

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE HERBICIDAS NA MICROBIOTA DO SOLO
EM SISTEMA FECHADO**

Grisel Mariom Fernandez Childs
Engenheira Agrônoma

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL
Janeiro de 2007

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**EFEITOS DE HERBICIDAS NA MICROBIOTA DO SOLO
EM SISTEMA FECHADO**

Grisel Mariom Fernandez Childs

Orientador: Prof. Dr. Robinson Antonio Pitelli

Co-orientador: Prof Dr. Galdino Andrade

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Agronomia (Produção Vegetal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Janeiro de 2007

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

GRISEL MARIOM FERNANDEZ CHILDS nasceu na cidade de Paysandú - URUGUAY, formando-se Engenheira Agrônoma pela Facultad de Agronomía de la Universidad de la República Oriental del Uruguay, em 1979. Concluiu seu mestrado em Produção Vegetal pela Universidade Estadual Paulista Câmpus de Jaboticabal no ano de 1995 e iniciou seu doutorado na mesma área e local em 2003. Desde 1980 desempenha-se como docente e pesquisadora da Facultad de Agronomía de la Universidad de la República Oriental del Uruguay. É atualmente Professora responsável da Unidade de Malezas do Departamento de Protección Vegetal.

**À Bernardo, pelo amor,
pelo apoio permanente**

OFEREÇO

**Aos meus adorados filhos, Martin e Pedro
À minha querida mãe, Ida**

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao amigo e orientador professor **Dr. Robinson A. Pitelli** pelos ensinamentos técnicos e pessoais.

Ao **Dr. Galdino Andrade** pelos aprendizados e pela solidariedade demonstrada.

Aos professores **Dr. Joaquim Gonçalves Machado Neto, Dr. Luiz Lonardoni Foloni, Dr. Marcus Barifouse Matallo**, pelas sugestões feitas na banca examinadora que contribuíram para melhoria do presente trabalho.

Ao professor **Dr. Pedro Luis da Costa Aguiar Alves** pelo incentivo, pelo apoio constante.

Ao professor **Dr. Wanderley José de Melo** por disponibilizar materiais e equipamentos tão importantes e essenciais para o andamento da presente pesquisa e a **Dra. Valéria Peruca de Melo** pelos aportes e disposição permanentes.

À **turma toda** do Laboratório Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia pelo apoio, em especial aqueles com os que mais comparti **Claudia, Elaine, Lê**, pelo carinho dispensado, pelos momentos convividos.

As minhas amigas **Ana e Maria do Carmo** pela compreensão, pelo otimismo.

À **Flávia** que sempre esteve tão perto, pelo seu apoio, pelo carinho.

À **Juana e à Mônica** pela sua incondicionalidade, por estar sempre ali, mesmo a distancia.

À **Fernando** um uruguaio de lei, por todo quanto me ajudou, pela sua enorme bondade.

À Brasil, a todos, o meu muito obrigado.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1. A importância da preservação da microbiota	4
2.2 Impacto dos herbicidas sobre a microbiota	5
2.3 Métodos para avaliação dos efeitos dos herbicidas sobre a microbiota e processos biológicos do solo	8
2.3.1 Parâmetros utilizados para a determinação de efeitos sobre a microbiota do solo	9
2.3.1.1 Indicadores de atividade	9
2.3.1.2 Indicadores de quantidade	13
2.3.1.3 Indicadores de densidade/diversidade	15
2.3.2 Escala a utilizar nos estudos de avaliação.	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.	18
3.1 Solo	18
3.1.1 Determinação de peso seco e capacidade de campo	19
3.1.2 Herbicidas	19
3.2 Descrição dos tratamentos e delineamento experimental	19
3.3 Determinações	22
3.3.1 Determinação de Respiração Basal.	22
3.3.2 Determinação da Mineralização do Nitrogênio	23
3.3.3 Determinação da Atividade da Desidrogenase	23
3.3.4 Determinação da Hidrólise de FDA	23
3.3.5 Determinação da densidade de microrganismos.	24
3.3.6 Análise estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27

4.1. Experimento 1	27
4.2. Experimento 2	33
4.2.1 Respiração basal	33
4.2.2. Atividades enzimáticas	39
4.2.3. Mineralização de nitrogênio	41
4.2.4. Quantificação de microrganismos	43
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

EFEITOS DE HERBICIDAS NA MICROBIOTA DO SOLO EM SISTEMA FECHADO

RESUMO

Avaliou-se o efeito de oito herbicidas em duas concentrações (2 e 10 vezes a dose média recomendada por hectare) sobre a microbiota de solo. Os herbicidas (bentazon, metolachlor, trifluralin, imazethapyr, imazethapyr+lactofen, haloxyfop-methyl, glyphosate e chlorimuron-ethyl) foram selecionados em função dos resultados de um estudo prévio. Como bioindicadores de atividade se utilizou: respiração microbiana, quantificando-se a emissão de CO₂ aos 2, 4, 8, 12, 16, 20, e 24 dias de incubação, mineralização de nitrogênio, atividade da enzima desidrogenase e a hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), aos 8 e 28 dias. Também se estimou diversidade microbiana. Bentazon e a mistura de imazethapyr+lactofen, na maior concentração, e o haloxyfop-methyl nas duas concentrações, apresentaram efeitos inibitórios na respiração microbiana, embora diferentes em época e duração do efeito. Na mineralização de nitrogênio não foi possível detectar efeitos dos tratamentos. Nenhum dos tratamentos herbicidas afetou a hidrólise do FDA. A atividade da desidrogenase mostrou comportamento variável aos 8 e 28 dias, com resultados de inibição e de estímulo. Somente o herbicida metolachlor 10x causou inibição na quantidade de fungos, os restantes efeitos detectados resultaram em incrementos dos microrganismos. A única correlação significativa encontrada foi entre a atividade da desidrogenase e a respiração basal aos oito dias de incubação.

Palavras-chave: bentazon, desidrogenase, FDA, haloxyfop-methyl, imazethapyr + lactofen, respiração microbiana.

HERBICIDES EFFECTS ON SOIL MICROBIOTA ACTIVITY

SUMMARY

The effects of eight herbicides on soil microorganism activity were evaluated at two concentrations: 2x and 10x the recommended doses for each product in soybean. These herbicides were selected through the results of a prior experiment where 17 herbicides were tested. The selected herbicides were: bentazon, metolachlor, trifluralin, imazethapyr, imazethapyr+lactofen, haloxyfop-methyl, glyphosate e chlorimuron-ethyl. To study the microorganism activity the following parameters were measured: CO₂ soil production until 28 days of incubation, nitrogen mineralization rate, dehydrogenase and FDA activities, at 8 and 28 days of incubation. The functional microbe diversity also was investigated. Bentazon (10x) and the mix imazethapyr+lactofen (10x) and haloxyfop-methyl at both concentrations, reduced the CO₂ production, although with differences in timing and duration. No effects of the herbicides could be detected on nitrogen mineralization or FDA hydrolyses. Variable effects involving inhibition or stimulation were detected in the dehydrogenase activity according on herbicide, concentration and period of incubation. Only metolachlor (10x) had inhibition effects on the soil fungi population; the other herbicides promoted increases on microorganism populations. Only dehydrogenase activity and soil respiration at 8 days correlated significantly.

–Keywords: Bentazon, dehydrogenase, FDA, haloxyfop-methyl, imazethapyr+lactofen, soil respiration.

:

1. INTRODUÇÃO

A produtividade líquida, assim como a sustentabilidade dos agroecossistemas, a longo prazo, baseia-se na intermediação microbiológica. A preservação da integridade da capacidade metabólica da microbiota é considerada um requerimento fundamental para a manutenção da qualidade de solo (Alef & Nannipieri, 1995). No entanto, tem-se comprovado que as práticas de manejo associadas à intensificação da agricultura (Giller et al., 1997) e, particularmente, as associadas à utilização de pesticidas (Waiwright, 1978, Moorman, 1989 e Wardle & Parkinson, 1991) podem alterar expressivamente a funcionalidade da microbiota, pela influência tanto na quantidade como na atividade dos microorganismos no solo.

O uso de herbicidas é um fator importante da agricultura atual. As elevadas perdas de produtividade ligadas à interferência das plantas daninhas, assim como a inexistência de alternativas de igual eficácia para a solução deste problema, fazem dos herbicidas uma prática essencial e generalizada. Por igual razão, o controle de plantas daninhas tem-se constituído em um dos principais fatores antropogênicos com potencialidade de alterar a microbiota dos solos agrícolas (Sanino & Gianfreda, 2001).

Os resultados das pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas neste assunto assinalam uma ampla variabilidade nos efeitos dos herbicidas na microbiota do solo, tanto na natureza como na magnitude, em função, principalmente, do herbicida e das doses utilizadas.

Embora se considere que a maioria dos herbicidas é potencialmente tóxica em elevadas concentrações, os impactos para doses reais estão relacionados com algum grupo de microrganismos ou processo metabólico específico e são transitórios, variando no tempo requerido para a recuperação dos efeitos (Edwards, 1989; Wardle & Parkinson, 1990). Por outro lado, o processo bioquímico do solo alterado pela ação herbicida pode ser fundamental na determinação da produtividade de uma cultura ou sistema de culturas em particular, independente do potencial de recuperação posterior. O uso repetido de herbicidas do mesmo grupo químico por extensos períodos, sem considerar os intervalos requeridos para a devida recuperação da funcionalidade da

microbiota do solo, pode desencadear alterações de difícil reversibilidade (Wardle et al., 1994).

Estas considerações enfatizam a necessidade de gerar informação específica para os distintos herbicidas.

Os estudos em laboratório, embora dificilmente considerem a multiplicidade de fatores que atua nas condições reais, constituem uma primeira etapa de importante valor exploratório e uma forma eficiente de revelar rapidamente efeitos potenciais (Schloter et al., 2003).

Para este tipo de estudos é proposta a utilização de bioindicadores genéricos, tais como medidas da respiração microbiana, mineralização de algumas substâncias e atividades de diferentes enzimas, que permitam a interpretação de reações não só de populações individuais, mas também de comunidades e biocenoses (Moorman, 1994, citado por Andréa & Hollweg, 2004) e aportam informações de utilidade quanto à atividade biológica no solo (Paul & Clark, 1996). No entanto, considerando a multiplicidade de componentes microbiológicos e processos bioquímicos no solo, o mais indicado é a utilização de um grupo mínimo destes bioindicadores (Carter, 1992).

No Brasil houve grande expansão e modernização da agricultura, especialmente na cultura da soja, a qual é cultivada desde o Rio Grande do Sul até a Hiléia Amazônica e tabuleiros Maranhenses. A cultura da soja é característica de grandes áreas e de uso intensivo de insumos, incluindo os herbicidas. Pela intensidade de uso e extensão das áreas aplicadas com herbicidas na cultura da soja, a sociedade passa a demandar informações que permitam inferir sobre possíveis efeitos ambientais de curto e longo prazo, os quais, em última análise, afetariam a sustentabilidade do agroecossistema e o próprio agronegócio.

Assim, o presente trabalho foi conduzido visando avaliar os efeitos de concentrações referentes à 2x e 10x das doses recomendadas dos herbicidas bentazon, metolachlor, trifluralin, imazethapyr, imazethapyr+lactofen, haloxyfop-methyl, glyphosate e chlorimuron-ethyl sobre a evolução de CO₂, mineralização de nitrogênio, atividades enzimáticas no solo e densidades de grupos funcionais microbianos em amostras de solo. A seleção dos herbicidas estudados resultou da análise de um

experimento prévio, no qual foram avaliados os efeitos de 17 herbicidas na mineralização de carbono.

2. REVISÃO DE LITERATURA.

2.1. A importância da preservação da microbiota

Os microrganismos são de extrema importância nos processos biogeoquímicos do solo, apesar de ocuparem menos que 1% do volume. A microbiota do solo é responsável pela execução e controle de funções essenciais, como a decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, fixação de nitrogênio atmosférico, solubilização de uma série de compostos essenciais, como o fósforo, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, decomposição de xenobióticos e, também, controle biológico de pragas e doenças (Moreira & Siqueira, 2002).

O envolvimento nestes processos vitais do ecossistema edáfico explica a essencialidade da microbiota na determinação da qualidade do solo e, conseqüentemente, na produção agrícola e saúde ambiental.

Tanto a produtividade líquida como a manutenção da sustentabilidade dos agroecossistemas, a longo prazo, baseia-se na intermediação microbiológica. Deste modo, a conservação da integridade da capacidade metabólica da microbiota é considerada como um requerimento fundamental para a preservação da capacidade produtiva dos solos (Alef & Nannipieri, 1995).

A manutenção da integridade da capacidade metabólica dos microrganismos no solo, ao ponto que permita o normal desenvolvimento dos processos edáficos, implica a preservação tanto da densidade como da diversidade dos mesmos (Bromilow et al., 1996). Ambas, quantidade e diversidade, variam fundamentalmente, em função de características edáficas, climáticas e de colonização biótica e são, desta forma, específicas para os distintos ambientes naturais.

No entanto, a ação do homem, ao transformar zonas florestais em áreas agrícolas e, além disso, adicionando xenobióticos, pode alterar expressivamente os tamanhos e as composições das comunidades de microorganismos adaptadas aos diferentes solos (Paul & Clark, 1996).

As pesquisas desenvolvidas nesta área, nas últimas décadas, têm comprovado alterações significativas tanto na biomassa como na atividade microbiana dos solos por efeito de práticas de manejo associadas à intensificação da agricultura (Giller et al., 1997), perturbação de solo (Beare et al., 1995, Carter, 1992), adição de fertilizantes (Kinney et al., 2005) e utilização de agrotóxicos (Waiwright, 1978, Moorman, 1989 e Wardle & Parkinson, 1991)

Segundo Powlson et al. (1987), mudanças nos parâmetros microbianos constituem um alerta antecipado da perda de qualidade de solo. Por tanto, a partir dos mesmos, é possível, além das avaliações retrospectivas, a implementação prospectiva do manejo sustentável para os fatores com impacto potencial, uma vez gerada a informação específica (Hofman, 2003).

2.2. Impacto dos herbicidas sobre a microbiota.

A literatura neste tópico mostra uma grande variabilidade de resultados registrando tanto efeitos de inibição como de promoção, ambos de variável magnitude e, freqüentemente, de difícil interpretação (Moorman, 1989).

Segundo Moreira & Siqueira (2002), as dificuldades ao abordar os estudos sobre os impactos dos pesticidas sobre a microbiota e processos biológicos do solo relacionam-se com a natureza, heterogeneidade e dinâmica dos efeitos e respostas adaptativas das populações microbianas do solo.

Em geral, os estudos “in vitro” revelam que a maioria dos herbicidas, quando utilizados em altas concentrações são potencialmente tóxicos para os microrganismos, sendo freqüente a comprovação de efeitos inibitórios na quantidade de microrganismos ou em sua atividade. Assim, Olson et al. (1984), citados por Moreira & Siqueira (2002), estudando o efeito da trifluralina, em concentrações de até 100 mg g⁻¹ de solo, sobre o crescimento de vinte espécies de fungos e vinte e uma espécies de bactérias em cultura pura, não observaram efeito inibitório apenas para os fungos *Mortierella isabellina* e duas espécies de *Penicillium*.

