



ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO COM O HERBICIDA
AMETRINA E ADIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE”**

***“EVALUATION OF MICROBIAL ACTIVITY IN SOIL WITH THE HERBICIDE
AMETRYN AND ADDITION OF BIOFERTILIZER”***

Limeira

2013

i

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE TECNOLOGIA**

ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIANA EM SOLO COM O HERBICIDA
AMETRINA E ADIÇÃO DE BIOFERTILIZANTE”**

***“EVALUATION OF MICROBIAL ACTIVITY IN SOIL WITH THE HERBICIDE
AMETRYN AND ADDITION OF BIOFERTILIZER”***

Orientador(a)/Supervisor: Profa. Dra. Cassiana Maria Reganhan Coneglian

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós Graduação da Faculdade de
Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestra em
Tecnologia na área de Tecnologia e Inovação.

Master thesis presented to the Technology Post graduation Program of the School of
Technology of the University of Campinas to obtain the Master grade in Technology and
Innovation.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO
DEFENDIDA PELA ALUNA ANA PAULA JUSTINIANO RÉGO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CASSIANA MARIA REGANHAN CONEGLIAN
Assinatura do Orientador

LIMEIRA

2013

iii

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR VANESSA EVELYN COSTA CRB-8/8295
BIBLIOTECA UNIFICADA FT/CTL
UNICAMP

Régo, Ana Paula Justiniano, 1988-
R265a Avaliação da atividade microbiana em solo com o
herbicida ametrina e adição de biofertilizante / Ana Paula
Justiniano Régo. -
Limeira, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cassiana Maria Reganhan Coneglian.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Tecnologia.

1. Atividade microbiana. 2. Herbicidas. 3. Biofertilizantes.
4. Biorremediação. I. Reganhan-Coneglian, Cassiana Maria.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Tecnologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Evaluation of microbial activity in soil with the herbicide ametryn and
addition of biofertilizer.

Palavras-chave em inglês (Keywords):

- 1- Microbial activity
- 2- Herbicides
- 3- Biofertilizers
- 4- Bioremediation

Área de concentração: Tecnologia e Inovação

Titulação: Mestra em Tecnologia

Banca examinadora: Cassiana Maria Reganhan Coneglian, Carmenlúcia Santos
Giordano Penteadó, Carlos Renato Corso.

Data da Defesa: 26-02-2013

Programa de Pós-Graduação em Tecnologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM TECNOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: TECNOLOGIA E INOVAÇÃO

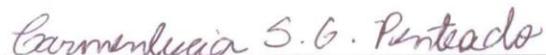
Avaliação da atividade microbiana em solo com o herbicida ametrina e adição de biofertilizante

Autor: Ana Paula Justiniano Régo

A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



Profª. Drª. Cassiana Maria Reganhan Coneglian
FT/UNICAMP



Profª. Drª. Carmenlúcia Santos Giordano Penteadó
FT/UNICAMP



Prof. Dr. Carlos Renato Corso
UNESP/IB

Dedico este trabalho ao meu Deus Cristo Jesus.

AGRADECIMENTOS

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

À minha família, principalmente os meus pais João e Marina e meus avós José e Jovelina.

À minha orientadora Prof.^aDr.^a. Cassiana Maria Reganhan Coneglian, pela oportunidade em ser a sua orientada, concedendo valiosos ensinamentos e além de tudo foi uma grande amiga.

À Faculdade de Tecnologia / UNICAMP, por me conceder conhecimentos para trilhar o caminho acadêmico, como também em conceder o espaço do Laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental (LEAL), para que eu pudesse realizar os experimentos necessários.

Agradeço aos técnicos do laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental (LEAL) da Faculdade de Tecnologia, Ádria Caloto de Oliveira, Gilberto de Almeida, Anjaína Fernandes de Albuquerque, Josiane Ap. de Souza Vendemiatti e Geraldo Dragoni Sobrinho, pela amizade e colaboração nos experimentos.

Agradeço à Anita Inafuku e a todos os meus colegas do laboratório de Ecotoxicologia Aquática e Microbiologia Ambiental (LEAL) da Faculdade de Tecnologia pela amizade e cooperação.

Agradeço a Capes pela bolsa concedida.

“O temor do Senhor é o princípio do saber, mas os loucos desprezam a sabedoria e o ensino” Provérbios 1:7

RESUMO

A ametrina é um herbicida utilizado em culturas de cana-de-açúcar no período de pré e pós emergência das plantas daninhas. É um composto persistente no meio ambiente, podendo lixiviar para água subterrânea e escoar para águas superficiais, provocando impacto na comunidade aquática. No presente trabalho avaliou-se a atividade microbiana em solo com histórico de aplicação da ametrina em cultivo de cana de açúcar, acrescidos de concentrações de solução de ametrina e biofertilizante comercial Microgeo. Coletou-se três amostras de solo em área de cultivo de cana de açúcar, sendo o primeiro solo caracterizado como argiloso, o segundo arenoso, o terceiro arenoso, mas esterilizado em estufa a 106°C. As concentrações utilizadas da ametrina nos experimentos foram de 8 e 12 µg/mL e, as de biofertilizante foram 1, 5 e 10%. Para avaliar a atividade microbiana do solo utilizou-se o método respirométrico de Bartha que quantifica a geração de CO₂ em mg/L e após o processo de biodegradação o método enzimático de hidrólise de FDA para avaliar a estimativa da atividade microbiana. Quantificou-se a população de bactérias heterotróficas e fungos expressos em UFC/g de solo antes e após o experimento de respirometria. Realizou-se teste de toxicidade com o organismo-teste *Daphnia similis* exposta ao herbicida ametrina nas concentrações 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/L, do biofertilizante nas concentrações 1, 10 e 100% e do solo antes e após o experimento de respirometria, utilizando a fração solúvel. Realizou-se teste de fitotoxicidade com a semente *Lactuca sativa* antes e após os experimentos de respirometria, utilizando a fração solúvel do solo. De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que a produção de CO₂ foi maior em solo arenoso e menor em solo argiloso e em solo estéril. A estimativa microbiana pelo método de FDA foi maior em solo argiloso e arenoso e menor em solo estéril. O herbicida ametrina apresentou toxicidade ao organismo *Daphnia similis*. Antes e após os experimentos de respirometria, o solo não apresentou efeitos tóxicos à *Daphnia similis*, não sendo possível calcular o CE50. Os solos antes e após experimentos de respirometria não apresentaram inibição na germinação e alongamento das raízes de *Lactuca sativa*. Conclui-se que o herbicida ametrina como citado na literatura é lentamente biodegradado no solo e a adição de biofertilizante Microgeo não corroborou com a sua biodegradação, mas favoreceu a atividade microbiana do solo.

Palavras-chave: atividade microbiana; herbicidas; biofertilizantes; biorremediação

ABSTRACT

The ametryn is an herbicide used on crops of sugar cane in the pre and post emergence weed. It is a compound persistent in the environment and can leach into groundwater and surface water to drain, causing impact on the aquatic community. In this study we evaluated the microbial activity in soil with a history of application of ametryn in cultivation of sugar cane, plus concentrations of ametryn solution and commercial bio fertilizer Microgeo. Three samples were collected from soil in sugar cane cultivation area, the first being characterized as clayey soil, the second sandy, and the third gritty but sterilized in an oven at 106 °C. The concentrations used in the experiments of ametryn were 8 and 12 µg / mL, and the bio fertilizers were 1, 5 and 10 %. To evaluate the microbial activity in the soil it was used the Bartha respirometric method that quantifies the CO₂ generation in mg / L and after the biodegradation the process of the enzymatic hydrolysis of FDA to evaluate the estimation of microbial activity. We quantified the population of heterotrophic bacteria and fungi expressed in CFU / g of soil before and after the respirometry experiment. We held a toxicity test with the *Daphnia similis* organisms test exposed to herbicide ametryn at 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/L of bio fertilizer concentrations 1, 10 and 100% and soil before and after the respirometry experiment, using the soluble fraction. A test of fitotoxicity was performed with *Lactuca sativa* seed before and after the respirometry experiments using the soluble fraction of the soil. According to the obtained results it can be concluded that the CO₂ production was higher on sandy soil and smaller in clayey soil and sterile soil. A method for estimating microbial FDA was higher in clay soil and sandy soil and lower in sterile. The herbicide ametryn showed toxicity to the organism *Daphnia similis*. Before and after the respirometry experiments, the soil showed no toxic effects to the *Daphnia simillis*, it is not possible to calculate the EC50. The soils, before and after respirometry experiments showed no inhibition on seed germination and root elongation of *Lactuca sativa*. It is concluded that the herbicide ametryn as quoted in the literature is slowly biodegraded in soil and the addition of the bio fertilizer Microgeo has not substantiated its biodegradation, but favored the soil microbial activity.

Keywords: microbial activity; herbicides; biofertilizers; bioremediation

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURA	xiv
LISTA DE TABELA	xv
1.INTRODUÇÃO	1
2.OBJETIVOS	3
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
5.RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	60
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
LISTA DE FIGURA	xiv
LISTA DE TABELA	xv
1.INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1 Objetivos gerais	3
2.2 Objetivos específicos	3
3.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1Herbicidas triazínicos	4
3.2 Comportamentos do herbicida no solo	6
3.2.1 Processo de retenção	9
3.2.2 Transformação	10
3.2.3 Transporte	12
3.2.4 Biodegradação	16
3.3 Biofertilizantes	21
3.4 Respirometria	24
3.5 Herbicidas e Ecotoxicologia	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1.1 Ametrina	28
4.1.2 Biofertilizante	28
4.1.3 Coleta de solo	28
4.1.4 Respirometria de Bartha	29
4.1.5 Vidrarias, reagentes e soluções	29
4.1.6 Organismo teste com <i>Daphnia similis</i> e <i>Lactuca sativa</i>	29
4.2 Métodos	29
4.2.1 Análise granulométrica	29

4.2.2	Análise físico química	30
4.2.3	Obtenção da fração solúvel do solo em água	32
4.2.4	Quantificação da microbiota do solo	32
4.2.5	Estimativa da atividade microbiana por FDA	32
4.2.6	Experimento de respirometria	33
4.2.7	Teste de toxicidade com organismo <i>Daphnia simillis</i>	35
4.2.8	Ensaio de fitotoxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i>	36
4.2.9	Quantificação da ametrina no solo	36
4.2.10	Análise estatística	37
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO	38
5.1	Resultados das características do solo	38
5.2	Resultados da Respirometria de Bartha	40
5.3	Análise cromatográfica	53
5.4	Testes de toxicidade aguda com <i>Daphnia simillis</i>	53
5.5	Teste de toxicidade com semente de <i>Lactuca sativa</i>	56
6.	CONCLUSÃO	60
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

1.	Estrutura química da ametrina(USEPA, 2005)	4
2.	Destino dos herbicidas no ambiente (TOMITA, 2003)	6
3.	Ciclo da matéria orgânica do solo (COSTA, 2004)	8
4.	Degradação do herbicida atrazina (Adaptado de Satsuma, 2010)	17
5.	Degradação do herbicida ametrina (Adaptado de Satsuma, 2010)	18
6.	Metabólitos do herbicida ametrina (SEVERINO e SILVA, 2012)	19
7.	Geração de CO ₂ acumulado durante 47 dias de incubação do solo argiloso, à temperatura de 26± 2°C (Experimento 1)	40
8.	Geração de CO ₂ acumulado durante 30 dias de incubação, em solo arenoso à temperatura de 26± 2°C (Experimento 2).	44
9.	Geração de CO ₂ acumulado durante 104 dias de incubação, à temperatura de 26± 2°C (Experimento 3)	48

LISTA DE TABELAS

1. Características físico-químicas do herbicida ametrina (Adaptado de USEPA, 2005)	4
2. Classificação do herbicida quanto à sua persistência (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006)	15
3. Tratamentos realizados no experimento de respirometria do herbicida ametrina no solo acrescido de biofertilizante Microgeo- Experimento 1 com incubação de 47 dias à temperatura de $26\pm 2^{\circ}\text{C}$	34
4. Tratamentos realizados no experimento de respirometria do herbicida ametrina no solo acrescido de biofertilizante Microgeo- Experimento 2 com incubação de 30 dias e, experimento 3 com 104 dias de incubação à $26\pm 2^{\circ}\text{C}$	35
5. Composição granulométrica dos solos coletado de 0 a 20 cm de profundidade, em lavoura de cana de açúcar, na região norte de Piracicaba-SP na primeira coleta, e região leste de Piracicaba-SP na segunda e terceira coletas	38
6. Características físico químicas do solo da segunda coleta, em lavoura de cana de açúcar, na região leste de Piracicaba-SP	39
7. Características físico químicas do solo da terceira coleta, em lavoura de cana de açúcar, na região leste de Piracicaba-SP	39
8. Resultados do experimento de respirometria (CO_2 acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 1)	42

9. Resultado da respirometria (CO ₂ acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 2)	46
10. Resultado da respirometria (CO ₂ acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 3)	50
11. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Daphnia simillis</i> , antes e após o 1º experimento de respirometria	53
12. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Daphnia simillis</i> , antes e após o 2º experimento de respirometria	54
13. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Daphnia simillis</i> , antes e após o 3º experimento de respirometria	55
14. Germinação relativa e índice de germinação de <i>Lactuca sativa</i> antes e após o segundo experimento de respirometria	57
15. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste <i>Daphnia simillis</i> , antes e após o 3º experimento de respirometria	58

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos no mundo, devido a sua imensa área cultivada e produtividade, como soja, cana de açúcar e milho.

O conceito de produção agrícola tem sido modificado em decorrência do aumento na demanda mundial por alimentos. Os agricultores consideram os pesticidas como uma ferramenta essencial para garantir a produção de culturas, para manter a demanda de alimentos para a crescente população mundial, pois cerca de 26-40% de toda safra eram perdidas com a concorrência com as plantas daninhas e pragas. Como resultado desse aumento na produção de alimentos, a utilização de pesticidas intensificou-se nas últimas décadas, pois o seu uso ainda é a principal estratégia na agricultura para o controle e a prevenção de pragas nas culturas, garantindo alimentos com qualidade e em quantidades capazes de suprir a demanda populacional (GRAHAM, 2006).

De acordo com Araújo (2002) “agroquímicos são produtos utilizados na agricultura com a finalidade de controle fitossanitário, aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento, ou seja, são substâncias utilizadas na agricultura destinadas à prevenção e, ao controle de qualquer praga, as quais resultam no prejuízo da produção, transporte e comercialização de alimentos, da madeira e de produtos agrícolas”.

Os herbicidas são os grupos mais utilizados de pesticidas, podem agir em contato com a planta ou serem translocados para dentro da mesma, sendo estes mais importantes para combater plantas daninhas perenes. A maior parte dos pesticidas aplicados nas culturas acaba atingindo as águas e o solo, resultando na contaminação ambiental.

A ametrina (2 thiomethyl-4-6-ethylamino isopropyls-triazina) é um herbicida pertencente ao grupo da s-triazinas muito utilizado em plantações de cana-de-açúcar, milho, abacaxi, entre outras, em períodos de pré e pós emergência para o controle de plantas daninhas e gramíneas. É um herbicida com forte potencial de contaminação de águas

superficiais e subterrâneas em decorrência da sua persistência ambiental, lixiviação e escoamento superficial.

A aplicação de herbicidas altera a comunidade microbiana no solo, provocando desequilíbrio em suas funções no ambiente, como decomposição da matéria orgânica e ciclagem de nutrientes. Após um período pode ocorrer o estabelecimento de um equilíbrio populacional semelhante ao seu estado inicial.

No entanto, os pesticidas podem influenciar positivamente ou negativamente a dinâmica da microbiota no solo, as quais por sua vez influenciam o comportamento dos nutrientes presentes no solo, podendo resultar na evolução da biomassa no solo, no potencial de solubilização de compostos inorgânicos como também o aumento da quantidade de CO₂ presentes no solo.

