaliar as similaridades entre os grupos bacterianos observados.

A PCoA fundamenta-se em uma projeção no espaço cartesiano, o qual faz um mapeamento linear da distância ou diferenças entre os grupos bacterianos para o espaço de ordenação. Assim, utiliza-se um algoritmo a fim de explicar o conjunto de dados alcançados, que são representados como pontos no espaço. Com o coeficiente de correlação entre as posições obtidas nas matrizes, pode-se avaliar as permutações das amostras (RAMETTE, 2007). Dessa forma, pode-se relacionar a dissemelhança ambiental com a diversidade da comunidade microbiana.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analizou-se a imagem do gel de DGGE, a partir da formação de bandas de cada tratamento utilizado (Figura 27), para bactéria.

Figura 27 – Aparecimentos dos amplicons do gene 16S DNAr de bactéria, após separação por DGGE



Poliacrilamida 6,0%; gradiente desnaturante 45-65%; TAE 0,5 x; 60° C; 90 volts;16 h.

(1: Solo controle; 2: Controle surfactante; 3: Controle consórcio microbiano; 4: Controle herbicida (6,25 µg/mL); 5: Controle herbicida (12,50 µg/mL); 6: Controle herbicida (125,00 µg/mL); 7: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; 8: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; 9: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano; 10: 6,25 µg/mL de herbicida + surfactante; 11: 12,50 µg/mL de herbicida + surfactante; 12: 125,00 µg/mL de herbicida + surfactante; 13: 6,25 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante; 14: 12,50 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante; 15: 125,00 µg/mL de herbicida + consórcio microbiano + surfactante; 16: 6,25 µg/mL de herbicida, tempo inicial; 17: 12,50 µg/mL de herbicida, tempo inicial; 18: 125,00 µg/mL de herbicida, tempo inicial). (Fonte: Elaborado pela autora)

A partir das formações das bandas, as quais são grupos particulares de microorganismos, pode-se avaliar a contaminação do solo. Ao realizar comparações entre elas, foi possível observar as influências resultantes de um determinado tratamento do solo com a variabilidade microbiana.

Pode-se observar a formação de inúmeras bandas presentes entre os tratamentos. Nos tratamentos com maior concentração de herbicida Gesapax em solo, houve menor quantidade no aparecimento de bandas.

3.1 Análise estatística

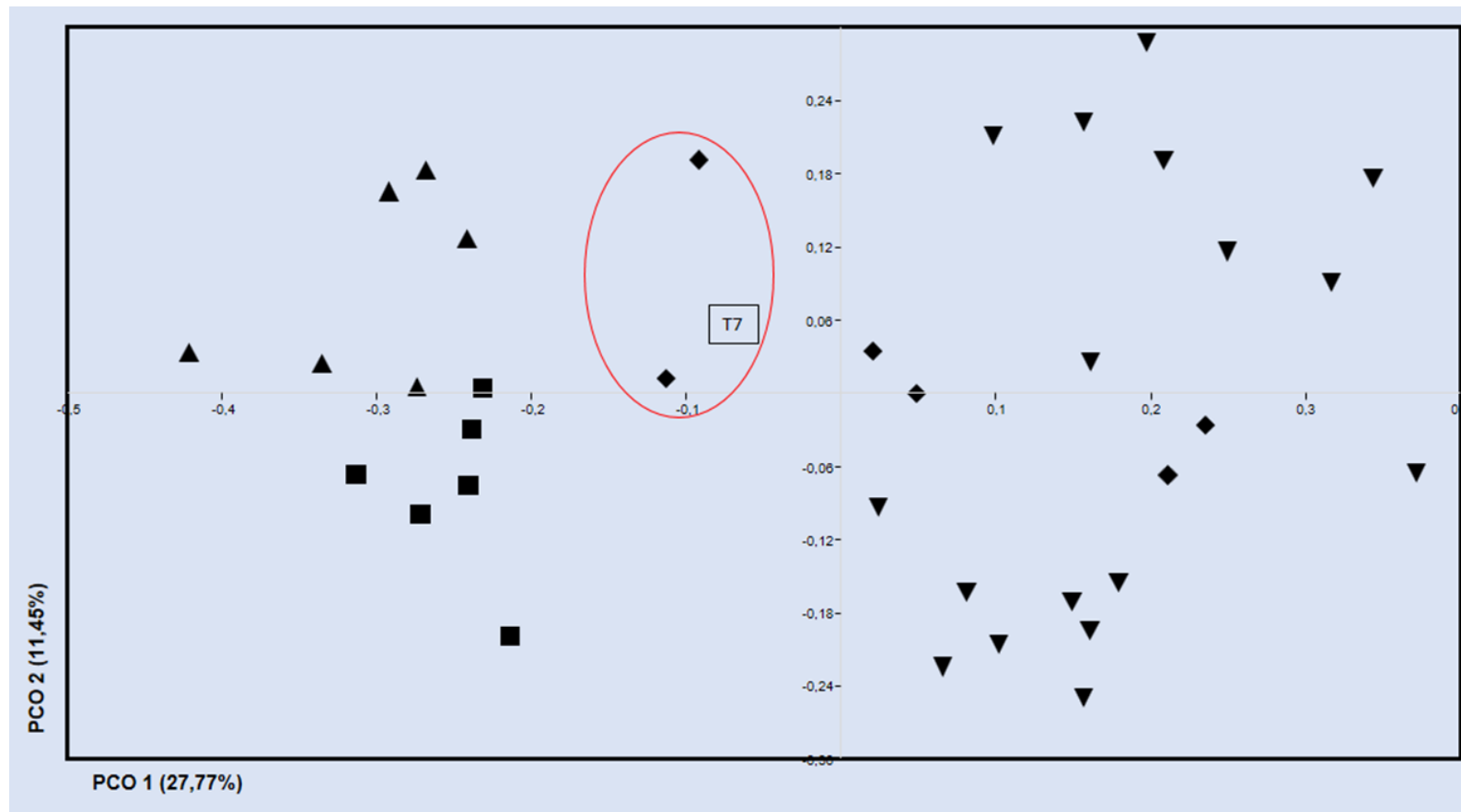
A Figura 28, mostra a análise estatística realizada com os resultados obtidos das imagens de DGGE, os quais pode-se verificar as modulações das comunidades microbianas antes e após o processo de biodegradação do herbicida Gesapax em solo.