Várias outras pesquisas avaliando impactos de herbicidas sobre a densidade de espécies ou grupos de microrganismos corroboram com esta observação. Como exemplos poderiam ser citados os resultados da inibição de bactérias anaeróbicas fixadoras de N_2 (Allievi et al., 1996) e de bactérias e fungos celulolíticos (Marsh et al., 1978) como consequência da ação do bentazon, as inibições de fungos micorrízicos com trifluralina (Kelley & South 1978) assim como a toxicidade do imazethapyr ao *Rhizobium leguminosarum pv viciae* (Royuela et al., 1997).

As respostas observadas para os processos microbianos são menos consistentes que as relacionadas a densidades de microrganismos. Devido à característica “redundância funcional” que apresentam as biocenoses dos solos, mesmo que um produto iniba certos microrganismos, funções globais como atividade heterotrófica medida pela liberação de CO_2 , podem não ser afetadas.

Assim, com frequência, os estudos não conseguem detectar relações entre a diversidade de microrganismos e parâmetros de atividade microbiana. A redução de um ou uns poucos grupos de espécies, pode ser compensada pelo crescimento de outros, resultando minimamente afetado o total de processos no solo (Nannipieri et al., 2003).

Exemplo deste tipo de resposta ocorre com o glyphosate, o qual, mesmo inibindo o crescimento de alguns fungos, pode incrementar, em altas concentrações, a biomassa (Stratton & Stewart, 1992; Wardle et al., 1994) ou a atividade microbiana do solo (Haney et al., 2000; Busse et al., 2001) como resultado da ativa mineralização do C e do N por bactérias que utilizam o herbicida como fontes de carbono e energia.

A atividade dos microrganismos nos solos é a principal determinante da degradação dos herbicidas. Da mesma depende basicamente tanto a taxa como a extensão nas quais os herbicidas são degradados.

Na degradação os herbicidas podem atuar de duas formas sobre a microbiota do solo. De um lado podem atuar como substrato para o seu crescimento e por outro lado também podem influenciar os microrganismos responsáveis pela degradação. (Cork & Krueger, 1991).

A participação microbiana na degradação de xenobióticos no solo, em geral, envolve a utilização de sistemas enzimáticos que, bioquimicamente, transformam o

agrotóxico em nutriente e fonte de energia. As enzimas podem ser intracelulares, necessitando que o produto seja absorvido, ou extracelulares quando são secretadas ou liberadas pelos microrganismos para a solução do solo circunvizinha, de onde se encontram e, assim, podendo reagir com as moléculas de agrotóxicos (Bollag, 1974).

Bactérias e fungos têm sido descritos como os principais degradadores de herbicidas sendo responsáveis pela transformação completa do pesticida dando origem a CO₂, água e sais minerais, ou incompleta, dando origem a metabólitos. Normalmente, os metabólitos formados são menos tóxicos, embora ocasionalmente ocorra formação de produtos mais tóxicos do que a molécula original (Monteiro, 2001).

Os microrganismos exibem duas estratégias diferentes para a metabolização dos herbicidas que são o catabolismo e o cometabolismo. No catabolismo o herbicida absorvido é quebrado em moléculas menores gerando energia. Consequentemente, a biomassa microbiana aumenta à custa do substrato e este diminui consideravelmente. No cometabolismo, o pesticida é transformado por reações metabólicas, mas não serve como fonte de energia para os microrganismos. Por tanto, é necessário um substrato secundário biodegradável como fonte de carbono e energia. Normalmente não ocorre a transformação completa da molécula herbicida (Alexander, 1981).

A taxa de degradação de herbicidas assim com sua influencia sobre os microrganismos é condicionada pela disponibilidade do herbicida em solo.

Lehr et al. (1996), avaliaram a mineralização do herbicida isoproturon em solo e sua relação com a atividade e biomassa microbiana. Observaram que a biomassa e a atividade correlacionaram-se com a mineralização do isoproturon livre no solo, enquanto na fração do composto ligado não houve correlação entre mineralização e os parâmetros microbianos.

Um aspecto adicional de importância na avaliação dos impactos é a consideração da reversibilidade dos efeitos dos pesticidas no solo.

Domsch et al. (1983), citados por Moreira & Siqueira (2002), analisaram um total de 48 estudos publicados para considerar o tempo necessário para a comunidade microbiana se recuperar do estresse promovido pelos pesticidas. Verificaram que em 30 casos avaliados houve recuperação em menos de 30 dias e que apenas em dois casos

foram necessários mais de 60 dias para a recuperação da população ao nível da testemunha. Concluíram que, de modo generalizado, os efeitos dos pesticidas sobre a biota são de curta duração.

Por outra parte, embora facilmente demonstráveis em condições controladas, em condições reais os efeitos sobre a microbiota apresentam grande variabilidade em função da complexidade das interações dos múltiplos fatores envolvidos e, por isso, são de difícil detecção.

Fatores como a natureza química do herbicida em interação com a dose, momento e forma de aplicação, tipo de solo, cultura estabelecida e manejos culturais, podem alterar fortemente as respostas.

2.3. Métodos para avaliação dos efeitos dos herbicidas sobre a microbiota e processos biológicos do solo

As detecções dos efeitos dos pesticidas dependem da maneira como os impactos são avaliados. O grau de sensibilidade de um determinado parâmetro depende do produto, da sua especificidade como biocida, modo de ação e da concentração, sendo, portanto, muito impreciso fazer generalizações.

Não existem respostas mais apropriadas para avaliar o impacto dos xenobióticos, mas sempre se deve optar por aquelas relacionadas ou indicadoras de funções essenciais à produtividade do ecossistema (Moreira & Siqueira, 2002).

Para estudos de tipo geral, e considerando a multiplicidade de microrganismos e processos biológicos no solo, o mais indicado é a utilização de um grupo mínimo destes bioindicadores (Carter, 1992).

Em geral, os microrganismos de solo respondem rapidamente a estresses através de mudanças nas taxas de atividade, na biomassa e na diversidade (Schloter et al., 2003).

Como consequência, os parâmetros utilizados para a determinação dos impactos de xenobióticos na microbiota pertencem a alguma das seguintes categorias: (a) indicadores de atividade ou funcionalidade dos microrganismos como respiração global,

mineralização do nitrogênio ou atividades enzimáticas; (b) indicadores de quantidade, como a biomassa microbiana e as contagens em meios de culturas, e (c) indicadores de diversidade quando se determinam as alterações na estrutura das comunidades microbiana (Hofman, 2003).

2.3.1. Parâmetros utilizados para a determinação de efeitos sobre a microbiota do solo

2.3.1.1. Indicadores de atividade

No caso das avaliações de atividade microbiana, os métodos se relacionam com diferentes procedimentos bioquímicos que permitem detectar processos metabólicos das comunidades de microrganismos. Os mais freqüentemente utilizados são as determinações da respiração basal, a partir da evolução de CO_2 , a mineralização do N e ensaios enzimáticos, nos quais são catalisadas transformações de substratos específicos para a estimativa da atividade de enzimas.

A respiração basal é uma boa estimativa da respiração microbiana, sendo que a contribuição de organismos não microbianos é desprezível, e, geralmente representa a decomposição do material orgânico (Garcia et al.1994). É medida sem a adição de substrato ao solo, e é avaliada pela produção de CO_2 ou pelo consumo de O_2 em amostras de solo intactas

Paul & Clark (1996) consideram a técnica de medição de evolução de CO_2 como a mais sensível dentro das técnicas para quantificação de respiração.

Alterações da respiração microbiana podem refletir mudanças na matéria orgânica do solo, mudanças na reciclagem de nutrientes, impacto de fatores de solo assim como o impacto de xenobióticos introduzidos ao solo. Por tanto, ao interpretar resultados neste parâmetro deve-se ter em consideração também a possível influência das propriedades do solo (Hofman, 2003).

Os estudos de efeitos de poluentes em solos citam freqüentemente diminuições na respiração. No entanto, a interpretação desses decréscimos não sempre é fácil, a

medida em que os níveis de respiração refletem também os requerimentos energéticos da microbiota. A energia de manutenção das comunidades microbianas se incrementa em respostas a estresses de fatores antropogênicos ou naturais e, em consequência, aumentam-se os requerimentos das fontes de energia (Killham, 1985).

As relações entre respiração e biomassa também podem apresentar dificuldades de interpretação. Nsbimana et al. (2004) utilizaram a respiração basal e a biomassa microbiana para avaliar o efeito de diferentes tipos de usos de solo. Os solos aráveis embora apresentando menores valores de biomassa microbiana, apresentaram maiores estimativas de respiração basal quando comparados com solos de menor perturbação, sugerindo a presença de poucos grupos funcionais, mas de alta atividade metabólica na comunidade microbiana. Por outra parte, nos solos de menor perturbação, neste caso solos sob florestas, embora apresentassem maiores conteúdos de carbono orgânico foram estimadas menores produções de CO₂. Segundo citam os pesquisadores deste trabalho, é freqüente que exista inibição da atividade dos microrganismos devido a presença de aleloquímicos em solos florestados.

A mineralização de nitrogênio é outra das características propostas para estimativa da atividade microbiana. É um processo essencial ao ecossistema solo e, portanto, indicador de qualidade. Entretanto, com freqüência, resulta em uma estimativa de baixa sensibilidade.

Em experimentos de campo, a estimativa da atividade microbiana através de avaliações de mineralização de nitrogênio somente é possível após de longos períodos de incubação. As mudanças significativas se produzem somente a partir da semana quatro ou oito (Schloter et al., 2003). Em períodos tão prolongados é inevitável que ocorram variações nas condições de solo, as quais terminam influenciando os resultados.

A atividade de várias enzimas pode ser medida no solo "*in situ*" ou "*ex-situ*" visando determinar atividade microbiana. Entre as mais estimadas encontram-se a desidrogenase, a α -glicosidase, fosfatases ou grupos variados de enzimas, como no caso da hidrólise do diacetato de fluoresceína, que permite obter informação tanto de exo-enzimas como enzimas ligadas às membranas (Hofman, 2003).

A sensibilidade destes métodos é variável. Partindo-se de uma análise empírica das respostas relatadas em 734 estudos com 71 pesticidas diferentes e 25 processos biológicos Domsch (1984), citado por Moreira & Siqueira (2002), relata que a atividade da fosfatase ácida, degradação da matéria orgânica e nitrificação são indicadores sensíveis e a atividade da urease e a fixação não simbiótica de N_2 são insensíveis. Outras características como amonificação, produção de CO_2 , absorção de O_2 e atividade da desidrogenase são de sensibilidade intermédia.

A análise da atividade dos microrganismos de solo através de análises enzimáticas só permite avaliar a atividade potencial e, considerando-se a redundância funcional do ecossistema solo, o resultado pode não ter estreita relação com a biodiversidade microbiana.

Se as enzimas do solo são indicadoras de qualidade do solo, não está claro quantas enzimas seriam necessárias para representar uma boa qualidade.

Uma das análises enzimáticas a partir da qual é possível se obter informação sobre varias enzimas freqüentes nos solo é a quantificação da hidrólise de FDA.

As estereases, lipases e proteases que hidrolisam o diacetato de fluoresceína FDA são abundantes no solo e a capacidade de hidrolisar o FDA é generalizada entre os fungos e bactérias. Portanto, a quantificação da hidrólise fornece boa estimativa da atividade microbiana total (Silva et al., 2005).

A técnica da hidrólise do FDA foi descrita inicialmente como um método simples para descrever e avaliar a atividade de lípases na presença de outras estereases. Em 1980, Swisher & Carroll demonstraram que o total da produção de fluoresceína pela hidrólise do diacetato de fluoresceína foi diretamente proporcional ao crescimento da população microbiana e em 1982, foi usado por Schnürer & Roswall para determinar a atividade microbiana em solo (Adam & Duncan, 2001).

O diacetato de fluoresceína é hidrolisado pela atividade de ambos os tipos de enzimas, livres e intracelulares, liberando fluorescência, a qual é quantificada por espectrofotometria.

A quantificação do FDA para avaliações em solos tem limitações relativas à textura. Tem-se observado uma baixa atividade em solos com elevado conteúdo de

areia dificultando a medição, e variando para o tipo de solvente usado. Adam & Duncan (2001), provaram que a combinação de metanol e cloroformio usada como solvente é mais eficiente quanto a hidrólise e a quantificação no espectrofotômetro para todo tipos de solo, comparada com acetona, solvente tradicionalmente usado. Outros parâmetros foram otimizados para a reação de hidrólise em amostras de solo, como pH, temperatura de incubação, quantidade de solo, tempo de incubação total e preparação de substrato.

As enzimas que hidrolisam FDA, por serem extracelulares, geralmente estão protegidas da degradação pela adsorção às argilas ou substancias húmicas e assim podem se acumular. Essas enzimas imobilizadas pelos colóides do solo podem não ser tão sensíveis como às associadas às células microbianas (Nannipieri 1994, citado por Silva et al., 2005).

Diferenças no uso do solo relacionadas às mudanças no conteúdo de matéria orgânica têm importantes efeitos na atividade e diversidade da comunidade microbiana de solo. Nsabimana et al. (2004) confirmaram maior atividade hidrolítica de FDA em milho e azevém comparado com outros usos menos intensivos do solo.

A atividade da desidrogenase é considerada indicador do metabolismo oxidativo dos solos e, assim, da atividade microbiana. Malkome (1987) citado por Dick (1992), recomenda seu uso como teste de rotina com agrotóxicos, uma vez que a desidrogenase permite determinar com sensibilidade a atividade microbiana em 1 ou 2 dias em experimentos de laboratório.

Este parâmetro é especialmente importante em avaliações de solos com alta porcentagem de areia e baixo conteúdo de matéria orgânica, nos quais a atividade enzimática do solo depende fundamentalmente de enzimas intracelulares como a desidrogenase (Burns, 1982).

O teste de desidrogenase pode também ser utilizado para quantificar a respiração de microrganismos de solos *in situ*. Uma das limitantes da metodologia é o cuidado que se deve prestar no momento das avaliações para não permitir a entrada de oxigênio, porque atua como aceitador de elétrons, afetando a atividade da enzima. Outra limitante está relacionada com as variações na textura de solo, podendo causar

dificuldade na obtenção de uma boa estimativa. Testes conduzidos com amostras saturadas de umidade evitam a entrada de oxigênio no sistema; por isso, é importante na determinação da atividade da desidrogenase em amostras de solo a correção por conteúdo de umidade (Casida et al., 1964).

As respostas observadas para os processos microbianos são menos consistentes que as relacionadas a densidades de microrganismos. Devido à característica “redundância funcional” que apresentam as biocenoses dos solos, mesmo que um produto iniba certos microrganismos, funções globais, como atividade heterotrófica medida pela liberação de CO₂, podem não ser afetadas.

Assim, com frequência, os estudos não conseguem detectar relações entre a diversidade de microrganismos e a decomposição da matéria orgânica. A redução de um, ou, uns poucos grupos de espécies, pode ser compensada pelo crescimento de outros, resultando minimamente afetado o total de processos no solo (Nannipieri et al., 2003).