Vários estudos na literatura tais como Medeiros e Lopes (2006), Souza e Resende (2003), Santos (1992) e Bettiol *et al.* (1998), têm aplicado substratos orgânicos com a finalidade de estimular a microbiota local para auxiliar na biodegradação dos compostos xenobióticos descartados no solo.

Os biofertilizantes são compostos orgânicos ricos em nutrientes e contém biomassa microbiana, capazes de suprir nutricionalmente o solo, auxiliando na atividade metabólica da comunidade local. O biofertilizante Microgeo vem sendo utilizado na agricultura desde o ano de 2002, como alternativa viável de fertilização do solo a partir de fontes orgânicas.

Diante do exposto, tornam-se necessários estudos para avaliar a degradação da ametrina no solo com a adição de biofertilizante, pois o uso em excesso desse herbicida pode acarretar em vários problemas ambientais, tais como contaminação de águas superficiais e subterrâneas, e os biofertilizantes podem ser coadjuvantes na biodegradação, tendo em vista suas características nutricionais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho tem por objetivo a avaliar a atividade microbiana no solo na presença do herbicida ametrina e adição de biofertilizante comercial Microgeo.

2.2 Objetivos específicos

-Avaliar a atividade microbiana do solo mediante aplicação do herbicida ametrina e adição do biofertilizante Microgeo, mediante os métodos:

- Respirometria de Bartha;
- Método enzimático da Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA);
- Quantificação de ametrina e metabólitos por Cromatografia Líquida com detecção por Espectrometria de Massas.

- Avaliar a toxicidade do solo antes e após método respirométrico de Bartha, mediante os organismos-teste *Daphniasimilis* e *Lactuca sativa*.

- Avaliar a toxicidade do herbicida ametrina mediante os organismos-teste *Daphniasimilis*.

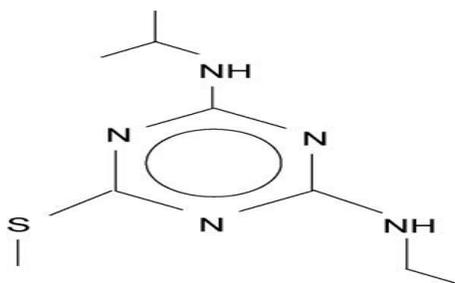
- Avaliar a atividade microbiana de solo estéril mediante a aplicação do herbicida ametrina e do biofertilizante Microgeo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Herbicidas triazínicos

O herbicida ametrina ($C_9H_{17}N_5S$) (Figura 1) pertence à família das s-triazinas, constitui um dos cinco herbicidas mais utilizados no cultivo de cana-de-açúcar no Brasil. A ametrina é um herbicida seletivo, sendo aplicado no controle de plantas daninhas, no período de pré e pós-emergência com características expressas na Tabela 1. Este herbicida apresenta a capacidade de inibir a fotossíntese e outros processos enzimáticos, sendo absorvido pelas folhas e raízes com translocação no xilema e acumulação nos meristemas apicais e nos cloroplastos (USEPA, 2005).

Figura 1. Estrutura química da ametrina.



Fonte: (GAO *et al.*, 2009).

TABELA 1. Características físico-químicas do herbicida ametrina

Nome comum	Meia Vida (Dias)	Solubilidade (H_2O) a 20-25°C ($mol L^{-1}$)	Pressão de vapor 10^6 mm Hg a 25°C	pKa 21°C
Ametrina	70-129	185	2,74	4,1

Fonte: (Adaptação de USEPA, 2005)

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

A ametrina é persistente e bioacumula-se no ambiente provocando impacto significativo nos ecossistemas terrestre e aquático (FARRÉ *et al.*, 2002).

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

Em 1964, o herbicida ametrina foi registrado para uso de controle de plantas daninhas nos Estados Unidos. A USEPA (2005) estima que até 380.000 libras de ametrina são utilizados por ano, principalmente na culturas de milho, abacaxi e cana de açúcar.

A ametrina é um potente contaminante da água, pois apresenta as seguintes características: elevado potencial de escoamento, média persistência em solo ocorrendo pequenos deslocamentos para as regiões ao seu redor, hidrólise lenta, de baixa a moderada solubilidade em água e a forte adsorção a matéria orgânica (USEPA, 2005).

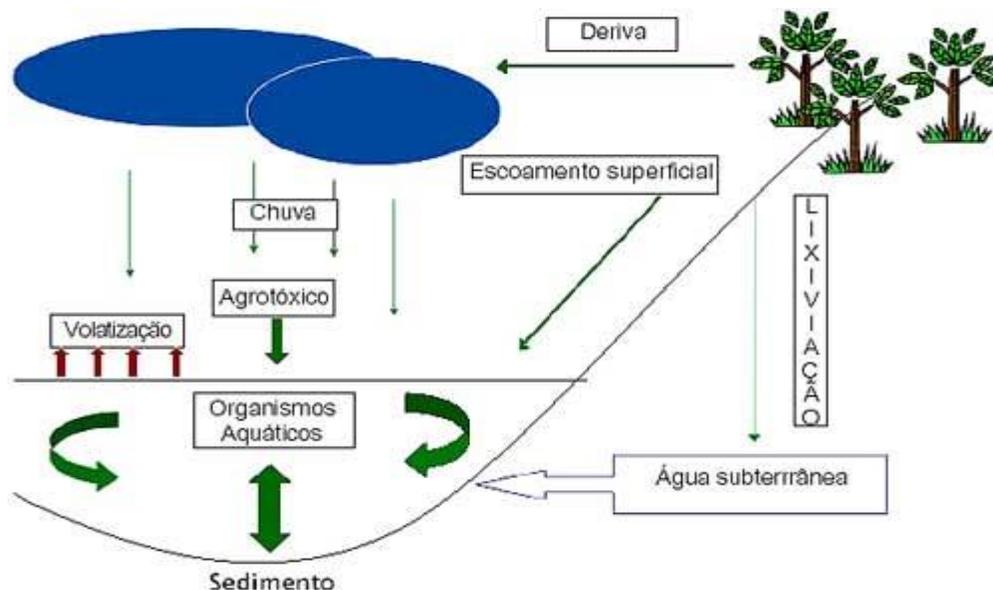
A biodegradação da ametrina ocorre principalmente por cometabolismo, ou seja, quando o composto orgânico é metabolizado por micro-organismos, mas este não serve como nutriente ou fonte de energia para o cometabolizante, ou seja, não responde em crescimento microbiano (PRATA *et al.*, 2001).

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

3.2 Comportamentos dos herbicidas no solo

Após a aplicação do herbicida ele pode sofrer processo de retenção, como adsorção e absorção, processos de transformação, como a degradação biótica e abiótica, e processos de transporte, como a lixiviação, volatilização e escoamento superficial (Figura 2), sendo de extrema importância o conhecimento desses processos, para delinear projetos de monitoramento ambiental (SPADOTTO, MATALLO e GOMES, 2003).

Figura 2. Destino dos herbicidas no ambiente



Fonte: (TOMITA, 2003).

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

Propriedades físico-químicas dos herbicidas como a pressão de vapor (Pva), a solubilidade em água (S) e o coeficiente de partição octanol-água (Kow), também são fatores que influenciam no comportamento dos mesmos no solo.

A pressão de vapor é a medição da quantidade de pressão requerida à temperatura em que a fase de vapor está em equilíbrio com a fase líquida. Portanto, quanto maior a pressão de vapor de um herbicida, maior será a sua volatilização, resultando em menor contaminação do solo, entretanto poderá causar poluição atmosférica (BARRIGOSI, LANNA e FERREIRA, 2005).

A solubilidade em água é a quantidade máxima em que um composto orgânico se dissolve em água a certa temperatura e pH (BARRIGOSI *et al.*, 2005). Herbicidas que apresentam alta solubilidade em água, baixa sorção e alta lixiviação são mais propensos a causarem a contaminação dos corpos d'águas (GUIMARÃES, 1987).

O coeficiente de partição octanol-água (Kow) é a medida da lipofilicidade de um composto, como a razão da concentração do mesmo, após dissolução em um sistema de duas fases, formadas por dois solventes imiscíveis, água e octanol (SILVA e FERREIRA, 2003). Portanto, é a concentração de herbicida presente na fase n-octanol saturada em água e a concentração saturada em água em n-octanol (BARRIGOSI *et al.*, 2005).

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

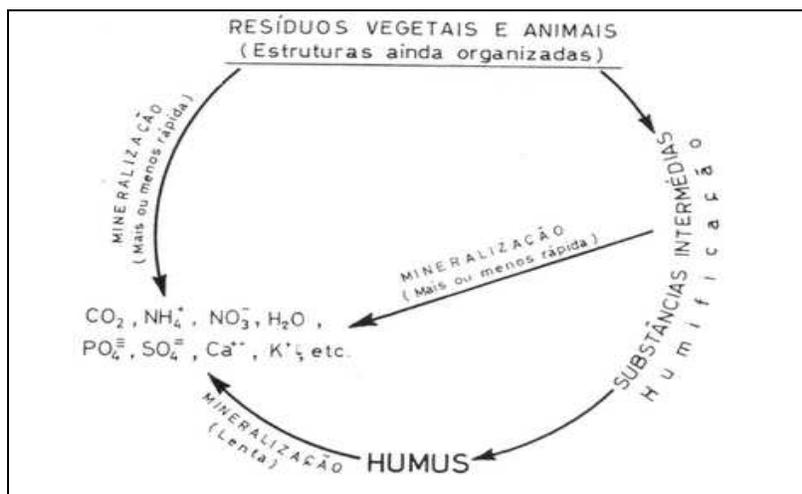
Segundo Costa (2004), “o solo é definido como o meio natural para o desenvolvimento das plantas terrestres, tal como se formou (solo dito natural), ou mais ou menos modificado como resultado da sua utilização pelo homem. Desta forma, propriedades físico-químicas do solo como os minerais argila, o teor de matéria orgânica, o potencial hidrogênionico (pH) e a capacidade de troca de cátions (CTC), também são fatores que influenciam no comportamento dos herbicidas no ambiente”.

Os minerais presentes no solo, tais como o alumínio, ferro, manganês, cromo, zinco e silício, podem atuar cataliticamente acelerando a decomposição do composto (GUIMARÃES, 1987).

A matéria orgânica refere-se a restos de plantas e outros organismos, em estado mais ou menos avançado de alteração, os quais tem influência nas propriedades físicas,

químicas, biológicas, e no processo de sorção dos herbicidas no solo (AHMAD *et al.*, 2001), sendo controlada pelo tipo da população microbiana e por seu metabolismo, além das condições ambientais (Figura 3) (DALMOLIN, 2002).

Figura 3. Ciclo da matéria orgânica do solo.



Fonte:(COSTA, 2004).

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

O potencial hidrogênionico (pH) do solo possui a capacidade de interferir na estabilidade dos minerais de argila, na capacidade de troca iônica, como também na degradação biótica e abiótica (GUIMARÃES, 1987). Em áreas de solos de caráter menos ácido, favorecem a biodegradação de herbicidas em sua forma molecular, pois a sorção é maior em condições ácidas. Exemplos desses compostos são os pesticidas bentazon e o clorimuron (SPADOTTO *et al.*, 2003).

3.2.1 Processos de retenção

A retenção constitui-se de processos de sorção, o qual se divide em absorção e adsorção. Esses processos aplicam-se a capacidade do solo em aderir a uma molécula orgânica, impedindo a sua movimentação no perfil do mesmo, sendo controlado por transformações químicas e biológicas, influenciando no transporte dessas moléculas (KOSKINEN e HARPER, 1990). Compreende-se de um processo interfacial, em que ocorre a adesão ou atração entre camadas iônicas ou moleculares em certa superfície (PRATA e LAVORENTI, 2000).

O processo de adsorção é a interação da molécula do herbicida (soluto) da fase líquida com a superfície das partículas da fase sólida do solo (GUIMARÃES, 1987; BARIZON, 2004).

A adsorção afeta a biodisponibilidade e a persistência dos pesticidas no solo (CORREIA *et al.*, 2007).

Os fatores que interferem no processo de adsorção são as características físico-químicas dos herbicidas, como também as dos coloides do solo, a constante de dissociação do composto, a sua solubilidade em água, o pH, a temperatura, teor de umidade do solo, e o tipo de formulação do composto do herbicida (GUIMARÃES, 1987).

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

A absorção é a entrada do herbicida nas partículas do solo, o qual pode ser acumulado no sistema absorvedor e ser também metabolizado por uma planta ou um organismo vivo (LAVORENTI, 1996).

Segundo Prata e Lavorenti (2000) quando a molécula de um herbicida chega ao solo, ela pode sofrer os processos de degradação e sorção, e os resultados destes dois processos podem ser: a absorção da molécula pelas plantas, a lixiviação da molécula para camadas sub superficiais do solo, podendo até mesmo atingir os cursos de água subterrâneos ou a formação de resíduos ligados.

A sorção pode limitar a contaminação dos corpos d'água causada pela presença das moléculas dos pesticidas, contudo pode reduzir a eficiência dos pesticidas que são aplicados diretamente no solo diante das pragas invasoras, e diminuir a degradação dos pesticidas, afetando a biodisponibilidade, na qual as moléculas dos pesticidas são sequestradas através das interações entre frações de pesticidas e frações no solo (SUDHARSHAN *et al.*, 2012). No entanto, com a adição de teores de matéria orgânica ocorre o favorecimento da degradação desses compostos por micro-organismos que atuam por cometabolismo (BARRIUSO *et al.*, 1997).

Os fatores relacionados com o processo de sorção de pesticidas são pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas. Os herbicidas triazínicos utilizam forças eletrostáticas (PRATA e LAVORENTI, 2000).

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

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

O mecanismo de ligação primária das triazinas são as interações hidrofóbicas para as moléculas menos ácidas ($Pka < 2$), e para as moléculas mais ácidas ($Pka > 4$) a força de absorção é maior devido ao modo misto de ligação entre os constituintes do solo (STIPICEVICS *et al.*, 2009).

3.2.2 Transformação

A transformação do herbicida no ambiente pode ocorrer de forma biótica, a partir da degradação bioquímica dos contaminantes por meio da atividade metabólica dos micro-organismos e plantas alóctones ou autóctones (USEPA, 2005), e de forma abiótica, através da ação de componentes físicos do meio ambiente, como fotodegradação e degradação química (LAVORENTI, 1996).

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

A degradação biótica ocorre através de compostos passíveis à degradação por micro-organismo, resultando na mineralização desse composto orgânico. Constituem-se como um processo de grande importância, por ser econômico e efetivo, resultando na degradação das moléculas dos herbicidas no ambiente (ARAÚJO, 2002).

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

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

No período em que a degradação do composto está ocorrendo, espera-se o aumento da população microbiana, pois estes são os responsáveis pela transformação dos herbicidas. Isto pode ser averiguado através da estimativa do número populacional de micro-organismos, o qual pode ser realizado mediante a sua quantificação do solo (MONTEIRO, 1996).

O metabolismo microbiano mediado por mecanismos enzimáticos podem apresentar-se das seguintes maneiras (TORSTERNSSON, 1980):

- ❖ Metabolismo incidental quando o composto por si só não serve como fonte de carbono, devido à participação de enzimas específicas presente em várias espécies microbianas, tais como as hidrolases e oxidases.
- ❖ Cometabolismo quando as enzimas microbianas utilizam substrato semelhante ao composto.

- ❖ Catabolismo quando parte da molécula do xenobiótico é utilizado como fonte de energia.