Os resultados estão agrupados em conjuntos de marcadores, para melhor visualização e compreensão, da seguinte forma:

T7, T9 e T13	Degradadores
T1	Solo controle
T4, T5, T6, T8, T10, T11, T12, T14 e T15	Solo com herbicida
T2 e T3	Não degradadores (Sem herbicida)

Para a compreensão da PCoA utiliza-se a regra do cosseno baseada no eixo central. Se o ângulo entre os pontos com o eixo central for menor que 90° , a correlação será positiva. Contudo, se o ângulo entre eles for maior que 90° , a correlação entre será negativa. No entanto, se houver um ângulo reto entre os pontos com o eixo central, não haverá correlação entre as amostras. Por fim, o agrupamento e a posição entre os pontos no plano, indicam similaridade e a proximidade entre elas nas coordenadas.

Figura 28 - Análise de coordenadas principais (PCoA) para os tratamentos mais efetivos no processo de biodegradação da molécula do herbicida em solo



(Fonte: Elaborado pela autora)

A aplicação do herbicida afetou a comunidade natural do solo, interferindo em suas atividades biológicas. Assim, a utilização de auxiliares no processo de biodegradação da molécula em solo, tais como consórcio microbiano e adição de surfactante, favoreceram a modulação, ou seja, variação da comunidade microbiana, formando um gradiente.

Pode-se observar a efetividade do solo em degradar herbicida Gesapax, assim como a capacidade em modular a comunidade microbiana. Dessa forma, se houver uma maior adição da quantidade de herbicida Gesapax em solo, será necessário aumentar as quantidades de consórcio microbiano e de surfactante, a fim de estabelecer um equilíbrio químico entre o contaminante e os auxiliares da biodegradação.

Os tratamentos contendo solo, 6,25 µg/mL de herbicida e consórcio microbiano (T7), com solo, 6,25 µg/mL de herbicida e adição de surfactante (T10) e o com solo, 6,25 µg/mL de herbicida, consórcio microbiano e surfactante (T10), modularam a comunidade microbiana, uma vez que estes tratamentos se diferenciam dos demais.

Contudo, o tratamento contendo solo, 6,25 µg/mL de herbicida e consórcio microbiano foi o que apresentou uma comunidade microbiana mais específica para biodegradar o herbicida Gesapax, constituindo de uma característica particular em relação aos demais tratamentos. Portanto, pode-se utilizar este tratamento como referência para aplicar a quantidade de inóculo microbiano referente a concentração do herbicida em solo. Desse modo, a adição de mistura de consórcio microbiano e surfactante, foi fundamental para a biodegradação de Gesapax no solo.

É essencial o conhecimento das comunidades microbianas no ambiente, o seu comportamento e funções, a fim de inferir estratégias e meios para a biorremediação do local contaminado (ROS et al., 2010; SUN et al., 2012).

6. CONCLUSÃO

O processo de bioaugmentação e bioestimulação da microbiota obtiveram grande sucesso na metabolização do herbicida.

A bioaugmentação, por meio de consórcio microbiano, biodegradou o herbicida Gesapax ao longo do tempo. Contudo, o surfactante Tween 80, que atuou na forma de bioestimulação, foi essencial para a desintoxicação do solo causada pela aplicação do herbicida.

Observa-se que nos tratamentos que continham surfactante a atividade microbiana foi maior, sendo que este acelerou o processo de biodegradação do herbicida, reduzindo intensamente a concentração deste em solo, principalmente nos vinte primeiros dias, após a aplicação, sendo considerado um período crítico, por riscos de lixiviação, devido ao aumento dos índices pluviométricos, no qual a cana-de-açúcar é plantada.

Além disso é um produto viável economicamente, sendo necessário baixa quantidade dele em campo para a obtenção do sucesso na biodegradação do herbicida.

A avaliação da atividade microbiana em solo com herbicida Gesapax, apresentou resultados semelhantes analisado por meio de duas metodologias diferentes, as quais são respirometria de Bartha e Pramer e a colorimetria por DCPIP.

A colorimetria por DCPIP foi interessante para uma prévia avaliação do solo contaminado, bem como dos possíveis tratamentos a serem utilizados para o processo de biodegradação.

O ensaio respirométrico de Bartha e Pramer foi essencial para complementar a avaliação da atividade microbiana ao longo do tempo, a fim de observar os efeitos à microbiota por meio da geração de CO₂, bem como observar diferenças entre os tratamentos.

Os resultados obtidos na modelagem matemática, pode-se observar que a comunidade microbiana manteve-se ativa no período de 100 dias, com acréscimo na liberação de CO₂, sendo confirmado com os ensaios de fitotoxicidade, mutagenicidade e isolamento da população microbiana, por PCR- DGGE.

A comunidade microbiana sofreu intensas interferências em sua diversidade, nos tratamentos contendo herbicida o qual pode ser observado por meio da biologia molecular. O tratamento que continha herbicida e consórcio microbiano causou maior diversificação da comunidade microbiana, concluindo que o grupo das bactérias atuou como principal responsável na biodegradação do herbicida Gesapax em solo, isso após a aplicação de surfactante ao solo.

Todos organismos testes utilizados nos ensaios de ecotoxicidade demonstraram sensibilidade à presença do herbicida, que mesmo em baixas concentrações causou toxicidade aos organismos *S. cerevisiae*, *L. sativa*, *E. sativa*, *C. sativus* e para *T. pallida*.

Contudo, a levedura *S. cerevisiae* demonstrou pouca sensibilidade ao herbicida em diferentes concentrações. O aumento da sua sensibilidade nos tratamentos com solo, pode ser advindo da presença de surfactante.

Entre as sementes utilizadas nos ensaios, a *L. sativa* demonstrou maior sensibilidade a presença do Gesapax. O herbicida inibiu o crescimento e germinação das sementes, sendo que a inibição ao crescimento foi mais expressiva com o aumento das concentrações do herbicida.

O ensaio de germinação com sementes, mostrou a degradação do herbicida nos tratamentos com consórcio microbiano e surfactante.

Também o herbicida causou grandes efeitos mutagênicos na *T. pallida*, avaliados pela frequência do aparecimento de micronúcleos. No entanto, após a biodegradação do herbicida, os efeitos mutagênicos foram diminuídos, assemelhando-se ao solo controle.

Dessa forma, a utilização de bioestimulação, por meio da adição de surfactante foi intrínseca para o processo de metabolização do herbicida Gesapax, pois acelerou o

processo de desintoxicação do solo, favorecendo o crescimento de microbiota do local, bem como dos organismos superiores. Assim, se houver aumento da concentração de aplicação do herbicida, faz-se necessário a elevação proporcional das quantidades de adição de surfactante e consórcio microbiano.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBY, S.; DAUBIN, V. Comparative genomics and the evolution of prokaryotes. **Trends Microbiology**, v. 15, n. 3, p. 135-141, 2007.

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. **NBR 14283**. Resíduos em solos- Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. 1999.

ABRASCO *dossiê*: **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; BÚRIGO, A. C. Rio de Janeiro: EPSJV; São Paulo: Expressão Popular, 2015.

