

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE ENGENHARIA

CÂMPUS DE ILHA SOLTEIRA

EDIVALDO WILSON DE LIMA

**METABOLISMO MICROBIANO DE ISOLADOS DE SOLOS CULTIVADOS COM
CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE TEBUTHIURON**

Ilha Solteira

2020

EDIVALDO WILSON DE LIMA

**METABOLISMO MICROBIANO DE ISOLADOS DE SOLOS CULTIVADOS COM
CANA-DE-AÇÚCAR NA PRESENÇA DE TEBUTHIURON**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia – FEIS – UNESP – Câmpus de Ilha
Solteira, como parte dos requisitos para obtenção
do título de Mestre em Agronomia.

Prof. Dr. Paulo Renato Matos Lopes
Orientador

Ilha Solteira

2020

FICHA CATALOGRÁFICA

Desenvolvido pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

L732m Lima, Edivaldo Wilson de.
Metabolismo microbiano de isolados de solos cultivados com cana-de-açúcar na presença de tebuthiuron / Edivaldo Wilson de Lima. -- Ilha Solteira: [s.n.], 2020
51 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira. Especialidades: Sistema de Produção, 2020.

Orientador: Paulo Renato Matos Lopes
Inclui bibliografia

1. Respirometria. 2. Biodegradação. 3. Bioprospecção. 4. Herbicida. 5. Modelagem matemática.


Raiane da Silva Santos

Supervisora Técnica de Seção
Seção Técnica de Referência, Atendimento ao usuário e Documentação
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
CRB/8 - 9999



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Ilha Solteira

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Metabolismo microbiano de isolados de solos cultivados com cana-de-açúcar na presença de tebutiuron

AUTOR: EDIVALDO WILSON DE LIMA

ORIENTADOR: PAULO RENATO MATOS LOPES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em AGRONOMIA, área:
Sistemas de Produção pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. PAULO RENATO MATOS LOPES (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. LEANDRO TROPALDI (Participação Virtual)
Departamento de Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas de Dracena - UNESP

Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO (Participação Virtual)
Núcleo de Pesquisa em Ciências Ambientais / Centro Universitario da Fundação Herminio Ometto - FHO

Ilha Solteira, 17 de dezembro de 2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, por sua proteção e iluminação em cada momento de minha vida. Pela saúde minha e de minha família. E poder caminhar sempre sob sua proteção.

Também agradeço, pelo apoio de minha família, pela força, confiança e fé e ajuda ao longo de todo o período do mestrado. Sem o apoio da minha família, a minha mãe Maria José pela vida, pelo carinho e incentivo, meu pai Nivaldo que onde estiver olha por mim, minha querida irmã Elisângela, as minhas sobrinhas Eloise e Eloá, meu cunhado Maichi, minha sogra Lourdes e meu sogro Irineu pelo carinho e apoio gigante, minha madrinha Iraides pelo amor e orações. Agradeço a todos pelas preces e orações sem as quais eu não teria conseguido chegar a concretizar a primeira parte desta longa jornada. Muito obrigado a todos pelo incentivo.

Agradeço aos meus pais por nunca terem deixado de acreditar em mim, por nunca me deixarem desistir e por tudo terem feito para me apoiar no decorrer do meu percurso acadêmico. Não há palavras que descrevam tamanha minha gratidão a todos vocês.

A minha doce esposa Nayara que é meu apoio, meu norte, sempre ao meu lado, minha filha Giovana que é o presente de Deus em nossas vidas, a sua existência é a minha maior motivação para persistir sempre.

As minhas grandes amigas Débora e Vanessa que sempre caminharam comigo em pensamentos, lembranças, exemplos de persistência, determinação e incentivo incondicional em cada fase de nossas histórias.

A Dona Cleuza, exemplo de mãe, mulher, ser humano inspirador, presente nessa trajetória de muitos anos, nos momentos mais difíceis foi apoio, para o meu caminhar e de muitos outros amigos que assim o fizeram. Sou eternamente grato por me sentir parte desta família linda.

As pessoas valorosas que conheci em Dracena e em Ilha Solteira, em especial a todos os alunos da pós, aos amigos do GAIA, em especial, Bruno Brunaldi, Laura, Munick, Thalia e meus amigos parceiros de caminhada Yanca minha hermanita, Bruninho parceiro das idas e vindas de Ilha Solteira, na realização das disciplinas e do grande apoio.

Ao Bruno Pinheiro Brunaldi, companheiro de GAIA e de pesquisa, que colaborou imensamente com os dados de bioprospecção e de forma ativa em minha pesquisa.

Ao Bruninho, pequeno na estatura, mas gigante no conhecimento. Pela ajuda na estatística e orientação na modelagem matemática.

Aos amigos da pós graduação que contribuíram ao me auxiliarem na condução de meu experimento em especial ao Bruninho, Tati, Chagas, Matheus Maceió, meu muito obrigado.

Agradeço imensamente ao meu orientador Paulo Lopes. Tive o grande prazer e honra de ser seu orientando. Professor Paulo, em suas orientações e direcionamentos, sempre com paciência e compreensão pude aprender um pouco do seu vasto conhecimento. Com o coração repleto de muita gratidão, devo esta conquista, em grande parte ao seu apoio incondicional. De coração, muitíssimo obrigado.

Ao professor Reges Heinrichs, por ter permitido a utilização dos equipamentos e do laboratório para condução do experimento.

Aos técnicos Heloisa, Mirian, Andreia, Ariane, Lucas, Edison e demais técnicos por ter auxiliado durante a preparação e condução do experimento.

Ao professor Ronaldo Cintra, pela ajuda com os dados meteorológicos.

Ao professor Evandro pelo apoio em minha pesquisa.

À professora Carol Bonini e seu esposo professor Alfredo pelo incentivo e apoio em buscar a conquista de um sonho antes inatingível.

Aos professores Matheus Mantuanelli Roberto e Ronaldo Viana, pela imensa contribuição com seus conhecimentos na minha qualificação. Todas as informações foram de grande relevância para o resultado final dessa dissertação.

Aos professores Matheus Mantuanelli Roberto e Leandro Tropaldi, por terem aceitado esse convite em participar da minha banca de defesa de mestrado, e contribuir grandemente com essa pesquisa. Desde já, meu muito obrigado.

Por fim, agradeço a Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Unesp, campus Dracena por ter sido o local que permitiu a excelente execução do meu experimento e todos os professores, funcionários e colegas que de alguma maneira contribuíram com essa pesquisa. Muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos sempre depois de cada queda.” Oliver Goldsmith.

RESUMO

A cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), devido a sua produção em larga escala, necessita da aplicação de produtos químicos para o controle de plantas daninhas. Assim, é comum o uso de herbicidas principalmente pela sua eficiência e baixo custo. Neste sentido, o tebuthiuron é um dos herbicidas mais usados no cultivo da cana-de-açúcar no país. Embora os pesticidas possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o risco potencial desses compostos químicos no ambiente, o que tem despertado o interesse científico para sua degradação e seu comportamento ambiental junto aos compostos relacionados. Em vista dos efeitos adversos da sua utilização, como toxicidade para espécies não-alvo e produção de compostos intermediários no ambiente, ele tem chamado a atenção para melhor compreensão da persistência no ambiente e no desenvolvimento de métodos eficientes de descontaminação. Logo, o presente trabalho propôs compreender a ação de isolados microbianos de dois sistemas de cultivos na biodegradação do herbicida tebuthiuron. Primeiramente, foram isoladas linhagens potencialmente biodegradadoras de tebuthiuron a partir de amostras de solo em área cultivada com cana-de-açúcar em sistema convencional (ICV) e de cultivo mínimo (ICM). Assim, ensaios respirométricos foram conduzidos com solo associado a três doses do herbicida (ausência, 0,5T e 1,0T) e a quatro inóculos microbianos (ausência, ICM, ICV e ICM-ICV). O experimento foi conduzido por 91 dias, sendo os resultados analisados estatisticamente e elaborados modelos matemáticos da cinética do metabolismo microbiano. Os resultados revelaram que as linhagens bioprospectadas foram capazes de degradar a molécula de tebuthiuron no solo. Na presença da maior concentração do herbicida, houve uma maior atividade microbiana na produção de CO₂. Os tratamentos que utilizaram os inóculos consorciados (ICV-ICM) apresentaram uma maior taxa respiratória quando presente a dose do herbicida recomendada no produto comercial. Além disso, o estudo cinético evidenciou o maior potencial de metabolismo do tebuthiuron pelos inóculos bioprospectados em solo de sistema convencional de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação de tebuthiuron. Vale ressaltar que as curvas de respiração microbiana ao longo do tempo ajustaram-se ao modelo de Gompertz que estimou a cinética de biodegradação do tebuthiuron sob ação dos diferentes inóculos microbianos. Neste sentido, o estudo destaca-se como o pioneiro na demonstração de modelos matemáticos adaptados à cinética de degradação microbiana do tebuthiuron.

Palavras chave: Respirometria. Biodegradação. Bioprospecção. Herbicida. Modelagem matemática.

ABSTRACT

Sugarcane (*Saccharum* spp.) large-scale production requires the application of chemicals to control weeds. Thus, it is common to use herbicides mainly for their efficiency and low cost. Tebuthiuron is one of the most widely used herbicides in sugarcane crops in Brazil. Although pesticides can have a beneficial effect on agricultural productivity, the potential risk of chemical components in the environment must be considered, which has aroused scientific interest for their degradation and environmental behavior with related compounds. About these adverse effects such as toxicity to non-target species and intermediate compounds generation, it has drawn attention to a better understanding of persistence in environment and the development of efficient decontamination methods. Therefore, the present research proposed comprises microbials action from two cultivation systems in the biodegradation of tebuthiuron. Firstly, potentially biodegradable tebuthiuron strains were isolated from soil samples in an area cultivated with sugarcane in conventional (ICV) and no-tillage (ICM) systems. Thus, respirometric tests were conducted with soil associated with three herbicide doses (zero, 0.5T and 1.0T) and four microbial inocula (absent, ICM, ICV and ICM-ICV). Experiment was performed for 91 days and results were analyzed statistically and also used in a mathematical modelling. Results revealed that bioprospected strains were able to degrade the tebuthiuron molecule in soil. In the presence of the highest herbicide concentration, there was a greater microbial activity in CO₂ production. Treatments that used the intercropped inoculants (ICV-ICM) presented a higher respiratory rate when present the recommended dose of the herbicide. Moreover, the kinetic study showed the greatest potential for metabolism of tebuthiuron by the bioprospecting inoculum in soil of sugarcane cultivation in conventional system with a history tebuthiuron application (ICV). Furthermore, microbial respiration curves over time adjusted to the Gompertz model that estimated the tebuthiuron biodegradation kinetics under the action of different microbial inoculums. Therefore, this study stands out as the pioneer in demonstrating mathematical models adapted to the tebuthiuron microbial degradation kinetics.

Keywords: Respirometry. Biodegradation. Bioprospecting. Herbicide. Mathematical Modeling.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular do herbicida tebuthiuron.....	19
Figura 2 - Variáveis climáticas do ano de 2019 na região de Dracena-SP.....	22
Figura 3 - Constatação do crescimento microbiano em meio CN-T. Direita: meio estéril. Esquerda: com inoculação da amostra após 9 dias e com mais três dias de incubação.....	30
Figura 4 - Placas de Petri com crescimento de linhagens microbianas após o cultivo de bioprospecção. Sistema de cultivo mínimo (a, b, c) e Sistema convencional (d, e, f)	31
Figura 5 - Produção diária de CO ₂ durante 91 dias de biodegradação.....	32
Figura 6 - Produção média diária de CO ₂ após 91 dias de biodegradação.....	33
Figura 7 - Produção acumulada de CO ₂ durante 91 dias de biodegradação.....	35
Figura 8 - Modelo de Gompertz na produção de CO ₂ a partir do metabolismo microbiano...	39
Figura 9 - Traçado 2D de contorno difuso para a variabilidade espacial da produção de CO ₂ a partir do metabolismo microbiano do tebuthiuron.....	42
Figura 10 - Diagramas de Pareto em relação à produção de CO ₂ quanto à origem dos inóculos microbianos: ICM–cultivo mínimo e ICV–cultivo convencional.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do solo para os ensaios respirométricos.....	25
Tabela 2 - Composição dos ensaios respirométricos de monitoramento da biodegradação microbiana do tebuthiuron com os isolados microbianos.....	27
Tabela 3 - Constatação do crescimento microbiano em meio CN-T. Direita: meio estéril. Esquerda: com inoculação da amostra após 9 dias e com mais três dias de incubação.....	37
Tabela 4 - Parâmetros e adequação do modelo Gompertz para a produção de CO ₂ a partir do metabolismo microbiano do tebuthiuron.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS

α	Assíntota superior ou máximo de geração de CO ₂
AIC	Critério de Informação de Akaike
β	Ponto de inflexão da curva de Gompertz
BIC	Critério de Informação Bayesian
CM	Sistema de cultivo mínimo
CV	Sistema de cultivo convencional
ICM	Inóculo isolado em sistema de cultivo mínimo
ICV	Inóculo isolado em sistema convencional
GCO _{2max} t	Tempo de pico da geração de CO ₂
κ	Taxa específica de geração de CO ₂
T	Tebuthiuron
T1	Controle (Ausência total de inóculos e doses de tebuthiuron)
R _{adj} ²	Coeficiente de determinação ajustado
UFC	unidade formadora de colônia
0,5T	Meia dose (12,5 mg L ⁻¹) do produto comercial Combine [®] 500 SC
1,0T	Uma dose (25 mg L ⁻¹) do produto comercial Combine [®] 500 SC

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	Cana-de-Açúcar	16
2.2	Impacto Ambiental de Herbicidas	16
2.3	Tebuthiuron	17
2.4	Biorremediação.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Geral	19
3.2	Específicos.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Coleta do Solo de Cultivo de Cana-de-açúcar.....	20
4.2	Herbicida Tebuthiuron.....	21
4.3	Meios de Cultura	21
4.3.1	Caldo nutriente e ágar nutriente	21
4.3.2	Meio mineral mínimo.....	22
4.4	Isolamento de Potenciais Cepas Biodegradadoras	22
4.4.1	Verificação do crescimento microbiano na bioprospecção.....	22
4.5	Coleta de Solo para os Ensaio Respirométricos	23
4.6	Ensaio Respirométricos	24
4.6.1	Análise quantitativa da respirometria.....	25
4.7	Análise Estatística e Modelagem Matemática.....	26
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
5.1	Isolamento de Potenciais Cepas Biodegradadoras	28
5.2	Monitoramento da Atividade Microbiana - Biodegradação	29
5.2.1	Produção diária de CO ₂	29
5.2.2	Produção média diária de CO ₂	32
5.2.3	Produção acumulada de CO ₂	33
5.3	Análise Estatística e Modelagem Matemática.....	37
5.3.1	Modelo cinético de Gompertz.....	37

5.3.2 Variabilidade espacial na cinética de produção de CO ₂	40
6 CONCLUSÕES.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

A produção de cana-de-açúcar possui grande importância nacional devido à sua alta produtividade, com destaque nos setores energético e econômico. Nesta cultura, as plantas invasoras representam o maior fator biótico com capacidade de interferir negativamente na produtividade, pois competem pelos recursos disponíveis e elevam os custos de produção pelos tratos culturais (MACIEL *et al.*, 2008; BERGMANN, 2019).