A fotodegradação é o processo abiótico, em que ocorre a degradação do herbicida por radiações ultravioletas. A molécula do herbicida absorve a energia de radiação, fazendo com que os seus elétrons fiquem em fase de excitação, provocando a ruptura das ligações químicas envolvidas. Herbicidas que possuem anel aromático em sua estrutura são facilmente fotodegradados (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

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

3.2.3 Transporte

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

O transporte por lixiviação segundo Keller e Weber (1998), é o carreamento do herbicida em solução para baixo no solo por meio da força gravitacional, que acarreta na

movimentação ao longo do perfil do mesmo, percolação da solução do solo, direcionando-se ao lençol freático (LAVORENTI, 1996), resultando na contaminação de corpos hídricos e do lençol freático (FONTES *et al.*, 2004), pois as substâncias químicas são carregadas com as águas de recarga dos aquíferos (SPADOTTO, 2002).

A lixiviação está relacionada com o teor de matéria orgânica ou argila presente no solo, com a solubilidade da molécula do herbicida e a quantidade de água que se movimenta no perfil do solo (GUIMARÃES, 1987). As propriedades físicas do solo, como densidade, porosidade e permeabilidade são os responsáveis pelos processos de lixiviação. Esse processo ocorre através da condução das moléculas dos herbicidas para dentro do perfil do solo, a partir da propagação do ar nos poros e da propagação do fluxo ascendente e descendente de água no solo (INOUE *et al.*, 2003).

O potencial de lixiviação é maximizado quando ocorre o aumento da solubilidade (> 30 ppm) do composto no solo, baixo potencial de sorção ($K_d < 5 \text{ L Kg}^{-1}$ ou $K_{oc} < 300-500 \text{ g}^{-1}$ carbono), alta persistência ($t_{1/2} > 2$ a 3 semanas) e quando aplicado em solos arenosos com baixo teor de matéria orgânica (FUTCH e SINGH, 1999).

Em alguns casos nas áreas de plantio direto, o potencial de lixiviação do herbicida é maior resultante da alta quantidade de macro poros, canais no perfil do solo formados por macro fauna e por raízes, como também da maior quantidade de matéria orgânica peculiar destas áreas e principalmente em áreas em condição de saturação hídrica (FONTES *et al.*, 2004).

Os fatores que controlam a lixiviação são a taxa de adsorção e decomposição dos herbicidas, além da quantidade da cobertura do solo com palha, pois os herbicidas adsorvem-se nos resíduos das plantas (FERRI e VIDAL, 2003).

A volatilização é o processo que distribui o herbicida que está contido nas frações do solo ou em solução do mesmo para a atmosfera (LAVORENTI, 1996). Através da medição da pressão de vapor (Pva) do herbicida, pode-se determinar a sua utilidade de aplicação em uma área, por exemplo, um herbicida com alta volatilidade não pode ser aplicado em local de clima seco (SILVA e FERREIRA, 2003).

Desta forma, em climas tropicais a temperatura do ar e do solo é mais elevada do que em regiões temperadas, então se espera o aumento da perda de uma parte de pesticidas para a atmosfera por volatilização (LAABS *et al.*, 2001).

Escoamento superficial (Runoff) é o processo que acarreta a movimentação do herbicida ao longo do perfil do solo em declive, com a água da chuva ou o vento, em direção aos rios e lagos (LAVORENTI, 1996). Este processo favorece a contaminação das águas superficiais através da presença de herbicidas em solução ou adsorvida nas partículas do solo (SPADOTTO, 2002).

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

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

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

No sul da Flórida, nos Estados Unidos, na década de 90, o herbicida ametrina foi detectado em águas superficiais e em amostras de sedimentos. As concentrações diminuam no período de inverno devido à minimização das chuvas (PFEUFFER e RAND, 2004).

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

Torna-se importante o conhecimento do comportamento dos pesticidas no ambiente, como propriedades físico-químicas do solo e da molécula, taxa de biodegradabilidade e

sorção, para estudar o tempo de permanência como também sua disponibilidade no solo, para que desta maneira possa realizar o diagnóstico sobre o risco de contaminação ambiental por seu transporte no ambiente (SILVA *et al.*, 2012).

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

O período de tempo em que a substância permanece inalterada é expresso como a *meia vida*, tempo para que a concentração inicial seja reduzida à metade. Mediante o fator de persistência no ambiente, os herbicidas podem ser classificados em não persistentes, moderadamente persistentes e persistentes ou recalcitrantes (Tabela 2).

TABELA 2- Classificação dos herbicidas quanto à persistência no ambiente

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

Fonte: MOREIRA e SIQUEIRA, 2006.

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

3.2.4 Biodegradação

Os xenobióticos lançados no ambiente podem sofrer alterações em suas estruturas químicas devido a fatores bióticos. No processo de biodegradação os compostos químicos podem servir de fonte de energia para o organismo ou servir como elementos estruturais para a célula (AZEVEDO e CHASIN, 2004).

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

Os micro-organismos têm papel fundamental no comportamento dos herbicidas no ambiente, pois possuem a capacidade de metabolizar esses compostos através de suas enzimas e transformá-los em energia e nutrientes para a sua sobrevivência (BEIGEL, CHARMAY e BARRIUSO, 1999). A degradação microbiana dos herbicidas geralmente leva à formação de compostos menos tóxicos, CO₂ e água.

Os principais micro-organismos responsáveis pela degradação de herbicidas no solo são as bactérias e os fungos, sendo mais abundante na camada superficial do solo, o qual diminui com a profundidade (MONTEIRO, 1996).

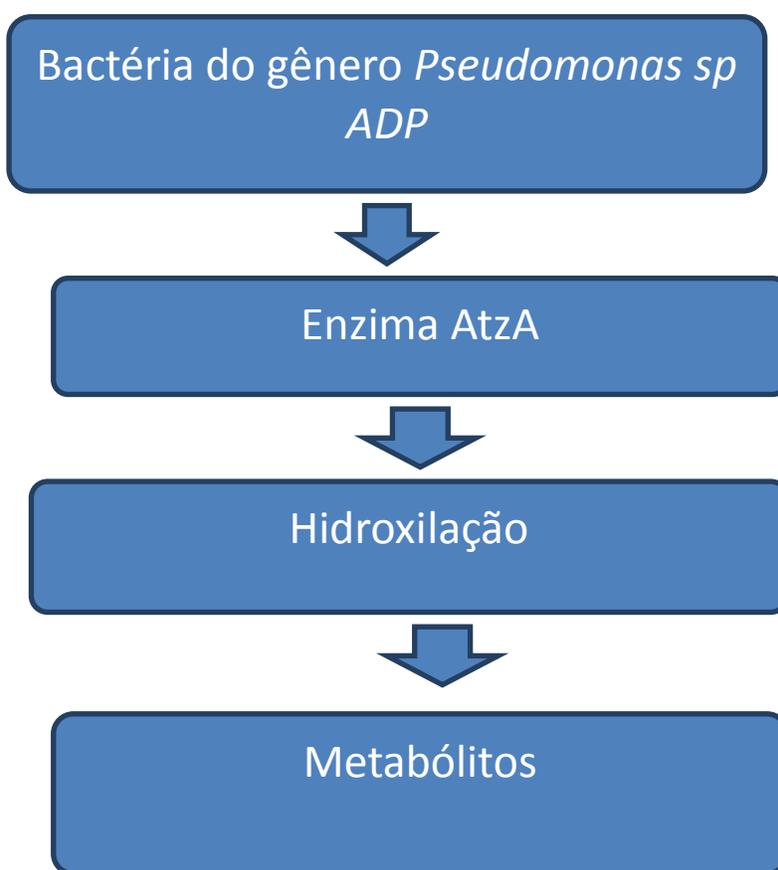
As principais via de degradação dos herbicidas triazínicos são a decloração, desalquilação e oxidação. Os produtos hidroxilados como a hidroxiatrazine apresentam caráter menos ácido do que o composto inicial (STIPICEVICS *et al.*, 2009).

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

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

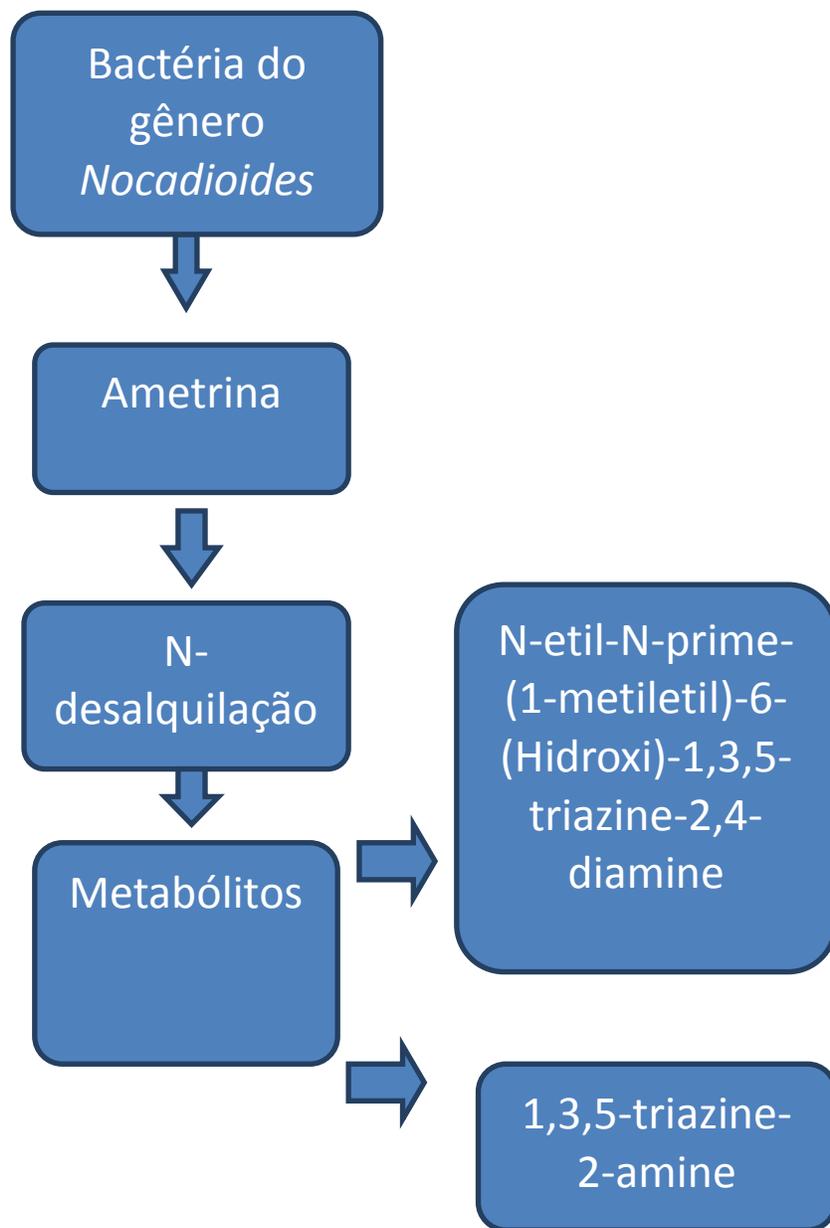
A enzima AtzA foi encontrada em *Pseudomonas* sp. ADP, com a capacidade de degradar especificamente os herbicidas atrazinas. Estas enzimas catalisam a primeira etapa da hidroxilação para produzir hidroxilas-triazinas (Figura 4). No entanto, estão distribuídas dentro de um gênero limitado às bactérias gram-positivas degradantes das demais triazinas, como os gêneros *Rhodococcus*, *Arthrobacter* e *Nocardioides*. A cepa *Rhodococcus* degrada as triazinas por via N-desalquilação (Figura 5) (SATSUMA, 2010).

Figura 4. Degradação do herbicida atrazina por bactérias do gênero *Pseudomonas*.



Fonte: Adaptado de Satsuma (2010).

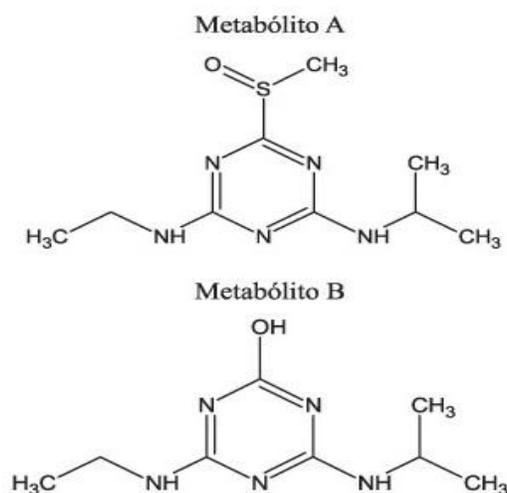
Figura 5. Degradação do herbicida ametrina por bactérias do gênero *Nocardioides*.



Fonte: Adaptado de Satsuma (2010).

Severino e Silva (2012) após 120 dias de incubação do herbicida ametrina no solo observaram a formação de dois metabólitos da ametrina. O metabólito A, denominado como N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-6 (methylsulfinyl) -1,3,5- triazine -2,4- diamine e, o metabólito B, denominado como 4-(ethylamino)-6- [(1-methylethyl) amino]- 1,3,5-triazin-2-ol (Figura 6).

Figura 6. Metabólitos formados da degradação do herbicida ametrina no solo.



Fonte. (SEVERINO e SILVA, 2012).

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

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

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

Segundo Araújo *et al.* (2008) as funções dos micro-organismos no solo são a decomposição de matéria orgânica, liberação de nutrientes em formas disponíveis para as plantas, degradação de substâncias tóxicas, associações simbióticas com as raízes das plantas, controle biológico de patógenos, solubilização de minerais e estruturação e agregação do solo.

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

O potencial hidrogênionico (pH) do solo reflete as condições ambientais do local, sendo que em climas úmidos o pH é ácido em consequência da decomposição da serrapilheira. As atividades humanas contribuem para reduzir o pH do solo através de fertilização incontrolada e a formação de chuva ácida. Em geral o pH varia para a maioria dos solos brasileiros entre 4,0 e 8,5.

Para a microbiota do solo, os valores de pH menores que 5,0 são ideais para as atividades dos fungos, e para as bactérias os valores entre 6,0 e 8,0 permitem melhores atividades (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Normalmente as bactérias e os actinomicetos são neutrófilos e basófilos com pH 6,0 e 8,0, e os fungos são acidófilos com valores de pH menores que 5,0. Em solos ácidos ocorrem à toxicidade por manganês e alumínio (ARAÚJO *et al.*, 2008).

A temperatura afeta as reações fisiológicas das células como também das características físico-química do ambiente. As reações microbianas são maiores em

temperaturas em torno de 28°C e são inibidas em temperaturas menores que 25°C ou maiores que 35°C (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Segundo Moreira e Siqueira (2006) a atividade microbiológica pode ser definida como toda reação bioquímica catalisada pelos organismos do solo, podendo resultar em atividade física, como no caso do efeito da excreção de polissacarídeos na agregação do solo.

A descamação de células vegetais e os exsudatos radiculares são o caminho para o transporte de fontes de energia como carbono e nitrogênio aos micro-organismos.

Nos exsudatos radiculares encontram-se os compostos aminados, ácidos orgânicos, ácidos graxos e esteróis, fatores de crescimento, açúcares, nucleotídeos, flavononas e enzimas, e compostos miscelâneos (ARAÚJO *et al.*, 2008; MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

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

O solo não possui a capacidade de ser infalível para a degradação de todas as substâncias orgânicas, pois existem comunidades microbianas que são incapazes de biodegradar algumas moléculas recalcitrantes. Tal percepção é importante para evitar o crescimento da poluição ambiental provenientes das ações antrópicas.

3.3 Biofertilizantes

Em decorrência do desenvolvimento sustentável, o setor agrícola vem buscando a utilização de produtos orgânicos para atividades como o combate a pragas, controle de doenças e a fertilização do solo. Em resposta a essa busca, o biofertilizante traz em sua composição compostos orgânicos capazes de resolver esses fatores, de forma sustentável e com baixo custo de produção (ARAÚJO *et al.*, 2007).