AHMAD, R.; KOOKANA, R. S.; ALSTON, A. M.; SKJEMSTAD, J. O. The nature of soil organic matter affects sorption of pesticides. Relationships with Carbon Chemistry as determined by ¹³C CPMAS NMR spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 5, p. 878-884, 2001.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**, 2^aed., Academic: 453 p. San Diego, 1999.

ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; D'ANTONINO, L. Sorção e dessorção do ametryn em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 177-184, 2010a.

ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FRANÇA, A. A. C.; D'ANTONINO, L. Meia-vida do ametryn em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 275-383, 2010b.

ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J. L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.

ARAÚJO, A. S. F.; LEITE, L. F. C.; NUNES, L. A. P. L.; CARNEIRO, R. F. V. **Matéria Orgânica e organismos no solo**. Teresina: EDUFPI, 2008.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R.; ANTUNES, P. M.; SANTOS, M. A. P. F.; CAMARGO, P. B.; ABAKERLI, R. B. Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1119-1127, 2007.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. 340 p. São Paulo: RIMA, 2003.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Potential commercial application of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, n. 5, p. 495-508, 2000.

BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. **Inseticidas registrados para a cultura do arroz e análise de parâmetros indicadores de seu comportamento no ambiente**. Góias: EMBRAPA, 2005.

BARIZON, R. R. M. **Sorção e transporte de pesticida sob condições de não-equilíbrio**. 2004. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luís de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.

BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; WITTLING, C. S. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. **Pesticide Science**, v. 49, n.1, p. 65-75, 1997.

BARROS, F. F. C.; QUADROS, C. P.; JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-412, 2007.

BARTHA, R., PRAMER, D. Features of flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

BEIGEL, C.; CHARMAY, M. P.; BARRIUSO, E. Degradation of formulated and informulated triconazole fungicide in soil: effect of application rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, n. 1, p. 525-534, 1999.

BERNARDES, R. S. **Respirometria no controle de sistemas de tratamento de águas residuárias e como bioensaio no controle da poluição do meio aquático**. In: Simpósio de Recursos Hídricos do Centro-Oeste. Unb-FT. Distrito Federal, 1999.

BERTONI, J.; NETO, F. L. Conservação do solo, Ícone: 355 p. São Paulo, 2010.

BETTIOL, W.; TRATCH, R. GALVAO, J. A. H. Controle de doenças de plantas com biofertilizantes. **EMBRAPA – CNPMA**: 22 p. Jaguariúna, 1998.

BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology**, v. 2, p. 1277-1288, 2010.

BRACONI, D.; BERNARDINI, G.; SANTUCCI, A. *Saccharomyces cerevisiae* as a tool to evaluate the effects of herbicides on eukaryotic life. **Journal of Proteomics**, v. 137, n. 1, p. 19-34, 2016.

CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, C. P. **Microbiologia do Solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992.

CARMO, D. A.; CARMO, A. P. B.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Revista Ambiente & Água*, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013.

CETESB - Companhia de Tecnologia Saneamento Ambiental. Contagem em placas de bactérias heterotróficas. **L5. 201**-São Paulo, 1986.

CETESB - Companhia de Tecnologia Saneamento Ambiental. Solos-Coleta e preparação de amostras-Procedimentos. **L6. 245-** São Paulo, 1984.

CHAUÍ-BERLINK, J. G.; BICUDO, J. E. P. W. **Respirometria a Técnica**. São Paulo: Santos, 2006.

COLEMAN, N. V.; MATTES, T. E.; GOSSET, J. M.; SPAIN, J. C. Biodegradation of cis-dichloroethene as the sole carbon source by a beta-proteobacterium. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 68, n. 1, p. 2726-2730, 2002.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Observatório agrícola. Acompanhamento da safra brasileira. Cana-de-açúcar. Safra 2016/2017, Terceiro levantamento, v. 3, n. 3, p. 1-78, 2016.

CORREIA, F. V.; MERCANTE, F. M.; FABRÍCIO, A. C.; CAMPOS, T. M. P.; JÚNIOR, E. V.; LAGENBACH, T. Adsorção de atrazina em solo tropical sob plantio direto e convencional. **Ecotoxicologia e Meio ambiente**, v. 17, n. 1, p. 37-46, 2007.

CONSEA. Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional. Mesa de controvérsias. Sobre impactos dos agrotóxicos na soberania e segurança alimentar e nutricional e no direito humano à alimentação adequada, 112 p., 2012.

COSTA, J. V. B. **Caracterização e constituição do solo**. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2004.

COSTA, M. R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em Latossolo vermelho escuro**. 2009. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos) - Faculdade de Tecnologia, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília.

CRUCIANI, D. G.; BAPTISTA, G. C.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; MINMI, K. **Scientia Agrícola**, v. 53, n. 23, 1996.

DANTAS, A.; DI, B.; PASCHOALATO, C. F. P. R.; BALLEJO, R. R. Pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular para remoção dos herbicidas Diuron e Hexazinona de água subterrânea. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 14, n. 3, p. 373-380, 2009.

DAVANÇO, T.; PALMU-TAMADA, P.; GROSSO, C. Filmes compostos de gelatina, triacetina, ácido esteárico ou capríco: efeito do pH e da adição de surfactantes sobre a funcionalidade dos filmes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 408-416, 2007.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research**, v. 140, n. 1, p. 234-243, 1998.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n. 12, p. 1296-1301, 2014.

DIFCO & BBL MANUAL. Manual of microbiological culture media. 2^a ed. 2009.

DONALDSON, K.; POLAND, C. A. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 24, n. 4, p. 724-734, 2013.

DUBEY, S. K.; TRIPATHI, A. K.; UPADHYAY, S. N. Exploration of soil bacterial communities for their potencial as bioresource, **Bioresource Technology**, v. 97, n. 17, p. 2217-2224, 2006.

FARRÉ, M.; FERNADEZ, M. P.; GRANADA, L.; BARBA, L.; GUTIERREZ, H. M.; PULGARIN, C.; BARCELÓ, D. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, n. 1, p. 704-709, 2002.

FERRI, M. V. W.; VIDAL, R. A. Persistência do herbicida Acetochlor em função de sistemas de preparo e cobertura com palha. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 399-404, 2003.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 111-125, 2004.

FONTES, J. R. A.; SILVA, A. A.; VIEIRA, R. F.; RAMOS, M. M. Lixiviação de herbicidas no solo aplicados com água de irrigação em plantio direto. **Planta Daninha**, v. 22, n. 4, p. 623-631, 2004.

GAO, N. Y.; DENG Y.; ZHAO D. Ametryn degradation in the ultraviolet (UV) irradiation/hydrogen peroxide (H₂O₂) treatment. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, n. xx, p. 640-645, 2009.