Assim, visando uma alta produtividade em cultivos agrícolas o método químico é o mais empregado para o controle de plantas daninhas. Neste sentido, o Brasil é o líder do ranking da utilização de pesticidas, ressaltando sua utilização ao longo de todo ano para inúmeras culturas (NASCIMENTO, 2016).

O aumento na demanda global por alimentos intensificou o uso de herbicidas nas lavouras, o que promoveu o lançamento intensificado desses compostos no ambiente, cujo potencial de deslocamento no solo ocasiona impactos ambientais maiores. A contaminação das águas superficiais e subterrâneas pelos processos de lixiviação e percolação em áreas agrícolas maximiza o impacto ao meio ambiente e à saúde humana (MACIEL *et al.*, 2008).

Somado a isso, diversas transformações podem ocorrer quando pesticidas são lançados no meio ambiente. Esta série de reações pode modificar ou degradar partes da sua molécula e, desta forma, alterar sua estrutura química, e gerar outros compostos intermediários (AZANIA *et al.*, 2005). No processo de degradação, o resultado ideal seria originar compostos com menor efeito tóxico que a molécula original, mas em muitos casos os compostos gerados podem ter efeito ainda mais nocivo ao meio ambiente (VILLAVERDE *et al.*, 2017).

Dentre os herbicidas empregados na produção de cana-de-açúcar, destacam-se o tebuthiuron, a hexazinona, o diuron e a ametrina (BRASIL, 2020).

O tebuthiuron possui ação pré-emergente, que atua na fotossíntese ao interromper o transporte de elétrons no fotossistema II nas plantas. Assim, o modo de ação é pela inibição da fotossíntese, se ligando ao sítio de ligação da plastoquinona QB, e proteína D1 do fotossistema II. Há ainda nesse processo um bloqueio de transporte de elétrons, que resulta na paralisação da fixação de CO₂ e produção de ATP e NADHP₂, elementos fundamentais para a sobrevivência da planta. Desta forma, é induzida a morte da planta invasora (BRASIL, 2020; WANG *et al.*, 2019; OLIVEIRA JR. *et al.*, 2011). Sua molécula (N-t5-(1,1-dimetiletil) -1,3,4-tiadazol-2-il-N, N-dimetilureia) pertence ao grupo das ureias substituídas, sendo seletivo e de ação sistêmica (MORTON; HOFFMAN, 1976; BRASIL, 2020). Possui alta solubilidade em água e, portanto, torna-se altamente persistente no solo e em águas superficiais e subterrâneas o que ocasiona uma elevada toxicidade ambiental. Esta molécula está registrada sob registro

nº 00718701, sendo classificada como classe II (BRASIL, 2020). Desta forma, pelas suas características químicas, meia vida alta e ser largamente utilizado, o tebuthiuron representa um dos principais contaminantes em áreas agrícolas. Sua meia vida é de 15 meses (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011), em outros estudos pode-se encontrar resíduos após 24 meses ou mais, posterior a sua aplicação (HUSSAIN *et al.*, 2015; PRETE *et al.*, 2017; IBAMA, 2019).

Logo, a biorremediação apresenta-se como estratégia ecologicamente viável no tratamento de áreas impactadas com resíduos orgânicos, como os aplicados na lavoura de cana-de-açúcar. Seu principal fundamento baseia-se na aceleração dos processos biológicos de degradação, estimulando a ação de microrganismos sobre compostos orgânicos a fim de metabolizá-los em moléculas menos tóxicas (VILLAYERDE *et al.*, 2017; FRANCISCO; QUEIROZ, 2018).

Vários estudos já relataram o impacto do tebuthiuron residual em diferentes ecossistemas aquáticos e no entorno da área plantada com cana-de-açúcar (MICKELSON *et al.*, 2001; DONALD *et al.*, 2004; SIBER *et al.*, 2009; LEWIS *et al.*, 2012; FLORES *et al.*, 2013), assim como a sua bioacumulação nos organismos, impactando negativamente na biodiversidade de espécies vegetais e animais em diferentes ecossistemas (DAM *et al.*, 2004; SIBER *et al.*, 2009; WAN *et al.*, 2014; QIAO *et al.*, 2014). Assim, há prejuízo à saúde humana devido a ingestão de alimentos contaminados ou através do contato com contaminante (BOUWMAN *et al.*, 2012).

Diante do exposto, surge como alternativa a utilização de cepas de microrganismos bioprospectados com o intuito de diminuir os efeitos tóxicos deste herbicida. A microbiota natural do solo possui um alto potencial para degradar e transformar pesticidas em moléculas orgânicas menos tóxicas e/ou inertes (VILLAYERDE *et al.*, 2017). O modelo de remediação utilizando a própria capacidade do ambiente denomina-se atenuação natural. Logo, sua eficiência pode ser melhorada por técnicas que minimizam os efeitos negativos de moléculas poluentes (CARDOSO, 2016; MORILLO; VILLAYERDE, 2017).

Diferentes fatores podem interferir na taxa de metabolização de moléculas de interesse, como o substrato; a atividade de hidrólise enzimática dos microrganismos biodegradadores, os parâmetros físicos e químicos do solo; temperatura; entre outros (MARCATO; YABUKI; FONTANETTI, 2014). Na literatura científica, não há estudos específicos de microrganismos que possam degradar o tebuthiuron relacionados à cinética de mineralização do herbicida no solo in situ ou em laboratório.

Desta forma, relatar a produção de CO₂ a partir do metabolismo do tebuthiuron por isolados microbianos de solo com cultivo de cana-de-açúcar se faz importante para suprir essa lacuna de conhecimento. Assim, nesse estudo são fornecidos parâmetros e modelos matemáticos até então inexistentes para este herbicida, a fim de nortear futuramente investigações de bioprocessos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cana-de-Açúcar

A cana-de-açúcar está no grupo das gramíneas do gênero *Saccharum spp* e representa uma cultura perene introduzida no Brasil junto à colonização portuguesa. Atualmente, há um interesse crescente no desenvolvimento desta cultura pela alta produtividade em biomassa, energia, bioetanol e açúcar (GOLDEMBERG *et al.*, 2008; SPAROVEK *et al.*, 2009; WALTER *et al.*, 2011; ADAMI *et al.*, 2012).

Esta cultura representa um dos setores mais importantes da economia brasileira, sendo o país o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, gerando uma riqueza equivalente a US\$ 43 bilhões por ano, ou seja, cerca de 2,0% do PIB nacional. Em aproximadamente 8,5 milhões de hectares na safra 2019/20 foi cultivado cerca de 642,7 milhões de toneladas na produção nacional de cana-de-açúcar (CONAB, 2020).

O investimento em fontes energéticas com baixa demanda de carbono e o aumento pela busca por fontes de energia renováveis estimularam o mercado mundial de biocombustíveis, o que propiciou um significativo aumento na produção e no consumo no setor sucroenergético (CALDARELLI, 2018). Além disso, destaca-se seu impacto positivo na geração de empregos diretos e indiretos na cadeia produtiva, mas também de forma negativa no extenso uso de recursos naturais e geração dos resíduos agroindustriais (ASSAD, 2017; UNICA, 2019).

Neste contexto, o Brasil possui uma alta produtividade devido às condições favoráveis ao seu cultivo como área e características edafoclimáticas. No entanto, esses fatores ambientais favorecem também o desenvolvimento de uma alta diversidade de espécies daninhas, as quais interferem no desenvolvimento e produtividade da cultura da cana-de-açúcar (NASCIMENTO, 2016).

A diversidade nos fatores ecológicos proporciona base para o surgimento de uma grande variedade de espécies vegetais, as quais competem com as culturas por recursos como: água, luz e nutrientes (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2011). Consequentemente, as extensas áreas da lavoura canavieira devem ter um sistema eficiente de controle dessas espécies infestantes, o que é representado pela aplicação de herbicidas com ações pré- e pós-emergentes (MACIEL *et al.*, 2008; BERGMAN, 2019).

2.2 Impacto Ambiental de Herbicidas

O método químico é o mais utilizado para o controle de plantas daninhas visando uma alta produtividade em cultivos agrícolas. Neste sentido, o Brasil é o líder do ranking da

utilização de pesticidas, ressaltando sua utilização ao longo de todo ano para inúmeras culturas (NASCIMENTO, 2016).

Os herbicidas são substâncias que agem na germinação e/ou no desenvolvimento de plantas específicas e sua eficácia e seletividade neste controle estão relacionadas à intensidade em que ocorrem os processos de sorção, transformação e transporte (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2008).

O aumento na demanda global por alimentos intensificou o uso de herbicidas nas lavouras, o que promoveu o acúmulo desses compostos no ambiente, cujo potencial de deslocamento no solo ocasiona impactos ambientais maiores. A contaminação das águas superficiais e subterrâneas pelos processos lixiviação e percolação em áreas agrícolas maximiza o impacto destas substâncias ao meio ambiente e à saúde humana (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2008; MACIEL *et al.*, 2008).

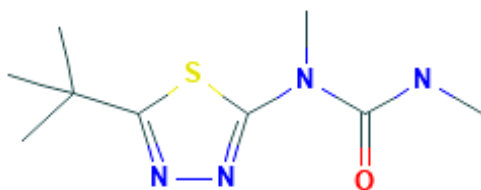
Somado a isso, diversas transformações ocorrem quando pesticidas são lançadas no meio ambiente. Esta série de reações pode modificar ou degradar partes da sua molécula e, desta forma, alterar sua estrutura química, gerando outros compostos intermediários (AZANIA *et al.*, 2005).

2.3 Tebuthiuron

Como grande produtor agrícola, o Brasil assume igualmente o papel de grande consumidor de pesticidas no mundo. Quanto aos pesticidas empregados na cana-de-açúcar destacam-se o tebuthiuron, a hexazinona, o diuron e a ametrina (BRASIL, 2020).

O tebuthiuron (N-t5-(1,1-dimetiletil)-1,3,4-thiadazol-2-yl-N,N-dimetilureia) pertence ao grupo das ureias substituídas, sendo seletivo e de ação sistêmica (BRASIL, 2020). Ele é altamente solúvel em água e, portanto, torna-se altamente persistente no solo e em águas superficiais e subterrâneas. Sua molécula (Figura 10) pertence à Classe II, sendo considerado perigoso ao meio ambiente (IBAMA, 2019), e apresenta elevada toxicidade e persistência no ambiente (PRETE *et al.*, 2017; FERREIRA, 2019).

Figura 1 – Estrutura molecular do herbicida tebuthiuron



Fonte: Pubchem (2018).

Pelas suas características e por ser amplamente utilizado, este herbicida representa um dos principais contaminantes em áreas agrícolas, uma vez que possui um tempo de meia vida muito alto, sendo possível encontrar resíduos por dois anos ou mais após sua aplicação (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011; HUSSAIN *et al.*, 2015).

2.4 Biorremediação

Como forma de remediar impactos ambientais pelas ações antrópicas, processos físicos, químicos e biológicos podem ser utilizados em diferentes formas de tratamento. Neste sentido, a biorremediação utiliza organismos vivos com capacidade de transformar ou eliminar compostos poluentes no meio e, assim, surge como uma importante alternativa econômica e ecologicamente viável para a descontaminação de áreas contaminadas (CORIOLANO; MORAIS FILHO, 2016).

Várias técnicas podem ser empregadas na biorremediação com o intuito de atenuar ou eliminar o efeito prejudicial dos contaminantes nos ecossistemas, tais como: biodegradação microbiana, vermicompostagem com minhocas e fitorremediação com espécies vegetais (MORILLO; VILLAYERDE, 2017).

A microbiota natural do solo possui um alto potencial de mineralizar transformar pesticidas em moléculas orgânicas menos tóxicas e/ou inertes (MORILLO; VILLAYERDE, 2017). O modelo de remediação utilizando a própria capacidade do ambiente denomina-se atenuação natural. Logo, sua eficiência pode ser melhorada por técnicas que minimizam ainda mais os efeitos negativos de moléculas poluentes (FASANELLA; CARDOSO, 2016; MORILLO; VILLAYERDE, 2017).

Porém, alguns compostos orgânicos, como os herbicidas, podem gerar compostos intermediários com toxicidade maior que a molécula original, quando submetidos à ação microbiana. Este processo maximiza o impacto ambiental e seus efeitos deletérios à biodiversidade, aumentando o potencial ecotoxicológico da contaminação (MORILLO; VILLAYERDE, 2017; ROCHA *et al.*, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a ação de isolados da microbiota natural de dois sistemas de cultivos, mínimo e convencional, na biodegradação do herbicida tebuthiuron.

3.2 Específicos

- Estudar a cinética de degradação do tebuthiuron por microrganismos bioprospectados de dois sistemas diferentes de produção canavieira; e
- Propor alternativas sustentáveis a partir de modelos matemáticos para a remediação de solo contaminado por tebuthiuron, utilizando-se isolados microbianos de área com o cultivo de cana-de-açúcar.