A fertilidade do solo é o resultado do equilíbrio de fatores químicos, físicos e biológicos formados com base em macro e micro-organismos decompositores, biomassa microbiana e complementos dos minerais em desequilíbrio (MACHADO e MACHADO, 2009).

O termo biofertilizante teve seu registro no decreto nº 86.955 de 18 de fevereiro de 1982 do Ministério da Agricultura, denominado como um produto que contém princípios ativos capazes de atuar em culturas, resultando no aumento da sua produtividade (PARANÁ, 1997).

Segundo Medeiros e Lopes (2006), os biofertilizantes são compostos bioativos, resíduo final da fermentação de compostos orgânicos, contendo células vivas ou latentes de micro-organismos (bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos) e por seus metabólitos, além de quelatosorgano-minerais. São produzidos em biodigestores por meio de fermentação aeróbia e/ou anaeróbia da matéria orgânica. Esses compostos são ricos em enzimas, antibióticos, vitaminas, toxinas, fenóis, ésteres e ácidos, inclusive de ação fito-hormonal. São produtos que apresentam intensa atividade microbiana capaz de proteger as culturas contra pragas e doenças, além de seu caráter nutricional.

Para a produção de biofertilizantes não existe uma receita padrão. Medeiros e Lopes (2006) relatam que o processo de fermentação é complexo e os micro-organismos existentes passam por quatro fases distintas de crescimento celular: latência, crescimento exponencial, fase estacionária e morte celular. Cada micro-organismo participante degrada o alimento para outro, numa relação de interdependência mútua e harmônica, e assim o processo de fermentação acaba sendo contínuo, desde que seja alimentado com meio nutritivo, processo conhecido como compostagem líquida.

Os biofertilizantes são adubos orgânicos líquidos obtidos a partir da dissolução de composto orgânico em água, e fermentação ou digestão de micro-organismos. Esse processo resulta em duas fases, sendo uma sólida que poderá ser usada como adubo orgânico no solo e a fase líquida utilizada como adubo foliar e no controle de pragas (MEDEIROS e LOPES, 2006; VESSEY, 2003).

Para a produção de biofertilizante como o utilizado neste estudo, são utilizados tanques de volumes de até 1000 litros, ou “piscinas” para volumes maiores. Estes devem

localizar-se em área com incidência dos raios solares mantendo o tanque descoberto. Adiciona-se no tanque esterco fresco de gado (inoculante), e um composto enriquecido com minerais e água não clorada. Deve-se agitar duas vezes ao dia manualmente. Após quinze dias da mistura inicial dos insumos o biofertilizante pode ser utilizado

Segundo Vessey (2003), fertilizantes e biofertilizantes são compostos distintos, pois os fertilizantes são compostos químicos que aumentam a fertilidade do solo, e os biofertilizantes são compostos orgânicos que possuem micro-organismos vivos, os quais promovem crescimento das plantas, melhorando o seu estado nutricional.

A produção de biofertilizante tem contribuído para a suplementação de nutrientes em diversas culturas, seja por sistema de irrigação, aplicado ao solo ou pulverizado sobre as plantas. Devido ao seu baixo custo de produção e alta concentração de nutrientes, tem aumentado a sua utilização na agricultura (SOUZA e RESENDE, 2003).

Na década de 1980, o biofertilizante foi utilizado em lavouras de café e de cana de açúcar, com o objetivo de auxiliar na irrigação e complementação nutricional das culturas. Em 1985 foi utilizado em seringueiras, culturas de café e maracujá, resultando no aumento da produção e redução de ataques de fitopatógenos (SANTOS, 1992), e as mudas de tomates e de pepino pulverizadas com biofertilizante apresentaram maior vigor, e em culturas de alfaces quando tratadas pelo mesmo, os efeitos foram positivos aumentando a produção (BETTIOL *et al.*, 1998).

Os adubos orgânicos ou biofertilizantes são fontes de macronutrientes tais como nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio e micronutrientes tais como cobre e zinco. Além da sua composição mineral, os adubos orgânicos aumentam teores de matéria orgânica ativando a microbiota do solo, resultando no desenvolvimento da estruturação do solo, aeração, infiltração e retenção de água (MACHADO e MACHADO, 2009).

Os biofertilizantes possuem em sua composição quase todos os nutrientes (nitrogênio, fósforo, potássio, fenol *etc.*), variando em suas concentrações, conforme a matéria-prima utilizada na fermentação (NETO, 2006). Esta composição rica em nutrientes faz com que os biofertilizantes sejam uma alternativa para o uso na degradação de xenobióticos no solo.

3.4 Respirometria

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

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

O respirômetro de Bartha é um sistema fechado, constituído de duas câmaras interligadas, onde ocorrem a biodegradação do composto e a remoção do CO₂ produzido para a sua quantificação. Este sistema é utilizado para estimar a taxa de respiração no solo ao qual foi adicionado o composto (COSTA, 2009).

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

A partir da aplicação desse método é possível a classificação de resíduos para o seu tratamento, assim como inferir técnicas de manejo como taxas de aplicação e concentração de nutriente.

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

Moreno *et al.* (2007) avaliaram o efeito da aplicação do herbicida atrazina, da família das triazinas, na biomassa e respiração microbiana, teor de ATP e atividade de

desidrogenase e uréase em solo semiárido. Utilizaram solo com adição de atrazina na concentração de 0,2 - 100 mg.Kg⁻¹, incubados durante 6 horas, durante 16 e 45 dias. Concluíram que a variação na atividade microbiana do solo reflete a capacidade dos microorganismos em responder a aplicação de atrazina em solo semiárido com baixo teor de matéria orgânica. A atividade microbiana aumentou em resposta à adaptação do estresse causado pela alta concentração do xenobiótico aplicado. Os parâmetros microbiológicos, como respiração do solo, ATP e atividade de desidrogenase demonstraram-se bioindicadores sensíveis à resposta da atividade microbiana na presença de atrazina.

3.5. Herbicidas e Toxicidade

Toxicidade é a propriedade inerente de um agente químico em produzir efeitos deletérios tais como, agudos, subletais, letais e crônicos sobre um organismo (RAND, 1995).

As substâncias tóxicas podem ser mais ou menos perigosas dependendo das condições climáticas do local, tais como a luz UV, a formação de *smog* fotoquímico, no entanto a radiação UV acelera a degradação de substâncias químicas (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Segundo Duffus (1986), é quase impossível prever exatamente o que ocorrerá com um agente químico quando este for liberado em razão da complexidade ambiental.

A presença de um xenobiótico no ambiente não indica um efeito nocivo, no entanto devem ser estabelecidas relações entre os níveis externos de exposição e os níveis internos de contaminação dos tecidos do organismo, além dos efeitos adversos que poderão ocorrer precocemente (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

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

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

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

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

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

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

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

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

Os resultados dos testes de toxicidade são analisados estatisticamente e expressos em unidades numéricas como CL50 (Concentração Letal: concentração real da amostra que causa efeitos agudos a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio), CE50 (Concentração Efetiva: concentrações reais da amostra que causa efeitos agudos a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio), e CENO (Concentração de Efeito Não Observado) (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2008).

Os experimentos de toxicidade são ferramentas essenciais em experimentos de

biodegradação para avaliar se o composto orgânico degradado teve a sua toxicidade reduzida ou aumentada (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

Nunes e Vidal (2008) observaram que após 35 dias de aplicação dos herbicidas S-metolachlor associado ao glifosato ou paraquat, ocorreu redução da toxicidade para plantas indicadoras de nabo forrageiro.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Ametrina

Para a realização deste estudo, utilizou-se o herbicida ametrina (N-etil-N-(1-metiletil)-6-(metiltio)-1, 3, 5 triazina 2,4-diamina) da marca Fluka (Germany), com 98,5% de pureza, na forma granular.

4.1.2 Biofertilizante

O biofertilizante Microgeo foi cedido pela empresa Microbiol Biotecnologia, no município de Limeira-SP, o qual foi patenteado pela mesma, com o registro PI0207342-0 A2.

O mesmo foi formado por compostos orgânicos fermentados, contendo células vivas ou latentes de micro-organismos (bactérias, leveduras, algas e fungos filamentosos) e por seus metabólitos, além de quelatosorgano-minerais. A sua produção é baseada na compostagem (fermentação) em meio líquido, de forma contínua e realizada em um mesmo tanque, através do uso de um composto orgânico especialmente desenvolvido e a adição de insumos extras, sem interrupção da produção (D'ANDREA, 2010).

4.1.3 Solo

O solo foi coletado em área de plantação de cana de açúcar, com histórico de aplicação do herbicida ametrina, na região de Piracicaba-SP, a 20 cm de profundidade, utilizando-se uma enxada e pá, de acordo com CETESB (1984).

Realizou-se a primeira coleta de solo em uma área ao norte da região de Piracicaba-SP no mês de agosto, e novembro de 2011 e maio de 2012 em uma área ao leste da região da região de Piracicaba-SP.

4.1.4 Respirometria de Bartha

Utilizou-se o respirômetro de Bartha e Pramer (ABNT NBR 14283/1999) para avaliar a atividade microbiana do herbicida ametrina no solo com a adição de biofertilizante.

Os reagentes utilizados para a quantificação de CO₂ estão de acordo norma ABNT-NBR 14283/ 1999 são eles:

- Solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2N;
- Solução padrão de ácido clorídrico (HCl) 0,1N;
- Solução de carbonato de cálcio (Na₂CO₃) 0,1N;
- Solução de cloreto de bário (BaCl₂) 1,0N;
- Solução indicadora de fenolftaleína;
- Solução indicadora de vermelho-de-metila;
- Água isenta de CO₂.

4.1.5 Vidrarias, reagentes e soluções

Utilizou-se os equipamentos, reagentes e vidrarias usuais de Laboratório Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental.

4.1.6 Organismo teste com *Daphnia similis* e *Lactuca sativa*

Para o experimento utilizou-se os organismos teste *Daphnia similis* cultivados no laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental, bem como os materiais para o experimento de fitotoxicidade com *Lactuca sativa*.

4.2 Métodos

4.2.1 Análise granulométrica

Realizou-se a análise granulométrica para determinar as frações minerais contidas no solo com histórico de aplicação do herbicida ametrina. O experimento foi realizado no laboratório de solos da FT/UNICAMP de acordo com CETESB (1995).

4.2.2 Análise físico química

As amostras de solo foram analisadas no laboratório do Departamento de Ciência do Solo, na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”.

Utilizaram-se amostras de solo seco e peneirado por peneira de 2mm. As metodologias utilizadas estão descritas abaixo, segundo Raijet *al.*, (2001) e Korndorfer, Pereira e Nolla (2004):

- **pH em CaCl₂ (acidez ativa)- Método: CaCl₂ 0,01 mol.L⁻¹**

Princípio do método: Medida da atividade de hidrogênio com eletrodo combinado de vidro e referência, na suspensão de terra em CaCl₂ 0,01 mol.L⁻¹, na proporção de 1:2,5.

- **Matéria orgânica- Método: Colorimétrico**

Princípio do método: A determinação da quantidade de matéria orgânica em solos baseou-se na sua oxidação a CO₂ por íons dicromato, em meio fortemente ácido. Determinou-se a quantidade de íons Cr (III) por colorimetria, medindo-se a intensidade da cor esverdeada produzida por esses íons em solução. A determinação por colorimetria requer a montagem de uma curva padrão de calibração, que relaciona as quantidades de matéria orgânica e a absorvância do extrato preparado com dicromato de sódio e ácido sulfúrico.

- **H⁺Al (acidez potencial)- Método: pH SMP**

Princípio do método: A acidez da amostra de terra em contato com a solução tampão SMP provoca um decréscimo do valor original do pH da solução (7,5), quando titulada potenciométricamente com ácido forte. A correlação destes valores com aqueles obtidos pelo método do CaOAc 1N (estudo de correlação) permitiu-se obter os valores de acidez potencial da amostra.

- **Alumínio trocável- Método: Titulometria (1 mol.L⁻¹)**

Princípio do método: A solução de KCl 1 mol/l, por ser um sal neutro, possui a capacidade de extrair apenas cátions ligados eletrostaticamente com colóides do solo (cátions trocáveis). Assim, utilizou-se esta solução para extração de Al trocável, sendo a quantificação realizada colorimetricamente pelo reagente alaranjado de xilenol.

- **Fósforo, Potássio, Cálcio e Magnésio- Método: Resina trocadora de íons**

Princípio do método: A extração dos teores “disponíveis” de P, K, Ca e Mg de amostras de terra fez-se com uma mistura de resinas (catiônica e aniônica) trocadoras de íons, saturadas com bicarbonato de sódio. Realizou-se a quantificação do P por colorimetria; do Ca e Mg por espectrofotometria de absorção atômica, e do K por fotometria de chama ou por espectrofotometria de emissão atômica.

- **Enxofre(SO₄)⁻² - Método: Turbidimetria**

Princípio do método: Extração do sulfato (S-SO₄⁻²) das amostras de terra pelo fosfato monocálcico e posterior medição da turbidez, provocada pela presença de BaSO₄ formado pela reação do BaCl₂.2H₂O com o S-SO₄ extraído das amostras de terra. Realizou-se as leituras em espectrofotômetro a 420 nm.

- **Ferro, Manganês, Cobre e Zinco- Método: DTPA em pH 7,3**

Princípio do método: É a complexação dos metais. O agente quelante reage com os íons livres de Cu, Fe, Mn, Zn em solução, formando complexos solúveis, o que resulta em redução da atividade dos metais livres em solução. Em resposta, íons desses metais desorvem da superfície do solo ou dissolvem da fase sólida para reabastecer a solução do solo. A quantidade de metais quelatados que acumula na solução durante a extração é função das atividades desses íons livres na solução do solo (fator intensidade) da habilidade do solo em reabastecer a solução (fator capacidade) da estabilidade do quelato e da capacidade do quelante em competir com a matéria orgânica pelo íon.

Realizou-se as determinações dos elementos por espectrofotometria de absorção atômica (AAS).

- **Boro- Método: Água Quente/microondas**

Princípio do método: Extração dos teores de Ácido Bórico “disponível” pelo cloreto de bário, utilizando microondas como fonte de aquecimento e posterior quantificação por espectrofotometria usando o reagente azometina-H.

4.2.3 Obtenção da fração solúvel do solo em água

Pesou-se 25 g de solo, em frasco de 250 mL e adicionou-se 100 mL de água destilada, sendo estes mantidos sob agitação por 22 h \pm 2 h. Após esse período, os frascos ficaram em repouso por 30 min. Utilizou-se a fração solúvel nos experimentos de quantificação da microbiota do solo, testes de toxicidade com *Daphnia similis* e fitotoxicidade com *Lactuca sativa*

4.2.4 Quantificação da microbiota do solo

A quantificação da microbiota do solo foi expressa em Unidades Formadoras de Colônia por grama de solo (UFC/g de solo) de fungos e bactérias, mediante o método *Pour Plate*, utilizando-se para bactérias o meio de cultura *Plate Count Agar* (PCA), e para fungos o meio Sabouraud, em duplicata.

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

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

4.2.5 Estimativa da atividade microbiana do solo pelo método FDA

A atividade microbiana total do solo foi avaliada pelo método da Hidrólise de Diacetato de Fluoresceína (FDA), descrito por Boehm e Hoitinik (1992).

Esta metodologia consiste na quantificação da hidrólise de diacetato de fluoresceína no solo. As enzimas responsáveis pela hidrólise do FDA são abundantes no ambiente do solo. Enzimas não-específicas como esterases, proteases e lipases, têm se mostrado capazes de hidrolisar o FDA, estando envolvidas na decomposição de muitos tipos de compostos. A capacidade de hidrólise do FDA, parece generalizada, especialmente entre os principais decompositores, bactérias e fungos (SCHNÜRER e ROSSWALL, 1982).