GAYTÁN, B. D.; LOGUINOV, A. V.; LANTZ, S. R.; LEROT, J. M.; DENSLOW, N. D.; VULPE, C. D. Functional Profiling Discovers the Dieldrin Organochlorinated Pesticide Affects Leucine Availability in Yeast. **Toxicological Sciences**, v. 132, n. 2, p. 347-358, 2013.

GIL, F. N.; MOREIRA-SANTOS, M.; CHELINHO, S.; PEREIRA, C.; FELICIANO, J. R.; LEITÃO, J. H.; SOUSA, J. P.; RIBEIRO, R.; VIEGAS, C. A. Suitability of a *Saccharomyces cerevisiae*-based assay to assess the toxicity of pyrimethanil sprayed soils via surface runoff: Comparison with standard aquatic and soil toxicity assays. **Science of the Total Environment**, v. 505, n. 1, p. 161-175, 2015.

GRIPPA, G. A.; MOROZESK, M.; NATI, N.; MATSUMOTO, S. T. Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16. 2010.

HAICHAR, F. Z.; MAROL, C.; BERGE, O.; RANGEL-CASTRO, J. I.; PROSSER, J. I.; BALESSENT, J.; HEULIN, T.; ACHOUAK, W. Plant host habitat and root exudates shape soil bacterial community structure. **The ISME Journal**, v. 2, n. 2, p. 1221-1230, 2008.

HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistical software package for education and data analysis. **Paleontological eelectronica**, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D., DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v.7, n. 10, p. 745–748, 1993.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, E. M. Analysis of actinomycete communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233-3241, 1997.

INOUE, M. H. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no Estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 313-323, 2003.

JACOMINI, A. E.; CAMARGO, P. B.; AVELAR, W. E. P.; BONATO, P. S. Determination of ametryn in river water, river sediment and bivalve mussels by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 1, p. 107-116, 2009.

KAMIDA, H. M.; DURRANT, L. R.; MONTEIRO, R. T. R.; ARMAS, E. D. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotussajor-caju*. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 629-632, 2005.

KARAGUNDUZ, A.; KARASULOGLU, E. Surfactant enhanced electrokinetic remediation of DDT from soils. **Science of the total environment**, v. 385, n. 1-3, p. 1-11, 2007.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. Fundamentos em toxicologia de Casarett e Doull, 2. ed. 472 p., Porto Alegre: AMGH, 2012

KONSTANTINIDIS, K. T.; RAMETTE, A.; TIEDJE, J. M. Toward a more robust assessment of intraspecies diversity, using fewer genetic markers. **Applied Environmental Microbiology**, v. 72, n. 11, p. 7286-7293, 2006.

KOSKINEN, W. C.; HARPER, S. S. The retention process: mechanisms. Pesticide in the soil environment: processes, impacts, and modeling. In: CHENG, H.H. (Ed.) **Soil Science Society of America**, Madison. p.51-78. 1990.

KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y.; CHUNG, S.; KUBO, M. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbon-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, n. 5, p. 749-757, 2008.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; WANTZEN, M.; SILVA, C. J.; ZECH, W. Pesticides in Surface Water, Sediment, and Rainfall of the Northeastern Pantanal Basin, Brazil. **Journal of Environmental Quality**, v.31, n.5, p. 1636-1648, 2001.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M., eds., John Wiley and Sons, New York, v. 31, n. 6, p. 115-175, 1991.

LEITE, A. S.; ZANDONATO, V. V.; FLUMINHAN, A. Avaliação da genotoxicidade provocada por fatores ambientais em *Tradescantia pallida* cv purpúrea através do ensaio de cometa. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental**, v. 9, n. 11, P. 399-417, 2013.

LI, R.; DÖFLER, U.; MUNCH, J. C.; SCHROLL, R. Enhanced degradation of isoproturon in an agricultural soil by a *Springomonas* sp. strain and a microbial consortium. **Chemosphere**, v. 168, n. 1, p. 1169-1176, 2017.

LOPES, P. R. M. Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI. 2014. (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

LOWS, F. J.; RADEMAKER, J. L. W.; BRUIJN, F. J. The three of PCR-based genomic analysis of phyto-bacteria: Diversity, detection and disease diagnosis, **Annual Review of Phytopathology**, v. 37, n. 1, p. 81-125, 1999.

MA, T. H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environmental Health Perspectives**, v. 37, n. 1, p. 85-90, 1981.

MA, T. H. *Tradescantia* micronuclei (Trad-MN) test for environmental clastogens. In: Kolber, A. R.; Wong, T. K.; Grant, Lester D.; DeWoskin, Robert S. & Hughes, J. T. **In vitro toxicity testing of environmental agents**. Ed. Plenum Publishing Corporation, New York, p. 1191-214, 1983.

MACHADO, A. T.; MACHADO, C. T. T. **Manejo da diversidade genética do milho em sistemas agroecológicos**. EMBRAPA Cerrados. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Planaltina-DF, 2009.

MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos de biorremediação. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, n. 3, p. 296-304, 2007.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das substâncias orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248-1255, 2013.

MCCAIG, A. E.; GLOVER, L. A.; PROSSER, J. I. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimes by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4554-4559, 2001.

MCDONALD, L.; JEBELLIE, S. J.; MADRAMOOTOO, C. A.; DODDS, G. T. Pesticide mobility on a hill side soil in St. Lucia. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 72, n. 2, p. 181-188, 1999.

MEDEIROS, M. B. e LOPES, J. S. Biofertilizantes líquidos e sustentabilidade agrícola. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p. 24-26, 2006.

MIELLI, A. C. Avaliação da atividade genotóxica de lodo de esgoto tratado do Estado de São Paulo com o teste de micronúcleo em células germinativas de *Tradescantia* (Trad-

MN). 2008. (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MONQUERO, P. A.; BINHA, D. P.; AMARAL, L. R.; SILVA, P. V.; SILVA, A. C.; INÁCIO, E. M. Lixiviação de clomazone + ametryn, diuron + hexazinone e isoxafluotole em dois tipos de solo. **Planta Daninha**, v. 26, n. 3, p. 685-691, 2008.

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

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicity**, v. 67, n. 1, p. 1-12, 2014.

MONTAGNOLLI, R. N. Incêndios de petróleo e petroquímicos: biorremediação de áreas afetadas. 2015. Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro.

MORALES, G. C. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. México: IMTA. 189p. 2004.

MOREIRA, F. M; SIQUEIRA, O. J. **Microbiologia e bioquímica do solo** – 2ª ed. Atual. e. Ampl- Lavras: Editora UFLA, 729 p. 2006.

MORENO, J. L.; ALIAGA, A.; NAVARRO, S.; HERNÁNDEZ, T.; GARCÍA, C. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 120-127. 2007.