4 MATERIAL E MÉTODOS

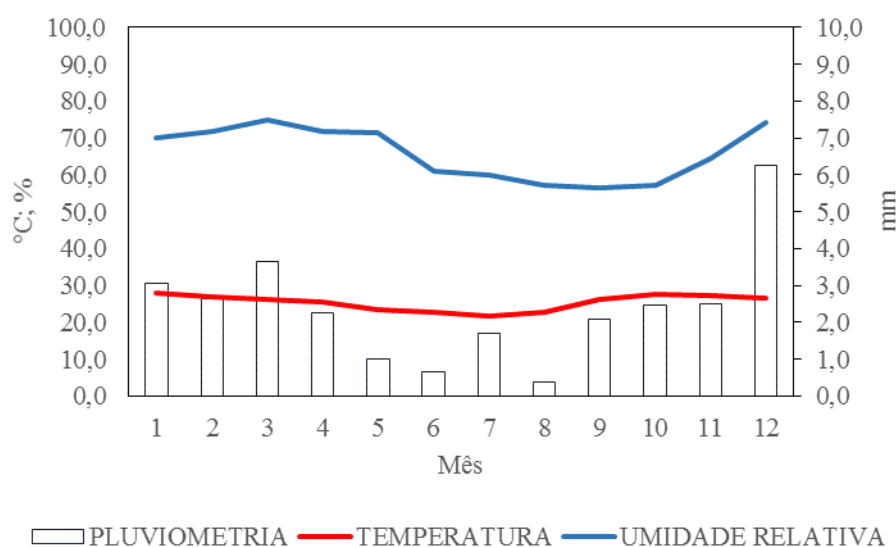
A pesquisa foi realizada na Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista, campus de Dracena. A primeira parte, envolvendo a coleta de amostras de solo para bioprospecção em dezembro de 2019, e na segunda, realizou-se as análises respirométricas na bioremediação do tebuthiuron, que ocorreram entre fevereiro e maio de 2020.

4.1 Coleta do Solo de Cultivo de Cana-de-açúcar

As amostras de solo para seleção de potenciais cepas biodegradadoras de tebuthiuron foram coletadas em dezembro de 2019 em duas áreas com histórico de aplicação deste herbicida, na região de Dracena-SP, e imediatamente encaminhadas à FCAT/Unesp, câmpus de Dracena.

O município de Dracena está sob as coordenadas 21°28'S e 51°31'O com altitude média de 400 m. O clima da região é classificado como do tipo Aw (tropical úmido), segundo Köppen (1948). As variáveis climáticas (pluviometria; temperatura e umidade relativa) da região de coleta estão representadas na Figura 2, obtidas a partir da estação meteorológica de Dracena EMA/FCAT.

Figura 2 - Variáveis climáticas do ano de 2019 na região de Dracena-SP.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com o intuito de obter isolados microbianos com potencial de biodegradação da molécula alvo, amostras de solo foram coletadas em áreas de plantios de cana-de-açúcar diferentes (mínimo e convencional), com histórico de aplicação do herbicida tebuthiuron.

A área de sistema convencional (ICV) estava com cana-planta (variedade 11459) e havia recebido a última aplicação de tebuthiuron na formulação do produto comercial (800 g i.a. kg⁻¹ de produto comercial) cinco meses antes da coleta, em área total de cultivo.

A área de cultivo mínimo (ICM) estava com cana-soca (variedade 11125) no seu terceiro corte. Esta cultura recebeu a última aplicação de tebuthiuron (800 g i.a. kg⁻¹ de produto comercial) em área total de cultivo um mês antes da coleta. Ressalta-se que, além do herbicida, havia também histórico de aplicação de vinhaça via canhão por fertirrigação.

A coleta foi realizada no dia 02/12/2019 nas duas áreas de estudo. Previamente à coleta foram removidas, restos de palhada e outros detritos presentes na área. Em seguida, coletaram-se três amostras de solo cultivado com cana-de-açúcar em cada sistema (ICM e ICV), numa profundidade de até 15 cm. A definição dos pontos foi realizada de forma aleatória em uma extensão de aproximadamente 100 m². Assim, seis amostras de solo coletadas foram armazenadas e lacradas em sacos plásticos estéreis, sendo três de cada sistema. Todas foram transportadas ao laboratório da FCAT/Unesp, onde foram acondicionadas em geladeira a 4 °C (ABNT, 1999).

4.2 Herbicida Tebuthiuron

O herbicida tebuthiuron foi adquirido em estabelecimento comercial pelo produto comercial Combine[®] 500SC - Dow AgroSciences Industrial Ltda sob o lote nº 041-14-2000. A partir dele foi preparada a solução de tebuthiuron para adição de 100 mg L⁻¹ nos meios de cultura.

4.3 Meios de Cultura

Foram preparados os meios de cultura caldo nutriente (CN), ágar nutriente (AN) e meio mineral mínimo (MMM), sendo esterilizados em autoclave a 121 °C durante 15 min previamente ao uso. Todos os meios de cultura eram da KASVI[®].

4.3.1 Caldo nutriente e ágar nutriente

Para o preparo de 0,200 L do caldo nutriente (CN), foram dissolvidos 2,6 g de *Nutrient Broth* em 0,200 L de água deionizada, seguindo as normas do fabricante. Após esse procedimento, foi acrescido 0,8 mL da solução de tebuthiuron (25 g L⁻¹), que resultou no meio de cultura caldo nutriente + 100 mg L⁻¹ de tebuthiuron (CN-T).

Para o preparo de 0,500 L de ágar nutriente (AN), foram dissolvidos 14,0 g de *Nutrient Agar* em 0,500 L de água deionizada, seguindo as normas do fabricante. Após esse procedimento, foram adicionados 2,0 mL da solução de tebuthiuron (25 g L^{-1}), que resultou no meio de cultura ágar nutriente + 100 mg L^{-1} de tebuthiuron (AN-T).

Após o preparo, os meios estéreis foram armazenados em frascos Erlenmeyer de 250 mL e acondicionados em geladeira a 4°C até seu uso.

4.3.2 Meio mineral mínimo

Foi realizado o preparo do meio mineral mínimo (MMM) seguindo a metodologia de Richard e Vogel (1999). Os compostos utilizados no seu preparo foram, em g L^{-1} : KCl 0,7; KH_2PO_4 2,0; Na_2HPO_4 3,0; NH_4NO_3 1,0; além de $1,0 \text{ mL L}^{-1}$ da solução de micronutrientes. Esta solução foi preparada com os seguintes elementos, em g L^{-1} : MgSO_4 4,0; FeSO_4 0,2; MnCl_2 0,2; CaCl_2 0,2. O pH inicial do MMM foi ajustado para 7,2.

A partir do meio mineral mínimo (MMM), foram preparados frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 90 mL de MMM. Estes frascos foram vedados com bonecas e submetidos a esterilização em autoclave e, posteriormente, foram adicionados 0,36 mL da solução de tebuthiuron (25 g L^{-1}) em cada um dos frascos, formando a solução meio mineral mínimo + 100 mg L^{-1} do herbicida (MMM-T).

4.4 Isolamento de Potenciais Cepas Biodegradadoras

Os microrganismos potencialmente degradadores de tebuthiuron foram isolados em laboratório segundo Rani *et al.* (2008) e Qiao *et al.* (2014), com adaptações.

Inicialmente, pesou-se separadamente em papel alumínio 10 g de cada uma das amostras de solo coletadas nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar. Cada uma delas foi transferida respectivamente para um frasco Erlenmeyer com 90 mL de MMM-T. Os frascos foram incubados em um agitador rotativo a 120 rpm por 3 dias a 30°C (t0). Transcorrido este período, 10 mL do meio com crescimento microbiano foi transferido em novo frasco Erlenmeyer de 125 mL com 90 mL MMM-T, já esterilizado. A incubação foi realizada novamente sob agitação orbital a 120 rpm por 3 dias a 30°C (t1).

A cada três dias, uma nova transferência de 10 mL do meio do frasco com crescimento foi realizada para um novo MMM-T, sob as mesmas condições. Este procedimento foi realizado mais duas vezes, totalizando 12 dias – t2 e t3.

4.4.1 Verificação do crescimento microbiano na bioprospecção

Aos nove dias de cultivo microbiano, foi realizado um teste qualitativo previamente ao final do período de bioprospecção para verificar a presença de microrganismos. Assim,

foram inoculados 10 mL de MMM-T do cultivo microbiano em um frasco Erlenmeyer contendo caldo nutriente estéril, o qual ficou por mais três dias sob as mesmas condições de cultivo juntamente com as demais amostras da bioprospecção microbiana (120 rpm por 3 dias a 30 °C).

Transcorrido esse período de 12 dias de bios prospecção, 1,0 mL do MMM-T com crescimento microbiano foi inoculado em placas de Petri com meio AN-T pelo método *Pour Plate*. Para cada uma das seis amostras de solo foram preparadas duas placas, cuja incubação ocorreu por 48 h a 37 °C. Após 48 horas de inoculação, as placas com crescimento de UFC foram acondicionadas em geladeira a 4 °C.

4.5 Coleta de Solo para os Ensaio s Respirométricos

O solo utilizado nos ensaios respirométricos foi obtido sem qualquer interferência de aplicação de pesticidas e outros compostos orgânicos. Assim, foi coletado na área experimental da Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas da Universidade Estadual – FCAT/Unesp, Dracena. Após coleta, a amostra foi peneirada em peneira de 2,0 mm e, posteriormente, suas propriedades físicas e químicas caracterizadas no Laboratório Qualisolo - Laboratório de Fertilidade do Solo, Presidente Prudente/SP (Tabela 1).

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do solo para os ensaios respirométricos

Propriedades	Valor
Ph	5,2
Matéria orgânica, mg m ⁻³	3,0
Fósforo, mmolc dm ⁻³	5,0
Potássio, mmolc dm ⁻³	1,7
Cálcio, mmolc dm ⁻³	15
Magnésio, mmolc dm ⁻³	4,0
Acidez potencial, mmolc dm ⁻³	13
Cátions permutáveis, mmolc dm ⁻³	21
Capacidade de troca catiônica, mmolc dm ⁻³	34
Saturação dos cátions permutáveis, %	61
Boro, mg dm ⁻³	0,17
Cobre, mg dm ⁻³	0,5
Ferro, mg dm ⁻³	8,0
Manganês, mg dm ⁻³	7,8
Zinco, mg dm ⁻³	0,3

Fonte: Adaptado do Laboratório Qualisolo - Laboratório de Fertilidade do Solo (2020).

4.6 Ensaios Respirométricos

O monitoramento do metabolismo microbiano na degradação de tebuthiuron em solo foi realizado com a adição dos isolados microbianos pelo método respirométrico, baseado na Norma Técnica L6.350 da CETESB (1990) e na NBR 14283 (ABNT, 1999).

A análise possibilitou determinar o comportamento do metabolismo microbiano, através da análise quantitativa na produção de CO₂ no interior do respirômetro em diferentes ensaios (BARTHA; PRAMER, 1965).

Desta forma, a respirometria é um dos protocolos mais simples e rápidos para auxiliar na quantificação precisa e confiável da produção de CO₂ a partir do metabolismo do substrato alvo (GRAVES *et al.*, 1991). Nesta técnica o volume de geração de CO₂ originado da biodegradação do composto em análise produzido durante a respiração microbiana é capturado pela solução alcalina (KOH), localizada no braço lateral do respirômetro, que consiste em um sistema fechado, apresentando duas câmaras conectadas, o braço lateral e o frasco Erlenmeyer.

Assim, os níveis de dióxido de carbono (CO₂) foram calculados e representados em função do tempo da incubação, sendo analisada e quantificada periodicamente em cada tratamento ao longo da análise respirométrica (BALBA, 1998). Com esta técnica, podemos associar taxas específicas de biodegradação com as fases do processo de degradação (FIÚZA; VILA, 2005).

O delineamento experimental utilizado na análise da biodegradação foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 3x4, ligado: (i) à dose recomendada de tebuthiuron pelo Combine[®] 500SC; e (ii) à adição das linhagens isoladas na bioprospecção.

Logo, foram analisadas três doses do herbicida: ausência total do herbicida, 0,5T (metade da dose indicada na bula do produto comercial), e 1,0T (dose inteira indicada na bula do produto comercial); associadas a quatro inoculações de microrganismos: ausente, isolados em sistema de cultivo mínimo - ICM, isolados em sistema convencional - ICV, e utilização de ambos os inóculos em consórcio (ICM-ICV).

Portanto, foram preparados doze tratamentos em triplicata, sendo utilizado o Tratamento 1 como Controle, para comparação entre os demais tratamentos. Todos os tratamentos estão descritos na Tabela 2.

Nota-se que os microrganismos potencialmente biodegradadores de tebuthiuron, isolados previamente, foram cultivados em meio caldo nutriente durante 24 h a 37 °C em modo estático. Sua inoculação nos ensaios respirométricos foi padronizada pela utilização do

meio cultivado com diluição em solução salina estéril (NaCl 0,9% m/v). Para isto, a alíquota foi estabelecida em espectrofotômetro com 0,800 u.a. no comprimento de onda 600 nm.

Tabela 2 - Composição dos ensaios respirométricos de monitoramento da biodegradação microbiana do tebuthiuron com os isolados microbianos.

Tratamentos		Dose de tebuthiuron	Isolados	
			ICM	ICV
1	Controle	Ausente	Ausente	Ausente
2	0,5T	0,5	Ausente	Ausente
3	1,0T	1,0	Ausente	Ausente
4	ICM	Ausente	+	Ausente
5	0,5T-ICM	0,5	+	Ausente
6	1,0T-ICM	1,0	+	Ausente
7	ICV	Ausente	Ausente	+
8	0,5T-ICV	0,5	Ausente	+
9	1,0T-ICV	1,0	Ausente	+
10	ICM-ICV	Ausente	+	+
11	0,5T-ICM-ICV	0,5	+	+
12	1,0T-ICM-ICV	1,0	+	+

*Legendas: T = dose de tebuthiuron; ICM = linhagens isoladas em sistema de cultivo mínimo; ICV = linhagens isoladas em sistema de plantio convencional; Controle = ausência total das doses de tebuthiuron e linhagens isoladas. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.6.1 Análise quantitativa da respirometria

O monitoramento do metabolismo microbiano foi realizado por 91 dias sem agitação dos frascos e com aeração semanal após a quantificação de CO₂. Este procedimento foi realizado por meio de técnica de condutividade elétrica com o auxílio de um condutivímetro, estabelecida por Faria *et al.* (2013). Logo, garantiram-se eficiência e menores riscos de interferência dos resultados por variações nos protocolos experimentais.

Retirou-se a solução de KOH do braço lateral, adicionou-se 1,0 mL da solução de BaCl₂ e, assim, foi inserido um sensor de condutividade previamente calibrado e seco. Com base na Equação 1 ($R^2 = 0,9997$) da curva padrão proposta por Faria *et al.* (2013), foi possível transformar os valores de condutividade, em mS, para mg de CO₂.

$$GCO_2 = 1554,8 - 95,726 * C \quad [1]$$

em que, GCO₂= geração de gás carbônico em mg;

C = condutividade em mS.