2.3.1.2. Indicadores de quantidade

A quantidade pode ser avaliada a partir de contagens ou a partir da estimativa da biomassa microbiana. Os métodos de contagens podem ser diretos ou indiretos. As contagens diretas apresentam importantes limitações na execução, constituindo uma técnica extremadamente trabalhosa. As contagens indiretas em meios de cultura apresentam, por sua vez, outra limitação séria. Estima-se que só 1% dos microrganismos do solo seja cultivável, e, portanto, este método apresenta sempre resultados subestimados.

Por estas razões o método mais utilizado para a determinação de quantidades é, até o presente, a determinação de biomassa microbiana (Moreira & Siqueira, 2002).

A biomassa microbiana é uma medida do total de microrganismos do solo expresso em massa. É um bom indicador da significância da microbiota do solo, desde que é uma das poucas frações da matéria orgânica dos solos de importância biológica, com sensibilidade tanto ao manejo como a poluição, e, mensurável (Schloter et al.,

2003). Inclusive, uma vez que mudanças significativas na biomassa microbiana podem ser detectadas muito antes que alterações na matéria orgânica possam ser percebidas, tem-se proposto seu uso como um indicador inicial das alterações previsíveis por efeito de práticas agrícolas diversas, como fertilizações ou aplicação de pesticidas, dentre eles, os herbicidas (Wardle & Parkinson, 1991; Kinney et al., 2005).

Os decréscimos na biomassa microbiana do solo pode ser um bom indicador da perda da qualidade do solo e, a longo prazo, pode predizer tendências no conteúdo total de matéria orgânica (Powlson et al., 1987).

Os efeitos dos poluentes podem ser diretos, ocasionando a morte dos microrganismos ou diminuindo o aproveitamento do substrato, resultando na diminuição da biomassa microbiana (Brookes, 1995).

Os principais métodos empregados atualmente para avaliação da biomassa microbiana são os chamados da fumigação-incubação, desenvolvido por Jenkinson & Powlson (1976) e o da fumigação-extração proposto por Vance et al. (1987). Ambos são métodos indiretos desenhados para a quantificação do carbono microbiano em solos nos quais a biomassa microbiana é calculada a partir dos excessos de carbono extraível nas amostras fumigadas por subtração de carbono extraído desde amostras não fumigadas (Schloter et al., 2003).

Segundo os estudos de Andréa & Hollweg (2004) o método de Vance et al. (1987) é a melhor opção para a comparação de quantidades de carbono microbiano entre diferentes tipos de solos.

A biomassa microbiana também pode ser medida indiretamente por meio da respiração do solo (Nielsen & Winding, 2002, citados por Andréa & Hollweg, 2004). A partir da respiração basal, método originalmente proposto por Anderson & Domsch (1978) aplica-se um fator de conversão aos valores da respiração para obter a biomassa.

A biomassa microbiana nem sempre tem relação direta com a qualidade de solo (Schloter et al., 2003), desde que o tamanho da biomassa microbiana não seja necessariamente um indicador da atividade dos microrganismos. A determinação da biomassa microbiana é uma aproximação e não permite a diferenciação da

heterogeneidade da comunidade de microrganismos. Mesmo assim, é um parâmetro de ampla utilização para a avaliação de qualidade de solo devido a relativa rapidez da metodologia (Silveira et al., 2006).

Andréa & Pettinelli (2000) verificaram que, embora temporários, o efeito dos pesticidas pode ser inibindo ou estimulando a biomassa microbiana, dependendo do tipo de solo.

Segundo Hofman (2003), esta combinação de efeitos estimulantes e inibidores constituem uma forte crítica à metodologia, consequência da reduzida sensibilidade do parâmetro à poluição do ambiente solo.

Corroborando, Wardle (1998), considerou o tipo de solo como um fator importante afetando o nível de biomassa microbiana, já que são muitas as propriedades do solo com forte impacto sobre a taxa de crescimento da biomassa.

2.3.1.3. Indicadores de densidade/diversidade

A determinação da biomassa microbiana, mesmo quando interpretada como estimativa grosseira da densidade, é uma aproximação do tipo “caixa preta” e não permite a diferenciação da heterogeneidade da comunidade de microrganismos.

Os novos métodos de estudo, que não requerem cultivar os microrganismos, baseados em avaliações genotípicas e fenotípicas (Amann et al., 1995; Zelles, 1996) permitem uma melhor compreensão das reais composições da microbiota. No entanto, a complexidade dos resultados com estas técnicas, com as quais é possível detectar até mais de 10000 espécies microbianas por grama de solo, torna, difícil o manejo desta informação como indicador da qualidade de solos. Tem sido utilizada em várias pesquisas avaliando efeitos do uso de pesticidas visando determinar os impactos globais como aumento, manutenção ou redução da diversidade.

As principais críticas sobre estudos de comunidades de microrganismos de solo têm a ver com as dificuldades da técnica e a complexidade da interpretação ligada a dinâmica do sistema biológico do solo. O problema central é conhecer a relação entre a estrutura da comunidade e a diversidade genética. Isso requer de avaliações

taxonômicas através de técnicas de identificação de DNA, assim como técnicas de alta resolução para detectar células microbianas na matriz do solo (Nannipieri et al. 2003).

Um exemplo da dificuldade das interpretações seria a relação inexistente entre diversidade microbiana e decomposição da matéria orgânica: geralmente, o desaparecimento de um grupo de espécies não tem impacto, ou este é muito baixo nos processos que ocorrem no solo, porque há outros microrganismos que tomam essa função. Então, a determinação da composição da comunidade não é necessária para a melhor quantificação das transformações de nutrientes.

Uma alternativa, embora não permitindo a diferenciação em nível de espécies, mas, sim uma interessante aproximação à biodiversidade das comunidades, é a determinação de grupos funcionais de interesse. Esta aproximação tem demonstrado maior relevância ecológica que as técnicas de determinação taxonômicas

Estas técnicas baseiam-se em análises do funcionamento das comunidades microbianas e utilizam seqüências de substratos carbonados (Degens & Harris, 1997; Degens et al., 2000).

Segundo Silveira et al. (2006), a potencialidade de utilização dos parâmetros microbiológicos densidade e diversidade de grupos funcionais de microrganismos está explicada pela alta sensibilidade expressa às atividades antrópicas e também devido à simplicidade na determinação.

2.3.2. Escala a utilizar nos estudos de avaliação.

Além da seleção dos bioindicadores a utilizar na avaliação deve se decidir a escala de estudo. A prospectiva dos possíveis impactos ao ecossistema solo causado por distintos fatores, incluídos os pesticidas, pode ser realizada em diferentes escalas. Os biotestes em laboratório requerem o controle das condições de experimentação e dos níveis dos fatores de estresse, apresentam elevada standardização e baixa variabilidade, embora também baixa relevância ecológica (Hofman, 2003).

Os estudos a campo, inversamente, podem ser considerados de maior relevância ecológica, mas requerem maior número de estimativas e resultam em maior variabilidade, apresentando freqüentemente sérias dificuldades na hora de interpretar os resultados devido à multiplicidade de fatores e interações atuando em condições reais.

Na avaliação de herbicidas são muito utilizados testes de laboratório baseados nos testes originalmente desenvolvidos para a determinação de efeitos colaterais de pesticidas (OECD, 1999a e OECD, 1999b) Utiliza-se um solo não contaminado previamente e uma comunidade microbiana natural. As propriedades do solo devem respeitar alguns critérios, ter mais de 70% de areia, um pH entre 5,5 e 7, carbono orgânico entre 0,5 e 1,5% e uma relação C_{bio}/C_{org} maior a 1%, de tal forma a representar o "pior cenário", a máxima biodisponibilidade, do contaminante.

Considerar a biodisponibilidade do herbicida no solo é outro aspecto importante na avaliação dos efeitos na microbiota do solo. A quantidade de herbicida disponível para os microrganismos no solo depende de vários fatores, como o pH, nível de nutrientes, temperatura e umidade, de influencia variável dependendo do herbicida.

Ate o presente não existem evidencias conclusivas sobre o papel da adsorção na biodegradação e na biodisponibilidade dos herbicidas para os microrganismos. Os mecanismos de adsorção, a duração do contato solo-herbicida, as características físico-químicas tanto do adsorvente como do herbicida e as características específicas dos degradadores são determinantes importantes da biodisponibilidade dos herbicidas. (Guerin & Boyd, 1993, citados por Haney et al. , 2000).

Uma importante proporção da pesquisa desenvolvida com herbicidas tem utilizado, de forma padronizada, concentrações do produto na base de uma incorporação em 15 cm de solo, para herbicidas sujeitos a forte adsorção, nos quais a incorporação dificilmente ocorra além dos primeiros milímetros de solo. A padronização leva a importantes subestimações dos possíveis efeitos na microbiota (Haney et al., 2000).

3. MATERIAL E MÉTODOS.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Impacto Ambiental do Núcleo de Estudos e Pesquisas Ambientais em Matologia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP Jaboticabal/SP. As análises de mineralização de Nitrogênio foram realizadas no Laboratório de Fertilidade de Solos e os correspondentes às atividades enzimáticas com auxílio do Laboratório de Bioquímica do Solo da mesma Faculdade

3.1. Solo

Utilizaram-se amostras de solo colhidas em uma área que nunca recebera herbicida. As amostras foram coletadas de um Latossolo Vermelho Escuro, de textura arenosa, sob pastagem. A composição química do solo utilizado apresenta-se na Tabela 1.

Tabela 1. Principais características químicas da terra utilizada nos experimentos.
FCAV/UNESP. Jaboticabal/SP, 2004.

P resina	M. O.	pH	K	Ca	Mg	H + Al	S.B.	C.T.C.	V
mg/dm ³	g/dm ³		mmol _c /dm ³						(%)
2,0	6,0	4,6	0,10	4,33	1,00	20,0	5,43	25,33	21

As amostras de solo foram deixadas a secar a temperatura ambiente e na sombra, e depois foram peneiradas em tamis de dois milímetros.

3.1.1. Determinação do peso seco e da capacidade de campo do solo

Amostras de 10 g de solo foram levadas para secar em estufa a temperatura de 105 °C por 24 horas, em três repetições. A umidade foi determinada, em porcentagem, pela diferença dos pesos dos solos antes e após a secagem na estufa.

Na determinação da capacidade de campo, foram colocados 150 g de solo em um béquer de 500 mL de capacidade e adicionou-se gota a gota 2 mL de água destilada, com auxílio de uma pipeta, por 40 segundos. O torrão formado foi colocado em uma placa de Petri e levada a estufa para secar a temperatura de 105 °C por 24 horas. A capacidade de campo foi calculada pelo peso seco do solo que absorveu os 2 mL de água adicionados, (Costa, 1983).

3.1.2. Herbicidas

Os herbicidas, 17 no Experimento 1 e oito no Experimento 2, foram adicionados nas amostras de solo, em concentrações equivalentes a 100 vezes (100 x) a dose recomendada por hectare no Experimento 1 e, duas (2 x) e dez (10 x) vezes a dose recomendada por hectare no Experimento 2.

O cálculo das quantidades de herbicidas aplicadas se baseou numa profundidade de incorporação de um centímetro de solo com massa específica de 1.3 g/cm³, que resultou em 7,69 g de solo para cada 1000 g ha⁻¹ de ingrediente ativo. As quantidades calculadas foram adicionadas ao solo diluídas em água em um volume equivalente ao necessário para atingir 60% da capacidade de campo

3.2 Descrição dos tratamentos e delineamento experimental

O Experimento 1 compreendeu 18 tratamentos, 17 herbicidas avaliados a 100 x da dose recomendada comercialmente e a testemunha. Os 17 tratamentos + testemunha foram dispostos em delineamento de blocos ao acaso, com três repetições.

Os princípios ativos e a dose recomendada por hectare estão apresentados na Tabela 2 e na Tabela 3 seguindo, apresenta-se um resumo das principais características destes herbicidas.

Tabela 2. Tratamentos herbicidas e doses recomendadas. FCAV/UNESP - Jaboticabal (SP), 2004. Adaptado de Rodriguez & Almeida

HERBICIDA	PRODUTO COMERCIAL	ia (g Ha.⁻¹)
bentazon	Basagran 600	720
chlorimuron-ethyl	Classic	15
diclosulam	Spider 840	35
flumetsulam	Scorpion	120
fomesafen	Flex	250
glyphosate	Round up Original	720
haloxyfop-methyl	Verdict-R	60
imazaquin	Scepter	290
imazethapyr	Pivot DG	100
imazethapyr + chlorimuron ethyl	Pivot DG +Classic	50+15
imazethaoyr + fomesafen	Pivot DG + Flex	60+125
imazethapyr + lactofen	Pivot DG + Cobra	50+80
lactofen	Cobra	180
metolachlor	Dual Gold	1920
metribuzin	Sencor 480	480
sulfentrazone	Boral 500	600
trifluralin	Trifluralina Milenia	534

Tabela 3. Principais características dos herbicidas estudados. FCAV/UNESP - Jaboticabal (SP), 2004.
(adaptado de Rodrigues & Almeida, 2005; WSSA, 1994).

HERBICIDA	família química modo de ação	solubilidade água (mg L ⁻¹)	pKa	Koc mL/g	Kow	degradação	vida média dias
bentazon	Tiadiazinas inibição do fotossistema II	500	nd	34	35	microbiana fotodegradação	20
chlorimuron - ethyl	Sulfoniluréias inibição da ALS	1200	4,2	110	320 (pH 5), 2,3 (pH 7)	hidrolises	40
diclosulam	Sulfoanilidas inibição da ALS	124	4,09	nd	1,42	microbiana	33-65
flumetsulam	Sulfoanilidas inibição da ALS	5600	4.6	700	1,62	microbiana	30-90
fomesafen	Difeniléteres inibição da PPO	50	2,7	60	794 a 1	fotodegradação microbiana	100
glyphosate	----- inibição da EPSPs	15700	2,6-5,6 y 10,3	24000	0,0006-0,0017	microbiana	47
haloxyfop- methyl	Arioxifenoxipropionatos inibição de ACCase	9,3	4,33	33	11700	hidrolises	60-90
imazaquin	Imidazolinone inibidores da ALS	60	3,8	20	2,2	microbiana fotólises	210
imazethapyr	Imidazolinonas inibidores da ALS	1400	3,9	nd	11(pH 5), 31 (pH 7), 16 (pH 9)	microbiana fotólises	60
lactofen	Difeniléteres inibição da PPO	0,1	0	10000	nd	microbiana	3
metolachlor	Amidas inibição da divisão celular	488	0	200	794	microbiana fotodegradação	15-50
metribuzin	Triazinas inibição do fotossistema II	1100	nd	60	44,7	microbiana	30-60
sulfentrazone	Aritriazolinonas inibição da PPO	490	6,56	43	1,48	microbiana	180
trifluralin	Dinitroanilinas inibição da formação de microtubulos	0,3	0	7000	118000	fotodegradação microbiana	45

(*) nd: não disponible

Baseando-se nos resultados do Experimento 1, foram selecionados os oito herbicidas estudados no Experimento 2: bentazon, metolachlor, trifluralin, imazethapyr, imazethapyr+lactofen, haloxyfop-methyl, glyphosate e chlorimuron-ethyl. Este experimento totalizou 16 tratamentos constituídos pela combinação de oito herbicidas e duas concentrações (duas e dez vezes a dosagem média recomendada), mais a testemunha sem aplicação de herbicida.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com 16 tratamentos em esquema fatorial 8X2 (8 herbicidas e 2 concentrações) + a testemunha, em três repetições.