MORTIMER, R.; POLSINELLI, M. On the origins of wine yeast. **Research in Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 199-204, 1999.

MOURA, Q. L.; RUIVO, M. L. P.; RODRIGUES, H. J. B.; ROCHA, E. J. P.; JUNIOR, J. A. S.; VASCONCELO, S. S.; ANDRADE, M. C.; MANES, C. L. O. Variação sazonal da população de bactérias e fungos e dos teores de nitrato e amônio do solo nos sítios do Iba e ppbio, na amazônia oriental. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 30, n. 5, p. 265-274, 2015.

MUDHOO, A.; GARG, V. K. Sorption, Transport and Transformation of Atrazine in Soils, Minerals and Composts: A Review. **Pedosphere**, v. 21, n. 1, p. 11-25, 2011.

MULLIGAN, C. N. Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 14, n. 5, 372-378, 2009.

MUYZER, G.; DE WAAL, E. C.; UITERLINDEN, A. G. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S RNA. **Applied Environmental and Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 695-700, 1993.

OECD – Organization for economic co-operation and environment aerobic and anaerobic Transformation in soil. Guideline for Testing of Chemicals – 307, p. 17, 2002.

PARIA, S. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 138, n. 1, p. 24-58, 2008.

PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Screening of bacterial biosorbents for removal of atrazine. **Clean Technologies Environmental Policy**, v. 15, n. 6, p. 921-929, 2012.

PFEUFFER, R. J.; RAND, G. M. South Florida Ambient Pesticide Monitoring Program. **Ecotoxicology**, v. 13, n. 3, p. 195-205. 2004.

PRADO, E. P.; RAETANO, C. G.; POGETTO, M. H. F. A. D.; COSTA, S. I. A.; CHRISTOVAM, R. S. Taxa de aplicação e uso de surfactante siliconado na deposição da pulverização e controle da ferrugem da soja. **Journal of the Brazilian Association of Agricultural Engineering**, v. 35, n. 3, p. 514-527, 2015.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de herbicida no solo: influência da matéria orgânica. **Revista Biociências**, v.6, n. 2, p. 17-22, 2000.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Degradação e sorção da ametrina em 2 solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.36, n.7, p. 975-981, 2001.

PRETORIUS, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. **Yeast**, v. 16, n. 8, p. 675-729, 2000.

PRIMO, D. C.; MENZES, R. C.; SILVA, T. O. Substâncias húmicas da matéria orgânica do solo: uma revisão de técnicas analíticas e estudos no nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 7, n. 5, p. 1-13, 2011.

QUEIROGA, F. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaluation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *B. subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 4, p. 321-324, 2003.

RAIJ, B. V. **Fertilidade do solo e manejo de nutrientes**, International Plant Nutrition Institute: 420 p. Piracicaba, 2011.

RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 2, p. 142-160, 2007.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 167-177, 2000.

RASCHE, F.; HÖDL, V.; POLL, C.; KANDELER, E.; GERZABECK, M. H.; VAN ELSAS, J. D.; SESSITSCH, A. Rhizosphere bacteria affected by transgenic potatoes with antibacterial activities compared with the effects of soil, wild-type potatoes, vegetation stage and pathogen exposure. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 56, n. 2, p. 219-235, 2005.

RÉGIS, G.; BIDOIA, E. D. Tratamento de efluente de uma indústria química através do processo eletrolítico visando a diminuição da toxicidade monitorada pelo bioindicador *Saccharomyces cerevisiae*. **Salusvita**, v. 20, n. 3, p. 43-51, 2001.

RÉGO, A. P. J.; REGANHAN-CONEGLIAN, C. M.; MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. CO₂ production of soil microbiota in the presence of ametryne and biofertilizer. **Water Air Soil Pollution**, v. 225, n. 1, p. 1-6, 2014.

REIS, M. R.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; GUIMARÃES, A. A. FERREIRA, E. A.; SANTOS, J. B.; CECON, P. R. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após a aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 323-331, 2008.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**, Grafmarke: 696 p. Londrina, 2011.

RODRIGUES, G. S.; MA, T. H.; PIMENTEL, D.; WEINSTEIN, L. H.; ICHIKAWA, S. *Tradescantia* bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis – a review. **Critical Reviews in Plant Sciences**, Boca Raton, v. 16, n. 4, p. 325-359, 1997.

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S.; ANDRIETTA, S. R.; SANTOS, P. E. R. Biodegradação do Diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 393-400, 2010.

RODRIGUES, Y. A.; CHRISTOFOLETTI, C. A.; PEDRO, J.; BUENO, O. C.; MALASPINA, O.; COSTA FERREIRA, R. A.; FONTANETTI, C. S. *Allium cepa* and *Tradescantia pallida* bioassays to evaluate effects of the insecticide imidacloprid. *Chemosphere*, v. 120, n. 1, p. 438-452, 2015.

RODRIGUEZ-CRUZ, M. S.; SANCHEZ-MARTIN, M. J.; SANCHEZ-CAMAZANO, M. Surfactant-enhanced desorption of atrazine and linuron residues as affected by aging of herbicides in soil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 1, p. 128-137, 2006.

ROS, M.; RODRIGUEZ, I.; GARCIA, C.; HERNADEZ, T. Microbial communities involved in the biorremediation of a recalcitrant hydrocarbon polluted soil by using organic amendments. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 18, p. 6916-6923, 2010.

ROSSETO, R.; SANTIAGO, A. D. Árvore do conhecimento cana-de-açúcar. Agência Embrapa de Informação Tecnológica – EMBRAPA. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, p. 1-2, 2016.

RUMLOVA, L.; DOLEZALOVA, J. A new biological test utilising the yeast *Saccharomyces cerevisiae* for the rapid detection of toxic substances in water. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 33, n. 1, p. 459-464, 2012.

SANTOS, A. C. V. **Biofertilizante líquido, o defensivo da natureza**, EMATER: 16 p. Niterói, Agropecuária Fluminense, 1992.

SATSUMA, K. Mineralization of s-triazine herbicides by a newly isolated *Nocardioides* species strain DN36. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 86, n. 5, p. 1585-1592, 2010.

SCHMIDT, S. K., SIMKINS, S., ALEXANDER, M. Models for the kinetics of biodegradation of organic compounds not supporting growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p. 323-331, 1985.

SCHULMEYER- KOCH, M.; GINEBREDÁ, A.; GONZALEZ, S.; CORTINA, J.L.; ALDA, M.L.; BARCELÓ, D. Analysis of the occurrence and risk assessment of polar pesticides in the Lobreg at River Basin (NE Spain). **Chemosphere**, v.86, n.1, p. 8-16, 2012.