A quantificação de CO₂ ao longo dos dias permitiu projetar modelos matemáticos para prever o comportamento dos isolados microbianos e da dosagem do tebuthiuron em solo.

Após cada análise da taxa de CO₂ evoluída, os respirômetros foram incubados a $28 \pm 2,0$ °C até a quantificação seguinte.

4.7 Análise Estatística e Modelagem Matemática

O modelo de Gompertz foi utilizado para representar o comportamento da produção de CO₂ resultante do metabolismo microbiano na degradação do tebutiuron. Os dados foram expressos na função de crescimento, cujos parâmetros foram pré-definidos ($\alpha = 100$, $\beta = 10$, e $K = 0,5$), para ajuste no modelo matemático (Equação 2) (TJØRVE; TJØRVE, 2017).

$$f(x) = \alpha e^{\beta e^{-Kx}} \quad [2]$$

em que, $f(x)$: produção de mg CO₂;
 x : tempo de amostragem, em dias;
 α : assíntota superior ou o máximo de produção de CO₂, em mg;
 β : ponto de inflexão;
 K : taxa de crescimento específico, mg CO₂ d⁻¹;
 e : número de Euler.

Os dados obtidos a partir do monitoramento da geração de CO₂ serviram de base para a modelagem matemática. O conjunto de critérios para análise de qualidade de ajuste das curvas de Gompertz foi composto por AIC, BIC e R_{adj}^2 .

A escolha do modelo estatístico se relaciona diretamente a modelos com parâmetros possíveis de serem estimados e que explique de forma clara e concisa o comportamento da variável resposta. Os critérios para seleção de modelos são apresentados na literatura e são baseados no máximo da função de verossimilhança (mensura a quantidade de informações perdidas), sendo os mais utilizados: AIC - Critério de Informação de Akaike, e BIC - Critério de Informação Bayesiano (BOZDOGAN, 1987; WOLFINGER, 1993; LITTEL *et al.*, 2002).

O AIC é fundamentado na teoria da informação, na qual um modelo estatístico é utilizado a fim de representar um determinado processo, estimando-se a quantidade relativa de informações perdidas por um determinado modelo. Assim, quanto menos informações um modelo perde, maior a qualidade desse modelo e menor a pontuação AIC. Além de favorecer a escolha de modelos mais simples, admite a existência de um modelo “real” que descreve os dados desconhecidos (BOZDOGAN, 1987; LITTEL *et al.*, 2002).

Já o BIC tem como pressuposto a existência de um “modelo verdadeiro” partindo-se de que todos os modelos são estimativos ao descreverem a relação entre a variável dependente

(número de parâmetros; espaço de delineamento experimental) e as diversas variáveis explanatórias entre os diversos modelos sob seleção. Assim, o critério é definido como a estatística que maximiza a probabilidade de se identificar o verdadeiro modelo dentre os avaliados. O modelo com menor valor BIC é considerado o de melhor ajuste, pois a quantidade de informações perdidas em relação ao espaço de delineamento experimental e grau de complexidade de parâmetros é menor (BOZDOGAN, 1987; WOLFINGER, 1993).

Desta forma, AIC e BIC são critérios de seleção de ajustes de modelo não lineares, que apresentam a qualidade de ajuste no modelo proposto – Gompertz.

Assim, quanto menor os valores destes ajustes mais preciso será o modelo. O parâmetro R_{adj}^2 estabelece a relação entre os eixos x e y ao informar o quanto a variabilidade dos dados do eixo y é explicada pela variabilidade dos dados do eixo x. Desta forma, quanto maior o valor de R mais próximo da realidade está o modelo, ou seja, quanto maior o valor de R^2 , melhor o modelo se ajusta aos seus dados (MCELREATH, 2016; PELEA *et al.*, 2019; TADDY, 2019).

A plotagem de contorno 2D também foi utilizada como método aplicado na modelagem matemática a fim de descrever os dados de variabilidade temporal da produção de CO_2 e a análise da biodegradação microbiana no período.

Além disso, para uma otimização na previsão dos dados gerados e visualização de padrões que não permitem o entendimento apenas com a lógica booleana clássica, utilizou-se a lógica fuzzy (KHANDARE; THAKUR, 2020). Estas análises e modelagens foram realizadas com o uso do software R (R CORE TEAM, 2020).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento de Potenciais Cepas Biodegradadoras

A verificação do crescimento microbiano na bioprospecção foi evidenciada pelo teste de crescimento em meio de cultura líquido que, após três dias, passou de brilhante e transparente para opaco e turvo (Figura 3).

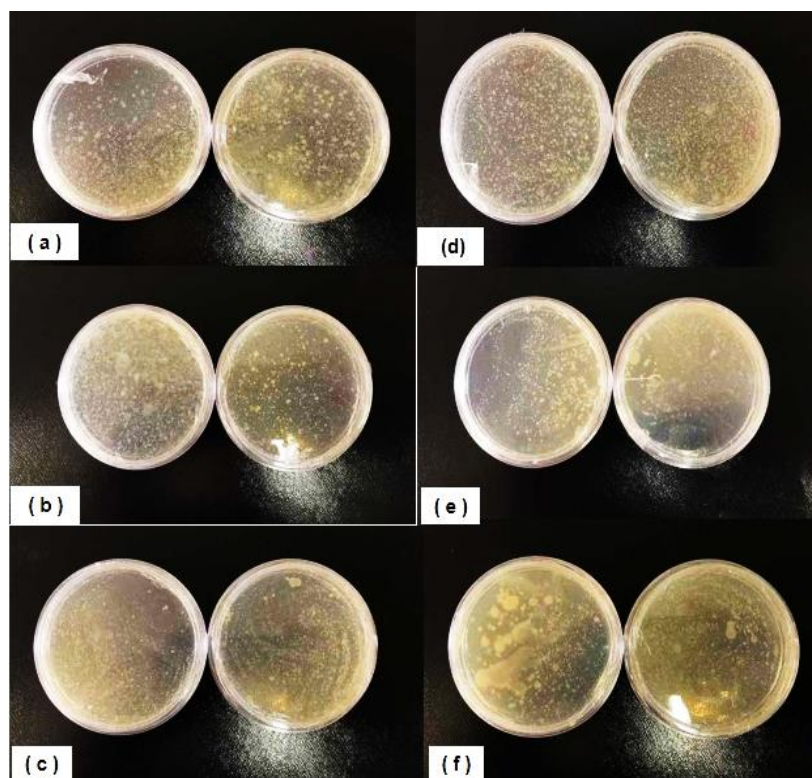
Além disso, após a etapa de bioprospecção de linhagens potencialmente biodegradadoras de tebuthiuron foi observada a formação de UFC em meio de cultura sólido (Figura 4).

Figura 3 - Constatação do crescimento microbiano em meio CN-T. Direita: meio estéril. Esquerda: com inoculação da amostra após 9 dias e com mais três dias de incubação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4 - Placas de Petri com crescimento de linhagens microbianas após o cultivo de bioprospecção. Sistema de cultivo mínimo (a, b, c) e Sistema convencional (d, e, f).



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Monitoramento da Atividade Microbiana - Biodegradação

5.2.1 Produção diária de CO₂

Os resultados referentes à geração diária de CO₂ pela atividade microbiana avaliada pela respirometria estão apresentados na Figura 5.

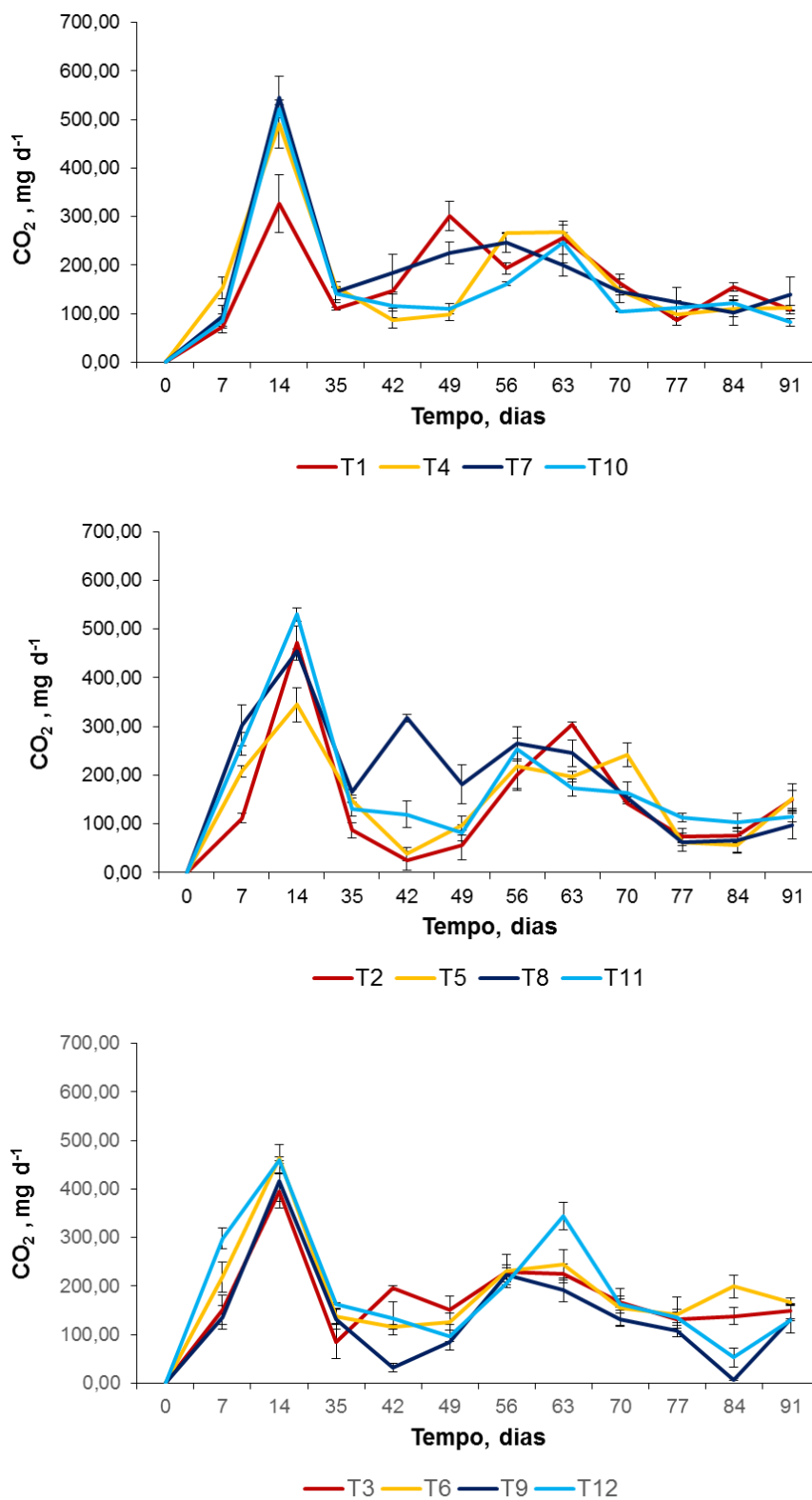
Na Figura 5, o pico geral da produção de CO₂ diária ocorreu nos primeiros 14 dias de avaliação, seguido de declínio até os 35 dias. Em seguida, houve tendência de estabilidade com um pico de crescimento novamente na atividade microbiana (63 dias) e estabilidade até o término da análise.

Dentre os 12 tratamentos, T7 (ICV) apresentou o maior volume de produção de CO₂ diário registrado durante os 91 dias na segunda semana de avaliação 545,88 mg CO₂ d⁻¹. Em contrapartida, T9 (1,0T-ICV) registrou o menor volume de produção de CO₂ diário na penúltima semana de avaliação 7,18 mg CO₂ d⁻¹ (Figura 5).

Segundo Faria *et al.* (2019), a alta atividade microbiana evidenciada nos primeiros dias pode ser relacionada à grande concentração de compostos orgânicos prontamente disponíveis, que estavam presentes no solo, o que acelerou exponencialmente o metabolismo

microbiano. Já o declínio após os 14 dias pode ser justificado pela desaceleração dessa degradação pelos microrganismos em virtude do esgotamento de matéria orgânica.

Figura 5 - Produção diária de CO₂ durante 91 dias de biodegradação.



Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional).
 T1 = Controle; T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV;
 T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; T12 = 1,0T-ICM-ICV. Fonte: Elaborado pelo autor.

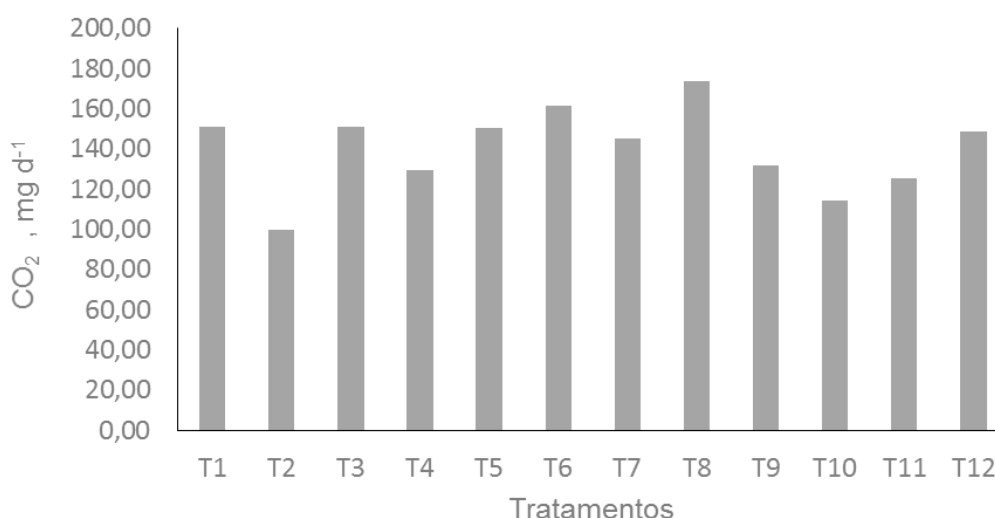
Neste sentido, Duah-Yentumi e Kuwatsuka (1982) verificaram que diversos fatores contribuíram para a rápida degradação do herbicida 2,4-D, tais como: textura do solo, diversidade de macro- e micronutrientes e concentração do próprio herbicida. Martinez *et al.* (2008) também citaram que uma possível explicação para a degradação do herbicida sulfentrazone pode estar relacionada à umidade, que interfere diretamente na proliferação dos microrganismos degradadores e, conseqüentemente, na sua taxa de respiração. Desse modo, sugere-se que o desempenho das linhagens não se deva apenas à sua adaptabilidade em metabolizar o tebuthiuron, mas também esteja influenciado por características físico-químicas do solo, da molécula e de outros compostos associados.

