



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS DE CERRO LARGO
CURSO DE AGRONOMIA

VIVIANE SOBUCKI

PARÂMETROS MICROBIANOS EM SOLO SOB APLICAÇÃO DO HERBICIDA
GLIFOSATO EM MICROCOSMOS

CERRO LARGO
2018

VIVIANE SOBUCKI

**PARÂMETROS MICROBIANOS EM SOLO SOB APLICAÇÃO DO HERBICIDA
GLIFOSATO EM MICROCOSMOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul como requisito para a obtenção de grau de Bacharel em Agronomia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit
Coorientadora: Ms. Caroline Badzinski

CERRO LARGO

2018

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Sobucki, Viviane

Parâmetros microbianos em solo sob aplicação do herbicida glifosato em microcosmos / Viviane Sobucki. -- 2018.

47 f.:il.

Orientador: Professor Doutor Daniel Joner Daroit.

Co-orientadora: Mestra Caroline Badzinski.

Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de Agronomia, Cerro Largo, RS, 2018.

1. Agrotóxico. 2. Atividade Microbiana. 3. Contaminação do Solo. 4. Latossolo Vermelho. I. Daroit, Daniel Joner, orient. II. Badzinski, Caroline, co-orient. III. Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

VIVIANE SOBUCKI

PARÂMETROS MICROBIANOS EM SOLO SOB APLICAÇÃO DO HERBICIDA
GLIFOSATO EM MICROCOSMOS

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado como requisito para obtenção de grau de Bacharel em Agronomia da Universidade Federal da Fronteira Sul

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado pela banca em:

06 / 12 / 2018

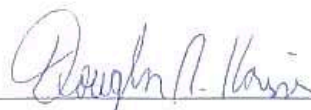
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit - UFFS



M.ª Caroline Badzinski - UFFS



Prof. Dr. Douglas Rodrigo Kaiser - UFFS

Dedico este trabalho à minha família;
Ao meu namorado Giovane;
Ao meu orientador Daniel Joner Daroit;
A minha coorientadora Caroline Badzinski.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por iluminar e guiar sempre a minha vida.

Agradeço aos meus pais, Silvestre e Ivone Sobucki, pelo amor incondicional ao longo da jornada acadêmica, pela compreensão em momentos de ausência, pelo apoio infinito, por tudo que fizeram e fazem pelos seus filhos, que por muitas vezes tiveram que renunciar aos seus sonhos para que meus irmãos e eu pudéssemos realizar os nossos. Obrigada por propiciarem mais este, tão importante na minha vida. Nunca conseguirei expressar minha gratidão por tudo que fizeram por mim.

Agradeço a minha irmã Lisiane, pelos anos que compartilhamos, pela amizade, pelos momentos que estivemos juntas e pelo auxílio na concretização deste trabalho.

Agradeço ao meu irmão Vinicio, pelo carinho, amor, zelo, ajuda e presença constantes. Obrigada pela colaboração em atividades e trabalhos práticos, és alguém que prezo muito.

Agradeço ao meu namorado Giovane Augusto Welter, pelo apoio incondicional desde o início dessa caminhada. Não há como deixar de reconhecer ao longo desses anos sua contribuição no meu crescimento, sempre com respeito e carinho comigo, assim como todos da sua família. Obrigada pelo auxílio na realização desse experimento, pelos momentos de consolo, compreensão, paciência e amor, foram essenciais para mim. Obrigada por estar sempre ao meu lado. Tu és alguém que admiro muito.

Agradeço ao colega Rodrigo Ramos, pelas vezes que se disponibilizou em fazer as análises nos momentos de ausência.

Agradeço aos professores Douglas Rodrigo Kaiser e Juliane Ludwig, pelo auxílio na montagem e implantação deste trabalho, pois eram muitas as dúvidas.

Agradeço ao professor Renan Costa Beber Vieira, pelo empréstimo de alguns equipamentos para a realização do experimento.

Agradeço ao professor Evandro Pedro Schneider, por ceder a área experimental para a coleta de solo e posterior montagem dos microcosmos.

Agradeço a técnica do laboratório Caroline Badzinski, por todo o auxílio e disponibilidade na realização das análises laboratoriais e pela coorientação neste trabalho.

Agradeço especialmente ao professor Daniel Joner Daroit, por aceitar orientar minha pesquisa de TCC, pelo apoio, paciência e pela ajuda no decorrer desse projeto que, com certeza, eu não conseguiria sozinha.