A concentração de FDA hidrolisado (μg de FDA hidrolisado g^{-1} de solo seco por minuto) foi determinada com auxílio da curva padrão por meio da correlação com a absorbância lida na amostra e o FDA hidrolisado. A curva de calibração foi obtida adicionando-se FDA nas concentrações de 0, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de solo seco (0, 50, 100, 150, 200 μL) em 5 mL de solução tampão fosfato de potássio, contidos em tubo de ensaio. Os tubos foram fechados e colocados em banho-maria a 100° C por uma hora para a hidrólise total do FDA. Após a hidrólise, o FDA foi adicionado a frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 5g de solo e 15 mL de tampão fosfato de potássio. Os frascos de Erlenmeyers foram colocados em shaker a 150 rpm à temperatura ambiente, durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados imediatamente 20 mL de acetona em cada frasco para interromper a reação. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 min, para determinação da absorbância em espectrofotômetro a 490 nm.

Para a análise das amostras, foram colocadas 5g de cada amostra de solo, em duplicata, em Erlenmeyer de 250 mL, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60mM (8,7g de K_2HPO_4 , 1,3g DE KH_2PO_4 ; 1000 mL de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA foi iniciada com a adição de 0,2 mL da solução estoque de FDA (2mg/mL de acetona). As amostras foram agitadas a 150 rpm e incubadas a temperatura ambiente, durante 20 minutos.

A reação foi interrompida pela adição de 20 mL de acetona P.A. por recipiente, que permaneceram tampados até a centrifugação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 min. Logo após, em espectrofotômetro, foi determinada a absorbância dos centrifugados a 490 nm.

4.2.6 Experimento de respirometria

Utilizou-se o método respirômetro de Bartha e Pramer (ABNT-NBR 14283, 1999) para avaliar a atividade microbiana no solo mediante a geração de CO_2 . Foram realizados três experimentos de respirometria.

No experimento 1 avaliou-se a geração de CO_2 durante o período de 47 dias a temperatura de 28°C (Tabela 3), e no experimento 2, durante o período de 30 dias (Tabela 4) com solo coletado em área de cultivo de cana de açúcar e peneirado. Para a realização do

experimento 3 (Tabela 4), avaliou-se a geração de CO₂ durante o período de 104 dias, entretanto neste experimento o solo foi coletado na mesma área do experimento 2, mas este foi deixado em estufa à 104°C durante o período de 24 horas, com o objetivo de torná-lo estéril.

No experimento 3, adicionou-se aos respirômetros 1 mL de acetona P.A. no 60° dia de incubação, e 1 mL de caldo nutriente aos 85° dias do experimento, a fim de fornecer fonte de carbono a fim de estimular a atividade microbiana no solo.

Em todos os experimentos, utilizou-se o biofertilizante Microgeo como coadjuvante no processo de biodegradação.

As concentrações de ametrina utilizada foram de 8µg/L de acordo com Costa, Monteiro e Tornisielo (2000), e 12 µg/L de acordo com a concentração de aplicação utilizada no campo onde coletou-se o solo.

TABELA 3. Tratamentos realizados no experimento de respirometria do herbicida ametrina no solo acrescido de biofertilizante Microgeo- Experimento 1 com incubação de 47 dias à temperatura de 28°C

Tratamentos respirômetros	50 g de solo Base seca	Herbicida ametrina (µg/L)	Biofertilizante (%)
Controle	+	-	-
Tratamento 1	+	8	1
Tratamento 2	+	8	5
Tratamento 3	+	8	10
Tratamento 4	+	12	1
Tratamento 5	+	12	5
Tratamento 6	+	12	10
Tratamento 7	+	8	-
Tratamento 8	+	12	-

TABELA 4. Tratamentos realizados no experimento de respirometria do herbicida ametrina no solo acrescido de biofertilizante Microgeo- Experimentos 2 com incubação de 30 dias e, experimento 3 com 104 dias de incubação à 28°C

Tratamentos respirômetros	50 g de solo Base seca	Herbicida ametrina (µg/L)	Biofertilizante (%)
Controle	+	-	-
Tratamento 1	+	8	1
Tratamento 2	+	8	5
Tratamento 3	+	8	10
Tratamento 4	+	12	1
Tratamento 5	+	12	5
Tratamento 6	+	12	10
Tratamento 7	+	8	-
Tratamento 8	+	12	-
Tratamento 9	+	-	1
Tratamento 10	+	-	5
Tratamento 11	+	-	10

4.2.7 Teste de toxicidade com o organismo *Daphnia similis*

Realizou-se os ensaios de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia similis*, para o herbicida ametrina, do solo coletado e após os experimentos de respirometria, e do biofertilizante, de acordo com a norma técnica ABNT-NBR 12713 (2004). Foram utilizadas neonatas de *Daphnia similis*, avaliando-se a imobilidade do organismo, expressos em Concentração Efetiva Mediana CE50 após 48 horas de exposição para o herbicida ametrina, e para o ensaio de respirometria o teste foi expresso em Unidades Tóxicas (UT).

Na avaliação de toxicidade do herbicida ametrina, utilizou-se as seguintes concentrações 0,01; 0,1; 1; 10 e 100 µg/L e o controle apenas com água de cultivo do organismo, e para a avaliação de toxicidade do solo coletado e do solo após o experimento de respirometria utilizou-se a fração solubilizada do mesmo. Para o biofertilizante, utilizou-se as concentrações 1, 10 e 100%.

Os testes foram realizados em quatro réplicas em recipientes contendo 10 ml da amostra e 5 neonatas de *Daphnia similis*. Os recipientes foram acondicionados em bandejas no escuro a 20°C durante 48 horas. Na leitura do teste, observou-se a quantidade de neonatas imóveis por recipiente.

Para expressão dos resultados utilizou-se a análise estatística através do programa método Trimmed Spearman-Kärber (HAMILTON *et al.*, 1977).

4.2.8 Ensaio de fitotoxicidade com sementes de *Lactuca sativa*

Os testes foram realizados antes e após o 2º e 3º experimento de respirometria. Utilizou-se sementes de *Lactuca sativa* (alface), avaliando a germinação e o alongamento da raiz, baseando-se na metodologia de Castillo (2004). Os experimentos foram realizados em triplicata constituídos de controle positivo com sulfato de zinco (ZnSO₄) como substância tóxica de referência, e controle negativo utilizando-se água destilada. Realizou-se o teste de fitotoxicidade com a fração solúvel de solo.

Realizou-se o teste em triplicata, adicionando-se 4mL da fração solúvel dos tratamentos da respirometria e 20 sementes dispostas equidistante na superfície do filtro. As placas foram mantidas no escuro a 22°C durante 120 horas.

Ao final de cada ensaio, mediu-se o comprimento da raiz das sementes germinadas. Avaliou-se a germinação relativa de sementes e o alongamento relativo da semente.

4.2.9 Quantificação da ametrina no solo

As análises de quantificação da ametrina no solo foram realizadas mediante extração com metanol e determinação por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas. O limite de detecção foi de 0,3 mg/L, segundo norma ABNT-NBR 14029 (2005). O equipamento utilizado foi LC/MS/MS Agilent/AB Sciex API-5000, na empresa Plantec Laboratórios.

4.2.10 Análise estatística

As análises dos resultados da geração acumulado de CO₂ obtidos nos experimentos de respirometria foram realizadas utilizando o delineamento em blocos inteiramente casualizado com 11 tratamentos e 3 repetições.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância ANOVA, e as médias dos tratamentos comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos nos experimentos de ecotoxicidade com *Daphnia similis* e *Lactuca sativa* foram aplicados o Coeficiente de Pearson, o qual apresenta o nível de correlação entre os dados e se as correlações são positivas ou negativas, ou seja, se houve aumento ou diminuição na toxicidade do herbicida ametrina juntamente com o biofertilizante no solo.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados das características do solo

A Tabela 5 descreve a classificação dos solos coletados quanto a sua composição granulométrica.

TABELA 5. Composição granulométrica dos solos coletado de 0 a 20 cm de profundidade, em lavoura de cana de açúcar, na região norte de Piracicaba-SP na primeira coleta, e região leste de Piracicaba-SP na segunda e terceira coletas

Solo	Composição granulométrica	Classificação
Etapa 1 1ª Coleta	50 % Argila 28% Silte 22% Areia	Argila silto-arenosa
Etapa 2 2ª Coleta	42% Areia 33% Argila 25% Silte	Areia argilo-siltosa
Etapa 3 3ª Coleta	69% Areia 18% Argila 13% Silte	Areia argilo-siltosa

Na primeira coleta, na região norte de Piracicaba, o solo apresentou características argilosas, contendo 50% de argila. Na segunda e terceira coletas na região leste de Piracicaba-SP, o solo apresentou caráter arenoso, contendo 42% de areia na segunda coleta e 69% de areia na terceira coleta.

A Tabela 6 expressa a qualidade do solo coletado no mês de novembro de 2011, este solo foi classificado como argiloso, e a Tabela 7 descreve a qualidade do solo coletado no mês de maio de 2012.

TABELA 6. Características físico-químicas do solo da segunda coleta, em lavoura de cana de açúcar, na região leste de Piracicaba-SP

Solo	pH _{so}	K	M.O	P	Ca	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Umidade %	
	(mol d/m ³)	-----					(g/dm ³)	-----				
--	6,3	3,5	42	72	87	0,16	2,8	31	12,6	4,8	24,4	

TABELA 7. Características físico-químicas do solo da terceira coleta, em lavoura de cana de açúcar, na região leste de Piracicaba-SP

Solo	pH solo	K	M. O	P	Ca	H+Al	S	B	Mg	Al	Cu	Fe	Mn	Zn	Umidade %
		(mol d/m ³)					-----					(g/dm ³)	-----		
	6,2	2,4	25	30	115	11	11	0,13	78	0	8,2	10	16,1	2,6	16,19

LEGENDA:

K: Potássio

S: Enxofre

Cu: Cobre

M.O: Matéria Orgânica

B: Boro

Fe: Ferro

P: Fósforo

Mg:

Mn:

Magnésio

Manganês

Ca: Cálcio

Al:

Zn: Zinco

Alumínio

H+Al: Acidez potencial

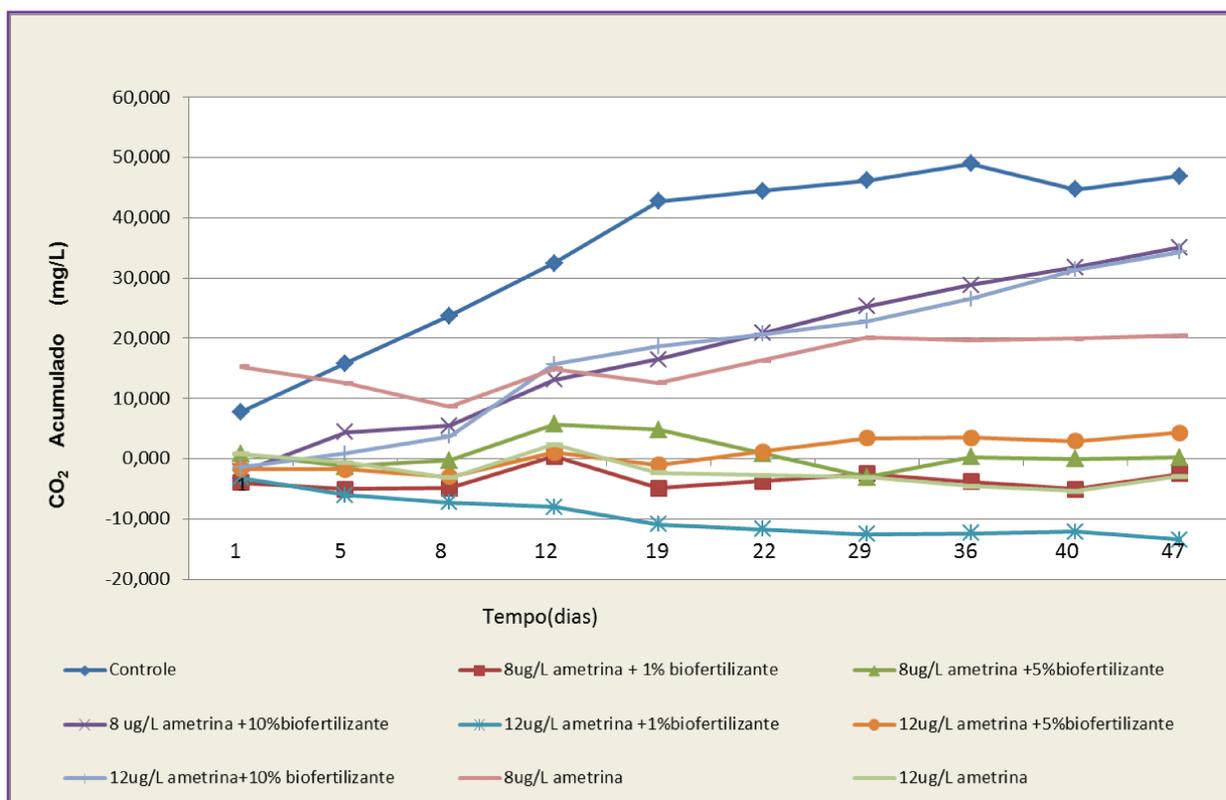
S: Enxofre

Cu: Cobre

5.2 Resultados da Respirimetria de Bartha

A Figura 7 expressa os resultados da geração de CO₂ acumulado em mg/L durante o período de 47 dias do experimento de respirometria com o herbicida ametrina no solo, nas concentrações de 8 e 12 µg/L de ametrina e acrescido do biofertilizante Microgeo nas concentrações de 1, 5 e 10%.

Figura 7. Geração de CO₂ acumulado durante o período de 47 dias de incubação, em solo argiloso, à temperatura de 28°C (Experimento 1)



Observa-se que os tratamentos com maior produção de CO₂ foram os que continha 8µg/L ametrina acrescido de 10% de biofertilizante com 35,07 mg/L de CO₂ e 12 µg/L ametrina acrescido de 10% de biofertilizante com 34,37 mg/L CO₂, com exceção do solo controle.

Esta geração de CO₂ está relacionada com a presença de mais carbono proveniente do biofertilizante para a degradação, portanto mais energia para os micro-organismos.

O tratamento com 8µg/L ametrina acumulou 20,48 mg/L de CO₂, e o tratamento com 12 µg/L de ametrina acrescido de 5% biofertilizante acumulou 4,31 mg/L de CO₂ após 47 dias de experimento.

O solo coletado para essa primeira respirometria apresentou caráter argiloso. Solos com essas características contribuem para maior sorção da ametrina, interferindo no mecanismo de biodegradação da molécula, uma vez que esta fica pouco disponível aos micro-organismos, podendo até formar resíduos ligados ao solo, e são impermeáveis com pouca aeração, resultando na ausência de O₂ (VIVIAN *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2012). Geralmente, solos com maiores teores de matéria orgânica são mais férteis e apresentam maior biomassa e atividade microbiana (PRATA e LAVORENTI, 2000).

Prata *et al.* (2001) observaram a degradação do herbicida ametrina, mediante método respirométrico e cromatografia delgada, no período de 120 dias de incubação no escuro com a adição de vinhaça. Após esse período, concluíram que a adição de vinhaça ao solo faz com que o processo de mineralização da ametrina seja acelerado.

A Tabela 8, expressa o resultado do acúmulo de CO₂ no experimento de respirometria, quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, e estimativa da atividade enzimática pelo método FDA antes e após o primeiro experimento de respirometria.