SEVERINO, M. R.; SILVA, P. M. Taxa de degradação de ametrina em quatro solos brasileiros: indicativo do comportamento ambiental. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 36, n. 3, p. 1023-1030. 2012.

SHANER, D. L.; KRUTZ, L. J.; HENRY, W. B.; HANSON, B. D.; POTEET, M. D.; RAINBOLT, C. R. Sugarcane soils exhibit enhanced atrazine degradation and cross

adaptation to other s-triazines. **Journal American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 30, n. 1, p. 1-11, 2010.

SILVA, G. H.; MESSIAS, T. G.; LEME, D. M.; MONTEIRO, R. T. R. Mutagenicidade e genotoxicidade em águas superficiais e subterrâneas antes e após o tratamento da água. **Holos Environment**, v. 13, n. 1, p. 64, 2013.

SILVA, K. S.; FREITAS, F. C. L.; BRAGA, D. F.; DOMBROSKI, J. L. D.; SANTOS, A. F. B. Ametryn leaching in soils from the sugarcane region in northeastern brazilian. **Planta Daninha**, v. 34, n. 4, p. 839-847, 2016.

SILVA, L. O. C.; SILVA, A. A.; D'ANTONINO, L.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; FREITAS, F. C. L. Sorção e dessorção do ametryn em Latossolos Brasileiros. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 633-640, 2012.

SILVA, L. R.; FERREIRA, M. M. C. Estudo do coeficiente de partição octanol-água de bifenilas policloradas (PCBs) utilizando parâmetros topológicos. **Química Nova**, v. 26, n.3, p.312-318, 2003.

SINGH, T.; PUROHIT, S. S.; PARIHAR, P. Soil microbiology, Agrobios: 487 p. New Delhi, 2012.

SOUZA, E. F.; PERES, M. R. R.; MORAES, S. B. Avaliação do desempenho de surfactante para a solubilização de fases líquidas não aquosa em meio aquoso. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 532-538, 2010.

SPADOTTO, C. A.; MATALLO, M. B.; GOMES, M.A. Sorção do herbicida 2,4-D em solos brasileiros. **Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v.13, n. 1, p. 103-110, 2003.

STIPICEVIC, S.; FINGLER, S.; DREVENKAR, V. Effect of organic and mineral soil fractions on sorption behaviour of chlorophenol and triazina micro pollutants. **Archives of Industrial Hygiene and Toxicology**, v. 60, n. 2, p. 43-52, 2009.

SUDHARSHAN, S.; NAIDU, R.; MALLAVARAPU, M.; BOLAN, N. DDT remediation uncontaminated soils: a review of recent studies. **Biodegradation**, v. 23, n. 6, p. 851-863, 2012.

SUN, G. D.; XU, Y.; JIN, J. H.; ZHONG, Z. P.; LIU, Y.; LIU, Z. P. Pilot scale ex-situ bioremediation of heavily PAHs-contaminated soil by indigenous microorganisms and bioaugmentation by a PAHs-degrading and biomulsifier- production strain. **Journal of Hazardous Materials**, v. 233, n. 1, p. 72-78, 2012.

SYNGENTA- Proteção de cultivos Ltda. GESAPAX® 500 CIBA-GEISY. São Paulo, 2016.

TEIXEIRA, M. C. V.; BARBÉRIO, A. Biomonitoramento do ar com *Tradescantia pallida* (Rose) D. R. Hunt Var *purpurea* Boom (Commelinaceae). **Revista Ambiente & Água**, v. 7, n. 3, p. 279-292, 2012.

TIRONI, S. P.; BELO, A. F.; FILHO, C. M. T.; GALON, L.; FERREIRA, E. A.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; BARBOSA, M. H. P. Efeito de herbicidas na atividade microbiana do solo. **Planta Daninha**, v.27, n. especial, p. 995-1004, 2009.

TUFFI, SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; BARROS, N. F.; SIQUEIRA, C. H.; SANTOS, I. C.; MACHADO, A. F. L. Ensudação radicular do glyphosate por *Brachiaria dewmbens* e seus efeitos em plantas de eucalipto e na respiração microbiana do solo. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 143-152, 2005.

USEPA. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration Eligibility Decision (RED) for Ametryn**. 738-F-05-007. EDWARDS, D., 2005.

VANDERHEYDEN, V.; DEBONGNIE, P.; PUSSEMIER, L. Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. **Pesticide Science**, v. 49, n.3, p. 237-242. 1997.

VAN HAMME, J. D.; ODUMERU, J. A.; WARD, O. P. Community dynamics of a mixed-bacterial culture growing on petroleum hydrocarbons in batch culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 5, p. 441–450, 2000.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática-princípios e aplicações**, Rima: 478 p. São Carlos, 2008.

ZAMBOLIM, L.; SILVA, A. A.; PICANÇO, M. C. **O que engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**, Suprema: 564 p. Viçosa, 2014.

8 - ANEXOS. Dados de cromatografia por HPLC

Figura A1 - Curva de calibração, para o ensaio de cromatografia por HPLC

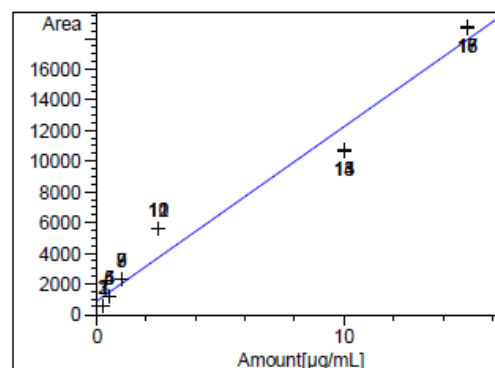
Method C:\CHEM32\1\METHODS\ANAPAUAAAMETRINA CC260116 .M

RetTime [min]	Lvl Sig	Amount [µg/mL]	Area	Amt/Area	Ref Grp Name
18		15.00000	1.87248e4	8.01076e-4	

