

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 16/05/2019.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS- 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.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Rio Claro



**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 SIVIERO 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.<sup>a</sup>Dr.<sup>a</sup>. 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 Biociências, 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<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> (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

---

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

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

## LISTA DE TABELAS

---

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

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

**B<sub>max</sub>** Valor máximo de biodegradação previsto

**B<sub>max</sub>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 respirometro.....	39
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

## 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 CO<sub>2</sub>, 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 CO<sub>2</sub>, 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 <sup>13</sup>C CPMAS NMR spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v. 35, n. 5, p. 878-884, 2001.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**, 2ªed., 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<sup>a</sup> 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 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 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. CO<sub>2</sub> 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<sup>®</sup> 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.