TABELA 8. Resultado da respirometria (CO₂ acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 1)

Tratamentos	CO₂ acumulado 47 dias	Bactérias heterotróficas (10⁶) UFC/g de solo	Fungos (10⁶) UFC/ g de solo	FDA µg FDA hidrolisado/ g de solo seco
Solo coletado	*	1,2a	3,2 a	37,99a
Solo controle	46,8b	0,16b	0,05b	35,47b
8µg/L ametrina+1% biofertilizante	-2,5c	103c	0,46c	1,8c
8µg/L ametrina+5% biofertilizante	0,1d	0,012d	0,03b	31,6d
8µg/L ametrina+10% biofertilizante	35,0e	0,027d	0,23b	42,76e
12µg/L ametrina+1% biofertilizante	-13,4f	5e	14d	67,91f
12µg/L ametrina+5% biofertilizante	4,3g	0,064d	0,37c	34,59b
12µg/L ametrina+10% biofertilizante	34,3e	10,3f	4,5e	42,34e
8µg/L ametrina	20,4h	3g	0,15c	45,21f
12µg/L ametrina	-2,9c	0,02d	21f	5,16g

*CO₂ não quantificado no solo coletado. ⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tykey a 5% de probabilidade.

No tratamento 8 µg/L ametrina acrescido de 10% de biofertilizante houve maior acúmulo de CO₂ após 47 dias de incubação e aumento na estimativa da atividade microbiana avaliada pelo método FDA, com 42,76 µg FDA hidrolisado/ g de solo seco.

O segundo tratamento com maior acúmulo de CO₂ foi 12µg/L ametrina acrescido de 10% de biofertilizante, o qual neste houve aumento da população bacteriana e fúngica e da estimativa da atividade microbiana pelo método FDA.

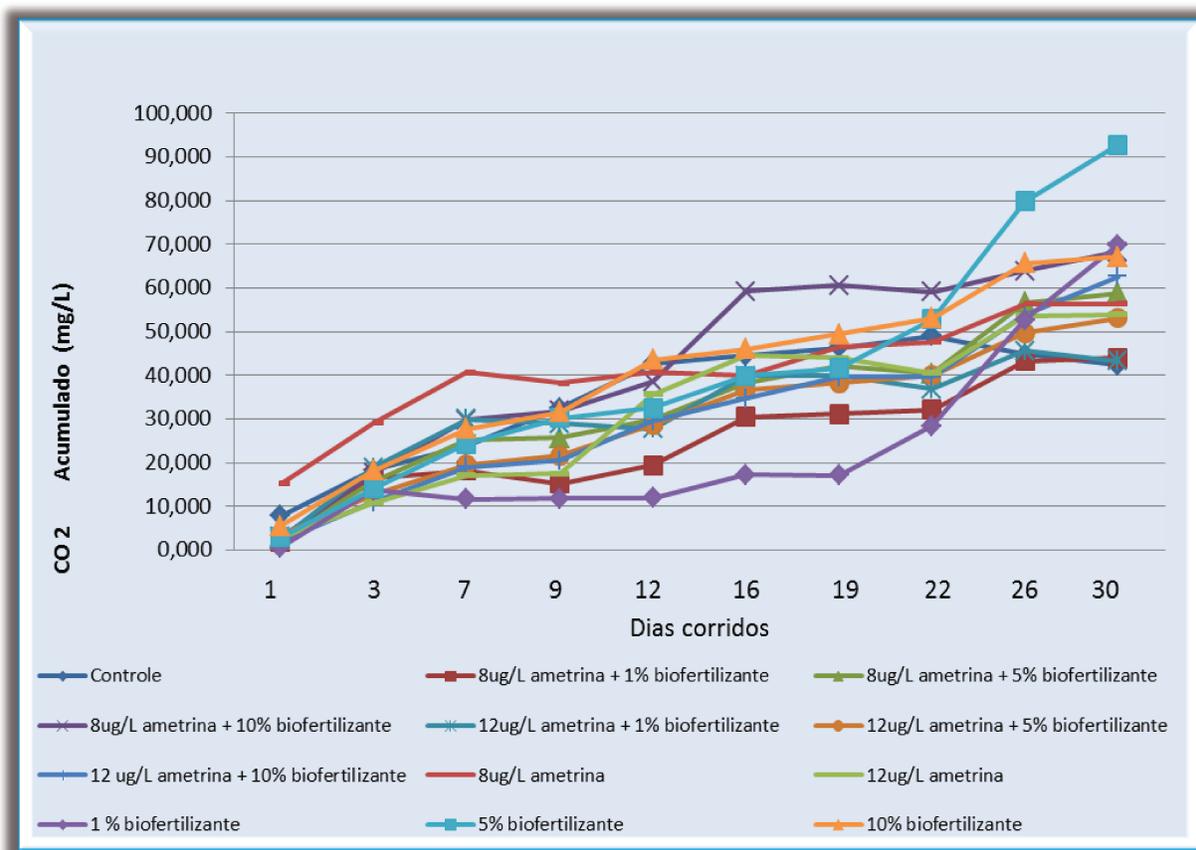
Nota-se na Tabela 8 que a atividade microbiana no solo coletado avaliada pelo método de FDA é maior, e que após a adição do herbicida ocorreu uma diminuição da mesma, provavelmente pela toxicidade da ametrina. Entretanto, esta comunidade tende ao estabelecimento do equilíbrio da população, pois segundo Alexander (1999) a resposta da microbiota do solo na presença dos herbicidas pode ocorrer em quatro fases: a) redução drástica das populações bacterianas e fúngicas; b) adaptação da população microbiana, principalmente bactérias adaptadas e com aumento do número populacional; c) estabelecimento de um equilíbrio; d) restabelecimento de um equilíbrio populacional semelhante ao original.

A degradação da ametrina por micro-organismos é o principal meio da sua transformação no solo (FARRÉ *et al.*, 2002), isto pode ser relacionado com o aumento da população bacteriana e fúngica e maior acúmulo de CO₂, no tratamento contendo 12µg/L de ametrina acrescido de 10% de biofertilizante.

Segundo Kontchou e Gschwind (1999), a degradação das triazinas (ametrina) ocorre mediante a comunidade bacteriana. O carbono da cadeia lateral das triazinas pode ser assimilado por bactérias heterotróficas. Inóculos de I6MIX possuem potencial para degradação de triazinas em baixas concentrações encontradas em ambiente naturalmente contaminado. Isto pode ser relacionado com o tratamento contendo 8µg/L de ametrina, no qual houve aumento da população bacteriana e na estimativa da atividade microbiana.

A Figura 8, expressa o segundo experimento de respirometria, avaliado durante o período de 30 dias. Neste houve o aumento de tratamentos que continham apenas biofertilizante no solo coletado na área de cultivo de cana de açúcar, nas concentrações de 1, 5 e 10% do biofertilizante Microgeo.

Figura 8. Geração de CO₂ acumulado durante 30 dias de incubação em solo arenoso, à temperatura de 28°C (Experimento 2).



Avaliando-se os resultados da Figura 8, pode observar que o biofertilizante favoreceu a atividade microbiana do solo, pois nos tratamentos com 5 e 1% de biofertilizante foram os que mais produziram CO₂ após 30 dias do experimento. Entretanto, a adição do biofertilizante provavelmente não influenciou na biodegradação do herbicida ametryn.

O biofertilizante possui matéria orgânica prontamente assimilável para a microbiota do solo, o qual pode ser verificado pela maior produção de CO₂.

A adição de substratos foi estudada por Jenkinson (1966) concluindo que houve o aumento da atividade microbiana no solo, acelerando a taxa de decomposição da matéria orgânica, mecanismos conhecido como “efeito priming”.

Entry e Emmingham (1995) verificaram que a aplicação de esterco animal em solos de pastagem aumentou a quantidade da biomassa microbiana, resultando na mineralização do herbicida atrazina.

Os biofertilizantes são capazes de aumentar a disponibilidade e absorção de minerais nutrientes pelas plantas, visto que contêm micro-organismos vivos capazes de aumentar o estado nutricional das plantas hospedeira através da sua contínua existência em associação com a planta (VESSEY, 2003).

A adição de substratos orgânicos pode ativar a microbiota, uma vez que disponibilizam nutrientes, resultando na diminuição da persistência das moléculas de herbicidas em decorrência do aumento da degradação de herbicidas (MEDEIROS, WANDERLEY e WANDERLEY, 2003).

O herbicida ametrina possui o grupo thiomethyl-s-triazina, o qual dificulta a sua degradação no ambiente, pois esse grupo é eletronegativo resultando no aumento da estabilidade química da ametrina. A biodegradação da ametrina ocorre pela substituição do grupo alquil (KONTCHOU e GSCHWIND, 1999), geralmente acondicionada à atividade metabólica de bactérias do gênero gram-negativa, resultando na mineralização do anel aromático do composto através de processos de hidroxilação e a posterior remoção do grupo alquilamino (SATSUMA, 2010).

A Tabela 9, expressa o resultado do acúmulo de CO₂ no experimento de respirometria, quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, e estimativa da atividade enzimática pelo método FDA antes e após o segundo experimento de respirometria.

TABELA 9. Resultados do experimento de respirometria (CO₂ acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 2)

Tratamentos	CO₂ acumulado mg/L 30 dias	Bactérias heterotróficas (10⁶) UFC/g de solo	Fungos (10⁶) UFC/ g de solo	FDA µg FDA hidrolisado/ g de solo seco
Solo coletado	*	1,2b	3,2a	25,9 a
Solo controle	42,2 b	1,55b	2a	26,2 a
8µg/L ametrina+1% biofertilizante	43,9b	0,8b	1,8b	26,85 a
8µg/L ametrina+5% biofertilizante	58,8c	1,2 a	2,a	24,78b
8µg/L ametrina+10% biofertilizante	68,1d	3c	1,2b	13,73c
12µg/L ametrina+1% biofertilizante	43,2b	17d	8,9c	13,78c
12µg/L ametrina+5% biofertilizante	53,0e	0,03e	0,7d	18,43d
12µg/L ametrina+10% biofertilizante	62,5f	0,1f	0,2d	18,72d
8ug/L ametrina	56,3g	0,6b	0,22d	32,1e
12ug/L ametrina	53,8e	0,06e	0,8d	30,75e
1% biofertilizante	69,9d	0,105f	0,035e	47,93f
5% biofertilizante	92,7h	0,045e	0,255d	51,45g
10% biofertilizante	67,1d	3c	0,015e	22,48h

*CO₂ não quantificado no solo coletado. ⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

O pH do solo (Tabela 6) foi de 6.3, de baixa acidez, no qual favorece a atividade da população bacteriana (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006). Isto pode ser relacionado com os tratamentos 8µg/L ametrina acrescido com 10% de biofertilizante e o que continha 10% biofertilizante, em que houve aumento da população bacteriana.

Nos tratamentos 8 e 12 µg/L ametrina, e 1 e 5% de biofertilizante tiveram aumento na estimativa da atividade microbiana.

A ametrina poderá lixiviar na maioria dos solos, no entanto esse fator poderá ser maximizado em solos arenosos, como o solo coletado para esse segundo experimento, pois possuem baixos teores de matéria orgânica e moderado potencial de sorção (SILVA *et al.*, 2012). Isto pode ser observado na comparação entre o primeiro e o segundo experimento de respirometria. No primeiro experimento utilizou-se solo argiloso, desta maneira supõe-se que a sorção do herbicida ametrina foi maior, portanto menor produção de CO₂. No segundo experimento utilizou-se solo arenoso, dessa maneira supõe-se que as moléculas da ametrina ficaram biodisponíveis á microbiota do solo, além da adição do biofertilizante, que contém matéria orgânica, resultando maior produção de CO₂ nos tratamentos.

O herbicida ametrina possui caráter de base fraca (pka= 4,1), e quando este valor está próximo ao valor do pH do solo, as moléculas do herbicida pode apresentar-se na forma protonada, promovendo a adsorção das moléculas às partículas do solo que são predominantemente cargas negativas (FERRI *et al.*, 2000; LINDSAY, 2001; FREITAS *et al.*, 2012). Em solos com baixo teores de matéria orgânica, o valor de pH da solução do solo influencia na distribuição das cargas elétricas, e no potencial de lixiviação (OLIVEIRA JR, KOSKINEN e FERREIRA, 2001; FREITAS *et al.*, 2012).

A presença de herbicidas triazínicos foi observada por Armas *et al.* (2007), em que a ametrina apresentava-se em níveis mais elevados em comparação com a atrazina e simazina. A ametrina apresenta maior solubilidade em água e menor tendência de adsorção as partículas do solo.

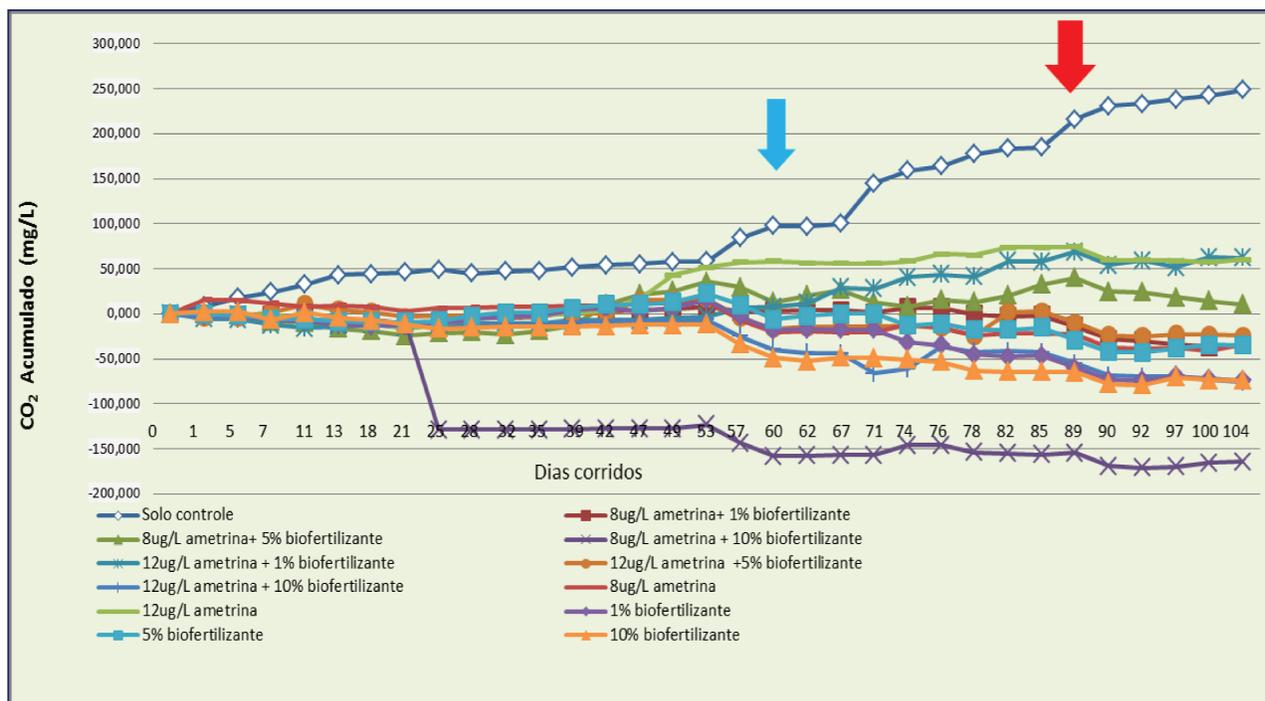
Na Alemanha Ocidental, em mais de 100 mil amostras coletadas de águas superficiais e subterrâneas, 80,7% dos contaminantes eram triazínicos (ARMAS *et al.*, 2007).

Quando a molécula de pesticida é aplicada no ambiente, ela pode atingir diferentes

caminhos, ficando retida pelas partículas minerais e orgânicas do solo, passando para a forma indisponível a biodegradação e sofrer processo de dessorção, sendo liberada a solução do solo na forma disponível a microbiota (NASCIMENTO, 2003).

A Figura 9, expressa o terceiro experimento de respirometria, avaliado durante o período de 104 dias, em solo seco.

Figura 9. Geração de CO₂ acumulado durante 104 dias de incubação, à temperatura de 28°C (Experimento 3).



Nos tratamentos todos os valores dos tratamentos do experimento de respirometria ficaram abaixo do solo controle.