Peak Sum Table

No Entries in table

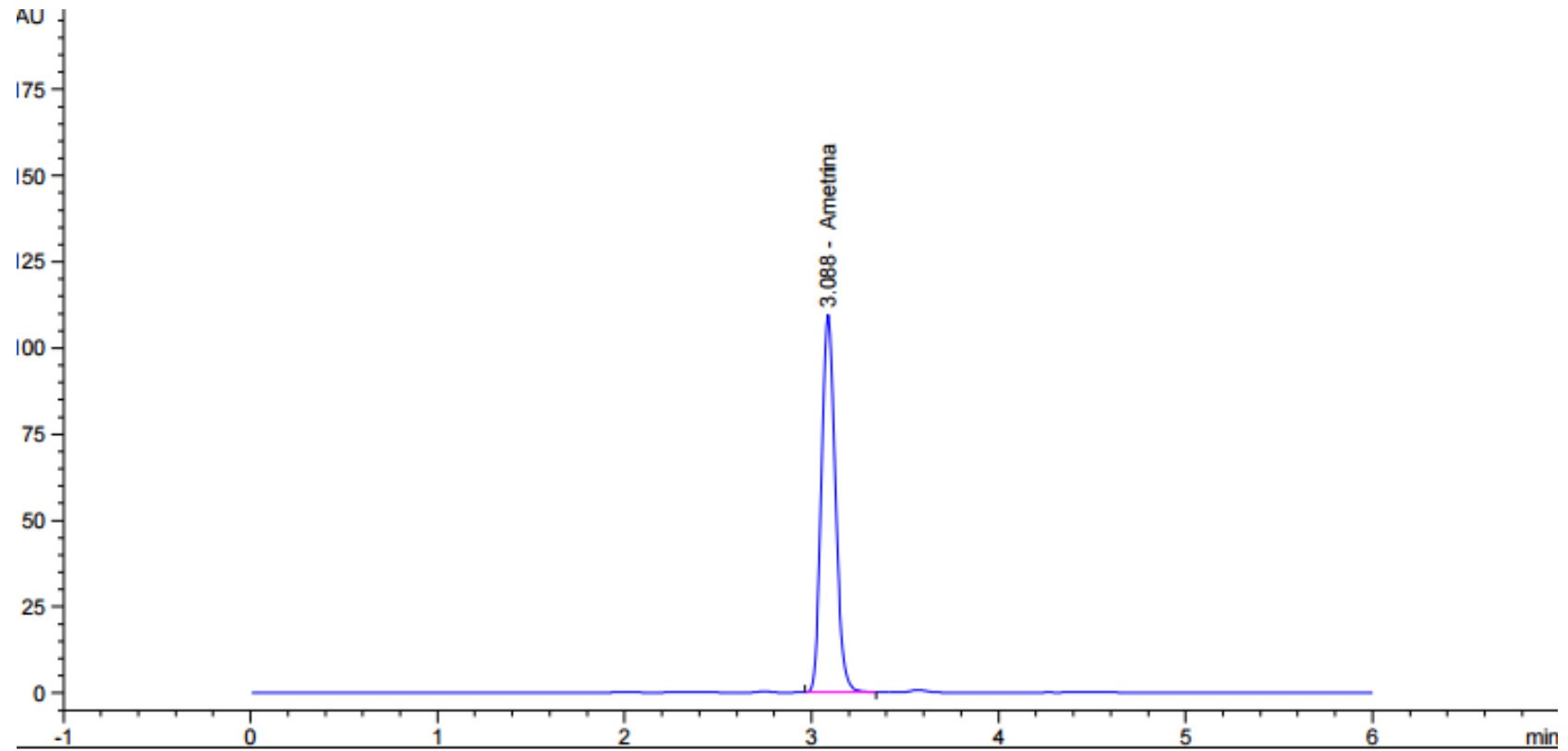
Calibration Curves



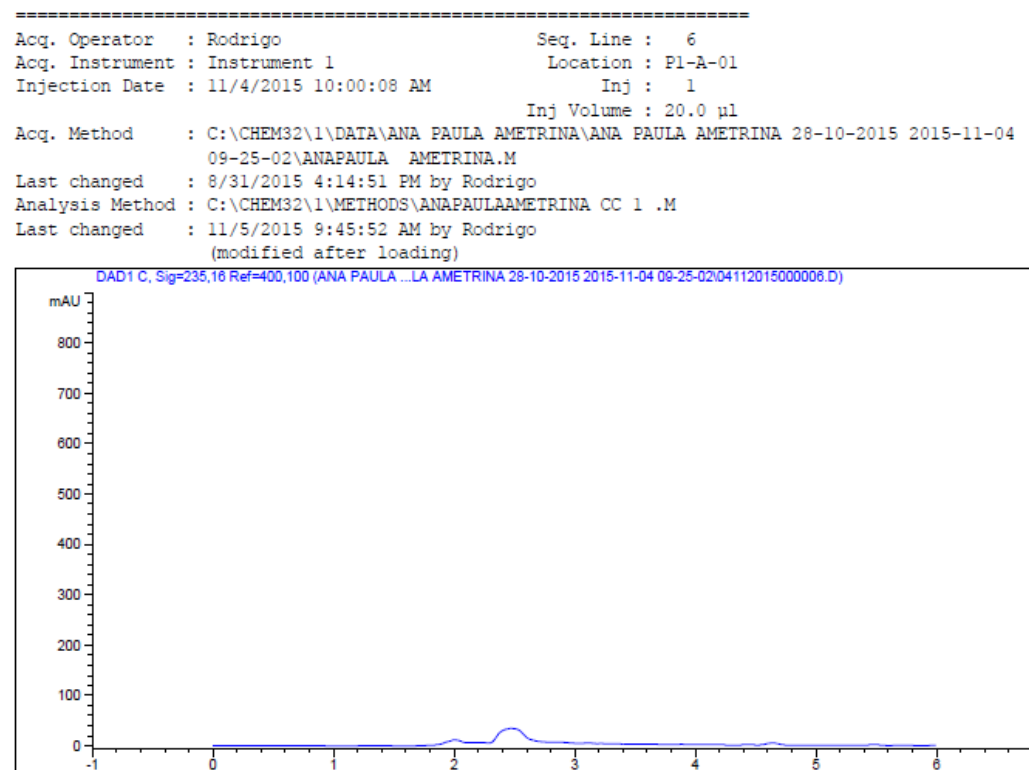
Ametrina at exp. RT: 2.650
 DAD1 C, Sig=235,16 Ref=400,100
 Correlation: 0.98609
 Residual Std. Dev.: 1132.46802
 Formula: $y = mx + b$
 m: 1137.93453
 b: 895.97536
 x: Amount
 y: Area

(Fonte: Elaborado pela autora)