Enfim, agradeço imensamente a todos aqueles, que de uma forma ou outra, auxiliaram na concretização do trabalho.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota. ”

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O glifosato é considerado um potente herbicida pós-emergente bastante utilizado na agricultura, principalmente no cultivo da soja, no entanto não é metabolizado nas plantas, sendo os microrganismos responsáveis pela sua degradação. A microbiota do solo é responsável pela execução e controle de várias funções fundamentais, e a contaminação do solo por agrotóxicos pode tanto inibir parte da microbiota pela toxicidade de seus componentes, mas também impulsionar populações autóctones capazes de degradar tais compostos. Nesse sentido, é de grande importância a avaliação dos parâmetros microbiológicos, pois proporcionam informações sobre a presença e a atividade de microrganismos, assim como também sobre a intensidade, tipo e duração dos efeitos da contaminação por agrotóxicos na atividade metabólica do solo. O objetivo deste trabalho foi avaliar diferentes parâmetros microbianos em Latossolo Vermelho sem histórico recente de contaminação sob aplicação de glifosato em microcosmos. Para o cálculo da dose utilizada, foi considerada a concentração de ingrediente ativo (i.a) como equivalente ácido de glifosato (36,5%) e a dose máxima indicada na bula de produto comercial formulado (6 L ha^{-1}), sendo avaliadas duas concentrações de glifosato: dose recomendada (DR; $2,37 \text{ mg ia kg}^{-1}$ de solo) e 10 vezes a dose recomendada por hectare (10X; $23,70 \text{ mg ia kg}^{-1}$ de solo). Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro estéreis ($3,5 \text{ L}$) com fechamento hermético, sendo adicionados $1,250 \text{ kg}$ de solo em cada frasco, contemplando uma camada de $7,5 \text{ cm}$. Para cada dose foram mantidos microcosmos em quadruplicata, além de microcosmos sem aplicação do herbicida (SA), também em quadruplicata. As incubações foram realizadas por 28 dias em temperatura ambiente, sem incidência de luz. Como indicadores de atividade microbiana utilizou-se a respiração do solo, atividade hidrolítica total, atividade de desidrogenase, contagem de heterotróficos totais, carbono da biomassa microbiana e quociente metabólico. Nas condições experimentais utilizadas, os resultados indicaram tendência de maior respiração nos microcosmos com aplicação de glifosato, sendo 15% e 54% superior nos tratamentos DR e 10X do que em SA. Os resultados de atividade hidrolítica, desidrogenase e contagem de heterotróficos totais oscilaram ao longo dos 28 dias, no entanto, sem diferença significativa entre os tratamentos. O carbono da biomassa microbiana apresentou tendência de diminuição logo após a aplicação de glifosato em comparação com SA; contudo, valores similares foram observados ao final dos 28 dias. No início das incubações, o quociente metabólico demonstrou tendência de valores superiores na presença de glifosato, potencialmente indicando maior estresse da microbiota. No entanto, este parâmetro apresentou-se similar entre os tratamentos ao final dos experimentos. Nas condições do experimento realizado, os resultados indicam que, na maior dose recomendada do herbicida formulado (6 L ha^{-1}) e, ainda, em dose dez vezes maior (60 L ha^{-1}), os potenciais efeitos sobre a microbiota são transitórios.

Palavras-chave: agrotóxico, atividade microbiana, contaminação do solo, Latossolo Vermelho.