Após 60 dias do experimento de respirometria, adicionou-se 1,0 ml de acetona aos tratamentos e ao solo controle, como fonte de carbono prontamente assimilável para estimular a microbiota do solo. Observa-se que houve aumento da geração de CO₂ nos seguintes tratamentos: 12 µg/L de ametrina + 1% de biofertilizante; 12 µg/L de ametrina; 8µg/L de ametrina + 5% de biofertilizante, e no tratamento com 5% de biofertilizante.

Ainda aos 89 dias do experimento, adicionou-se 1 mL de caldo nutriente para bioestimular a microbiota do solo. O tratamento que continham 12 µg/L de ametrina + 1% de biofertilizante acumulou 68,787 mg/L de CO₂, aumentando cerca de 11,116mg/L de CO₂ da leitura anterior do experimento. O tratamento que continha 8µ/L de ametrina + 5% de biofertilizante, acumulou 39,642 mg/L de CO₂, aumentando cerca de 7,01 mg/L de CO₂.

Verifica-se que desde o início até aos 49 dias do experimento, houve um período de adaptação da microbiota com a presença do herbicida ametrina. Após esse período, em alguns tratamentos, provavelmente ocorreu o restabelecimento do equilíbrio da comunidade microbiana (ALEXANDER, 1999).

Aos 104 dias, o solo controle acumulou 248,66 mg/L CO₂, os tratamentos com 12 µg/L ametrina e 12 µg/L ametrina+1% biofertilizante, produziram 60,24 mg/L CO₂, e o tratamento 8µg/L ametrina + 5% biofertilizante produziram apenas 10,72 mg/L CO₂.

Tironi *et al.* (2009) estudaram a degradação do herbicida ametrina mediante método respirométrico, concluindo que as alterações na taxa de evolução de CO₂ pode ser atribuída aos efeitos tóxicos da ametrina, e não houve diferenças entre os tratamentos que receberam quatro, oito e uma vez a dose da ametrina. Isso pode ser explicado pela maior taxa respiratória por unidade de biomassa nas maiores doses, no entanto estas podem ter reduzido a população dos micro-organismos.

A ametrina atua na inibição da fotossíntese nas plantas daninhas, podendo ser letal aos micro-organismos fotossintetizantes, como algas, cianobactérias entre outras (TIRONI *et al.*, 2009).

Reis *et al.* (2008) observaram que quando a ametrina foi aplicada em solo rizosférico, ela causou maiores efeitos negativos na evolução de CO₂ quando comparado com os herbicidas 2,4-D e trifloxysulfuron-sodium.

A Tabela 10 expressa o resultado do acúmulo de CO₂ em mg/L no experimento de respirometria, quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, e estimativa da atividade enzimática pelo método FDA antes e após o terceiro experimento de respirometria.

TABELA 10. Resultado da respirometria (CO₂ acumulado), quantificação de bactérias heterotróficas e fungos, e estimativa da atividade microbiana pelo método FDA (Experimento 3)

Tratamentos	CO₂ acumulado 104 dias	Bactérias heterotróficas (10⁶) UFC/g de solo	Fungos (10⁶) UFC/ g de solo	FDA µg FDA hidrolisado/ g de solo seco
Solo coletado	*	20a	16 a	28,47a
Solo controle	248,6b	18,1b	31,5b	15,18b
8µg/L ametrina+1% biofertilizante	-35,1c	0,62c	3,5c	23,84c
8µg/L ametrina+5% biofertilizante	10,7d	0,71c	2,5d	7,78d
8µg/L ametrina+10% biofertilizante	-164,3e	2,8d	0,6e	11,22e
12µg/L ametrina+1% biofertilizante	61,7f	1,1e	0,9e	17,46f
12µ/L ametrina+5% biofertilizante	-24,7g	0,45f	1,55f	12,51g
12µg/L ametrina+10% biofertilizante	-75,7h	0,82g	1,04f	15,01b
8µg/L ametrina	-34,0i	3,2h	0,62e	10,46e
12µg/L ametrina	60,2f	0,6c	2d	12,76h
1% biofertilizante	-74,5h	0,5c	1,3f	13,40i
5% biofertilizante	-35,0c	1,1e	0,3g	13,81i
10% biofertilizante	-74,1h	2,2d	2,8d	10,44e

*CO₂ não quantificado no solo coletado. ⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a Tabela 10 é possível observar que o solo possuía maior atividade microbiana, entretanto com a adição do herbicida e com a esterilização do mesmo, esta atividade diminuiu. A adição do biofertilizante foi fundamental para estimular algumas espécies sobreviventes pois, nos tratamentos com 8 µg/L de ametrina + 1% de biofertilizante; 12 µg/L de ametrina + 1% de biofertilizante e 12 µg/L de ametrina + 10% de biofertilizante, ocorreu aumento da atividade microbiana avaliada pelo método FDA hidrolisado em comparação ao solo controle. Os tratamentos com 8 µg/L e 12µg/L de ametrina apresentaram baixa concentração da enzima hidrolisada por FDA. Isto demonstra, que mesmo após a esterilização do solo, permaneceram algumas espécies microbianas.

A colonização em solo estéril por diferentes tipos de espécies de micro-organismos representa o sucesso inerente de cada espécie para estabelecer um nível predominante sobre as outras na ausência de fatores bióticos determinantes (AL-ACHI, PLATSOUKA e LEVY, 1991).

O potencial de colonização de micro-organismos depende de fatores ambientais e intrínsecas ao seu desenvolvimento, como disponibilidade de nutrientes, ausência de espécies concorrentes. Em solos estéreis que estão desprovido de concorrentes e predadores, as condições nutricionais e físicas do solo são os principais fatores determinantes (AL-ACHI, PLATSOUKA e LEVY, 1991).

A contaminação do solo por pesticidas está relacionado as suas propriedades de solubilidade em água, mobilidade no perfil do solo assim como também a sua persistência, propriedades do solo e do relevo local. Armas *et al.* (2007) verificou em estudos no rio Corumbataí a presença do herbicida ametrina em todo o seu período de estudo, em solo predominantemente arenoso e a cultura de cana de açúcar é predominante no local.

A biorremediação baseia-se no potencial metabólico da microbiota para a degradação de contaminantes que estão no meio (MEDINA *et al.*, 2012). Os poluentes devem estar em sua forma biodisponível para a conversão biológica, a qual está em função das propriedades físico-químicas dos contaminantes e fatores ambientais bem como do sistema biológico (SUDHARSHAN *et al.*, 2012).

A adição do biofertilizante contribuiu para o restabelecimento microbiano do solo, pois sendo este rico em nutrientes inorgânicos estimulam as atividades metabólicas da

microbiota (ATLAS e PHILP, 2005), contribuindo para a degradação de contaminantes orgânicos.

Os biofertilizantes possuem fontes de nutrientes inorgânicos, diferentes tipos de micro-organismos que tem a capacidade de transformações de elementos minerais que se encontram indisponíveis para a forma disponível, através dos processos biológicos, resultando na melhora da qualidade do solo (JILANI *et al.*, 2007).

A inoculação de micro-organismos exógenos, técnica conhecida como bioaugmentação, foi observada por Medina *et al.* (2012), com a adição de inóculos de lodos ativados melhoraram a biodegradação de solos contaminados por hidrocarbonetos.

Nwachukwu (2001) observou que em alguns locais em que a terra fértil é escassa, há a necessidade da reutilização de terrenos contaminados por petróleo, para a implantação de práticas agrícolas. Primeiramente fez-se a aplicação de nutrientes com o objetivo de estimular a microbiota autóctone para resultar na biodegradação do hidrocarboneto. Com a seleção da estirpe autóctone *Pseudomonas putida* (PP) e adição de suplementos inorgânicos, obteve-se a eficiência de remoção de 98%.

Prata *et al.* (2001), observaram que a adição de vinhaça acelerou o processo de mineralização da ametrina, concluindo que a adição de vinhaça não interferiu no processo de sorção da ametrina nas partículas do solo.

Estratégias para acelerar a biodegradação de xenobióticos no solo abrangem ativação da microbiota autóctone, com a adição de nutrientes e oxigênio, controle de temperatura e pH. A degradação do poluente no solo é afetada por fenômenos de transferências de massa, reduzindo a adsorção dos poluentes orgânicos hidrofóbicos expandindo a extensão da biodegradação (MARIANO *et al.*, 2007).

O potencial biológico do biofertilizante revela a grande quantidade de micro-organismos que possui, os quais são responsáveis pela liberação de metabólitos e antimetabólitos, como antibióticos e hormônios vegetais, atuando na fertilização do solo, na bioproteção de plantas para cultivo, e ainda na biorremediação de solos contaminados por compostos orgânicos passíveis a biodegradação (MEDEIROS *et al.*, 2003).

5.3 Análise cromatográfica

As análises cromatográficas foram realizadas pela empresa PLANTEC Laboratórios, mas não foi possível obter resultados devido a unidade de quantificação do método realizado pelo laboratório que foi em mg/Kg, e neste trabalho utilizou-se concentração de µg/L nos tratamentos.

5.4 Testes de toxicidade aguda com *Daphnia similis*

Foi realizado teste de toxicidade aguda do herbicida ametrina, em sua fórmula pura, com o organismo-teste *Daphnia similis* obtendo-se CE 50 de 43,65 mg/L. Farré *et al.* (2002) utilizando o organismo teste *Daphnia magna* obteve CE 50 de 28 mg/L na exposição do herbicida ametrina em sua fórmula comercial, ou seja, 50% do herbicida e 50% de ingredientes inertes.

As Tabelas 11, 12 e 13 expressam a toxicidade do solo antes e após o primeiro, segundo e terceiro experimento de respirometria para o organismo teste *Daphnia similis*.

TABELA 11. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia similis*, antes e após o 1º experimento de respirometria

Tratamentos	Imobilidade (%)
Solo coletado	10 a
Solo controle	30b
8µ/L ametrina+ 1% biofertilizante	25c
8µ/L ametrina+ 5% biofertilizante	40d
8µ/L ametrina+ 10% biofertilizante	20c
12µ/L ametrina+ 1% biofertilizante	10 a
12µ/L ametrina+ 5% biofertilizante	20c
12µ/L ametrina+ 10% biofertilizante	20c
8µ/L ametrina	45d
12µ/L ametrina	10 a

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tykey a 5% de probabilidade.

TABELA 12. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia similis*, antes e após o 2º experimento de respirometria

Tratamentos	Imobilidade (%)
Solo coletado	25 a
Solo controle	25 a
8µ/L ametrina + 1% biofertilizante	15b
8µ/L ametrina + 5% biofertilizante	30c
8µ/L ametrina + 10% biofertilizante	40d
12µ/L ametrina + 1% biofertilizante	30c
12µ/L ametrina + 5% biofertilizante	45d
12µ/L ametrina + 10% biofertilizante	35c
8µ/L ametrina	25 a
12µ/L ametrina	35c
1% biofertilizante	35c
5% biofertilizante	35c
10% biofertilizante	15b

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tykey a 5% de probabilidade.

TABELA 13. Teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *Daphnia similis*, antes e após o 3º experimento de respirometria

Tratamentos	Imobilidade (%)
Solo coletado	25 a
Solo controle	30b
8µ/L ametrina+ 1% biofertilizante	25 a
8µ/L ametrina+ 5% biofertilizante	35b
8µ/L ametrina+ 10% biofertilizante	45c
12µ/L ametrina+ 1% biofertilizante	35b
12µ/L ametrina+ 5% biofertilizante	30b
12µ/L ametrina+ 10% biofertilizante	30b
8µ/L ametrina	20 a
12µ/L ametrina	25a
1% biofertilizante	25 a
5% biofertilizante	25 a
10% biofertilizante	30b

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tykey a 5% de probabilidade.

Os resultados do teste de toxicidade aguda com o organismo aquático *Daphnia similis*, mostram que não houve indícios de toxicidade para calcular o CE50, desta maneira não foram realizadas diluições dos materiais testados (tratamentos após experimentos de respirometria) e os resultados foram expressos em porcentagem de imobilidade.

Nenhum dos tratamentos obteve porcentagem de imobilidade maior que 50%. No primeiro tratamento contendo 8µg/L de ametrina (TABELA 11) obteve 45% de imobilidade, e os demais tratamentos ficaram abaixo do solo coletado e do solo controle da respirometria.

No segundo experimento de respirometria (TABELA 12), nenhum dos tratamentos obteve porcentagem de imobilidade maior que 50%. Os tratamentos 8µg/L de ametrina + 1% de biofertilizante, 8 µg/L de ametrina, 1% de biofertilizante, e 5% de biofertilizante ficaram abaixo do solo coletado e do solo controle da respirometria.

No terceiro experimento de respirometria (TABELA 13), nenhum dos tratamentos obteve porcentagem de imobilidade maior que 50%. O tratamento que continha 8µg/L de ametrina + 10% de biofertilizante apresentou 45% de imobilidade aos organismos e o tratamento que continha 8µg/L de ametrina foi o que apresentou menor porcentagem de imobilidade as *Daphnias similis*.

O biofertilizante não apresentou toxicidade aguda ao organismo aquático *Daphnia similis*. Concentração de 100% de biofertilizante apresentou 5% de imobilidade à *Daphnia similis*, e nas concentrações de 1 e 10% não apresentaram nenhum efeito adverso ao organismo.

Segundo Liu (1981), um fator importante que afeta o comportamento de um composto químico no ambiente é a toxicidade.

Inafuku (2011) realizou experimentos de toxicidade aguda utilizando organismos testes *Ceriodaphnia silvestrii* expostos aos herbicidas glifosato e ametrina. De acordo com os seus resultados observou-se que o herbicida ametrina foi mais tóxico aos crustáceos do que o herbicida glifosato.

A USEPA (2005) classifica o herbicida ametrina como Classe III, moderadamente tóxico para peixes, mamíferos de grande porte e humanos, e altamente tóxico para crustáceos e moluscos.

Pereira (2012) observou que a presença do herbicida ametrina na água interferiu nos parâmetros funcionais do peixe neotropical *Prochilodus lineatus*, pois causou danos ao material genético do organismo, podendo comprometer a saúde desses animais.

Em processos de biodegradação, ao metabolizar o composto orgânico pode alterar o seu caráter tóxico, diminuindo ou aumentando sua toxicidade (MOREIRA e SIQUEIRA, 2006).

5.5 Teste de fitotoxicidade com semente de *Lactuca sativa*

A utilização de sementes em testes de toxicidade é uma maneira simples e rápida de avaliar se um composto orgânico diminuiu seu potencial tóxico, observando o processo de germinação. Esta depende de uma série de ocorrências fisiológicas influenciadas por fatores externos como ambientais, fatores internos, estado de dormência e inibidores.

Pelegrini-Brito *et al.* (2012) mostraram que testes crônicos com sementes de hortaliças são metodologias ideais para averiguação da presença de substâncias tóxicas, sendo de baixo custo, rápida execução e alta sensibilidade.

As Tabelas 14 e 15 expressam a toxicidade do solo antes e após o segundo e terceiro experimento de respirometria para a semente *Lactuca sativa*.