Portanto, a análise em escala laboratorial representa uma importante ferramenta, pois esses representativos de biodegradação permitem uma avaliação do impacto sobre diversos parâmetros, que podem interferir na eficácia do biotratamento. Este tipo de análise fornece instruções a respeito de reduzir a duração e o custo do processo, além de vislumbrar a aplicação em campo futuramente (SZULC *et al.*, 2014).

5.2.2 Produção média diária de CO₂

A produção média de CO₂ diário dos doze tratamentos submetidos à avaliação pode ser observada pela Figura 6. O desempenho médio de cada tratamento é reflexo da soma das emissões de CO₂ diária mensuradas do dia 0 até o dia 91.

Figura 6 - Produção média diária de CO₂ após 91 dias de biodegradação.



Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional). T1 = Controle; T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV; T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM - ICV; T11 = 0,5T-ICM - ICV; T12 = 1,0T-ICM-ICV. Fonte: Elaborado pelo autor.

Em T1 e T3 geraram em média 151,12 e 150,85 mg CO₂ d⁻¹, respectivamente, enquanto T2 mostrou comportamento divergente (99,45 mg CO₂ d⁻¹), obtendo menor desempenho comparado a todos os demais tratamentos (Figura 6).

Nos tratamentos com isolados de cultivo mínimo (ICM), T4 apresentou o menor valor médio de produção de CO₂ (129,47 mg CO₂ d⁻¹), enquanto T6 registrou a maior capacidade de geração média entre essas linhagens (161,6 mg CO₂ d⁻¹). Nos tratamentos com isolados de plantio convencional (ICV), T8 produziu o maior volume médio diário de CO₂ (173,50 mg CO₂ d⁻¹), seguido de T7 (145,42 mg CO₂ d⁻¹) e T9 (131,78 mg CO₂ d⁻¹).

Por fim, quando analisado o solo com os isolados consorciados (ICM-ICV), T10 obteve a menor (114,51 mg CO₂ d⁻¹) e T12 a maior (148,86 mg CO₂ d⁻¹) produção média diária de CO₂ (Figura 6).

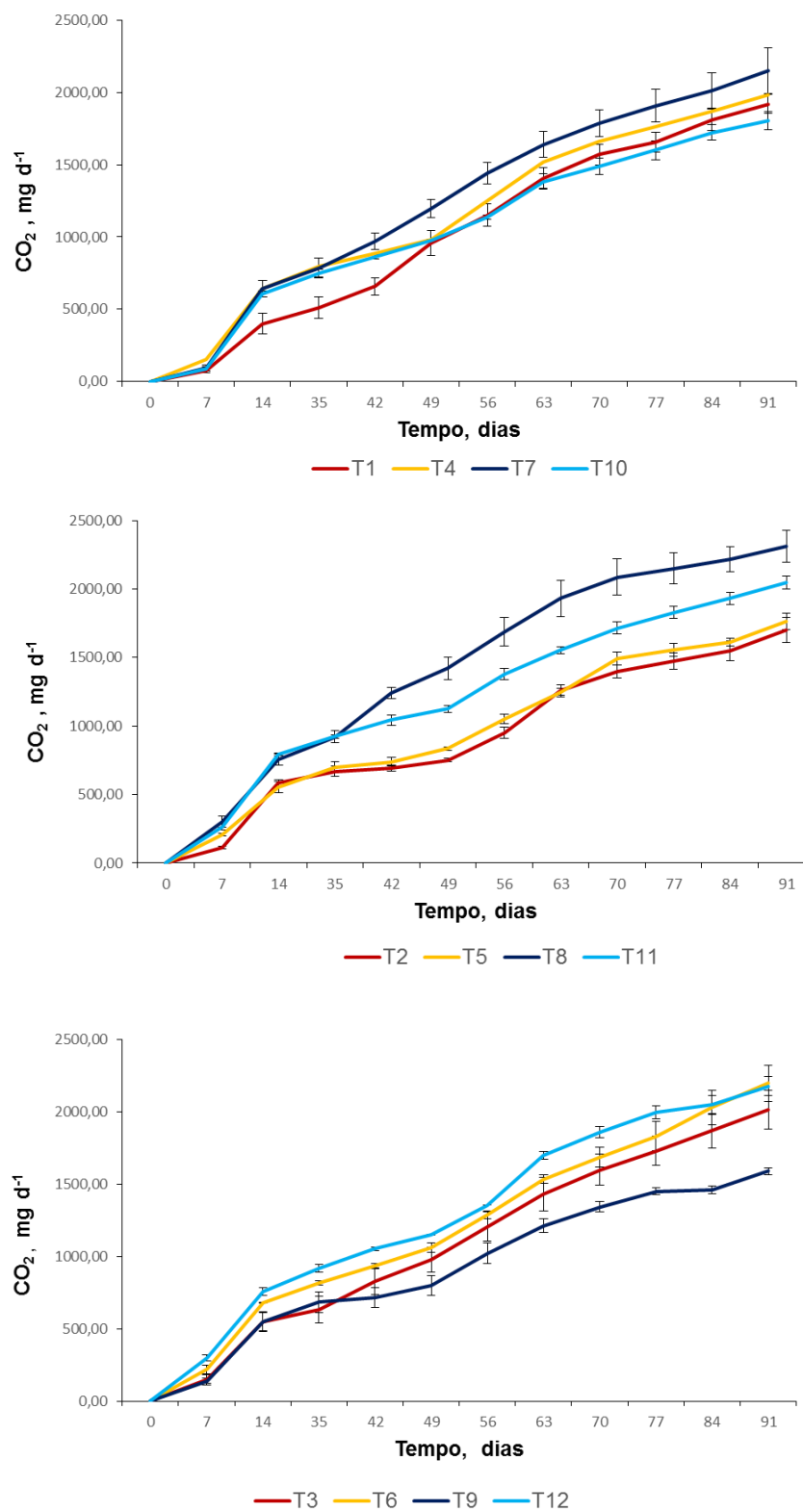
5.2.3 Produção acumulada de CO₂

Após a comparação do metabolismo diário na biodegradação das amostras de solo, foi calculada a produção de CO₂ acumulado na respirometria no decorrer do tempo para todos os tratamentos (Figura 7).

Na Figura 7 é possível evidenciar que, após a primeira semana, ocorreu uma disparidade dos dados e alguns tratamentos que tiveram herbicida aplicado se destacaram (T6, T8, T11 e T12), apresentando produção de CO₂ mais acentuada, em especial T8, que se sobressaiu acima de todos após 35 dias.

Com exceção de T7, os tratamentos com ausência de herbicida (T1, T4 e T10) figuraram entre os menores valores acumulados de geração de CO₂, juntamente com T2, T5 e T9. Portanto, foi demonstrado que a aplicação de herbicida alterou o metabolismo microbiano de modo que os microrganismos ficassem mais ativos, principalmente nos tratamentos com isolados de diferentes sistemas de plantio (cultivo mínimo e convencional) com histórico de aplicação da molécula-alvo. Logo, sugere-se que o tebuthiuron tenha sido assimilado com uma fonte de carbono no metabolismo dos microrganismos bioprospectados.

Figura 7 - Produção acumulada de CO₂ durante 91 dias de biodegradação.



Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional).
 T1 = Controle; T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV;
 T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; T12 = 1,0T-ICM-ICV (Fonte: Elaborado pelo autor).

Corroborando com os resultados, Pires *et al.* (2005) observaram que o solo rizosférico com tebuthiuron apresentou maior produção de CO₂ quando comparado ao solo sem vegetação, sendo esse fato atribuído à microbiota pré-adaptada. Em solo tratado com essa mesma molécula, mas na ausência de vinhaça, houve um ligeiro aumento na produção de CO₂ em relação ao solo ausente de ambos os compostos (FARIA *et al.*, 2019).

Souto *et al.* (2013) relataram um aumento na produção de CO₂ em solos com aplicação de imazetapir e imazapique, condicionado pela biodegradação dessas moléculas. Porém, a presença de triasulfuron e prosulfocarb teve impacto negativo na atividade microbiana (GARCÍA-DELGADO *et al.*, 2019), enquanto a aplicação de mesotrione não teve efeito na taxa de respiração do solo (POSE-JUAN *et al.*, 2015).

Analisando as três maiores produções de CO₂ isoladamente (Figura 7), uma foi submetida a 0,5T (meia dose do produto comercial = T8) e duas a 1,0T (dose recomendada do produto comercial = T6 e T12). Logo, não houve diferença evidente entre as doses 0,5T e 1,0T. Esses resultados corroboram os estudos de Neves (2017) e Faria *et al.* (2019), cuja dose do herbicida influenciou proporcionalmente a geração de CO₂.

Contudo, o tratamento com inóculo de sistema convencional e que não foi exposto ao composto xenobiótico (T7 = ICV) teve o quarto melhor desempenho na produção de CO₂ acumulado (Figura 7). Esse comportamento possivelmente ocorreu pela presença de matéria orgânica no solo e pela facilidade de assimilação desses isolados. Esta amostra de solo foi coletada em sistema convencional, o que prognostica a adaptabilidade, eficiência e superioridade dessas linhagens perante as outras classes microbianas em utilizar matéria orgânica como fonte de carbono e energia e, consequentemente, gerar grandes quantidades de CO₂ (FOLLET; SCHIMEL, 1989; ALVAREZ *et al.*, 1995; HENDRIX *et al.*, 1988).

Em contrapartida, os resultados na Figura 7 diferem-se do observado por Faria *et al.* (2014) que, ao investigarem os efeitos de herbicidas na atividade da microbiota rizosférica em solo com cana-de-açúcar, afirmaram que o tebuthiuron teve influência negativa sobre a população microbiana, limitando o seu crescimento e reduzindo sua taxa respiratória. Enfatiza-se, assim, a relevância dos isolados quanto ao potencial de degradar o tebuthiuron, cuja molécula possui alta persistência no solo.

A partir dos resultados de produção acumulada de CO₂, foi realizada a análise de variância após 91 dias de metabolismo microbiano (Tabela 3).

Por meio da Tabela 3, evidencia-se que a produção de CO₂ nos tratamentos sem herbicida (T1, T4, T7 e T10) não apresentou diferença significativa na comparação de T1 e

T4, assim como esses tratamentos não diferiram significativamente de T7. Já T10 apresentou-se estatisticamente diferente com relação a T7.

Tabela 3 - Análise de variância da produção de CO₂ acumulado após 91 dias de biodegradação

Tratamentos	Produção de CO ₂ acumulado / mg (91 dias)	
T1	1919,06 ± 65,41	bcd
T2	1700,19 ± 90,62	bc
T3	2018,53 ± 134,93	bc
T4	1984,23 ± 30,03	bc
T5	1763,26 ± 60,00	cde
T6	2199,13 ± 126,00	ab
T7	2151,91 ± 158,92	ab
T8	2312,96 ± 115,73	a
T9	1591,11 ± 22,35	e
T10	1804,82 ± 62,14	cde
T11	2047,87 ± 45,68	ab
T12	2179,03 ± 64,75	ab

**médias seguidas de letras iguais não diferem pelo teste de Tukey (p<0,05).*

Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional). T1 = Controle (Ausência total de inóculos e doses de tebuthiuron); T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV; T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; T12 = 1,0T-ICM-ICV. Fonte: Elaborado pelo autor.

Além disso, pela Tabela 3 confirma-se a eficiência do consórcio na degradação do composto-alvo, posto que esses tratamentos submetidos à meia dose do produto comercial (0,5T = T11) e dose completa (1,0T = T12) de tebuthiuron não diferiram significativamente entre si. Contudo, houve diferença em comparação ao tratamento consorciado que não recebeu herbicida (T10).

Quanto aos ensaios com a dose inteira recomendada, 1,0T (T3, T6 e T12), não houve diferença significativa entre si. Por outro lado, a amostra com o isolado do sistema de manejo convencional (T9) apresentou-se estatisticamente diferente dos outros (T3, T6 e T12).

Em relação aos tratamentos com isolados de sistema de cultivo mínimo - ICM (T4, T5 e T6), o tratamento com metade da dose (T5) diferiu significativamente daquele com a dose completa (T6), mas não da amostra sem o herbicida (T4).

Verificou-se que, para as linhagens bioprospectadas em solo com manejo convencional (T7; T8 e T9), o tratamento que recebeu a dose completa 1,0 diferenciou-se

significativamente de T7 e T8, enquanto que esses tratamentos (ausente e com 0,5T) não apresentaram diferenças estatísticas.

Diferente da tendência descrita pelo desempenho dos isolados individualmente, os tratamentos com a presença dos dois isolados microbianos em consórcio (T10; T11 e T12) não tiveram diferença significativa quando o herbicida foi aplicado (0,5T e 1,0T – T11 e T12, respectivamente). Entretanto, sua presença, independente da dose, foi capaz de gerar mais CO₂ pela diferença desses tratamentos em relação aquele com as linhagens ICM e ICV e sem a presença de tebuthiuron (T10).

5.3 Análise Estatística e Modelagem Matemática

5.3.1 Modelo cinético de Gompertz

Os modelos cinéticos de evolução de CO₂ de acordo com modelo de Gompertz estão demonstrados na Figura 8. Cada curva obtida demonstra a adequação do ajuste dos dados ao modelo e, assim, permite estimar o tempo de biodegradação da molécula-alvo sob ação do metabolismo microbiano. É possível observar que o modelo conseguiu prever e quantificar a produção de CO₂ ao relacionar a atividade microbiana na biodegradação do tebuthiuron em relação ao tempo (91 dias) nos ensaios respirométricos.