ABSTRACT

Glyphosate is considered a potent post-emergent herbicide widely used in agriculture, especially in soybean cultivation, but is not metabolized in plants, and the microorganisms are responsible for its degradation. The soil microorganism is responsible for the execution and control of several fundamental functions, and soil contamination by pesticides can both inhibit part of the microbiota by the toxicity of its components, but also boost native populations capable of degrading such compounds. In this sense, it is of great importance to evaluate the microbiological parameters, since they provide information on the presence and activity of microorganisms, as well as on the intensity, type and duration of the effects of pesticide contamination on soil metabolic activity. The objective of this work was to evaluate different microbial parameters in Red Latosol without recent history of contamination under application of glyphosate in microcosms. The concentration of active ingredient (ai) as glyphosate acid equivalent (36.5%) and the maximum dose indicated in the formulated commercial product package (6 L ha⁻¹) were considered for calculation of the dose used, and two concentrations of glyphosate: recommended dose (DR: 2.37 mg ai kg⁻¹ soil) and 10 times the recommended dose per hectare (10 × 23,70 mg ai kg⁻¹ soil). The microcosms were assembled using sterile glass bottles (3.5 L) with hermetic closure, adding 1,250 kg of soil in each flask, contemplating a layer of 7.5 cm. For each dose, the microcosms were maintained in quadruplicate, as well as microcosms without application of the herbicide (SA), also in quadruplicate. Incubations were performed for 28 days at room temperature, with no incidence of light. As indicators of microbial activity, soil respiration, total hydrolytic activity, dehydrogenase activity, total heterotrophic counts, microbial biomass carbon and metabolic quotient were used. In the experimental conditions used, the results indicated a tendency of greater respiration in the microcosms with application of glyphosate, being 15% and 54% higher in DR and 10X treatments than in SA. The results of hydrolytic activity, dehydrogenase and total heterotrophic counts fluctuated over the 28 days, however, with no significant difference between the treatments. The carbon of the microbial biomass presented a tendency of decrease soon after the application of glyphosate in comparison with SA; however, similar values were observed at the end of 28 days. At the beginning of the incubations, the metabolic quotient showed a trend of higher values in the presence of glyphosate, potentially indicating greater stress of the microbiota. However, this parameter was similar between the treatments at the end of the experiments. Under the conditions of the experiment, the results indicated that, at the highest recommended dose of the formulated herbicide (6 L ha⁻¹) and also in a dose ten times higher (60 L ha⁻¹), the potential effects on the microbiota are transient .

Keywords: agrotoxic, microbial activity, soil contamination, red latosol.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Vias de degradação do glifosato.....	16
Figura 2: Registro das temperaturas ao longo do experimento.	24
Figura 3: Microcosmo hermeticamente fechado contendo recipiente com NaOH.	24
Figura 4: Produção cumulativa de CO ₂ por tratamento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.	30
Figura 5: Atividade hidrolítica total do solo nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação...	32
Figura 6: Atividade da desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.	34
Figura 7: Contagem de microrganismos heterotróficos totais pelo NMP nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.....	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado da análise do solo utilizado no experimento. Cerro Largo, RS.	22
Tabela 2: Carbono da biomassa microbiana nos três tratamentos avaliados no 1° e 28° dias de incubação.....	35
Tabela 3: Quociente metabólico nos três tratamentos avaliados no 1° e 28° dias de incubação.	36

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 OBJETIVOS	13
1.1.1 Objetivo Geral.....	13
1.1.2 Objetivos Específicos.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA.....	14
2.2 O HERBICIDA GLIFOSATO.....	15
2.3 IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA DO SOLO.....	17
2.3.1 Parâmetros utilizados para a determinação de efeitos sobre a microbiota do solo.....	18
2.4 IMPACTO DOS HERBICIDAS SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO.....	22
3.2 PREPARO DO CONTAMINANTE.....	22
3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS.....	23
3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA	24
3.5 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO	25
3.6 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE.....	26
3.7 CARBONO DA MASSA MICROBIANA	26
3.7.1 Quociente metabólico.....	28
3.8 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS.....	28
3.9 ANÁLISE DOS DADOS	29
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA	30
4.2 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO	32
4.3 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE.....	33
4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E QUOCIENTE METABÓLICO.....	34
4.5 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS.....	37
5 CONCLUSÃO	39
6 REFERÊNCIAS	40

1 INTRODUÇÃO

Devido ao aumento da população mundial e para atender às necessidades nutricionais, criou-se uma demanda pela ampliação da produção agrícola global, impondo que a mesma área agrícola produza alimentos para um número cada vez maior de pessoas. As perdas ocasionadas por pragas, doenças e plantas daninhas podem contribuir significativamente para a redução da produtividade, tornando os agrotóxicos itens essenciais para a obtenção de maiores rendimentos (STEFFEN et al., 2011).

Entre os agrotóxicos mais utilizados estão os herbicidas. As elevadas perdas relacionadas à perturbação causada pelas plantas daninhas, bem como a carência de alternativas de igual ação, fazem dos herbicidas uma prática fundamental, fazendo com que se torne um dos principais fatores antropogênicos com potencial para alterar a microbiota dos solos agrícolas (BUSSE, 2001).