3.3 Determinações

3.3.1 Determinação de Respiração Basal.

Para a determinação da respiração basal, amostras de 100 g de solo foram enriquecidas com os herbicidas e incubadas, durante 20 dias no Experimento 1 e 28 dias no Experimento 2, em frascos de vidro com capacidade para três litros, hermeticamente fechados e incubados em câmara BOD a 25° C no escuro. A umidade das amostras incubadas foi mantida em 60% da capacidade de campo. A respiração microbiana global foi estimada cada dois dias no Experimento 1 e aos 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 e 28 dias de incubação, por meio da mobilização de CO₂ em 20 mL de NaOH (1N) e posterior titulação com solução de HCl (0,65 N) após a precipitação do carbonato com BaCl₂ (Jenkinson & Powlson, 1976).

O mesmo procedimento descrito acima foi utilizado para testemunhas sem adição de solo, os brancos, para determinar a quantidade de CO₂.

Para a determinação da quantidade de CO₂ liberado utilizou-se a fórmula (IBAMA, 1990):

$$\text{CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ de solo)} = ((\text{mL HCl}_{\text{gasto no branco}}) - (\text{mL HCl}_{\text{gasto no tratamento}})) \times \text{N} \times \text{E} \times 10$$

onde:

N: normalidade do HCl

E: equivalente grama do C (6 g)

10: para expressão em mg kg^{-1} de solo

3.3.2 Determinação da Mineralização do Nitrogênio

A avaliação da mineralização do nitrogênio foi realizada no Laboratório de Análise de Solo do Departamento de Solos e Adubos seguindo a metodologia descrita por Cantarella & Trivelin (2001) baseada no procedimento originalmente proposto por Bremner & Keeney (1966).

3.3.3 Determinação da Atividade da Desidrogenase

Avaliou-se a atividade enzimática da desidrogenase no solo segundo a técnica descrita por Alef (1995). Foram pesados 5 g de solo, com a umidade proveniente de campo, em tubos testes e misturados com 5 mL da solução de cloreto de trifetil tetrazólio (TTC) a 0,3%. Os tubos foram selados e incubados no escuro por 24 h a 30° C. Os tubos controles continham somente 5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, sem o TTC. Decorrido o período de incubação, adicionaram-se 40 mL de acetona aos tubos, que foram agitados por 1 minuto e, posteriormente, centrifugados a 2000 rpm por 10 min. Mediu-se o trifetil formazan (TTF), formado pela redução do TTC, no espectrofotômetro a 546 nm contra o branco.

3.3.4 Determinação da Hidrólise de FDA

Para a determinação da hidrólise de FDA utilizou-se a metodologia descrita por Schnurer & Rosswall (1982). Depois da determinação do teor de umidade, amostras de 1 g de solo incubado por oito e 28 dias foram colocadas em Erlenmeyers de 125 mL de

capacidade juntamente com 12,5 mL de tampão fosfato de sódio 60 mM (11,9 g de NaHPO_4 e 9,08 g de $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{L}^{-1}$ de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA (Sigma Chemical Co.) foi iniciada adicionando-se 1,25 mL de uma solução 1:18 de água destilada de solução estoque de FDA em acetona (2 mg mL^{-1} de acetona).

Os Erlenmeyers foram imediatamente fechados com papel alumínio e incubados a 24 °C por 3 horas. Após esse período, a reação foi paralisada adicionando 12,5 mL de acetona e procedeu-se a centrifugação a 4000 rpm por 15 minutos. A seguir, efetuou-se a filtragem em papel de filtro tipo Whatman nº 1, sendo os filtrados recolhidos em tubos de cultura. Logo após, determinou-se em espectrofotômetro a absorbância dos filtrados a 490 nm.

Para o cálculo da quantidade de FDA hidrolisado foi utilizada a equação da curva padrão correspondente à regressão linear entre o FDA hidrolisado e a absorbância para concentrações de 0, 100, 200, 300 e 400 μL de FDA com igual procedimento ao descrito anteriormente e os valores resultantes foram expressos em μg de fluoresceína g^{-1} de solo seco h^{-1} .

3.3.5 Determinação da densidade de microrganismos.

Na determinação de microrganismos no solo, utilizou-se a técnica de número de unidades formadoras de colônias de fungos e microrganismos amilolíticos, celulolíticos e proteolíticos, em plaqueamento por gotas tal como sugerem Brigatto & Andrade (2006). As diluições para os grupos funcionais foram de 10^{-4} e para fungos de 10^{-5} .

O detalhe dos meios de cultura utilizados é apresentado na Tabela 3.

O plaqueamento foi realizado com gotas do meio de cultura em alíquotas de 0,02 mL, com auxílio de micropipeta, utilizando 5 gotas de cada diluição, uma do lado da outra, em placas de Petri estéreis. Em seguida, as placas foram vedadas com Parafilm™ e incubadas de três a cinco dias à 28° C.

Após este período, foram feitas observações da presença de unidades formadoras de colônias (UFC).

Tabela 3. Meios de cultura e técnicas de revelação dos halos de degradação. FCAV/UNESP. Jaboticabal (SP), 2004. (Adaptado de Brigatto & Andrade, 2006).

Meio BDA para fungos	Agar batata dextrose 39 g e água destilada 1000 mL, pH= 5,6.
Meio mínimo para amilolíticos (Pontecorvo et al., 1953)	Amido solúvel 10 g, extrato de levedura 0,1 g, NH_4NO_3 0,1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, KH_2PO_4 1,5 g, agar 15 g. , extrato de solo (v/v) 950 mL, pH=7,0. Revelação do halo de lise: Cobrir a superfície do meio com solução salina (0,85%) 50 mL, eliminar o excesso, contar as colônias que formaram halo.
Meio com celulose para celulolíticos (Wood, 1980)	Carboximetil celulose 5 g, NO_3NH_4 1.0 g, solução salina (0.85%) 50 mL, extrato de solo (v/v) 950mL, ágar 15 g, pH = 7,0. Revelação do halo de lise: Cobrir a superfície do meio com solução de NaCl 1M e esperar 5 minutos; eliminar; adicionar solução de vermelho Congo 0.1% por 30 minutos, lavar com água destilada até o aparecimento dos halos ao redor das colônias, contar as colônias que formaram halo.
Meio caseína para proteolíticos (Wood, 1980 modificado por Andrade)	Caseína hidrolisada 10 g, extrato de levedura 0,1 g, KH_2PO_4 1,5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, solução salina (0.85%) 50 mL, agar 15 g, extrato de solo (v/v) 950 mL pH= 7,0. Revelação do halo: Adicionar solução de 0,1N HCl sobre a superfície do meio por 2 min, eliminar, contar as colônias que formaram halo.

3.3.6 Análise estatística

Os dados das avaliações nas diferentes datas foram submetidos à análise de variância pelo teste F. Para a comparação geral das médias de respiração basal, quantidade de TPF e de diacetato de fluoresceína foi aplicado o teste de Tukey (5%). Para as comparações dos tratamentos com a testemunha foram avaliados contrastes ortogonais.

Com o objetivo de analisar o comportamento dos tratamentos através do tempo, processou-se, complementarmente, uma análise de variância de dados longitudinais e, para tanto, foi utilizada a correção AR(1) para a consideração das possíveis autocorrelações dos dados no tempo. Para o estudo das evoluções do CO₂ acumulado durante o período de incubação, também se ajustaram curvas de regressão exponencial, do tipo $CO_{2acum} = \hat{\alpha}_0 * e^{\hat{\alpha}_1 * dias}$ para cada herbicida no Experimento 2 e logarítmicas, do tipo $CO_{2acum} = \hat{\alpha}_0 + \hat{\alpha}_1 \log(dias)$ no Experimento 1. Estas, linearizadas, foram comparadas mediante o teste de homogeneidade de coeficientes de regressão, utilizando-se intervalos de confiança a 95% para a separação dos coeficientes $\hat{\alpha}_1$, e conseqüente, diferenciação das curvas.

No Experimento 2, para estudar possíveis associações entre os bioindicadores estimados, foram realizadas análises de correlação simples.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Experimento 1

Os resultados obtidos para os acúmulos de CO₂ no período de incubação apresentam-se na Tabela 4. Na mesma, pode-se apreciar que, em geral, a respiração ocorreu a taxas importantes na fase inicial de incubação até o oitavo ou décimo dia e, a partir daí, constatou-se uma tendência à estabilização das quantidades de CO₂ desprendidas do solo. As regressões ajustadas em todos os tratamentos corresponderam, como consequência, com um modelo logarítmico do tipo $CO_{2acum} = \hat{\alpha}_0 + \hat{\alpha}_1 \log(\text{dias})$.

Em função destes resultados é possível afirmar que a mineralização do C teve um padrão similar ao longo do período experimental, tanto na testemunha como nos tratamentos com herbicidas.

No entanto, embora com padrões similares, o estudo comparativo das curvas detectou evoluções diferentes. O cálculo dos intervalos de confiança para os coeficientes $\hat{\alpha}_1$ das curvas ajustadas permitiu diferenciar a testemunha (*limites inferior= 595,8 e limite superior= 667,1*) do tratamento com glyphosate (*limite inferior= 785,4 e limite superior=850,4*), e dos tratamentos com bentazon e metolachlor (*limite inferior= 439 e limite superior= 488,4; limite inferior=468,7 e limite superior=512,8; respectivamente*)(Figura 1).

Os acúmulos no tratamento com glyphosate evoluíram em forma semelhante à testemunha inicialmente, mas foram crescentemente superiores no final do período de incubação. No entanto, os tratamentos com bentazon e com metolachlor, de comportamento muito similar entre eles, apresentaram sempre acúmulos menores que os da testemunha, embora não significativos no início do período de incubação.

Existiram, por tanto, notórias diferenças nos níveis de atividade respiratória entre a testemunha e estes três tratamentos. Os maiores e menores acúmulos totais aos 20 dias detectados pela análise estatística correspondente são reflexo

Tabela 4. Médias dos acúmulos de CO₂ (mg CO₂.kg⁻¹de solo) para todas as datas e todos os tratamentos, CV e DMS(5%) correspondentes para cada estimativas. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

TRATAMENTO	DIAS DE INCUBAÇÃO									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
bentazon	257 ab	501 bc	817 de	962 ef	1057 f	1127 d	1182 d	1233 e	1297 f	1324 f
chlorimuron-ethyl	452 ab	933 ab	1205 abc	1474 abc	1637 abc	1743 ab	1825 ab	1935 ab	1989 ab	2023 ab
diclosulam	469 ab	956 a	1255 ab	1514 a	1668 ab	1745 ab	1824 ab	1922 ab	1962 ab	1996 abc
flumetsulam	504 a	997 a	1268 a	1500 ab	1636 abc	1719 ab	1797 ab	1889 ab	1940 abc	1965 abcd
fomesafen	435 ab	831 abc	1080 abcd	1271 abcdef	1432 abcde	1545 bc	1634 bc	1694 bcd	1761 bcde	1798 bcde
glyphosate	457 ab	939 ab	1271 a	1535 a	1756 a	1905 a	2024 a	2120 a	2221 a	2277 a
haloxyfop-methyl	118 b	503 c	705 e	943 f	1129 ef	1263 cd	1396 cd	1517 cde	1579 def	1634 def
imaz+chlorimuron	435 ab	927 ab	1217 abc	1483 abc	1641 abc	1711 ab	1801 ab	1901 ab	1953 abc	1978 abcd
imaz+fomesafen	388 ab	756 abc	975 abcde	1154 bcdef	1342 bcdef	1468 bcd	1558 bc	1632 bcd	1708 bcde	1740 bcde
imaz+lactofen	257 ab	653 abc	888 cde	1115 def	1281 def	1402 bcd	1506 bcd	1608 bcd	1664 bcde	1664 cdef
imazaquin	394 ab	882 ab	1173 abc	1447 abcd	1602 abcd	1697 ab	1770 ab	1879 ab	1930 abcd	1957 abcd
imazethapyr	408 ab	835 abc	1098 abcd	1296 abcde	1437 abcde	1529 bc	1600 bc	1684 bcd	1746 bcde	1786 bcde
lactofen	292 ab	669 abc	910 bcde	1148 bcdef	1302 cdef	1420 bcd	1536 bc	1669 bcd	1729 bcde	1766 bcde
metolachlor	375 ab	671 abc	891 cde	1040 ef	1179 ef	1258 cd	1330 cd	1383 de	1444 ef	1459 ef
metribuzin	386 ab	695 abc	920 abcde	1118 def	1305 cdef	1408 bcd	1476 bcd	1517 cde	1602 cdef	1632 def
sulfentrazone	383 ab	814 abc	1125 abcd	1301 abcde	1430 abcde	1515 bc	1581 bc	1629 bcd	1679 bcde	1709 bcde
trifluralin	327 ab	658 abc	895 cde	1134 cdef	1317 bcdef	1435 bcd	1539 bc	1631 bcd	1731 bcde	1792 bcde
testemunha	485 a	909 ab	1235 abc	1428 abcd	1561 abcd	1652 ab	1752 ab	1804 abc	1867 bcd	1924 bcd
CV(%)	11,46	7,62	9,51	7,57	6,89	6,38	6,04	5,91	6,05	6,24
DMS (5%)	134	185	307	296	303	300	301	309	329	346

¹ Valores seguidos das mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

dos comportamentos diferenciais observados para os solos tratados com glyphosate, bentazon e metolachlor, respectivamente.