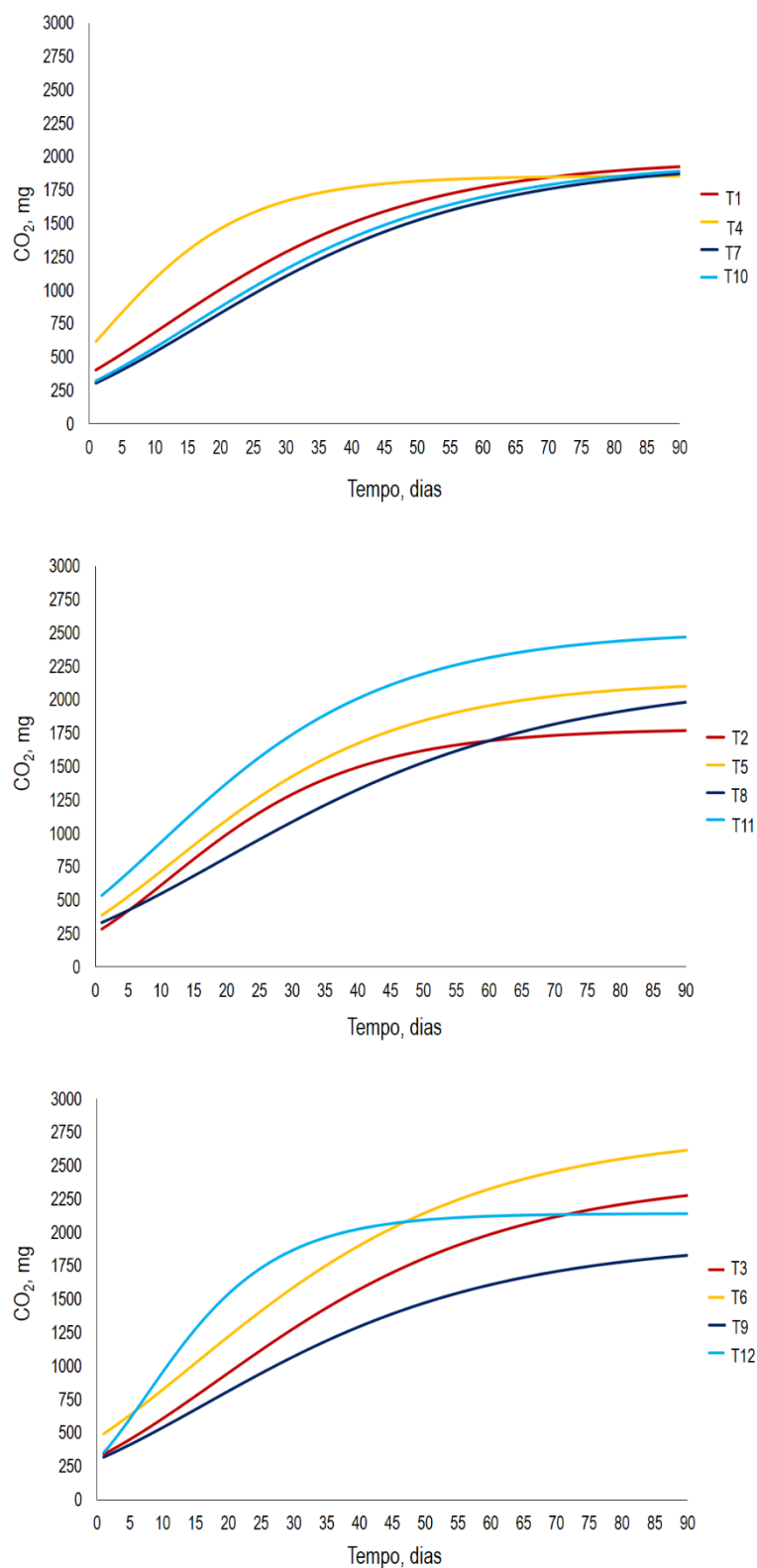
Pela Figura 8, observa-se que entre os tratamentos ausente de tebuthiuron e com os inóculos microbianos (T4, T7 e T10), T4 (ICM) obteve a melhor resposta no crescimento do modelo com inflexão da curva entre 25 e 30 dias.

Para os tratamentos com meia dose de tebuthiuron – 0,5T (T2, T5, T8 e T11), T11 (0,5T-ICM-ICV) apresentou uma resposta na inflexão da curva de crescimento superior aos demais. No entanto, os outros tratamentos também obtiveram mudança de comportamento no crescimento comparativamente aos tratamentos sem a presença de tebuthiuron (T1, T4, T7 e T10).

Em relação aos tratamentos submetidos à dose comercial do herbicida – 1,0T (T3, T6, T9, T12), T12 (1,0T-ICM-ICV) apresentou um declínio na forma da curva com posterior estabilidade em 24 dias na cinética de biodegradação. Contudo, os demais tratamentos também obtiveram mudança na cinética de degradação do tebuthiuron comparativamente aos tratamentos sem a presença de tebuthiuron (T1, T4, T7 e T10) e com 0,5T (T2, T5, T8 e T11).

Pela Tabela 4, estas observações dos tratamentos são corroboradas pela produção de altas taxas de crescimento específico (k) ao apresentar maior eficiência em T12 (1,0T-ICM-ICV), considerando o menor tempo estimado de degradação de 24 dias ($GCO_{2max}T$, d) com maior eficiência na produção de CO₂.

Figura 8 - Modelo de Gompertz na produção de CO₂ a partir do metabolismo microbiano.



Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional): T1 = Controle (ausência total das doses de tebuthiuron e linhagens isoladas); T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV; T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; e T12 = 1,0T-ICM-ICV. (Fonte: Elaborado pelo autor).

Tabela 4 - Parâmetros e adequação do modelo de Gompertz para a produção de CO₂ a partir do metabolismo microbiano do tebuthiuron.

Tratamentos	Parâmetros				Qualidade de ajuste		
	α , mg	B	κ , mg d ⁻¹	GCO _{2max} T, d	AIC	BIC	R _{adj} ²
T1	1981,3150	1,6680	45,0205	44,0090	364,2270	369,8315	0,9540 *
T2	1780,6900	1,9560	60,0300	29,6630	335,6625	341,2670	0,9465 *
T3	2420,0360	2,0465	39,0655	61,9480	360,8330	366,4380	0,9450 *
T4	1856,6485	1,9830	80,5625	23,0460	334,5820	340,1865	0,9810 *
T5	2144,8030	1,8065	49,5330	43,3005	323,4520	329,0570	0,9905 **
T6	2749,1625	1,7945	39,5005	69,5980	354,0185	359,6230	0,9825 *
T7	1968,3860	1,9520	40,5785	48,5080	290,5405	296,5410	0,9960 **
T8	2161,6450	1,9400	34,5990	62,4770	317,3815	322,9865	0,9910 **
T9	1936,1700	1,8810	38,5150	50,2705	298,4065	304,0115	0,9945 **
T10	1969,6030	1,9030	42,5250	46,3160	313,4130	319,0175	0,9920 **
T11	2516,0010	1,6350	49,5550	50,7720	369,1560	374,7610	0,9655 *
T12	2141,0290	1,9755	89,5705	23,9030	365,3595	370,9640	0,9725 *

Código de significância: ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$.

Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional); T1 = Controle (ausência total das doses de tebuthiuron e linhagens isoladas); T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV; T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; e T12 = 1,0T-ICM-ICV.

α = produção diária de CO₂ , β = ponto de inflexão da curva (mudança de comportamento de crescimento da curva), κ = taxa de crescimento específico (quanto maior os valores mais eficiente o processo, menor tempo na degradação da molécula em estudo), GCO_{2max}T,d= tempo estimado para que ocorra a degradação, AIC=Critério de Ajuste de Akaike representa a qualidade do ajuste ao modelo, valores menores mais preciso é o modelo, BIC= Critério de Ajuste de Bayesiano representa a qualidade do ajuste ao modelo, valores menores mais preciso é o modelo , R_{adj}²= R ajustado apresenta o quanto de informação é perdida no modelo, quanto maior o valor menos informações são perdidas no modelo, mais preciso é o modelo. Fonte: Elaborado pelo Autor

Na Tabela 4, os outros tratamentos apresentaram uma taxa de crescimento específico (k) tão alta quanto o T12, porém com a utilização de um maior tempo estimado para que ocorra a degradação (GCO_{2max}T, d) da molécula. Como exemplo, tem-se T4 com taxa de crescimento específico (k) e tempo estimado de degradação (GCO_{2max}T, d) comparável ao T12, mas com baixa produção diária de CO₂ (α). Portanto, T4 torna-se uma alternativa menos eficiente na degradação da molécula alvo.

Assim, com base na modelagem de Gompertz, infere-se que a escolha do tratamento mais eficiente se baseia na análise dos parâmetros que o compõem, apresentando-se valores preditivos da produção de CO₂ com eficiência.

O tratamento com consórcio microbiano e meia dose do herbicida (T11 = 0,5T-ICM-ICV) teve resposta semelhante ao T12 (1,0T-ICM-ICV), mas com uma menor taxa de crescimento, apesar de geração comparável de CO₂. Uma possível resposta para este comportamento seria uma pressão ambiental exercida pelo tebuthiuron levando a microbiota obter propriedades enzimáticas particulares até a amostragem dos dois locais para bioprospecção (NETO *et al.*, 2017; VILLAYERDE *et al.*, 2017). Possivelmente, o histórico de aplicação de tebuthiuron no solo no sistema convencional permitiu a adaptação de sua comunidade microbiana mais rapidamente (ANDRIGHETTI *et al.*, 2014; FARIA *et al.*, 2018).

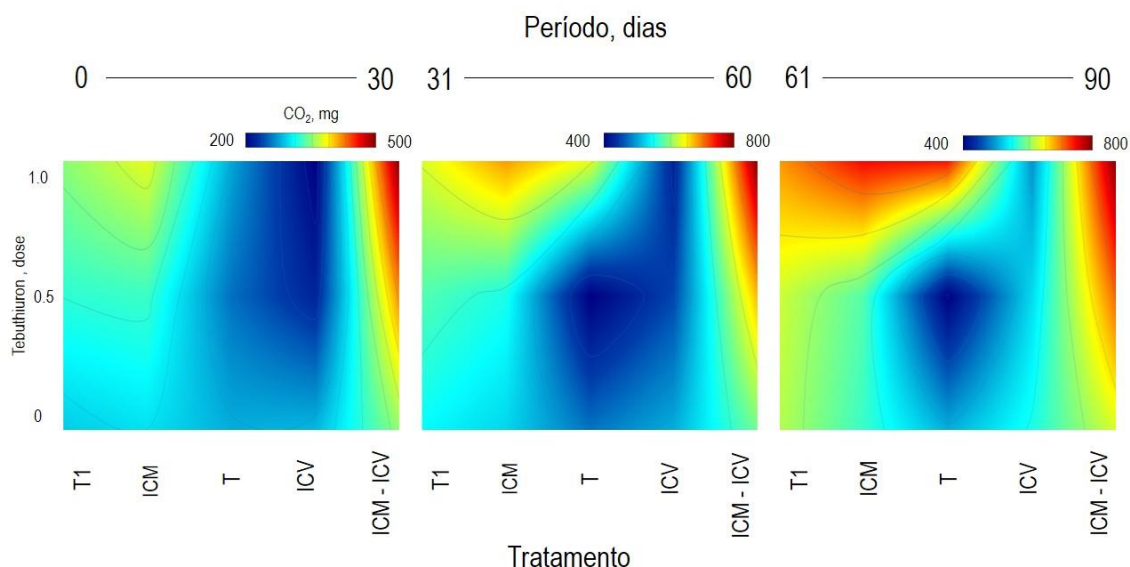
Os tratamentos apresentaram uma maior produção de CO₂ quando presente a dose completa de tebuthiuron (1,0T) ao invés da dose parcial (0,5T). Logo, a concentração do herbicida disponível influenciou na cinética de biodegradação, conforme observado na Tabela 4 (BETANCOURT-PORTELA *et al.*, 2018; ISLAM *et al.*, 2018). Infere-se que este fato ocorreu sob a ação de diferentes fatores: propriedades físico-químicas do pesticida (estabilidade química, estrutura molecular, interação com outras moléculas, metabólitos intermediários); falta de receptores e doadores de elétrons; baixa disponibilidade de carbono do meio; e baixo estímulo sobre a atividade da enzima degradante. Tais fenômenos podem inibir ou retardar a mineralização da molécula e, portanto, afetam sua cinética de biodegradação (GAW *et al.*, 2003; COSGROVE *et al.*, 2010; KANISSERY; SIMS, 2011; KAPUSTA *et al.*, 2011; LEE, 2011; JI *et al.*, 2016; VILLAYERDE *et al.*, 2017; ZHU *et al.*, 2019).

5.3.2 Variabilidade espacial na cinética de produção de CO₂

O monitoramento da cinética de biodegradação pelo metabolismo microbiano também foi analisado através da variabilidade espacial da produção de CO₂ relacionando as variáveis: tempo (dias); dosagem de tebuthiuron (0,0; 0,5 e 1,0); inóculo (ausente, ICV, ICM, ICM-ICV) aplicada a plotagem 2D de contorno (Figura 9).

Este tipo de plotagem apresenta os resultados de um conjunto de dados sobre a geometria do modelo, no qual os resultados são divididos em subintervalos que recebem um conjunto de cores em relação às variáveis (JIAN *et al.*, 1996).

Figura 9- Traçado 2D de contorno difuso para a variabilidade espacial da produção de CO₂ a partir do metabolismo microbiano do tebuthiuron.



Legenda: T (dose de tebuthiuron), ICM (isolado de cultivo mínimo), ICV (isolado de sistema convencional): T1 = Controle; T2 = 0,5T; T3 = 1,0T; T4 = ICM; T5 = 0,5T-ICM; T6 = 1,0T-ICM; T7 = ICV; T8 = 0,5T-ICV; T9 = 1,0T-ICV; T10 = ICM-ICV; T11 = 0,5T-ICM-ICV; e T12 = 1,0T-ICM-ICV. Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao longo do experimento ocorreram altas taxas de crescimento específico na produção de CO₂, como se é observado no comportamento da produção de dióxido de carbono em relação à degradação de tebuthiuron ao longo do tempo (Figura 9).