O glifosato é considerado um potente herbicida pós-emergente bastante utilizado na agricultura, principalmente no cultivo da soja e plantas transgênicas, para o controle de ervas daninhas tanto anuais como perenes, sendo absorvido pelas plantas por difusão através da cutícula, contudo não é metabolizado nas plantas, sendo os microrganismos responsáveis pela sua degradação (RODRIGUES, 2009).

A microbiota do solo é responsável pela execução e controle de várias funções fundamentais, como a decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, ciclagem de nutrientes, fluxo de energia, fixação de nitrogênio atmosférico, decomposição e, também, controle biológico de pragas e doenças. Diante disso, a contaminação do solo por agrotóxicos pode tanto inibir parte da microbiota pela toxicidade de seus componentes, mas também impulsionar populações que habitam naturalmente ali, por serem capazes de degradar esses compostos (MOREIRA, 2006).

Várias pesquisas vêm sendo desenvolvidas nas últimas décadas envolvendo esta temática e revelam uma ampla oscilação nos efeitos dos herbicidas sobre a microbiota do solo, tanto na natureza como na magnitude, em função, especialmente, do herbicida e das doses utilizadas. A utilização do uso repetitivo de herbicidas do mesmo grupo químico por longos períodos, sem levar em consideração os intervalos requeridos para que ocorra a recuperação da funcionalidade da microbiota do solo, pode desencadear alterações de difícil reversibilidade.

Estas considerações ressaltam a necessidade de gerar informação específica para os distintos herbicidas (WARDLE et al., 1990).

A partir das constatações descritas anteriormente, percebe-se a importância da avaliação dos parâmetros microbiológicos, como a respiração do solo, atividades enzimáticas e carbono da biomassa microbiana, pois proporcionam informações sobre a presença e a atividade de microrganismos, assim como também sobre a intensidade, tipo e duração dos efeitos da contaminação por esses produtos agrícolas na atividade metabólica do solo. Por isso, a atividade microbiana do solo se mostra como uma forma bem-intencionada de avaliar a perturbação do solo (WOLIŃSKA; STEPNIEWSKA, 2012).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar diferentes parâmetros microbianos em Latossolo Vermelho sem histórico recente de contaminação sob aplicação de glifosato em microcosmos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Mensurar a respiração do solo com e sem a aplicação de glifosato;
- Investigar a atividade enzimática da desidrogenase em solos com e sem a aplicação de glifosato;
- Determinação da atividade hidrolítica total dos solos, com e sem a aplicação de glifosato, através da hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA);
- Enumerar a população microbiana heterotrófica cultivável total do solo em condições de aplicação e não-aplicação de glifosato;
- Avaliar o efeito do glifosato no solo sobre o carbono da biomassa microbiana;
- Calcular o quociente metabólico frente a contaminação por glifosato no solo.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AGROTÓXICOS NA AGRICULTURA

O aumento da população mundial juntamente com a necessidade de elevar a produção de alimentos modificou as técnicas utilizadas na agricultura. Dentre uma das mais relevantes mudanças ocorridas na produção agrícola foi a utilização de agrotóxicos, produtos utilizados para o controle de insetos, doenças e plantas invasoras que danificam o crescimento das culturas (SILVA, 2017).

Segundo Jobim et al. (2010), no Brasil a utilização de agrotóxicos iniciou-se na década de 1960, ano em que o governo adotou o chamado Plano Nacional do Desenvolvimento (PND), onde forçou os agricultores a comprar uma cota de agrotóxicos para se ter o crédito rural. Diante disso, a utilização de agrotóxicos aumentou excessivamente, contribuindo para a quase extinção de práticas alternativas para o manejo de pragas.

O agrotóxico muitas vezes é conceituado como um insumo necessário para a viabilidade dos sistemas produtivos rurais. Uma cultura agrícola, segundo produtores e trabalhadores rurais, sem a presença de agrotóxicos não seria viável. O benefício, mais plausível associado ao uso de agrotóxicos seria o aumento na produtividade da lavoura, diminuindo assim, a demanda por recursos naturais e tecnológicos para a produção de uma mesma quantidade de produtos agrícolas a ser ofertada (VEIGA, 2007).