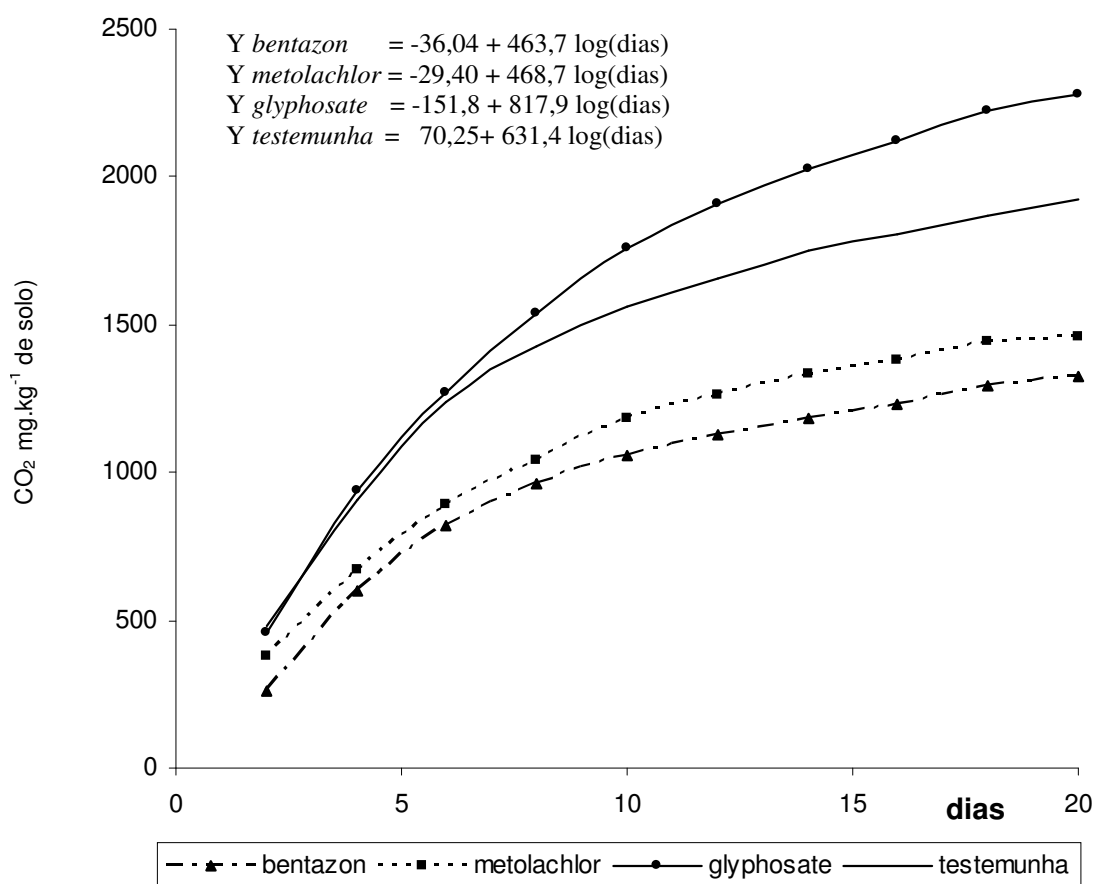


Figura 1. Representações gráficas da evolução de CO₂ acumulada em amostras de solo enriquecidas com os herbicidas, bentazon, metolachlor, glyphosate e para a testemunha. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

Pela Tabela 4 observa-se que o solo tratado com glyphosate liberou 18% a mais de CO₂ que no solo não tratado. No entanto, com bentazon e metolachlor, os totais produzidos foram 31 % e 24% menores, respectivamente.

Analisando os resultados da produção de CO₂ por data de avaliação (Tabela 5) pode-se confirmar a consistência do comportamento destes três tratamentos em relação à testemunha.

No tratamento com glyphosate determinaram-se maiores quantidades de CO₂ praticamente em todas as datas, embora esta superioridade só atingisse significância estatística na avaliação aos 10 dias.

Também nos casos de bentazon e metolachlor constatou-se menor atividade em quase a totalidade das avaliações.

Tabela 5. Médias da respiração (mg CO₂ kg⁻¹ de solo) por data de avaliação para todos os tratamentos. CV(%) e DMS (5%) correspondentes para cada estimativa. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

TRATAMENTO	DIAS DE INCUBAÇÃO									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
bentazon	257 d ¹	345 b	216 a	145 e	95 c	70 ab	54 d	51 cd	64 abc	27 ab
chlorimuron	452 ab	481 a	271 a	269 a	163 ab	106 ab	82 bcd	110 abc	54 c	34 ab
diclosulam	469 a	487 a	298 a	260 abc	153 bc	77 b	80 bcd	98 abcd	40 c	34 ab
flumetsulam	504 a	494 a	270 a	232 abcd	136 bc	83 ab	78 bcd	92 abcd	51 c	26 ab
fomesafen	435 ab	397 ab	249 a	191 abcde	161 ab	113 ab	89 bcd	60 bcd	67 abc	37 ab
glyphosate	457 ab	483 a	331 a	264 ab	221 a	149 a	118 ab	96 abcd	101 a	56 a
haloxyfop-methyl	118 e	385 ab	202 a	238 abc	186 ab	134 ab	133 a	121 ab	62 abc	55 a
imaz+chlorimuron	435 ab	492 a	289 a	266 a	159 abc	70 ab	90 abcd	100 abcd	52 c	25 ab
imaz+fomesafen	388 abcd	368 ab	219 a	179 bcde	188 ab	126 ab	90 abcd	74 abcd	76 abc	32 ab
imaz+lactofen	257 d	396 ab	234 a	227 abcde	166 ab	121 ab	104 abc	101 abcd	56 bc	0 b
imazaquin	394 abc	488 a	291 a	274 a	155 bc	95 ab	73 cd	109 abc	51 c	28 ab
imazethapyr	408 abc	426 ab	263 a	198 abcde	141 bc	92 ab	71 cd	84 abcd	62 abc	40 ab
lactofen	292 cd	377 ab	241 a	238 abc	153 bc	118 ab	116 ab	133 a	61 abc	37 ab
metolachlor	375 abcd	297 b	219 a	149 ed	139 bc	79 ab	72 cd	54 cd	61 abc	15 ab
metribuzin	386 abcd	308 b	225 a	198 abcde	187 ab	103 ab	68 cd	41 d	85 abc	29 ab
sulfentrazone	383 abcd	431 ab	311 a	176 cde	128 bc	85 ab	66 cd	48 cd	50 c	30 ab
trifluralin	327 bcd	331 b	237 a	239 abc	184 ab	118 ab	104 abc	92 abcd	100 ab	62 a
testemunha	485 a	424 ab	326 a	193 abcde	133 bc	91 ab	100 abc	52 cd	63 abc	57 a
CV(%)	11,46	10,65	20,62	12,87	13,24	22,65	16,00	25,62	22,84	43,76
DMS (5%)	133,51	134,79	165,38	86,58	64,44	70,80	43,44	66,32	45,08	46,95

¹ Valores seguidos das mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

No tratamento com bentazon as diminuições significativas ocorreram aos dois e aos quatorze dias e corresponderam a reduções de importante magnitude, da ordem de 50%. Entretanto, com metolachlor o menor acúmulo parece ser o resultado da soma de diminuições de menor magnitude ao longo do período experimental, que não puderam ser detectadas pelo teste estatístico.

Os resultados obtidos para o glyphosate estão em concordância com os obtidos em várias outras pesquisas, (Haney et al., 2000; Busse et al., 2001). Como a microbiota do solo é capaz de utilizar o glyphosate como fonte de carbono para seu metabolismo é

fácil compreender que, com as concentrações utilizadas, se comprovaram incrementos na respiração microbiana.

No entanto, a evolução da degradação do herbicida no presente experimento mostrou características destacáveis. Como se mencionara anteriormente, a atividade respiratória no solo enriquecido com glyphosate foi praticamente igual à avaliada na testemunha até os oito dias e superior a partir de esse momento, indicando a continuidade de uma efetiva mineralização do herbicida. Este resultado pode ser considerado contrário ao esperado.

Glyphosate é um composto forte e rapidamente adsorvido pelos componentes de solo. Portanto, afirma-se que a degradação deste herbicida ocorre de forma imediata logo após aplicação e diminui acentuadamente depois, a medida em que diminui sua biodisponibilidade. Isto explica os resultados de várias pesquisas, como a de Sprankle et al (1975) e a de Haney et al. (2000). Inclusive, segundo Hart & Brookes (1996) e Olson & Lindwall (1991) o fato dos efeitos serem iniciais pode ser a explicação para a não comprovação de estímulos na mineralização de C em pesquisas nas quais as determinações foram realizadas só a partir do sétimo dia.

Por outro lado, segundo Haney et al. (2000), a evidencia associando os efeitos da adsorção na biodegradação e na biodisponibilidade de herbicidas para os microrganismos do solo não é conclusiva. Entre outros fatores, a biodisponibilidade de compostos adsorvidos depende fortemente das características específicas dos microrganismos responsáveis pela degradação em cada situação e isto não sempre é conhecido.

Quanto ao bentazon, os resultados de inibição obtidos são similares aos de outros autores (Marsh et al., 1978; Allievi et al., 1996) nas primeiras semanas após aplicação e com concentrações elevadas. Com metolachlor, na literatura citam-se diminuições com a utilização de este herbicida em altas concentrações da ordem de 10 a 15% , em todos os casos menores a 25%.

Quando se considera 25% de alteração na respiração como valor limite para a categorização de pesticidas com riscos ecotoxicológicos, tal como propõem a maioria das normas atuais (i.e. OECD, 1999a), metolachlor; sem reduções significativas nas

avaliações por data de avaliação e apresentando uma diminuição embora significativa de só 24% no acúmulo final; não seria considerado como diferente da testemunha, tal como se estabelece na literatura para este herbicida.

Com base em esta última consideração, haloxyfop-methyl, lactofen, trifluralin e o tratamento de imazethapyr+lactofen, embora não se diferenciaram da testemunha no total acumulado, diminuíram a mineralização de C em magnitudes superiores a 25% em alguma das avaliações.

Como se pode observar na Tabela 5, estes quatro tratamentos mostraram efeitos de inibição no início da incubação. O efeito foi drástico no caso do haloxyfop-methyl, no qual o CO₂ desprendido representou apenas 24% do estimado na testemunha. Também Andréa et al. (2000) estudando este herbicida determinaram inibição na atividade respiratória unicamente no dia seguinte a aplicação. Quanto a magnitude do impacto, Santos et al. (2006) avaliando o fluazifop-p-butil, herbicida com igual modo de ação, obtiveram resultados similares e colocam que se trata de potentes inibidores da síntese de acetil coenzima A carboxilase (ACCase), presente também no metabolismo microbiano, o que poderia explicar a magnitude dos efeitos observados.

Ainda na Tabela 5, observa-se também a transitoriedade dos efeitos inibitórios estimados aos dois dias. Em particular, destaca-se a recuperação da respiração no solo enriquecido com o haloxyfop-methyl, que triplicando a taxa respiratória, igualou a produção de CO₂ da testemunha na avaliação seguinte. Similar tendência apresentaram bentazon, lactofen, imazethapyr+lactofen e, menos expressivamente, o trifluralin.

Tanto bentazon como a mistura de imazethapyr+lactofen apresentaram em uma segunda avaliação, aos 14 e 20 dias, respectivamente, novamente reduções na mineralização, superando 25% em relação à testemunha.

Este primeiro experimento procurou selecionar os herbicidas de maior interesse que justificaram incrementar o detalhamento nas avaliações. Em consideração a este objetivo e dos resultados obtidos, selecionaram-se os seguintes herbicidas: bentazon, metolachlor, haloxyfop-methyl, trifluralin, imazethapyr+lactofen e glyphosate.

Considerando a freqüência de utilização na cultura de soja, adicionaram-se o imazethapyr e o chlorimuron.

4.2. Experimento 2

4.2.1 Respiração basal

A análise de variância de dados longitudinais, que permite a consideração do comportamento dos tratamentos através do tempo, destacou um efeito de inibição na atividade respiratória do solo ao longo do período experimental para os tratamentos com bentazon e com haloxyfop-methyl, na maior dose. Nestes tratamentos, a respectiva emissão de CO₂ foi, em média, 31% e 33% menores que a determinada na testemunha. Os restantes dos tratamentos, não afetaram a respiração no período considerado, apresentando produções de CO₂ similares a da testemunha (Figura 2).

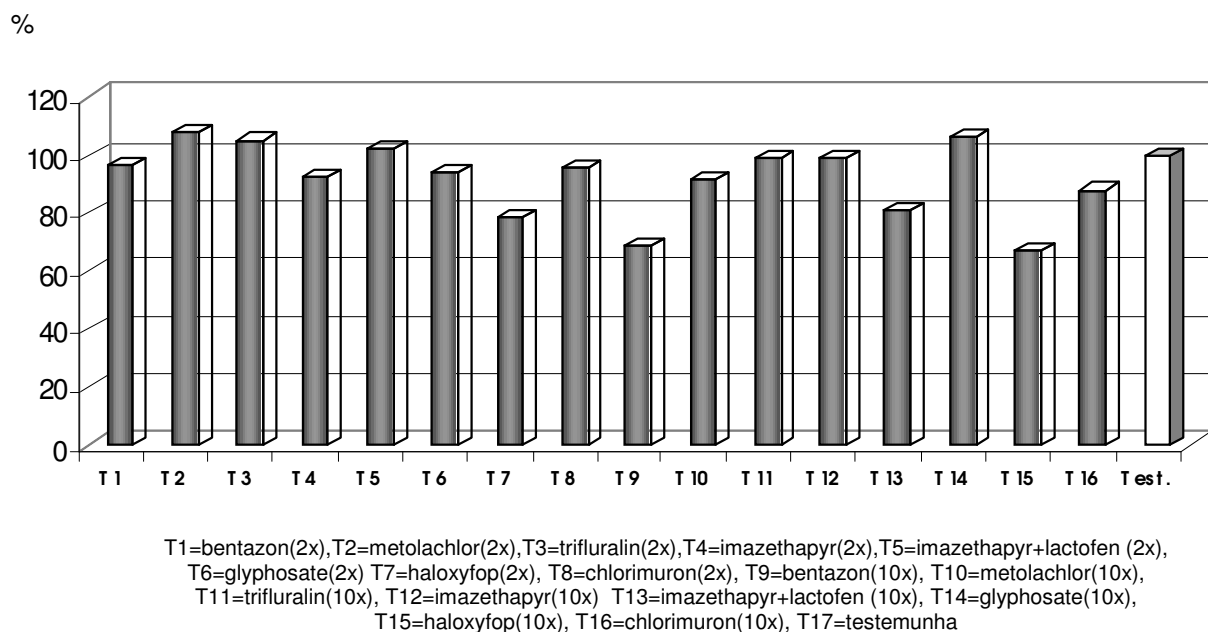


Figura 2. Efeitos dos herbicidas e concentrações nas evoluções de CO₂ das amostras de solo ao longo dos 28 dias de incubação. Dados expressos em percentuais em relação à testemunha. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

No entanto, a análise do comportamento dos tratamentos por data de avaliação, assim como os estudos das curvas de evoluções dos acúmulos, revelaram que, embora com efeitos médio de inibições similares, os herbicidas bentazon 10x e haloxyfop-methyl 10x influenciaram diferencialmente a atividade respiratória.

Para o bentazon 10x o efeito inibitório, de grande magnitude, determinando uma redução de 62% em relação à testemunha, ocorreu inicialmente, na primeira data de avaliação aos dois dias (Tabela 6). Posteriormente, com exceção da avaliação aos 12 dias, na qual se constatou também diminuição, o tratamento apresentou recuperação da atividade, igualando os valores de produção de CO₂ aos estimados na testemunha.

Tabela 6. Médias da quantificação de CO₂ (mg kg⁻¹ de solo) por data de avaliação para os tratamentos diferindo da testemunha segundo as comparações dos contrastes ortogonais (P•0,05) e para o haloxyfop-methyl (2x). FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

Avaliação (dias)	testemunha	bentazon_(10x)	imazethapyr + lactofen_(10x)	haloxyfop- methyl_(10x)	haloxyfop- methyl_(2x)	
2	50,18 A	19,07(38%) B	34,00(68%) B	35,73(68%) A	36,92 (74%)	A
4	24,61 A	24,09(98%) A	25,74(105%) A	30,19(123%) A	28,43 (116%)	A
8	27,56 A	22,62(82%) A	22,97(83%) A	1,82(7%)B	21,49 (78%)	A
12	23,60 A	13,43(57%) B	17,16(73%) A	15,69(66%) A	18,59 (79%)	A
16	23,31 A	25,13(108%) A	14,04(60%) A	22,97(99%) A	11,18 (48%)	A
20	29,47 A	23,40(79%) A	32,93(112%) A	9,53(32%) B	17,33 (59%)	A
24	28,80 A	25,55(89%) A	30,73(107%) A	21,97(76%) A	22,93 (80%)	A
28	32,93 A	44,20(134%) A	27,53(84%) A	22,00(67%) A	22,53 (68%)	A

*entre parênteses encontram-se os valores estimados para os herbicidas expressos como porcentagem da testemunha.