Figura A2 - Tempo de retenção para quantificação da ametrina em solo

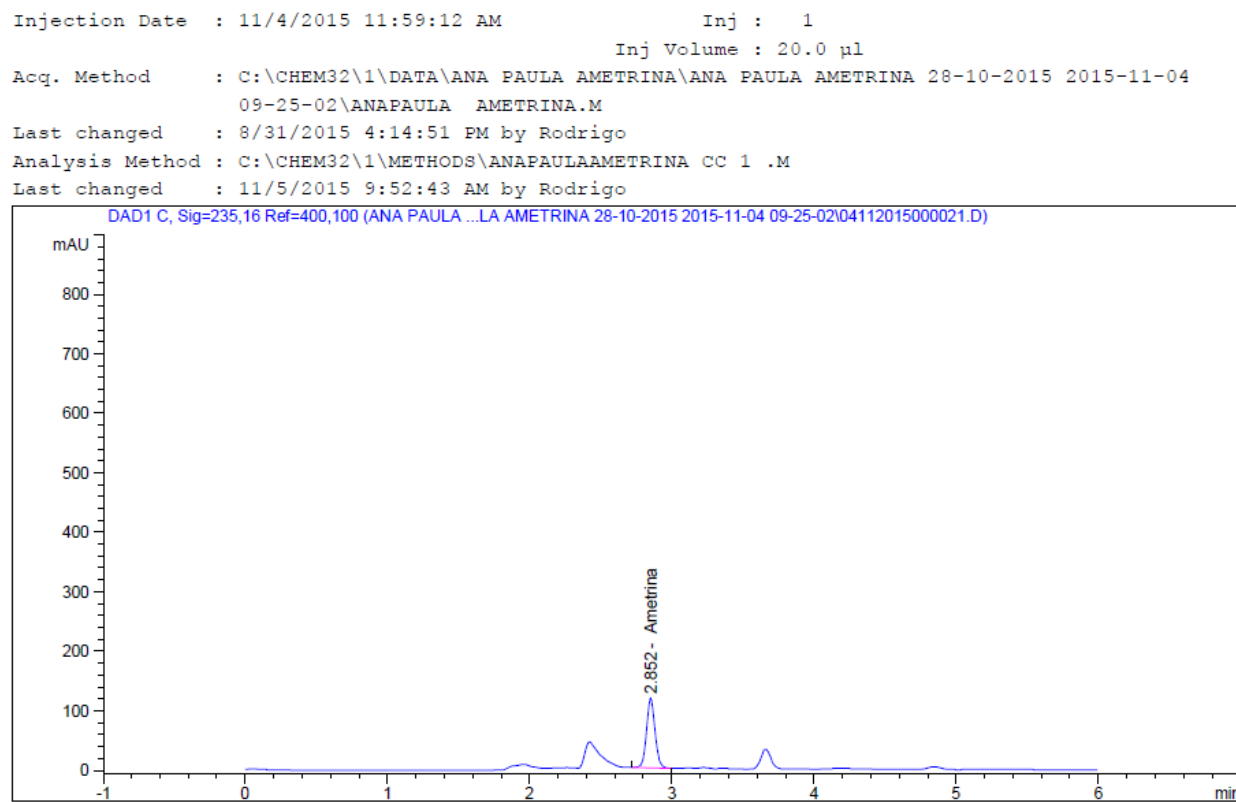


(Fonte: Elaborado pela autora)

Figura A3 - Pico cromatográfico, para o ensaio com solo controle (T1)

(Fonte: Elaborado pela autora)

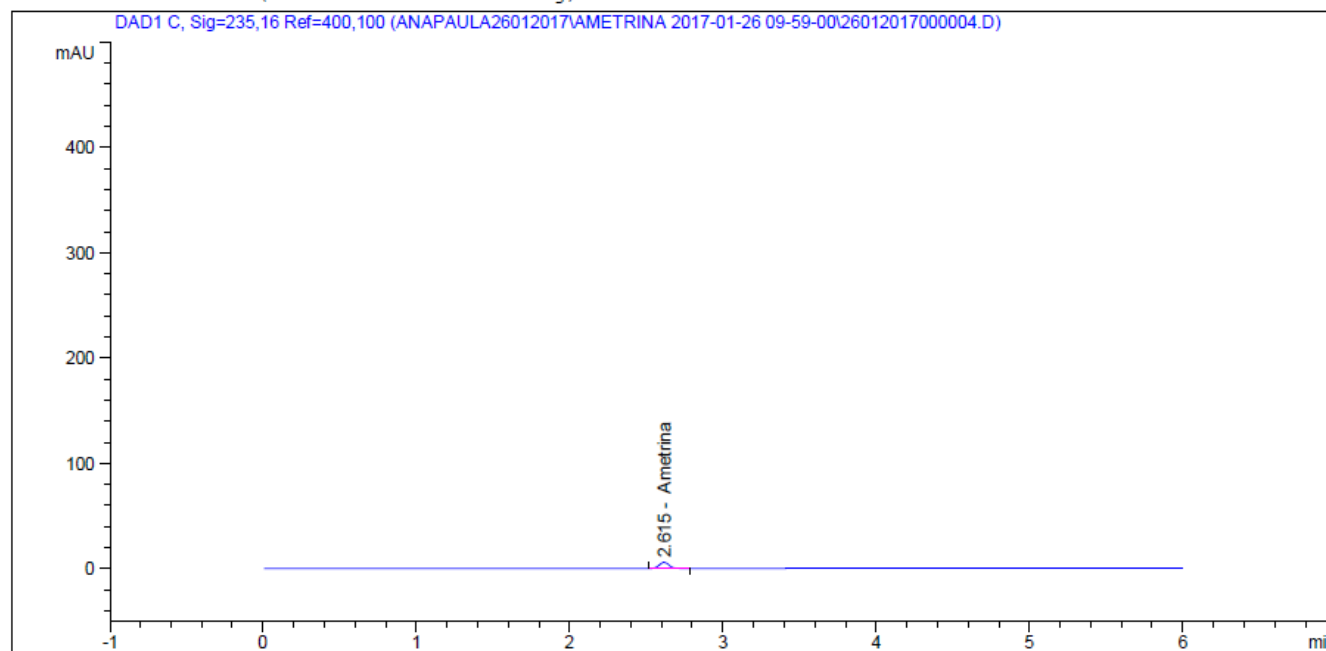
Figura A4 - Pico cromatográfico, após 32 dias de ensaio de respirometria, para o ensaio com solo, ametrina e consórcio microbiano (T7)



(Fonte: Elaborado pela autora)

Figura A5 - Pico cromatográfico, sinal ruído

Last changed : 8/31/2015 4:14:51 PM by Rodrigo
Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\ANAPAUULA AMETRINACC26012017.M
Last changed : 1/26/2017 1:05:06 PM by Rodrigo
(modified after loading)



(Fonte: Elaborado pela autora)

Figura A6 – Características físico-químicas do solo coletado no *campus* da Unesp, Rio Claro

Macronutrientes Mmol/dm ³				Micronutrientes Mg/dm ³				
P	S	K	Ca	Cu	Mg	Zn	Fe	B
6	<4	1,2	10	1,7	34,1	1	60	0,19

Análises complementares						
H + Al Mmol/dm ³	SB Mmol/dm ³	CTC Mmol/dm ³	Al Mmol/dm ³	V %	m %	M.O g/dm ³
52	16,2	68,2	4	24	20	40

Granulometria (g/kg)		
Areia total	Silte	Argila
676	92	232

(Fonte: Elaborado pela autora)