TABELA 14. Germinação relativa e índice de germinação de *Lactuca sativa* antes e após o segundo experimento de respirometria

Tratamentos	Germinação relativa (%)	Índice de germinação
Solo coletado	100 a	100 a
Solo controle	95,6 b	93,4b
8μ/L ametrina+ 1% biofertilizante	77,2 c	53,8c
8μ/L ametrina+ 5% biofertilizante	91,9d	65,08d
8μ/L ametrina+ 10% biofertilizante	108,3e	61,4e
12μ/L ametrina+ 1% biofertilizante	108,3e	81,9f
12μ/L ametrina+ 5% biofertilizante	85,6f	57,1g
12μ/L ametrina+ 10% biofertilizante	95,9b	66,8h
8μ/L ametrina	102,2 a	43,4i
12μ/L ametrina	102,2 a	72,4j
1% biofertilizante	106, g	83,7k
5% biofertilizante	104,4h	82,2k
10% biofertilizante	95,9b	63,9l e

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

TABELA 15. Germinação relativa e índice de germinação de *Lactuca sativa* antes e após o terceiro experimento de respirometria

Tratamentos	Germinação relativa (%)	Índice de germinação
Solo coletado	79,2 a	7 a
Solo controle	48b	7,7b
8µ/L ametrina + 1% biofertilizante	51c	6,6c
8µ/L ametrina + 5% biofertilizante	56d	5,04d
8µ/L ametrina + 10% biofertilizante	70e	11,06e
12µ/L ametrina + 1% biofertilizante	73f	13,14f
12µ/L ametrina + 5% biofertilizante	71g	12,78f
12µ/L ametrina + 10% biofertilizante	43h	3,92g
8µ/L ametrina	75i	13,73f
12µ/L ametrina	55d	8,3b
1% biofertilizante	61i	7,08b
5% biofertilizante	65k	13f
10% biofertilizante	78 l	26,06h

⁽¹⁾Médias seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si, pelo teste de Tykey a 5% de probabilidade.

Nos testes com semente *Lactuca sativa*, antes e após os experimentos de respirometria, não apresentaram inibição na germinação das mesmas e alongamento das raízes, portanto esses dados impossibilitaram a realização de cálculos para obtenção do CENO.

Em poucas amostras coletadas no rio Corumbataí com a presença de herbicidas, dentre eles a ametrina, apresentou efeitos tóxicos para *Lactuca sativa* (SANTOS, 2008).

6. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- A ametrina é um composto persistente no ambiente, de difícil degradação por via microbiana;
- A produção de CO₂ avaliada por respirometria foi maior em solo arenoso e menor em solo argiloso e em solo estéril;
- Tanto em solo argiloso como em solo estéril o melhor tratamento foi o que continha 8 µg/L ametrina ou 12 µg/L ametrina acrescido de 10% de biofertilizante;
- Houve aumento na atividade microbiana com adição de biofertilizante Microgeo em solo argiloso com ametrina e em solo estéril com ametrina, portanto o biofertilizante aumenta a atividade microbiana do solo;
- A estimativa da atividade microbiana foi maior em solo argiloso (Experimento 1) e em solo arenoso (Experimento 2);
- A população bacteriana foi maior em solo argiloso e arenoso, e menor em solo estéril;
- A população fúngica foi maior em solo argiloso e arenoso, e menor em solo estéril;
- A estimativa da atividade microbiana pelo método de FDA foi maior em solo argiloso e arenoso, e menor em solo estéril;
- A ametrina é tóxica ao mini crustáceo *Daphnia simillis*;
- Antes e após os experimentos de respirometria, o solo não apresentou efeitos tóxicos a *Daphnia simillis*, não sendo possível calcular o CE50;
- Os solos antes e após experimentos de respirometria não apresentaram inibição na germinação e alongamento das raízes de *Lactuca sativa*;
- O biofertilizante não influenciou na degradação do herbicida ametrina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 14029**. Agrotóxicos e afins- Validação de métodos analíticos. 2005.

ABNT- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS **NBR 12713**. Ecotoxicologia Aquática- Toxicidade aguda. Método de ensaio com *Daphnia Simillis*.Rio de Janeiro, 2004.

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

AHMAD, R.; KOOKANA, R.S.; ALSTON, A.M.; SKJEMSTAD, J.O. The Nature of Soil Organic Matter Affects Sorption of Pesticides. 1. Relationships with Carbon Chemistry as Determined by ¹³C CPMAS NMR Spectroscopy. **Environmental Science & Technology**, v.35, n.5, p. 878-884, 2001.

AL-ACHI, B.J.; PLATSOUKA, E.; LEVY, S.B. Competitive colonization between *Pseudomonas* species in sterile soils. **Current Microbiology**.v. 23, p. 97-104, 1991.

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

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise do glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 83 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba.

ARAÚJO, A.S.F.; LEITE, L.F.C.; NUNES, L.A.P.L.; CARNEIRO, R.F.V. **Matéria Orgânica e organismos no solo**. Ed.EDUFPI. 1ª ed. 220 p.Teresina, 2008.

ARAÚJO, E.N.; OLIVEIRA, A.P.; CAVALGANTE, L.F.; PEREIRA, W. E.; BRITO, N.M.; NEVES, C.M.L.; SILVA, E.E. Produção de pimentão adubado com esterco bovino e biofertilizante. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.11, n.5, p. 466-470, 2007.

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

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

BARRIGOSI. J.A.F.; LANNA,A.C.; FERREIRA, E. Inseticidas registrados para a cultura do arroz e análise de parâmetros indicadores de seu comportamento no ambiente. **Circular técnica 74**. EMBRAPA, 4 p, Góias, 2005.

BARIZON, R.R.M. **Sorção e transporte de pesticida sob condições de não-equilíbrio**. Tese apresentada à Escola Superior de Agricultura “Luís de Queiroz”, Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Agronomia, Piracicaba. 107 f. 2004.

BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; WITTLING, C.S. Influence of Compost Addition to Soil on the Behaviour of Herbicides. **Pesticide Science**, v. 49, n.1, pág.65-75, 1997.

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

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

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

BOEHM, M.J.; HOITINK, H.A.J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact on severity of *Pythium* root of Poinsettia. **Phytopathology**, v.82, p.259-264, 1992.

CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, C.P. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 360 p. Campinas, 1992.

CASTILLO, L.E. Pesticide residues in the aquatic environment of banana plantation areas in the North Atlantic Zone of Costa Rica. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.19, n. 8, p. 1942–1950, 2004.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Sedimentos: determinação da distribuição granulométrica - Método de ensaio. São Paulo. 15 p. **Norma Técnica, L6. 160**. 1995.

CETESB. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Solos-Coleta e preparação de amostras-Procedimentos. **Norma Técnica L6. 245**. 1984.

CHAUI-BERLINK, J.G.; BICUDO, J.E.P.W. **Respirometria a Técnica**. Ed. Santos. 130p. São Paulo. 2006.

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

COSTA, J.V.B. **Caracterização e constituição do solo**. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 7ªEd. 527 p. 2004.

COSTA, M.R. **Uso da respirometria para avaliação da biodegradação aeróbia de lixiviado de resíduos sólidos urbanos em Latossolo vermelho escuro**. 108 f. 2009. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Tecnologia, UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, Brasília.

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

DANTAS, A. Di B.; PASCHOALATO, C.F.P.R.; BALLEJO, R.R. Pré-oxidação e adsorção em carvão ativado granular para remoção dos herbicidas Diuron e Hexazinona de água subterrânea. Rev. **Engenharia Sanitária Ambiental**, v.14, n3, p. 373-380. 2009.

DUFFUS, J.H. Environmental Toxicology and Ecotoxicology. In: WHO/IPCS. World Health Organization/ International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Serie 10. **Environmental Toxicology and Ecotoxicology**. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe, 1986.

ENTRY, A. J.; EMMINGHAM, W.H. The influence of dairy manure on atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization un pasture soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v.75, p.379-383, 1995.

EPA. United States Environment Protection Agency. **R.E.D. FACTS. Ametryn. Prevention, Pesticides and toxic substances**. 2005.

Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/ametryn_red.pdf> Acesso em 2 de setembro de 2012.

FARRÉ, M.; FERNANDEZ, J.; PAEZ, M.; GRANADA, L.; BARBA, L.; GUTIERREZ, H.M.; PULGARIN, C.; BARCELÓ, D. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v37, p.704–709, 2002.

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

FERRI, M.V.W.; VIDAL, A.R.; JUNIOR, A.M.; FLECK, N.G. Atividade dos herbicidas flumetsulam e trifluralin em diferentes valores de pH densidade do solo. **Ciência Rural**, v.30, p.11-15, 2000.

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

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

FREITAS, F.C.L.; SILVA, A.A.; SILVA, L.O.C., ROCHA, P.R.P.; GUIMARÃES, F.C.L.; FREITAS, M.A.M.; FELIPE, R.S. Mobilidade do ametryn em solos da região semiárida do Rio Grande do Norte. **Planta Daninha**, v.30, n.3,p.641-648, 2012.

FUTCH, S.H.; SINGH, M. Herbicide mobility using soil leaching columns. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.62,p. 520-529, 1999.

GRAHAM, M. **Pesticides: Health, safety and the environment**. Ed. Blackwell. 235 p. Oxford-UK. 2006.

GUIMARÃES, G.L. Impactos ecológicos do uso de herbicidas no meio ambiente. **Série Técnica**.v.4,n.12, p.15-180. Piracicaba, 1987.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURSTON, R.V. Trimmed Spearman–Karber method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays.**Environmental Science & Technology**, v. 11, p. 714–719, 1977.

INAFUKU, M.M. **Avaliação da qualidade da água do rio Corumbataí com Ceriodaphnia silvestrii e determinação de metais pesados em sedimento em suspensão**.89 f. 2011. Dissertação (Mestrado). Centro de Energia Nuclear da Agricultura da Universidade de São Paulo.

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

JENKINSON, D.S. The priming action.**The use of isotopes in soil organic matter studies**.INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY.Vienna, p.199-208. 1966.

JILANI, G.; AKRAM, A.; ALI, R.M.; HAFEEZ, F.Y.; SHAMSI, I.H.; CHAUDHRY, A.N.; CHAUDHRY, A.G. Enhancing crop growth, nutrients availability, economics and beneficial rhizosphere microflora through organic and biofertilizers. **Annals of microbiology**, v.57.n.2.p.177-183. 2007.

KELLER, K. E.; WEBER, J. B. Soybean (*Glycine max*) influences metolachlor mobility in soil. **Weed Science**, v. 45, n. 6, p. 833-841, 1998.

KONTCHOU, C.Y.; GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a Pseudomonas strain.**Applied and Environmental Microbiology**, v.60, n.12, p.4297-4302, 1999.

KORNDORFER, G. H.; PEREIRA, H. S.; NOLLA, A. **Análise de silício no solo, planta e fertilizante**. GPSI – ICIAG – UFU. Boletim Técnico, 02. 50 p. Uberlândia, 2004.

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

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

LINDSAY, W.L. Chemical equilibria in soils. **Blackburn**, p. 449. New Jersey. 2001.

LIU, D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.145-149, 1981.

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

MARIANO, P.; KATAO, A.P.A.G.; ANGELIS, D.F.; BONOTTO, D.M. Laboratory study on the biorremediaion of diesel oil contaminated soil from a petrol Station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.346-353, 2007.

MEDINA, A.A.; ADETUTU, E.M.; ALLER, S.; WEBER, J.; PATIL, S.S.; SHEPPARD, P.J.; BALL, A.S.; JUHASZ, A.L. Comparison of indigenous and exogenous microbial populations during slurry phase biodegradation of long-term hydrocarbon-contaminated soil. **Biodegradation**, v. 23, p. 813-822, 2012.

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

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

MEDEIROS, M.B.; WANDERLEY, P.A.; WANDERLEY, M.J.A. Biofertilizantes líquidos. **Revista Brasileira de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n.31. 2003.

MONTEIRO, R.R.T. **Biodegradação de Herbicidas**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura/USP, p.120-126. EMBRAPA. CAMPINAS, 1996.

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

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

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

NASCIMENTO, L.A. **Da revolução verde é transgenia, ruptura e continuidade de paradigmas de tecnólogos**. Departamento de Economia. Curitiba-PR. 2003. Disponível em: <www.peteconomia.ufpr.br/banco_de_arquivos/00017_relatorio_evenci_leide.pdf> Acesso em: 15 de novembro de 2012.

NETO, M. L. **Mecanismos de Sorção de Herbicidas em solos e água**, p. 116-117. EMBRAPA-CNPDIA. São Carlos. 2006.

NUNES, A.L.; VIDAL, R.A. Persistência do herbicida S-metolachlor associado ao glyphosate ou para plantio direto. **Planta Daninha**, v. 26. n. 2. p. 385-393, 2008.

NWACHUKW, S.V. Biorremediation of sterile agricultural soils polluted with Crude Petroleum by application of the soil Bacterium, *Pseudomonas putida*, with inorganic nutrient supplementations. **Current Microbiology**, v. 42. p. 231-236, 2001.

OLIVEIRA JR, R. S.; Koskinen, W.C.; FERREIRA, F.A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. **Weed Research**, v. 41, n. 2. p. 97-110, 2001.

PATHAK, R.K.; DIKSHIT, A.K. Screening of bacterial biosorbents for removal of atrazine. **Clean Technologies Environmental Policy**, p. 1-9, 2012.

PARANÁ. Secretaria de Estado da Agricultura e do Abastecimento do Paraná- Departamento de Fiscalização. **Coletânea da Legislação de Fertilizantes, corretivos, inoculantes e biofertilizantes**. Curitiba: SEAB/DEFIS. 1997.

PELEGRINI-BRITO, N.N.; PATERNIANI, J.E.S.; BROTA, G.A.; SANTOS, E.M.; SILVA, N.B.; PELEGRINI, R.T. Ensaios biológicos com sementes para avaliar a redução da toxicidade do chorume tratamento por processo fotoquímico. **Pesquisa e Tecnologia Minerva**, v.6, n.3, p. 219-228, 2012.

PEREIRA, L. **Efeitos dos herbicidas clomazone e ametrina em parâmetros funcionais da espécie de peixe neotropical *Prochilodus lineatus***. 2012. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de São Carlos.

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

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de Herbicidas no Solo: Influência da Matéria. **Biociências**, v.6, n.2, p.17-22, 2000.

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

RAIJ, B. V.; ANDRADE, J.C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, J.A. **Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais**. Campinas: Instituto Agrônomo. 285 p. 2001.

RAND, G.M. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2.ed. Washington, D.C.: Taylor and Francis, 1995.

REIS, M.R. GUIMARÃES, A.A.; COSTA, M.D.; MASSENINI, A.M.; FERREIRA, E.A. Ação de herbicidas sobre microorganismos solubilizadores de fosfato orgânico em solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 26, n.2, p. 333-341, 2008.

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

SANTOS, M.L.P.F. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos**. 186 f.2008. Tese (Doutorado)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

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

SCHNURER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. **Applied Environmental Microbiology**, v.43, n.5, p.1256-1261, 1982.

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

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

SHANER, D.L.; KRUTZ, L.J.; HENRY, W.B.; HANSON, B.D.; POTEET, M.D.; RAINBOLT, C.R. Sugarcane soils exhibit enhanced atrazine degradation and cross adaptation to other s-triazines. **Journal American Society of Sugar Cane Technologists**, v. 30, p.1-10, 2010.

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

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

SOUZA, J. L.; RESENDE, P. **Manual de horticultura orgânica**. Viçosa: Aprenda Fácil. 564 p. 2003.

SPADOTTO, C.A. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, **Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**. 2002.

Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas>> Acesso em 29 de agosto de 2012.

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

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

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

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

TOMITA, R.Y. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **O Biológico**, v.64, n.2, p. 135-142, 2003.

TORSTENSSON, N.T.L. **Role of microorganisms in decomposition**. Academic Press. p. 159-178. London, 1980.

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

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

VESSEY, J.K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and soil**, v. 255, p. 571-586. 2003.

VIEIRA, G.M.; PRADO, A.G.S.; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O.O.; Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v.22, n.3, p. 305-308, 1999.

VIVIAN, R.; GUIMARÃES, A.A.; QUEIROZ, M.E.L.R.; SILVA, A.A.; REIS, M.R.; SANTOS, J.B. Adsorção e dessorção de trifloxysulfurion-sodium e ametryn em solos brasileiros. **Planta Daninha**, v.25, n.1, p. 97-109, 2007.

ZAGATTO, P.A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquáticos-princípios e aplicações**. p. 117-170. São Carlos: Rima, 2008.