Pese a recuperação imediata observada em este tratamento, a magnitude da redução inicial determinou que as diferenças nos acúmulos com a testemunha se mantivessem quase até o final do período de incubação (Tabela 7).

Tabela 7. Médias dos acúmulos de CO₂ (mg kg⁻¹ de solo) por data de avaliação para os tratamentos deferindo da testemunha segundo as comparações dos contrastes ortogonais (P•0,05). FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

Avaliação (dias)	Testemunha	bentazon_(10x)	haloxyfop- methyl_(10x)	haloxyfop- methyl_(2x)	imazethapyr + lactofen_(10x)
2	50 A	19 (38%) B	36 (72%) A	37 (74%) A	34 (68%) B
4	75 A	43 (57%) B	66 (88%) A	65 (87%) A	60 (80%) A
8	102 A	66 (64%) B	68 (66%) B	87 (85%) A	83 (81%) A
12	126 A	79 (63%) B	83 (65%) B	105 (83%) A	110 (87%) A
16	149 A	104 (69%) B	106 (71%) B	117 (78%) B	114 (76%) B
20	179 A	128 (71%) B	116 (64%) B	134 (74%) B	147 (82%) A
24	208 A	153 (73%) B	138 (66%) B	157 (75%) B	178 (85%) A
28	232 A	182 (78%) A	141 (60%) B	178 (76%) B	194 (83%) A

*entre parênteses encontram-se os valores estimados para os herbicidas expressos como porcentagem da testemunha

Para o haloxyfop-methyl 10x as reduções ocorreram mais tardiamente. A primeira ocorreu aos oito dias, quando a atividade resultou mínima, sendo o decréscimo em relação à testemunha de 93% (Tabela 6), e a segunda aos vinte dias. As maiores reduções observadas neste tratamento e também valores de mineralização sempre mais baixos que a testemunha explicam a permanência da detecção dos efeitos nos acúmulos (Tabela 7).

Os outros dois tratamentos destacáveis foram o imazethapyr + lactofen (10x) e o haloxyfop-methyl 2x. No primeiro detectou-se menor atividade aos dois dias e, aos 16 dias uma importante diminuição nos valores médios calculados, a qual, embora não significativa, foi determinante da diferenciação com a testemunha nas estimativas dos acúmulos.

Para o haloxyfop-methyl na menor dose observou-se algo similar. Excetuando a avaliação aos quatro dias, os níveis de atividade respiratória neste herbicida foram sempre inferiores aos estimados na testemunha, sem atingir a significância estatística. A somatória destes efeitos explica as diferenças encontradas a partir dos 16 dias e até final da incubação.

A análise das curvas ajustadas para a evolução da atividade respiratória corroborou as apreciações realizadas em relação à bentazon e haloxyfop-methyl. Na comparação dos coeficientes, o $\hat{\alpha}1$ estimado para o tratamento de bentazon 10x foi o único que diferiu do correspondente estimado para a curva do tratamento controle. No entanto, os coeficientes estimados para haloxyfop-methyl nas duas doses (Tabela 8), assim como os dos restantes tratamentos, não diferenciaram da testemunha.

Tabela 8. Valores de $\hat{\alpha}1$ estimados e valores correspondentes dos limites inferior e superior dos intervalos de confiança a 95%, para o bentazon_(10x), a testemunha e o haloxyfop-methyl nas concentrações correspondentes à dose 2x e 10x. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

Tratamento	$\hat{\alpha}1$ estimado	Limite inferior	Limite superior
Testemunha	0,0553 b	0,0445	0,0662
Bentazon	0,0786 a	0,0667	0,0894
haloxyfop-methyl _(10x)	0,0524 b	0,0405	0,0623
haloxyfop-methyl _(2x)	0,0507 b	0,0398	0,0616

No tratamento com bentazon 10x, após a inibição inicial foram observados incrementos nas taxas de liberação de CO₂. Esta recuperação da atividade respiratória explica a diminuição da diferença relativa com a testemunha (Figura 3).

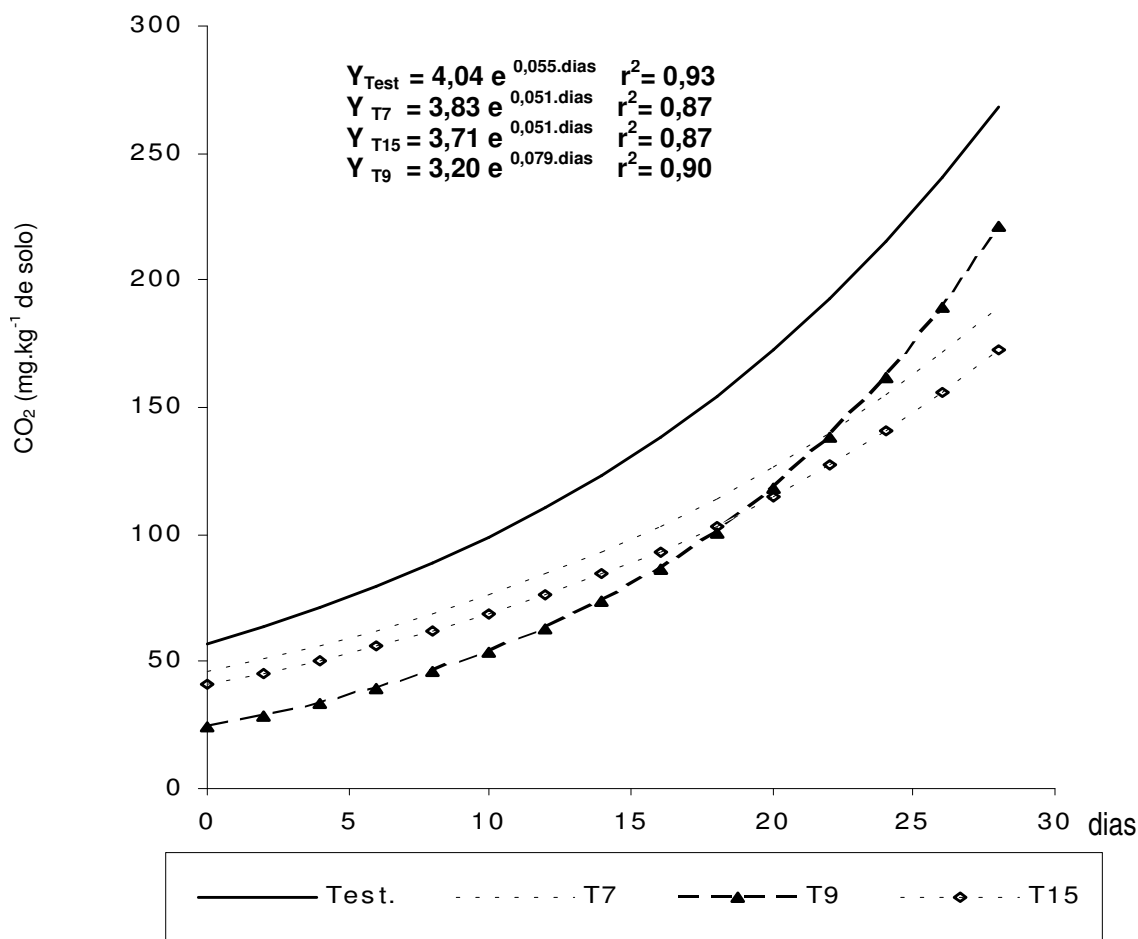


Figura 3. Representações gráficas da evolução de CO₂ acumulada em amostras de solo enriquecidas com os herbicidas bentazon_(10x) (T9), haloxyfop-methyl_(2x) (T7) e haloxyfop-methyl_(10x) (T15) e para a testemunha. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

No vigésimo oitavo dia de incubação, o acúmulo de CO₂ no tratamento de bentazon 10x, diferente do que ocorreu nos tratamentos com haloxyfop-methyl, não diferiu da testemunha (Tabela 7). Desta forma, e de acordo com os resultados de outros

autores (Allievi et al., 1996; Marsh et al., 1978; Grossbard & Davies, 1976) para o bentazon só foram observados efeitos inibitórios em dose elevada, e estes foram transitórios.

Segundo Huber e Otto (1994) este herbicida é rapidamente degradado pela microflora aeróbica na camada superficial do solo, resultando que parte considerável do herbicida é mineralizada a CO_2 (24-50%) e o restante caracterizado por produtos intermediários instáveis, os quais são imediatamente fixados, biótica ou abioticamente.

Marsh et al. (1978) estudando a resposta de distintos grupos de microrganismos ao bentazon em doses de 10 a 100 ppm, observaram diminuições temporárias de várias populações de bactérias e de alguns fungos celulolíticos, mas, também, incrementos de populações de outros fungos e de actinomicetes.

A combinação destes efeitos do tipo diferencial dos herbicidas sobre a biodiversidade original do solo e as dinâmicas induzidas pela alteração, pode explicar a variabilidade observada em bioindicadores da atividade global, como a respiração basal, em curtos espaços de tempo. A velocidade e natureza da fixação do xenobiótico, influenciando a evolução das quantidades biodisponíveis, também contribuem para explicar diferenças dos níveis de atividade no tempo.

Para o haloxyfop-methyl, a detecção dos efeitos inibitórios sobre a respiração basal nas duas doses e a magnitude dos mesmos, poderiam ser considerados como indicativos de um maior potencial biocida comparativo com os outros herbicidas testados neste estudo.

No trabalho de Andréa et al. (2000) também foram detectados efeitos inibitórios na atividade respiratória com este herbicida. A diferença do encontrado no presente experimento, na pesquisa citada a inibição foi detectada unicamente no dia seguinte ao da aplicação.

Segundo os mesmos autores é possível que haloxyfop-methyl e o composto haloxyfop-ácido que resulta da rápida hidrólise do primeiro, exibam efeitos diferenciais sobre a microbiota do solo. Diferenças na composição das comunidades de microrganismos e suas evoluções nos solos poderiam, por tanto, explicar as variações

entre momentos na detecção dos efeitos. Para as condições deste experimento pode se interpretar que se expressou uma maior sensibilidade ao composto hidrolisado.

4.2.2 Atividades enzimáticas

Não foram observados efeitos significativos dos herbicidas na hidrólise de FDA ($P > 0.05$), mas sim na atividade da desidrogenase tanto na avaliação das amostras com oito como com 28 dias de incubação ($P = 0.0001$ e $P = 0.0216$, respectivamente), indicando a ocorrência de alterações nos processos oxidativos do solo (Tabela 9).

Aos 28 dias de incubação, a maioria dos herbicidas inibiu a atividade da desidrogenase. Em todos os tratamentos na dose 10x, excetuando o tratamento de imazethapyr 10x, a quantidade de TPF foi menor que a estimada na testemunha.

Existe algum grau de concordância com as estimativas dos acúmulos de CO_2 nos tratamentos de bentazon 10x, haloxyfop-methyl 10x e imazethapyr + lactofen 10x pese a que, na determinação aos 28 dias, todos estes tratamentos mostraram recuperação na atividade respiratória, igualando-se a testemunha.

No entanto, destaca-se o fato de não se ter detectado efeito na atividade da desidrogenase para amostras de solo enriquecidas com haloxyfop-methyl 2x, assim como de se detectar acentuada redução em tratamentos que não apresentaram alterações na respiração, como o metolachlor 10x.

Na avaliação das amostras com oito dias de incubação constataram-se tanto efeitos de inibição como de estímulo. Como era esperado, o bentazon 10x e o imazethapyr+lactofen 10x reduziram, expressivamente no caso do primeiro herbicida, a atividade da desidrogenase, mostrando mais uma vez algum grau de concordância com as determinações de respiração. Entretanto, no haloxyfop-methyl 10x, no qual a diminuição da respiração fora drástica este bioindicador não mostrou efeitos.

Tabela 9. Valores médios obtidos nas estimativas da atividade da desidrogenase ($\bar{g}$ TPF. g^{-1} de solo seco h^{-1}) por data de avaliação para os tratamentos diferindo da testemunha segundo as comparações dos contrastes ortogonais ($P \leq 0,05$). FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

Tratamento	8 dias		28 dias	
	$\bar{g}$ TPF. g^{-1} de solo seco h^{-1}	Valor de P	$\bar{g}$ TPF. g^{-1} de solo seco h^{-1}	Valor de P
TEST.	1,75		1,48	
T1	-----	-----	0,50	0,0062
T2	2,26	0,0098	0,54	0,0084
T3	1,33	0,0298	-----	-----
T4	2,24	0,0050	-----	-----
T6	-----	-----	0,82	0,0492
T8	-----		0,69	0,0450
T9	0,62	<0,0001	0,14	0,0006
T10	-----	-----	0,19	0,0008
T11	-----	-----	0,66	0,0185
T13	1,10	0,0004	0,35	0,0023
T14	2,11	0,0314	0,55	0,0087
T15	-----	-----	0,66	0,0179
T16	-----	-----	0,74	0,0298

(*) os valores em sombreado destacam tratamentos com inibição da desidrogenase

T1=bentazon(2x), T2=metolachlor(2x), T3=trifluralin(2x), T4=imazethapyr(2x), T5=imazethapyr+lactofen (2x), T6=glyphosate(2x) T7=haloxyfop(2x), T8=chlorimuron(2x), T9=bentazon(10x), T10=metolachlor(10x), T11=trifluralin(10x), T12=imazethapyr(10x) T13=imazethapyr+lactofen (10x), T14=glyphosate(10x), T15=haloxyfop(10x), T16=chlorimuron(10x), T17=testemunha

Os resultados de estímulo detectados nos tratamentos de metolachlor 2x, imazethapyr 2x e glyphosate 10x estariam indicando efeitos de promoção da atividade oxidativa do solo para estes herbicidas.

Estes tipos de efeitos têm sido reportados na literatura para herbicidas com potencial de rápida mineralização e de serem utilizados como substrato para o crescimento de populações de microrganismos quando aplicados em altas concentrações. Para glyphosate, em particular, existem várias referências de

incrementos temporários na atividade da microbiota do solo (Wardle & Parkinson, 1990; Haney et al., 2000; Busse et al., 2001; Araujo et al., 2003). Em geral, trata-se de efeitos iniciais e transitórios (Haney et al., 2000; Araujo et al., 2003), como ocorreu com os resultados do presente trabalho.

A análise da atividade da desidrogenase mostrou, no presente estudo, ter maior sensibilidade para a detecção de efeitos de herbicidas quando comparada com os resultados obtidos com a análise da hidrólise de FDA. As enzimas responsáveis da hidrólise do FDA são ubíquas no ambiente solo. A habilidade para hidrolisar FDA está amplamente difundida, especialmente entre os principais decompositores do solo, fungos e bactérias, razão pela qual a quantificação deste processo deveria prover uma boa estimativa da atividade da microbiota (Schnürer & Rosswall, 1982). No entanto, a determinação da fluoresceína apresenta dificuldades em solos com baixa atividade microbiana relacionadas, segundo Adam & Duncan (2001), com limitações no desempenho do solvente utilizado no método tradicional de avaliação. O solo do presente estudo pode ser considerado nesta categoria.