Assim, estes fatores poderiam acabar beneficiando os consumidores finais, já que há um aumento na oferta e uma redução dos custos unitários de produção, proporcionando uma redução nos preços desses produtos a serem ofertados. Com isso, além de tornar os produtores locais relativamente mais competitivos, propiciaria que uma parte da população, com um nível de renda mais baixa, pudesse ter acesso a produtos que anteriormente não teria sem a diminuição desses preços (VEIGA, 2007).

É bem sabido, porém, que a utilização destes insumos provoca contaminação ambiental, bem como, também é a causa de muitos problemas de saúde pública (BOHNER et al., 2013). Segundo Cassal (2014), como o produtor rural é ou poderá ser diretamente afetado, ele deve ser o primeiro a tomar medidas preventivas, pois a sua atividade de renda depende de práticas que conservem o meio ambiente e conseqüentemente a sua saúde, sendo indispensável o uso consciente desses produtos em suas lavouras.

2.2 O HERBICIDA GLIFOSATO

De acordo com o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2016), as vendas anuais de agrotóxicos e afins no Brasil entre os anos de 2000 e 2012 tiveram um crescimento de 194,09%, tendo destaque a ocorrência de um crescimento mais acentuado na Região Centro-Sul do país. Em 2012, o RS estava em 4º lugar no ranking de comercialização de agrotóxicos, totalizando 46.778,99 toneladas de ingredientes ativos. E em 2016, o herbicida glifosato aparece na primeira colocação com a venda de 185.602,22 toneladas de ingrediente ativo no Brasil.

Os herbicidas são considerados agentes biológicos como fungos, ou compostos químicos, são usados na agricultura para controlar e evitar o desenvolvimento de espécies específicas (ROMAN, 2007).

Nesse sentido, é de grande relevância a resistência dessas espécies específicas a herbicidas, pois há um número pequeno de herbicidas alternativos no controle de biótipos resistentes, sendo um desses o herbicida glifosato (VARGAS; ROMAN, 2006).

O glifosato (N-(fosfometil)glicina) é um composto organofosforado, não seletivo, sistêmico, pós-emergente, e possui uma rápida absorção foliar e translocação. Foi desenvolvido para o controle de mais de 180 plantas daninhas incluindo as anuais e perenes para diversas culturas. O volume aplicado e a frequência variam de 0,5 a 6,0 L/ha que são dependentes de cada cultura (DÖRR, 2015).

Atualmente, existem algumas plantas daninhas, que por algum fator manifestam esta dificuldade de controle com o uso do glifosato, como por exemplo a trapoeraba (*Commelina benghalensis*) e a corda-de-viola ou corriola (*Ipomoea* spp.). Em virtude disso, essas espécies demandam maiores doses do herbicida e por isso são consideradas espécies de difícil controle, por se tornarem resistentes ao herbicida aplicado, como é o caso da buva (*Conyza bonariensis*). (PEDROSO; SIQUEIRA, 2016).

As plantas daninhas, diferem das culturas por apresentarem uma grande variabilidade genética entre si. Considerando uma mesma área geográfica, quanto maior for a variabilidade genética e maior for a densidade da infestação, as chances de surgir resistência a um determinado herbicida ou a mecanismos de ação aumentam expansivamente (PEDROSO; SIQUEIRA, 2016).

Quando o glifosato é aplicado sobre as plantas, ele é absorvido através das folhas e depois é translocado para as outras partes da planta. A Figura 1 apresenta a sua fórmula estrutural, onde possui em sua molécula uma ligação covalente carbono-fósforo (C-P)

altamente estável. Seu mecanismo de ação é muito peculiar porque ele é considerado o único herbicida que faz a inibição da enzima 5-enolpiruvil-chiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPs) que catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, fazendo com que a síntese de três aminoácidos essenciais – triptofano, fenilalanina e tirosina não seja realizada (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

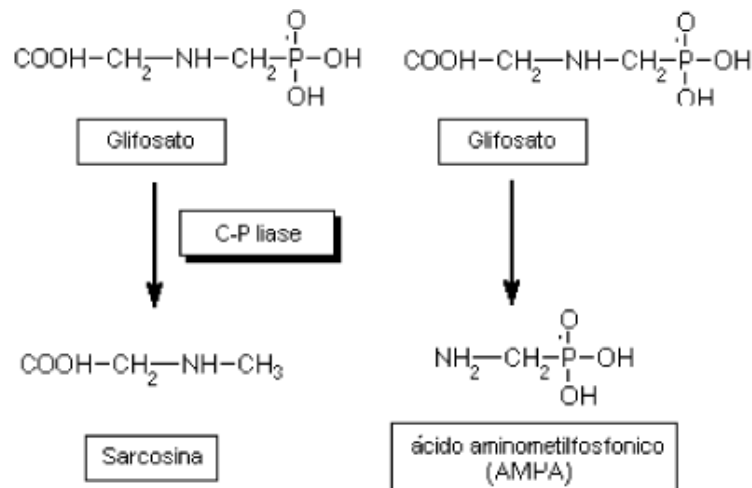


Figura 1: Vias de degradação do glifosato. (Fonte: Adaptado de De Amarante Junior; Santos, 2002).