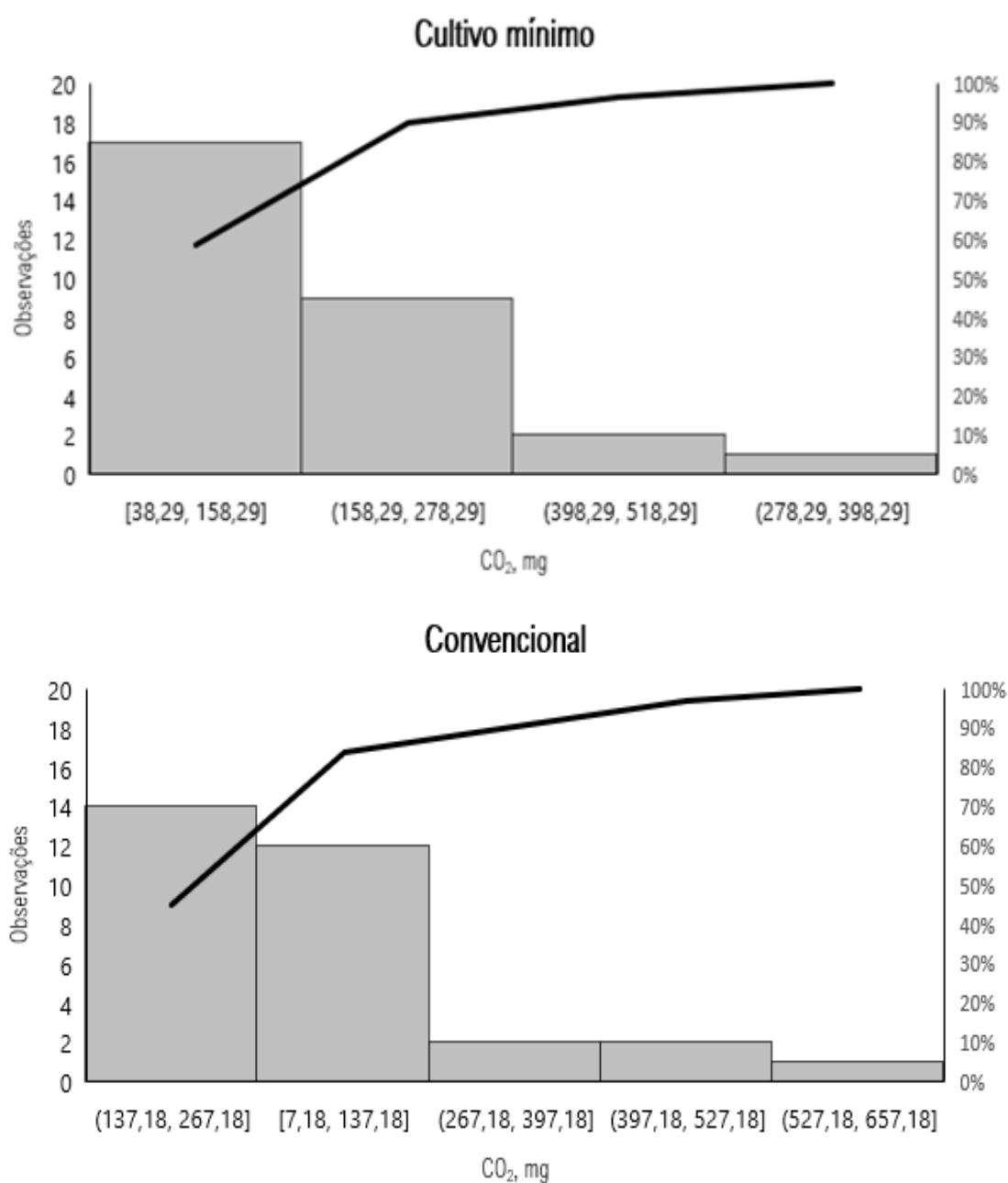
Os tratamentos inoculados com o consórcio microbiano ICM-ICV (T10, T11 e T12) mantiveram a produção contínua durante o período, obtendo-se a produção de 499,36 e 675,21 mg CO₂ no 30º e 60º dias, respectivamente. No entanto, a maior produção foi encontrada após 90 dias com uma produção de 810,36 mg de CO₂ independentemente da dose de pesticida.

As amostras de solo com a presença somente do inóculo de cultivo mínimo - ICM (T4, T5 e T6) tiveram taxa de geração de CO₂ considerável no último período (90º dia), cuja quantidade produzida comparou-se às taxas dos tratamentos em consórcio microbiano (T10, T11 e T12).

No entanto, para a análise da variabilidade espacial da produção de CO₂ a partir do metabolismo microbiano do tebuthiuron, exigem-se estudos mais aprofundados dos dados na avaliação de parâmetros que possam fechar as lacunas deste estudo, por exemplo: presença de receptores e doadores de elétrons; baixa disponibilidade de carbono do meio; condições favoráveis e desfavoráveis à ação enzimática degradante do tebuthiuron, etc. (COSGROVE *et al.*, 2010; KANISSERY; SIMS, 2011; VILLAYERDE *et al.*, 2017).

Neste sentido, foi realizada uma análise acerca da distribuição de informações da produção de CO₂ pela origem de inóculo: ICM ou ICV. Assim, foram estabelecidos diagramas de Pareto com relação à presença de cada grupo microbiano bioprospectados em sistemas de cultivo diferentes, conforme apresentado na Figura 10.

Figura 10 –Diagramas de Pareto em relação à produção de CO₂ quanto à origem dos inóculos microbianos: ICM – cultivo mínimo e ICV – cultivo convencional.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se uma maior densidade de observações de valores maiores na produção de CO₂ no sistema de cultivo convencional como é observado no diagrama de Pareto (Figura 10),

coerente com a cinética de degradação do tebuthiuron pela microbiota de origem do sistema de cultivo convencional (CV) a qual foi intensificada se comparada com uma distribuição de valores menores apresentada no cultivo mínimo (Figura 8).

Na distribuição dos dados da Figura 10, tem-se a produção de CO₂ em intervalos numéricos no eixo x que evidencia que as amostras de solo com ICV possuíam maior geração em relação às amostras com ICM. Este fenômeno possivelmente se relaciona ao fato da microbiota bioprospectada em sistema convencional estar pré-adaptada ao estresse ambiental (tratos culturais, adubação e a presença de nutrientes necessário a cultura), além da presença do tebuthiuron, uma vez que se demonstrou capaz de metaboliza-lo. No sistema de cultivo mínimo, há pouco contato da microbiota com fatores causadores de estresse, pois o solo sofre minimamente intervenção para o plantio da cultura. Logo, a microbiota presente neste sistema pode se tornar mais sensível ao estresse causado por vários fatores, como a presença do herbicida.

Portanto, tratamentos com ICV adicionado isoladamente ou conjuntamente com ICM tiveram maior taxa de crescimento específico em função do tempo. Logo, é possível afirmar que a microbiota isolada no sistema convencional de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação de tebuthiuron possui uma pré-adaptação na degradação desta molécula que permite estabelecer novas tecnologias sustentáveis na remediação de solos com alta concentração deste herbicida de elevado potencial de impacto ambiental.

6 CONCLUSÕES

A metodologia de bioprospecção microbiana utilizada permitiu o isolamento de linhagens altamente viáveis como potencial ferramenta na remediação de solo com elevada concentração do herbicida tebuthiuron.

Assim, a presença de tebuthiuron em maiores concentrações elevou a atividade microbiana de isolados de sistemas de cultivo mínimo e convencional, o que confirmou a seletividade desses inóculos na degradação desta molécula quando utilizados isoladamente. Contudo, a produção acumulada de CO₂ do inóculo consorciado não se alterou de acordo com a dose de tebuthiuron, mas foi menor na ausência do herbicida.

Os modelos matemáticos propostos e o estudo cinético da atividade microbiana foram capazes de propor parâmetros confiáveis para orientar a otimização de processos de biodegradação, tais como: a taxa de crescimento específico, o máximo de geração de CO₂ e tempo final de metabolismo microbiano.

O modelo matemático de Gompertz e o diagrama de Pareto evidenciaram o maior potencial de metabolismo do tebuthiuron pelos inóculo bioprospectados em solo de sistema convencional de cultivo de cana-de-açúcar com histórico de aplicação de tebuthiuron.

Por fim, este estudo relatou como inovação a cinética da biodegradação microbiana do tebuthiuron através da modelagem matemática.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, M.; RUDORFF, B. F. T.; FREITAS, R. M.; AGUIAR, D. A.; SUGAWARA, L. M.; MELLO, M. P. Remote sensing time series to evaluate direct land use change of recent expanded sugarcane crop in Brazil. **Sustainability**, New Rochelle, v. 4, n. 4, 574-585, 2012.
- ALVAREZ, R.; DÍAZ, R. A.; BARBERO, N.; SANTANATOGLIA, O. J.; BLOTTA, L. Soil organic carbon, microbial biomass and CO₂-C production from three tillage systems. **Soil Tillage Research**, Amsterdam, v. 33, n. 1, p. 17-28, 1995.
- ASSAD, L. Aproveitamento de resíduos do setor sucroalcooleiro desafia empresas e pesquisadores. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 69, n. 4, p.13-16, out. 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.21800/2317-66602017000400005>. Acesso em: 22 de ago. 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **NBR 14283**: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro, p.8, 1999.
- ANDRIGHETTI, M. S., NACHTIGALL, G. R., QUEIROZ, S. C. N. D., FERRACINI, V. L., & AYUB, M. A. Z. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 38, n. 5, p. 1643-1653, 2014.
- AZANIA, C. A. M.; ROLIM, J. C.; CASAGRANDE, A. A.; LAVORENTI, N. A.; AZANIA, A. A. P. M. Seletividade de herbicidas: I-Utilização do método de testemunhas pareadas em experimento com cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 23, n. 4, p. 661-667, 2005.
- BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Biorremediação de solos contaminados por petróleo: métodos microbiológicos para avaliação de viabilidade e avaliação de campo. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 32, p. 155-164, 1998.
- BARTHA, R. E; PRAMER, D. Características de um frasco e método para medir a persistência e os efeitos biológicos dos pesticidas no solo. **Soil Science**, Philadelphia, v. 100, p. 68-70, 1965.
- BERGMANN, G. E. Impacts of pesticide pollution on soil microbial communities, ecosystem function and human health. **Reference Module In Earth Systems and Environmental Sciences**, p.1-12, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-409548-9.11269-2>. Acesso em: 22 de ago. 2020.
- BETANCOURT-PORTELA, J. M.; BAUTISTA-DUARTE, P. A.; NARVÁEZ-FLÓREZ, S.,; PARRA-LOZANO, J. P. Biodegradation of Chlorothalonil Fungicide in Coastal Areas of the Colombian Caribbean Suitable for Banana Crops. **Tecciencia**, [s. l.], v. 13, n. 25, p. 19-28, 2018.
- BOUWMAN, H.; KYLIN, H.; SEREDA, B.; BORNMAN, R. Níveis elevados de DDT no leite materno: Ingestão, risco, duração da lactação e envolvimento do gênero. **Poluição ambiental**, [s. l.], v. 170, p. 63-70, 2012.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT**: Sistema de Agrotóxico Fitosanitário. 2020. Disponível em:

http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso em: 22 de ago. 2020.

BOZDONGAN, H. Model selection and Akaike's Information Criterion (AIC): The general theory and its analytical extensions. **Psychometrika**. New York, v. 52, n. 3, p. 345-370, set. 1987.

CALDARELLI, C. E.; PERDIGÃO, C. A agroindústria canavieira e seus impactos socioeconômicos na Região Centro-sul do Brasil. **Revista Brasileira de Estudos Regionais e Urbanos**, Curitiba, v. 12, n. 1, p. 35-50, 2018.

CETESB- COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. Solos: determinação da biodegradação de resíduos: método respirométrico de Bartha. **Norma Técnica L6.350**. São Paulo: CETESB, 1990. p.15.

CHRISTOFFOLETI, P. J.; LÓPEZ-OVEJERO, R. F. Resistência das plantas daninhas a herbicidas: definições, bases e situação no Brasil e no mundo. **Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas**, [s. l.], v. 3, p. 9-34, 2008.

CONAB - COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. **Safra 2019/20**, v. 4, n. 3, Brasília, DF, p. 1-77, 2017. Disponível em: <http://www.conab.gov.br>. Acesso em: 22 de ago. 2020.

CARDOSO, R. S.; NOVAES, C. P. Variáveis limnológicas e macroinvertebrados bentônicos como bioindicadores de qualidade da água. **Revista Nacional de Gerenciamento de Cidades**, [s. l.], v. 1, n. 5, 2013.

CORIOLOANO, A. C. F.; MORAIS FILHO, M. C. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **Holos**, Natal, v. 7, p.133-133, 12 nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.15628/holos.2016.4278>. Acesso em: 22 de ago. 2020.

COSGROVE, L.; MCGEECHAN, P. L.; HANDLEY, P. S.; ROBSON, G. D. Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 76, n. 3, p. 810-819, 2010

DAM, R. A.; CAMILLERI, C.; BAYLISS, P.; MARKICH, S. J. Ecological risk assessment of tebuthiuron following application on tropical Australian wetlands. **Human and Ecological Risk Assessment**, New York, v. 10, n. 6, p. 1069-1097, 2004.

DUAH-YENTUMY, S.; KUWATSUKA, S. Microbial degradation of benthiocard, MCPA and 2,4-D herbicides in perfused soils amended with organic matter and chemical fertilizer. **Soil Science Plant Nutrition**, Tokyo, v. 28, p. 19-26, 1982.

DONALD, W. W.; ARCHER, D.; JOHNSON, W. G.; NELSON, K. Zone herbicide application controla as ervas daninhas anuais e reduz o uso residual de herbicida no milho. **Ciência das ervas daninhas**, Viçosa, MG, v. 52, p. 821-833, 2004.

FARIA, A. T.; SARAIVA, D. T.; PEREIRA, A. M.; ROCHA, P. R. R.; DA SILVA, A. A.; SILVA, D. V.; DA SILVA, G. S. Efeitos de herbicidas na atividade da microbiota rizosférica e no crescimento da cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, Darmstadt, v. 30, n. 4, p. 1024-1032, 2014.

FARIA, A. U.; MARIN-MORALES, E.; ANGELIS, D. F. **Manual de protocolos de laboratório**. Rio Claro: Departamento de Bioquímica e Microbiologia - UNESP - IB, 2013.

FARIA, A. T.; GONÇALVES, B. F. D. S.; SARAIVA, D. T.; SOUZA, M. D. F.; SILVA, A. A. D.; SILVA, D. V. Atividade de microorganismos do solo da rizosfera de cultivares de cana-de-açúcar após a pulverização de herbicidas: diurônio, tebutiurão, ametrião e diurônio + hexazinona. **Revista Caatinga**, Mossoro, v. 31, p. 593-601, 2018.