Quanto as correlações entre a atividade respiratória e as atividades enzimáticas, só foi significativa a correlação com a atividade da desidrogenase estimada aos 8 dias de incubação ($P=0,017$) embora de baixa magnitude ($r = 0,57$).

4.2.4 Mineralização de nitrogênio

Na Tabela 10 encontram-se os resultados da quantificação de $N-NO_3$ e $N-NH_4$ para a testemunha e os tratamentos, após oito e 28 dias de incubação.

Considerando a somatória das quantidades de $N-NO_3$ e $N-NH_4$ como uma estimativa aproximada do N inorgânico total, observa-se que os valores para a testemunha, embora baixos, resultam dentro do esperável dadas às características do solo utilizado no experimento.

Observa-se também que não existiu efeito de tratamento nesta variável aos oito ($Pr.F= 0,16$) nem a aos 28 dias ($Pr.F= 0,81$). É possível afirmar, então, que a mineralização do N não foi afetada por nenhum dos herbicidas estudados.

Para alguns autores como van Beelen & Doelman (1997), a mineralização do N é um indicador de baixa sensibilidade na detecção de efeitos de pesticidas sobre a microbiota do solo. No entanto, nas normas internacionais para a avaliação de ecotoxicidade de pesticidas sobre microrganismos recomenda-se minimamente a determinação da respiração e da mineralização do N. Também para Haney et al. (2000), baseados nos resultados de seu trabalho, a mineralização tanto de carbono como de nitrogênio foram estimativas de maior sensibilidade que a biomassa na detecção da atividade microbiana.

Tabela 10. Valores de NH_4 , NO_3 e da soma de NH_4+NO_3 para os solos enriquecidos com os herbicidas estudados e para a testemunha. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

TRATAMENTO	8 dias			28 dias		
	NH_4	NO_3	NH_4+NO_3	NH_4	NO_3	NH_4+NO_3
	mg.kg^{-1} de solo			mg.kg^{-1} de solo		
bentazon (2x)	14,8	6,4	21,2	32,1	8,9	40,9
metolachlor (2x)	17,3	6,1	23,3	27,5	6,1	33,7
trifluralin (2x)	17,2	5,8	23,0	28,5	8,9	37,4
imazethapyr (2x)	16,7	6,3	23,0	30,0	10,1	40,1
imaz+lactofen (2x)	14,6	5,9	20,5	30,1	7,3	37,3
glyphosate (2x)	18,6	5,5	24,1	28,6	7,5	36,1
haloxyfop (2x)	14,7	5,8	20,6	30,3	8,4	38,7
chlorimuron (2x)	16,5	4,8	21,2	30,4	7,6	38,0
bentazon (10x)	13,4	5,9	19,4	23,2	4,7	27,9
metolachlor (10x)	14,0	4,5	18,4	30,0	6,3	36,3
trifluralin (10x)	14,4	4,3	18,7	29,7	6,9	36,6
imazethapyr (10x)	14,4	4,4	18,9	29,5	9,2	38,7
imaz+lactofen (10x)	15,5	5,8	21,3	29,9	7,8	37,7
glyphosate (10x)	17,7	5,8	23,5	29,2	7,3	36,4
haloxyfop (10x)	18,1	6,7	24,7	30,3	7,3	37,5
chlorimuron (10x)	18,3	6,0	24,4	29,8	7,1	36,9
TESTEMUNHA	9,1	4,1	13,3	24,3	7,3	31,6
Pr F•	0,08	0,38	0,16	0,91	0,19	0,81
CV (%)	19,7	22,5	18,6	18,2	24,5	18,1

¹ Valores seguidos das mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

A diferença do relatado para o N inorgânico total, a contribuição relativa das formas N-NO_3 e N-NH_4 não resultou o esperável. Os valores de N-NO_3 foram expressivamente baixos em comparação com os determinados para N-NH_4 .

Entretanto, observa-se na Tabela 10, que não se detectaram diferenças entre a testemunha e os tratamentos herbicidas para nenhuma das duas variáveis. Inclusive a relação $\text{N-NO}_3/\text{N-NH}_4$, também analisada estatisticamente, foi não significativa ($\text{Pr.F}=0.13$ e $\text{Pr.F}=0.14$ para a avaliação aos oito e 28 dias, respectivamente).

Este último resultado estaria indicando que a limitação na nitrificação demonstrada pela baixa relação $\text{N-NO}_3/\text{N-NH}_4$, não teria associação com a aplicação dos herbicidas. Mesmo que as bactérias quimioautotróficas, Gram-negativas, responsáveis pela oxidação do amônio a nitrato tem mostrado alta sensibilidade frente a vários herbicidas, a generalização do efeito neste experimento assim como a similaridade do resultado com a testemunha indicaram que existiram condicionantes próprias ao experimento.

Muito possivelmente, nas condições do presente experimento, a nitrificação foi limitada pela combinação de vários fatores. Por uma parte, é possível que tenham existido carências na disponibilidade de oxigênio, como consequência direta de um consumo ativo ou indiretamente, resultado de uma excessiva umidade nos solos. Inclusive, o excesso de umidade afeta diretamente, podendo retardar expressivamente o processo da nitrificação. Também o baixo pH do solo pode ter constituído uma importante limitante. Os microrganismos responsáveis pela nitrificação são sensíveis a valores baixos de pH; a nitrificação é máxima em pH 6,6 a 8,0, mas, muito reduzida em pH menores a 6 e praticamente nula em menos que 4,5

4.2.4 Quantificação de microrganismos

As contagens de microrganismos realizadas aos oito dias e no final do período de incubação, aos 28 dias, apresentam-se nas Tabelas 11 e 12.

Como se observa nas tabelas mencionadas, em nenhum dos grupos avaliados, fungos, microrganismos proteolíticos, amilolíticos ou celulolíticos, observou-se grande

variação nas quantidades entre os oito e 28 dias. Os valores nas testemunhas mostram contribuições similares dos grupos em ambas as datas, sendo o grupo dos celulolíticos o menos abundante.

Esta apreciação foi corroborada pela análise estatística nos casos dos fungos e do grupo dos celulolíticos, nos quais tanto o efeito dias como o correspondente a interação dias x tratamento foram não significativos. Por tanto, é possível afirmar que os efeitos mantiveram-se os mesmos entre as duas avaliações.

No entanto, para o grupo dos microrganismos proteolíticos assim como para o dos amilolíticos, embora não resultando significativo o efeito da data de avaliação (dias), detectou-se efeito da interação tratamento x dias.

Houve efeito de tratamento em todos os grupos e pode-se notar que com uma única exceção; com independência do grupo analisado e dos tratamentos responsáveis do efeito, a variação observada se correspondeu com incrementos nas quantidades de microrganismos.

A interação dia x tratamento tem igual explicação nos proteolíticos e nos amilolíticos (Tabela 11). Em ambos os grupos funcionais as densidades dos microrganismos variaram com os tratamentos aos oito dias e não se diferenciaram aos 28 dias resultando, em todos os herbicidas, similares a testemunha.

Quanto à determinação aos oito dias nos proteolíticos, o único herbicida diferindo da testemunha foi o bentazon (2x). Não entanto, os valores das médias para a maior dose de bentazon e para metolachlor nas duas doses, que resultaram intermédias sem diferir da testemunha nem do bentazon (2x) destacam, também para estes tratamentos, uma tendência a maiores números de microrganismos.

O efeito observado de aumento nas populações foi transitório. Nos tratamentos com bentazon nas duas doses, e também no metolachlor nas duas doses, constaram-se decréscimos significativos nas densidades dos oito aos 28 dias resultando os valores, nesta data, similares ao avaliados na testemunha.

Tabela 11. Quantidades de microrganismos dos grupos funcionais proteolíticos e amilolíticos. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

TRATAMENTO	log UFC g ⁻¹ de solo			
	PROTEOLITICOS		AMILOLITICOS	
	8 DIAS	28 DIAS	8 DIAS	28 DIAS
bentazon (2x)	6,85 A	6,05 A	6,33 A	5,75 A
metolachlor (2x)	6,50 AB	5,52 A	5,48 C	5,78 A
trifluralina (2x)	5,75 B	5,73 A	5,97 B	5,75 A
imazethapyr (2x)	6,41 AB	6,05 A	5,56 BC	5,87 A
imaz+lactofen (2x)	5,37 B	5,97 A	5,80 BC	5,64 A
glyphosate (2x)	5,37 B	5,48 A	5,43 C	5,70 A
haloxyfop (2x)	5,56 B	5,95 A	5,67 BC	5,52 A
chlorimuron (2x)	5,52 B	5,88 A	5,95 B	5,56 A
bentazon (10x)	6,58 AB	5,85 A	5,67 BC	6,00 A
metolachlor (10x)	6,58 AB	5,56 A	6,17 A	5,75 A
trifluralina (10x)	5,70 AB	5,87 A	5,80 BC	5,90 A
imazethapyr (10x)	5,73 B	5,70 A	5,64 BC	5,67 A
imaz+lactofen (10x)	5,52 B	5,73 A	5,97 B	5,80 A
glyphosate (10x)	5,56 B	5,92 A	5,82 BC	5,82 A
haloxyfop (10x)	5,70 B	5,95 A	5,88 BC	5,73 A
chlorimuron (10x)	5,43 B	5,87 A	5,88 BC	5,67 A
TESTEMUNHA	5,12 B	5,64 A	5,43 C	5,48 A

¹ Valores seguidos das mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O aumento inicial das populações dos microrganismos após a aplicação de herbicidas é freqüente (Kunc et al., 1985). A microbiota mineraliza temporariamente os herbicidas utilizando-os como fonte de energia o qual permite o aumento da população. Em geral estes incrementos iniciais são seguidos de decréscimos. Em ocasiões as populações microbianas embora resultando tolerantes aos herbicidas aplicados são susceptíveis aos produtos resultantes da interação solo-herbicida liberados posteriormente (Taiwo & Oso, 1997)

Segundo Huber & Otto (1994) o bentazon é, em geral, rapidamente degradado e seus metabólitos adsorvidos imediatamente em solo. Isto poderia ser a explicação do aumento inicial observado neste tratamento assim como da inexistência de efeitos posteriores

O número de tratamentos diferindo da testemunha no caso dos amilolíticos foi maior. Além do bentazon (2x) e do metolachlor nas duas doses, também o trifluralin, o chlorimuron-ethyl e a mistura de imazethapyr+lactofen apresentaram quantidades de microrganismos superiores a da testemunha. Ressaltou o fato de não se ter comprovado efeitos com a dose 10 x de bentazon.

Ao igual que acontecera com os proteolíticos, detectaram-se decréscimos significativos no número de unidades formadoras de colônias entre a primeira e a segunda avaliação no tratamento de bentazon a dose 2x e do metolachlor a dose 10x. Nos restantes tratamentos diferindo da testemunha, também se verificou uma diminuição nos valores das médias entre as avaliações, o qual, embora não sendo significativo, pode explicar a diferenciação com a testemunha, que apresentara praticamente iguais valores médios nas duas avaliações.

Para as avaliações de fungos e o grupo dos celulolíticos, como se antecipara o efeito dos tratamentos sobre os microrganismos foi similar tanto aos oito como aos 28 dias. Por tanto é possível considerar que os efeitos nestes grupos foram de mais permanência que os observados nos proteolíticos e amilolíticos.

Pela Tabela 12 observa-se que também o grupo dos celulolíticos incrementou com o bentazon e o metolachlor. Soma-se com igual efeito o imazethapyr+lactofen, para o qual já se tinha observado comportamento similar nos amilolíticos, e o haloxyfop-methyl pela primeira vez.

Nas avaliações dos fungos detectou-se o único resultado de diminuição na densidade nestas avaliações. O metolachlor na dose de 10x proporcionou uma redução significativa do número de unidades formadoras de colônias em relação à testemunha.

Tabela 12. Quantidades de microrganismos dos grupos funcionais celulolíticos e fungos. FCAV/UNESP – Jaboticabal/SP, 2004.

TRATAMENTO	log UFC g ⁻¹ de solo					
	CELULOLITICOS			FUNGOS		
	8 DIAS	28 DIAS	MEDIA	8 DIAS	28 DIAS	MEDIA
bentazon (2x)	5,85	5,90	5,87 AB	6,43	6,80	6,61 B
metolachlor (2x)	5,22	4,82	5,02 D	6,37	5,82	6,10 C
trifluralina (2x)	5,22	5,12	5,17 D	6,12	6,37	6,25 C
imazethapyr (2x)	5,00	5,12	5,06 D	6,30	6,22	6,26 C
imaz+lactofen (2x)	5,12	5,48	5,30 CD	6,43	6,43	6,43 BC
glyphosate (2x)	4,82	5,52	5,17 D	6,12	6,30	6,21 C
haloxyfop (2x)	5,70	5,37	5,53 BCD	6,22	5,82	6,02 C
chlorimuron (2x)	5,22	5,52	5,37 CD	6,43	6,22	6,32 BC
bentazon (10x)	5,99	5,97	5,98 A	6,94	7,01	6,98 A
metolachlor (10x)	5,80	5,60	5,70 ABC	5,52	6,12	5,82 D
trifluralina (10x)	5,43	5,52	5,47 CD	6,30	6,22	6,26 C
imazethapyr (10x)	4,52	5,30	4,91 D	6,00	6,37	6,18 C
imaz+lactofen (10x)	5,37	6,01	5,69 ABC	6,00	6,00	6,00 C
glyphosate (10x)	5,12	5,00	5,06 D	6,22	6,12	6,17 C
haloxyfop (10x)	5,67	5,78	5,72 ABC	6,00	6,22	6,11 C
chlorimuron (10x)	5,30	5,43	5,36 CD	6,00	6,30	6,15 C
TESTEMUNHA	5,00	5,12	5,06 D	5,82	6,22	6,02 C

¹ Valores seguidos das mesmas letras nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade

O outro tratamento diferindo da testemunha foi o bentazon, que neste caso apresentara, inclusive, efeito da dose, determinando incrementos de maior magnitude em relação à testemunha, a 10 x que a 2 x.

Estes resultados para o bentazon incrementando as populações de fungos são coincidentes com os obtidos por outros autores (Marsh et al. 1978). No entanto, as pesquisas destes mesmos autores também comprovaram reduções significativas de microrganismos celulolíticos. As reduções foram observadas com baixas concentrações de bentazon, aproximadas a dose de 2 x utilizada no presente estudo, que resultara em significativos incrementos.

Os estudos de correlação não detectaram nenhuma associação entre estes resultados de quantidade de microrganismos e os indicadores de atividade microbiana (respiração, atividade da desidrogenase e hidrólise de FDA).

Como se apresentara anteriormente, excetuando a diminuição provocada pelo metolachlor a dose 10 x, os efeitos detectados foram todos de promoção do número de microrganismos. Na avaliação da respiração basal não foram determinados incrementos significativos em relação à testemunha e, na quantificação da desidrogenase os tratamentos nos quais foram determinadas promoções da atividade (metolachlor e imazethapyr na dose de 2x e glyphosate a dose 10 x, aos oito dias) não coincidem com os que determinaram incrementos no número de microrganismos. Pode-se inferir, por tanto, que não existiu nenhuma associação entre a atividade microbiana e as quantidades dos microorganismos avaliados.