O principal metabólito do glifosato é o ácido aminometilfosfônico (AMPA), sendo este degradado pela população microbiana do solo, depois é degradado para dióxido de amônio e finalmente em carbono. Na presença de agrotóxicos, a atividade e a população de microrganismos são alteradas, devido ao aumento da fonte de carbono que auxilia no crescimento microbiano (WARDLE; PARKISON, 1990). Cerca de 50% da molécula original é metabolizada e o restante é adsorvido, aprisionado no solo, sendo a quantidade adsorvida influenciada pelo teor de matéria orgânica, nível de P e textura do solo (ALMEIDA, 1985).

De acordo com Liu et al., (1991), são duas as vias de degradação microbiana do solo: a primeira se relaciona com a clivagem da AMPA e a segunda é pela clivagem da ligação C-P, por ação da enzima C-P liase, transformando em sarcosina, como mostra a Figura 1.

Quando os herbicidas são aplicados durante vários anos, possuem degradação mais acelerada do que quando são aplicados à primeira vez, pois os microrganismos estão mais adaptados para metabolizar o composto (ROBERTSON; ALEXANDER, 1994).

As plantas transgênicas criadas para serem resistentes aos herbicidas foram desenvolvidas para simplificar o manejo de ervas daninhas dentro do sistema de produção

agrícola com uso de agrotóxicos. As empresas de transgenia afirmam que as atuais variedades de transgênicos reduzem substancialmente o uso de agrotóxicos (MONQUERO, 2005).

Quando o glifosato é aplicado sobre a planta, os primeiros sintomas são a clorose foliar seguida de necrose. Além destes, são encontrados outros sintomas como o enrugamento ou malformações, principalmente em regiões de rebrote. Os sintomas fitotóxicos de danos causados pelo glifosato em geral ocorre lentamente, com a morte da planta em vários dias (GRUYS; SIKORSKI, 1999).

O glifosato em contato com o solo, pode ser adsorvido pelos coloides. A sorção do herbicida é muito importante, porque indica quanto do produto ficará contido no solo e quanto estará disponível em sua solução. Isso se deve ao fato do composto possuir afinidade com os óxidos e hidróxidos de ferro e alumínio, formando assim o chamado resíduo-ligado. É considerado um processo definitivo, pois por causa dessa ligação, as moléculas ficam indisponíveis, sendo desprezível a ação na planta. Alguns estudos indicam também, que a matéria orgânica, temperatura e pH, influenciam na sorção do glifosato (FLORIDO, 2015).

Em se tratando das propriedades do glifosato, ele é classificado com baixa mobilidade, sendo insignificante o movimento da molécula abaixo de no perfil do solo (FLORIDO, 2015).

O glifosato, muitas vezes, é retratado com capacidade de contaminar o ambiente, por ser altamente hidrossolúvel, existindo a possibilidade de ser detectado em águas superficiais. No entanto, por ser pouco móvel no solo, só se constatará presença do herbicida em rios e lagos, após uma chuva muito forte ou erosão (AMARAL, 2009).

2.3 IMPORTÂNCIA DA MICROBIOTA DO SOLO

Os microrganismos existentes no solo, também denominados de microbiota, são assim caracterizados por cinco grupos: bactérias, actinomicetos, fungos, algas e protozoários. Os microrganismos vivos do solo também são chamados de biomassa microbiana e aproximadamente 90% da atividade microbiana do solo é realizada por bactérias e fungos (DA SILVEIRA; DOS SANTOS FREITAS, 2007).

Os atributos químicos e físicos do solo, bem como a meso e microfauna são diretamente afetados pela atividade desses microrganismos, por isso da importância de preservá-los contribuindo, para a melhoria dos sistemas agrícolas. A disponibilidade de água, nutrientes, energia, distribuição dos agregados do solo e a radiação são alguns dos fatores que limitam a atividade microbiana (HUNGRIA, 2000).