FARIA, M. A.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D.; FERREIRA, L. C.; MONTAGNOLLI, R. N.; PRADO, E. P.; FERRARI, S. Influence of tebuthiuron and vinasse under soil microbiota activity in sugarcane crop. **International Journal of Development Research**, Ikot Ekpene, v. 9, n. 7, p. 28861-2886, 2019.

FASANELLA, C. C.; CARDOSO, E. J. B. N. Biorremediação. In: ANDREOTE F. D.; CARDOSO, E. J. B. N. (org.). **Microbiologia do solo**. 2. ed. Piracicaba: ESALQ, v. 1, p. 197-210, 2016

FERREIRA, L. C. **Fitorremediação de solo com aplicação de tebuthiuron e vinhaça por espécies de interesse agrônomo**. 2019. 68 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira, 2019.

FRANCISCO, W. C.; DE QUEIROZ, T. M. Biorremediação. **Nucleus**, Paris, v. 15, n. 1, p. 249-256, 2018.

FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. Uma visão da biorremediação do solo através da respirometria. **Environment International**, Oxford, v. 31, p. 179-183, 2005.

FOLLET, R. F.; SCHIMEL, D. S. Effect of tillage practices on microbial biomass dynamics. **Soil Science Society of American Journal**, Madison, v. 53, n. 4, p. 1091-1096, 1989.

FLORES, F.; COLLIER, C. J.; MERCURIO, P.; NEGRI, A. P. Phytotoxicity of four photosystem II herbicides to tropical seagrasses. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, 2013.

GARCÍA-DELGADO, C.; BARBA-VICENTE, V.; MARÍN-BENITO, J. M.; IGUAL, J. M.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S. Influence of different agricultural management practices on soil microbial community over dissipation time of two herbicides. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, n. 646, p. 1478-1488, 2019.

GAW, S. K.; PALMER, G.; KIM, N. D.; WILKINS, A. L. Provas preliminares de que o cobre inibe a degradação do DDT para o DDE em solos de tubulações e de pomares de pedreiras na região de Auckland, Nova Zelândia. **Poluição ambiental**, [s. l.], v. 122, p. 1-5, 2003.

GOLDEMBERG, J.; COELHO, S.; GUARDABASSI, P. The sustainability of ethanol production from sugarcane. **Energy Policy**, London, v. 36, p. 2086-2097, 2008.

GRAVES, D. A.; LANG, C. A.; LEAVITT, M. E. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. **Applied biochemistry and biotechnology**, Heidelberg, v. 28, n. 1, p. 813-826, 1991.

HENDRIX, P. F.; HAN, C. R.; GROFFMAN, P. M. Soil respiration in conventional and no-tillage agroecosystems under different winter cover crop rotations. **Soil Tillage Research**, Amsterdam, v. 12, n. 2, p. 135-148, 1988.

HUSSAIN, S.; ARSHAD, M.; SPRINGAEL, D.; SØRENSEN, S.R.; BENDING, G. D.; DEVERS-LAMRANI, M.; MAQBOOL, Z.; LAURENT, M. F. Abiotic and biotic processes governing the fate of phenylurea herbicides in soils: a review. **Critical reviews in environmental science and technology**, New York, v. 45, n. 18, p. 1947-1998, 2015.

IBAMA - Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais renováveis. **Manual para requerimento de avaliação ambiental: agrotóxicos e afins**. Brasília: IBAMA, p. 180, 2009.

ISLAM, F.; WANG, J.; FAROOQ, M.A.; KHAN, M.S.S.; XU, L.; ZHU, J.; ZHOU, W. Potential impact of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on humans and ecosystems. **Environment International**, Oxford, v. 111, p. 332-351, 2018.

JIAN, X.; OLEA, R. A.; YU, Y. S. Semivariogram Modeling by Weighted Least Squares: **Computers & Geosciences**, Oxford, v. 22, p. 387-397, 1996.

KANISSERY, R. G.; SIMS, G. K. Biostimulation for the greatest degradation of herbicides in the soil. **Applied and Environmental Soil Science**, London, v. 2011, n. e843450, 2011.

KAPUSTA, P.; SZAREK-ŁUKASZEWSKA, G.; STEFANOWICZ, A. M. Direct and indirect effects of metal contamination on soil biota in a post-mine and Zn-Pb foundry area (S Poland). **Environmental pollution**, Oxford, v. 159, p. 1516-1522, 2011.

KHANDARE, S. T.; THAKUR, N. V. Multi-level thresholding and quantization for segmentation of color images. In: ZHANG, Y. D.; MANDAL, J. K.; SO-IN, C.; THAKUR, N.V. (ed.) **Smart trends in computing and communications** - smart innovation, systems and technologies Singapore: Springer, 2020. p. 487-496

KÖPPEN, W. **Climatologia**: conunestudio de los climas de latierra. México: Fondo de Cultura Económica, 1948. 479 p.

LEE, S. E. Purification and characterization of a carboxylesterase from a chlorine resistant *Oryzaephilus surinamensis* strain (Coleoptera: Silvanidae). **Australian Journal of Entomology**, Richmond, v. 50, p. 187-19, 2011.

LEWIS, S. E.; SCHAFFELKE, B.; SHAW, M.; BAINBRIDGE, Z. T.; ROHDE, K. W.; KENNEDY, K. Avaliando os riscos aditivos da exposição a herbicidas PSII à Grande Barreira de Corais. **Boletim 65 de Poluição Marinha**, [s. l.], p. 280-291, 2012.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D. **SAS System for Mixed Models**. Cary: Statistical Analysis System Institute, 2002. 633 p.

MCELREATH, R. Rethinking: Statistical Rethinking book package. **R package version**, [s. l.], v. 1, 2016.

MACIEL, C. D. G.; POLETINE, J. P.; VELINI, E. D.; AMARAL, J. G. C.; ZANI, L. P.; SANTOS, R. F.; RODRIGUES, M.; RAIMONDI, M. A.; RIBEIRO, R. B. Possibilidade de

aplicação de misturas de herbicidas de ação total com jato dirigido em mamoneira de porte anão. **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 26, n. 2, p. 457-464, 2008.

MARCATO, A. C. C.; YABUKI, A. T.; FONTANETTI, C. S. Nickel exposure promotes osmoregulatory disturbances in *Oreochromis niloticus* gills: histopathological and energy dispersive spectrometry analysis. **Environmental Science and Pollution Research**, Heidelberg, v. 21, n. 22, p. 13095-13102, 2014.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLY, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. **Geoderma**, Amsterdam, v. 147, p. 56-62, 2008.

MICKELSON, S. K.; BOYD, P.; BAKER, J. L.; AHMED, S. I. Tillage and herbicide incorporation effects on residue cover, runoff, erosion, and herbicide loss. **Soil and Tillage Research**, Amsterdam, v. 60, p. 55-66, 2001.

MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 586, p. 576-597, 2017.

MORTON, D. M.; HOFFMAN, D. G. Metabolism of a new herbicide, tebuthiuron {1-[5-(1, 1-dimethylethyl)-1, 3, 4-thiadiazol-2-yl]-1, 3-dimethylurea}, in mouse, rat, rabbit, dog, duck, and fish. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A Current Issues**, New York, v. 1, n. 5, p. 757-768, 1976.

NASCIMENTO, A. **Eficácia de herbicidas aplicados em pré-plantio incorporado na cultura da cana-de-açúcar**. 2016. 37 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Engenharia, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Ilha Solteira, 2016.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem Substance Record for SID 376227982, TEBUTHIURON, Source: Gulick Lab, Department of Structural Biology, University at Buffalo**. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/substance/376227982>. Acesso em: 22 de ago. 2020.

NETO, M. D. de C.; SOUZA, M. de F.; SILVA, D. V.; FARIA, A. T.; SILVA, A. A. da, PEREIRA, G. A. M.; FREITAS, M. A. M. Lixiviação de imidazolinonas em solos sob um sistema de campo livre. **Arquivos de Agronomia e Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 63, p. 897-906, 2017.

NEVES, A. B. R. **Influência da associação de vinhaça e tebuthiuron na microbiologia e ecotoxicidade de solo cultivado com cana-de-açúcar em manejo orgânico**. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Engenharia Agrônômica) Faculdade de Ciências Agrárias e Tecnológicas, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Dracena, 2017.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA J. R. R. S.; CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Ominipax, 2011. v. 20, cap. 11.

PELEA, L. P.; FERNÁNDEZ, E. B.; HERRERO, J. V. I.; PALENZUELA, B. V.; HERNÁNDEZ, M. T. C. Predicción de valores genéticos aditivos en genotipos de guayabo (*Psidium guajava*) (Myrtaceae). **Revista del Jardín Botánico Nacional**, [s. l.], v. 40, p. 23-32, 2019.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M. D.; CECOM, P. R.; SANTOS, J. B. D.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. D. O.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, MG, v. 29, n. 4, p. 627-634, 2005.

POSE-JUAN, E.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J.; HERRERO-HERNÁNDEZ, E.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S. Application of mesotrione at different doses in an amended soil: dissipation and effect on the soil microbial biomass and activity. **Science of the Total Environment**, Amsterdam, n. 536, p. 31-38, 2015.

PRETE, M. C.; DE OLIVEIRA, F. M.; TARLEY, C. R. T. Assessment on the performance of nano-carbon black as an alternative material for extraction of carbendazim, tebuthiuron, hexazinone, diuron and ametryn. **Journal of environmental chemical engineering**, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 93-102, 2017.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, 2016.

RANI, M. S.; LAKSHMI, K. V.; DEVI, P. S.; MADHURI, R. J.; ARUNA, S.; JYOTHI, K.; NARASIMHA, G.; VENKATESWARLU, K. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth response. **African Journal of Microbiology Research**, Sapele, v. 2, p. 26-31, 2008.

ROCHA, R. S.; BEATI, A. A. G. F.; VALIM, R. B.; STETER, J. R.; BERTAZZOLI, R.; LANZA, M. R. V. Avaliação dos subprodutos de degradação do herbicida ametrina obtidos via processos oxidativos avançados/evaluation of degradation by-products of herbicide ametrin obtained by advanced oxidative processes. **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, Tupã, v. 12, n. 1, p. 52-67, 2018.

RODRIGUES, M. N.; ALMEIDA, F. S. Tebuthiuron e Hexazinona. In: GUIA de herbicidas. Londrina: IAPAR. p. 102-697, 2011

SIBER, R.; STAMM, C.; REICHERT, P. Modeling potential herbicide loss to surface waters on the Swiss plateau. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 91, n. 1, p. 290-302, 2009.

SOUTO, K. M.; JACQUES, R. J. S.; AVILA, L. A. D.; MACHADO, S. L. D. O.; ZANELLA, R.; REFATTI, J. P. Biodegradação dos herbicidas imazetapir e imazapique em solo rizosférico de seis espécies vegetais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 43, n. 10, p. 1790-1796, 2013.

SPAROVEK, G.; BARRETTO, A.; BERNDEN, G.; MARTINS, S. Environmental, land-use and economic implications of Brazilian sugarcane expansion 1996–2006. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, Dordrecht, v. 14, n. 3, p. 285-298, 20 nov. 2008.

SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAC, L.; PIOTROWSKA-OCYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, Amsterdam, v. 132, p. 121-128, 2014.

TADDY, M. Stochastic Gradient Descent. **Business Data Science: Combining Machine Learning and Economics to Optimize, Automate, and Accelerate Business Decisions**. New York: McGraw-Hill, 2019. p. 303-307.

TJØRVE, K. M. C.; TJØRVE, E. O uso de modelos Gompertz em análises de crescimento, e nova abordagem de modelos Gompertz: Um acréscimo à família Unified-Richards. **PLoS One**, San Francisco, v. 12, e0178691, 2017.

UNICA - UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO. **Alimento e energia sustentável do brasil para o mundo**. São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.unica.com.br>. Acesso em: 12 ago. 2019.

VILLAVERDE, J.; RUBIO-BELLIDO, M.; MERCHAN, F.; MORILLO, E. Bioremediation of diuron-contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. **Journal of Environmental Management**, London, v. 188, p. 379-386, 2017.

WALTER, A.; DOLZAN, P.; QUILODRÁN, O.; DE OLIVEIRA, J. G.; DA SILVA, C.; PIACENTE, F.; SEGERSTEDT, A. Sustainability assessment of bio-ethanol production in Brazil considering land use change, GHG emissions and socio-economic aspects. **Energy Policy**, London, v. 39, n. 10, p. 5703-5716, out. 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enpol.2010.07.043>. Acesso em: 22 de ago. 2020.

WAN, R.; WANG, Z.; XIE, S. Dinâmica das comunidades de bactérias e microorganismos amônia-oxidantes em resposta à atenuação da simazina no solo agrícola. **Ciência do Ambiente Total**, [s. l.], n. 472, p. 502-508, 2014.

WANG, J.; AWAYA, J.; ZHU, Y.; MOTOOKA, P. S.; NELSON, D. A.; LI, Q. X. Tests of Hexazinone and Tebuthiuron for Control of Exotic Plants in Kauai, Hawaii. **Forests**, Basel, v. 10, n.7, p. 576, 2019.

WOLFINGER, R. D. Covariance estruture selection in general mixed models. **Communications in Statistics**, [s. l.], v. 22, p. 1079-1106, 1993.

WOLFINGER, R.; CHANG, M. Comparing the SAS GLM and mixed procedures for repeated measures. In: ANNUAL SAS USERS GROUP CONFERENCE 20, 1995, Cary. **Proceedings** [...]. Cary: SUG, 1995.

QIAO, J.; ZHANG, C.; LUO, S.; CHEN, W. Bioremediation of highly contaminated oilfield soil: Bioaugmentation for enhancing aromatic compounds removal. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, Beijing, v. 8, n. 2, p. 293-304, 2014.

ZHU, J.; FU, L.; JIN, C.; MENG, Z.; YANG, N. Study on the Isolation of Two Atrazine-Degrading Bacteria and the Development of a Microbial Agent. **Microorganisms**, Basel, v. 7, p. 80, 2019.

ZHU, J.; ZHAO, Y.; RUAN, H.; ZHU, J.; ZHAO, Y.; E RUAN, H. Comparative study on the biodegradation of methyl chlorpyrifos by *Bacillus megaterium* CM-Z19 and *Pseudomonas syringae* CM-Z6. **Proceedings of the Brazilian Academy of Sciences**, Washington, v. 91, p. 3, 2019.