Ressalta-se que os herbicidas que afetaram a densidade dos microrganismos (bentazon, metolachlor, imazethayr + lactofen e haloxyfop-methyl) foram os mesmos que determinaram alterações na respiração basal ou a desidrogenase, em alguma das avaliações.

Com as determinações realizadas no presente experimento não foi possível encontrar uma explicação para os resultados. Os incrementos podem ser devidos a promoção de microrganismos com capacidade de aproveitar os herbicidas ou seus metabólitos como fonte de carbono, energia e nutrientes. Mas não se pode excluir a possibilidade de que estes microrganismos que proliferaram sejam sobreviventes, utilizando resíduos dos herbicidas ou inclusive material celular de outros microrganismos mortos. De uma forma ou outra se destaca que estes aumentos não foram detectados nas determinações de respiração basal.

Tampouco é possível inferir sobre o impacto das mudanças observadas, à medida que se desconhecem aspectos de importância, tais como a permanência dos efeitos e a real transcendência dos mesmos. No entanto, se corroboram algumas afirmações gerais, como a sensibilidade dos parâmetros que estimam diversidade.

5. CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos e nas condições em que se desenvolveu a presente pesquisa, conclui-se que:

- Quanto a determinações de atividade da microbiota, a respiração basal e a atividade da desidrogenase apresentaram maior sensibilidade na detecção de efeitos dos herbicidas sobre a microbiota do solo que as determinações da hidrólise de FDA ou mineralização de nitrogênio.
- Todos os herbicidas na dose 10 x, exceto imazethapyr, apresentaram efeitos de inibição da atividade microbiana afetando a respiração ou a atividade da desidrogenase.
- Na menor dose (2 x) detectaram-se efeitos de inibição da atividade em bentazon, metolachlor, haloxyfop-methyl e trifluralin.
- As avaliações de diversidade microbiana também apresentaram importante sensibilidade na detecção de efeitos dos herbicidas e resultaram em incrementos nas populações de todos os grupos microbianos determinados a exceção da diminuição provocada pelo metolachlor em dose de 10 x nos fungos.
- Os efeitos nas densidades dos microrganismos proteolíticos e amilolíticos foram iniciais e transitórios. No entanto, as mudanças promovidas por bentazon e metolachlor; bentazon, metolachlor, imazethapyr+lactofen e haloxyfop-methyl; nas populações de fungos e celulolíticos, respectivamente, prolongaram-se até o final do período experimental.
- Só encontrou-se correlação significativa entre a atividade da desidrogenase e a respiração basal aos oito dias de incubação.

- Os resultados destacam a importância da consideração de múltiplos indicadores na avaliação dos efeitos de herbicidas na microbiota do solo.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 943-951, 2001.

ALEF, K. **Biological soil reclamation**. Weinheim: VCH, 1995. 269 p.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic, 1995. 576 p.

ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science**, v. 211, p. 132- 138, 1981.

ALLIEVI, L. et al. Influence of the herbicide bentazon on soil microbial community. **Microbiology Research**, v. 151, n. 1, p 105- 111, 1996.

AMANN, R.; LUDWIG, W.; SCHLEIFER, K.H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, p.143-149, 1995.

ANDERSON, J. P. E.; DOMSCH, K. H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.10, p.215-221, 1978.

ANDRÉA, M. M.; HOLLWEG, M. J. Comparação de métodos para determinação de biomassa microbiana em dois solos. **Revista Brasileira Ciência do Solo**, Viçosa, v.28, p.981-986, 2004.

ANDRÉA, M. M.; PERES, T.B.; MATALLO, M.B. Effect of the herbicide haloxifop-methyl on some soil biological parameters. In: INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, 3, 2000. Foz do Iguaçu, Brasil. **Proceedings...** Foz do Iguaçu, Brasil. 1 CD-ROM.

ANDRÉA, M. M.; PETTINELLI Jr, A. Efeito de aplicações de pesticidas sobre a biomassa e a respiração de microrganismos de solos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 67, n. 2, p. 223- 228, 2000.

ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, Oxford, v.52, p. 799-804, 2003.

BEARE, M. H. et al. A hierarchical approach to evaluating the significance of soil biodiversity to biogeochemical cycling. **Plant Soil**, Dordrech, v. 170, p. 5- 22, 1995.

BOLLAG, J.M. Microbial transformation of pesticides. **Advance Applied Microbiology**, San Diego, v. 18, p. 75- 130, 1974.

BRIGATTO ALBINO, U ; ANDRADE, G. Evaluation of the functional group of microorganisms as bioindicator on the rhizosphere microcosm. In: M.K. Rai (Ed.). **Handbook of microbial biofertilizers**. Food Products Press, New York. 2006. p. 29-50

BROMILOW, R. H. et al. The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years. **Pesticide Science**, Oxford, v. 48, p. 63-72, 1996.

BROOKES, P. C. The use of microbial parameters in monitoring soil pollution by heavy metals. **Biological Fertility Soils**, Berlin, v. 19, p. 269- 279, 1995.

BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v.14, p.423-427, 1982.

BUSSE, M. D. et al. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1777-1789, 2001.

CANTARELLA, H.; TRIVELIN, P.C.O. Determinação de nitrogênio inorgânico em solo pelo método da destilação a vapor. In: RAIJ, B. et al.(Ed.). **Análises químicas para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: IAC/FUNDAG, 2001, p. 270-627.

CARTER, M. R. Influence of reduced tillage systems on organic matter, microbial biomass, macro-aggregate distribution and structural stability of surface soil in a humid climate. **Soil Tillage and Research**, Washington, v. 23, p. 361-372, 1992.

CASIDA, L. E.; KLEIN, D. A.; SANTORO, T. Soil Dehydrogenase activity. **Soil Science**, Baltimore, v. 98, p. 371- 376, 1964,

CERNAKOVA, M.; KURUCOVA, M.; FUCHSOVA, D. Effect of the herbicide Bentanex on soil microorganisms and their activity. **Folia Microbiological**, Praha, v. 36, p. 561-566, 1991.

CHAKRAVARTY, P.; SIDHU, S.S. Effects of glyphosate, hexazinone and triclopyr on in vitro growth of five species of ectomycorrhizal fungi. **European Journal of Forest Pathology**, v.17, p. 204-210, 1987.

CORK, D. J.; KRUEGER, J. P. Microbial transformations of herbicides and pesticides. **Advances in applied Microbiology**, New York, v. 36, p.1-6, 1991.

COSTA, M. P. Efeito da matéria orgânica em alguns atributos do solo. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 137 p. 1983.

DEGENS, B. P.; HARRIS, J. A. Development of a physiological approach to measuring the catabolic diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 29, p.1309-1320, 1997.

DEGENS, B.P. et al. Decreases in organic C reserves in soils can reduce the catabolic diversity of soil microbial communities. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 32, p.189-196, 2000.

DICK, R. P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 40, p. 25- 36, 1992,

EDWARDS, C. A. Impact of herbicides on soil ecosystems. **Critical Reviews in Plant Science**, Boca Raton, v. 8, p. 221-257, 1989.

GARCÍA, C.; HERNANDEZ, T.; COSTA, F. Microbial activity in soils under mediterranean environmental conditions. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 26, p. 1185-1191, 1994.

GILLER, K. E. et al. Agricultural intensification, soil biodiversity and agroecosystem function. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 6, p. 3-16, 1997.

GROSSBARD, E.; DAVIES, H. A. Specific microbial responses to herbicides. **Weed Research**, Oxford, v. 16, p. 163-170, 1976.

GUERIN, W. F.; BOYD, S. A. Bioavailability of sorbed naphthalene to bacteria: influence of contaminant aging and soil organic carbon content. In: Linn, D. L. et al., eds. **Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil**. Madison, WI: American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. 1993. p. 197-208.

HANEY, R. L. et al. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, Champaign, v. 48, p. 89-93, 2000.

HART, M. R.; BROOKES, P.C. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1641-1649, 1996.

HOFMAN, J. Research of the soil microorganisms at the biomass-, process-, and community- levels. 2003. Disponível em: <<http://recetox.muni.cz>>. Acesso em abril 2006.

HUBER, R.; OTTO, S. Environmental behavior of bentazon herbicide. **Review Environmental Contamination Toxicology**, v. 137, p. 111-134, 1994.

INSTITUTO BRASILEIRO DE MEIO AMBIENTE E RECURSOS RENOVÁVEIS. **Manual de testes para avaliação de ecotoxicidade de agentes químicos**. 2.ed. Brasília: IBAMA, 1990. 351p.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. A method for measuring soil biomass. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 8, p. 209-213, 1976.

KELLEY, W.D.; SOUTH, D. B. In vitro effects of selected herbicides on growth and mycorrhizal fungi. **Weed Science Society of America Meeting**. Auburn, Alabama. p. 38, 1978.

KILLHAM, K. A physiological determination of the impact of environmental stress on the activity of microbial biomass. **Environmental Pollution**, London, v. 38, p. 283- 294, 1985.

KINNEY, C. A.; MANDERNACK, K. W.; MOSIER, A. R. Laboratory investigations into the effects of the pesticides mancozeb, chlorothalonil, and prosulfuron on nitrous oxide and nitric oxide production in fertilized soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 837-850, 2005.

KUNCB, F., TICHY, P., VANCURA, V. 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in the soil: mineralization and changes in the counts of bacteria decomposers. Versailles Ed. INRA Publ. **Les Colloques de l'INRA**, No. 31. pp 15, 1985.

LEHR, S.; SCHEUNERT, I.; BEESE, F. Mineralization of free and cell-wall-borne isoproturon in soils in relation to soil microbial parameters. **Soil Biological and Biochemistry**, Oxford, v. 28, p. 1-8, 1996.

MARSH, J. A. P. et al. Simultaneous assessment of various responses of the soil microflora to bentazone. **Weed Research**, Oxford, v. 18, p. 293, 1978.

MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In-. MELO, I.S. de; SILVA, C.M.M.S. de; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna-SP: Embrapa Meio Ambiente , 2001. v. 1, p. 1- 14.

MOORMAN, J. B., A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility. **Journal of Production Agriculture**, Madison, v. 21, p. 14-23, 1989.

MOORMAN, J.B. Production of hydrobenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, p. 289-291, 1992.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. Xenobióticos no Solo. In: MOREIRA, F. M. S.; SIQUIERA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras: Editora UFLA, 2002. p. 243-284

NANNIPIERI, P. et al. Microbial diversity and soil functions. **European Journal of Soil Science**, v. 54, p. 655-670, 2003.

NIEWIADOMSKA, A. Effect of Carbendazim, Imazetapir and Thiram on Nitrogenase Activity, the Number of Microorganisms in Soil and Yield of Red Clover (*Trifolium pratense* L.). **Polish Journal of Environmental Studies**. v. 13, n. 4, p. 403- 410, 2004.

NSABIMANA, D.; HAYNES, R. J.; WALLIS, F. M. Size, activity and catabolic diversity of the soil microbial biomasa as affected by land use. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 26, p. 81- 92, 2004.

OECD: Draft Document for Guideline for Testing of Chemicals No. 217. Soil microorganisms: Carbontransformation test. OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD 1999a.

OECD : Draft Document for Guideline for Testing of Chemicals No. 216. Soil microorganisms:Nitrogen transformation test. OECD guidelines for the testing of chemicals. OECD. 1999b.

PAUL, E.A.; CLARK, F.E. (Eds.) **Soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1996. 340 p.

PERES, T. B.; ANDRÉA, M. M.; LUCHINI, L. C. Agrotóxicos usados na cultura do algodão: efeito na atividade das enzimas desidrogenase e arilsulfatase do solo. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 363- 369, 2004.

PERUCCI, P. et al. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 32, n. 1, p. 17- 23, 2000.

POWLSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSEN, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 19, p. 159-164, 1987.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5.ed. Londrina: Edição dos autores, p. 484-490, 2005.

ROYUELA, M., GONZALEZ, A., ARRESE-IGOR, C., APARICIO-TEJO, P.M., GONZALEZ-MURUA, C. Imazethapyr inhibition of acetolactate synthase in *Rhizobium* and its symbiosis with pea. **Pesticide Science**, v. 52, p.372-380, 1999.

SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. **Chemosphere**, Oxford, v. 45, p. 417-425, 2001.

SANTOS, J. B. et al. Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. **Weed Research**, Oxford, v. 46, p. 284- 289, 2006.

SCHLOTER, M.; DILLI, O.; MUNCHA. J. C. Indicators for evaluating soil quality **Agriculture, Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 98, p. 255–262, 2003.

SCHNÜRER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein Diacetate Hydrolysis as a Measure of Total Microbial Activity in Soil and Litter. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v. 43, p. 1256–1261. 1982.

SCHUSTER, E.; SCHRÖDER, D. Side-effects of sequentially-applied pesticides on non-target soil microorganisms: field experiments. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 22, p. 375-383, 1990.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Efeito dos fungicidas metalaxil e fenarimol na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e meio ambiente**, Curitiba, v. 15, p. 93- 104, 2005.

SILVEIRA, R. B.; MELLONI, R.; MELLONI, E. G. P. Atributos microbiológicos e bioquímicos como indicadores da recuperação de áreas degradadas, em Itajubá/MG. **Cerne**, Lavras, v. 12, n. 1, p. 48-55, 2006.

SPRANKLE, P. W.; MEGGITT, F.; PENNER, D. Adsorption, mobility, and microbial degradation of glyphosate in soil. **Weed Science**, Champaign, v. 23, p. 229- 234, 1975.

STRATTON, G.W.; STEWART, K.E. Glyphosate effects on microbial biomass in a coniferous forest soil. **Environmental Toxicology Water Quality**, v.17, p. 223–236, 1992.



SWISHER, R.; CARROLL, G.C. Fluorescein diacetate hydrolysis as an estimator of microbial biomass on coniferous needle surfaces. **Microbial Ecology**, v. 6, p. 217- 226, 1980.

TAIWO. L.B., OSO, B.A . The Influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P-release under laboratory conditions. **Agric.Ecosystem & Environ.** , v. 65, p. 59-68, 1997

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 9, p. 703-707, 1987.

van BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. **Chemosphere**, Oxford, v. 34, p. 455-499, 1997

WAIWRIGHT, M. A review of the effect of pesticides on microbial activity in soil, **Journal Soil Science**, Oxford, v. 29, p. 287-298, 1978.

WARDLE, D. A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: A global-scale synthesis. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 30, p. 1627- 1637, 1998.

WARDLE, D. A.; NICHOLSON, K. S.; RAHMAN, A. Influence of herbicide applications on the decomposition, microbial biomass, and microbial activity of pasture shoot and root litter. **New Zealand Journal of Agricultural Research**, Wellington, v. 37, p. 29-39, 1994.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant Soil**, Netherlands, v. 122, p.21–28, 1990.

WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Relative importance of the effects of 2,4-D, glyphosate and environmental variables on the soil microbial biomass. **Plant Soil**, Netherlands, v. 134, p. 209-219, 1991.

ZELLES, L. Fatty acid patterns of microbial phospholipids and lipopolysaccharides. In: SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; KANDELER, E.; MARGESIN, R. (Eds.), **Methods in Soil Biology**. Springer, Berlin, p. 80-93, 1996.