Um fator relevante para o solo e conseqüentemente para o desenvolvimento das plantas, é o nitrogênio (N). Em se tratando dos sistemas de produção, a disponibilidade desse nutriente pode ser um fator limitante para o sucesso de uma plantação (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

O processo de mineralização é resultante de interações entre substratos distintos, diversidade dos organismos e condições específicas do solo. Algumas condições como temperatura baixa e níveis de água baixos no solo, fazem com que a atividade microbiana seja afetada e conseqüentemente reduzem as taxas de mineralização. Outro fator relevante é o manejo do solo, pois também afeta a qualidade do solo, a quantidade de matéria orgânica, interferindo também no processo de mineralização (MOREIRA; SIQUEIRA 2006).

A degradação de vários compostos, desde os mais simples, como aminoácidos e proteínas, até os mais complexos como resíduos de plantas e ceras são realizados pelos microrganismos, tendo importância também na degradação dos compostos químicos sintetizados pelo homem (TORSTENSSON, 1980).

Um fator fundamental nessa questão está a ação do homem em querer transformar áreas florestais em áreas agrícolas por meio da adição de xenobióticos que podem modificar gradativamente tanto o tamanho como a composição da comunidade de microrganismos adaptadas aos diferentes solos (CHILDS, 2007). Os estudos relacionados ao uso de parâmetros microbianos para indicar a poluição do solo e do ambiente têm sido desenvolvidos com o objetivo de certificar qual é a ação desses elementos contaminantes, que são oriundos de fertilizantes, pesticidas, resíduos orgânicos, bem como do manejo do solo sobre a comunidade e a atividade microbiana do solo. Nesse sentido, vários estudos estão sendo pesquisados, relacionados ao fato dos microrganismos possuírem uma intensa relação com as propriedades do solo e também porque são eles os responsáveis por vários processos biológicos e bioquímicos do solo, sendo assim, vulneráveis às alterações ocasionadas naturalmente ou pelo homem (DA SILVEIRA; DOS SANTOS FREITAS, 2007).

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

De acordo com alguns trabalhos, o parâmetro microbiano a ser analisado deve apresentar algumas características importantes, entre elas ser avaliado de forma minuciosa; possuir variedade nos tipos e condições de solo; ser vulnerável à ação do agente em estudo e possuir confiabilidade científica. Essas análises são muito utilizadas para avaliar a qualidade do solo, no entanto, há necessidade de realizar diversas análises ao mesmo tempo para obter um

resultado mais preciso da interferência do agente com o solo (DA SILVEIRA; DOS SANTOS FREITAS, 2007)

Para se determinar os efeitos dos contaminantes e do manejo do solo sobre a atividade microbiana, as análises mais utilizadas são a liberação de CO₂ pela respiração microbiana, atividades enzimáticas, mineralização de nitrogênio e carbono, contagem de microrganismos e biomassa microbiana (DA SILVEIRA; DOS SANTOS FREITAS, 2007).

Segundo Gregorich (1994), a quantificação da biomassa microbiana do solo é o parâmetro mais utilizado em estudos para determinar o impacto ambiental sobre a microbiota do solo. Ela é uma das responsáveis por controlar funções chaves no solo, como a decomposição e o acúmulo de matéria orgânica, ou transformações envolvendo os nutrientes minerais. Solos que possuem um alto conteúdo de biomassa microbiana são capazes de estocar e ciclar mais nutrientes no sistema (DE ARAÚJO; MONTEIRO, 2007).

O método de fumigação-extração é o mais utilizado para determinar a biomassa microbiana do solo. Esse método é baseado na esterilização parcial (fumigação) de amostras de solos com clorofórmio, fazendo com que as populações microbianas sejam mortas rapidamente, rompendo assim a membrana celular e liberando os constituintes internos, causando pouca interferência na matéria orgânica do solo e podendo ser facilmente removido do solo. A partir da extração e quantificação do carbono das amostras fumigadas e não-fumigadas após 24 h, é realizada a estimativa (VANCE et al., 1987).

A respiração microbiana é um método que determina a quantidade de carbono liberado na forma de CO₂, resultante da decomposição da matéria orgânica pela comunidade microbiana aeróbia do solo. Essa análise permite quantificar o carbono que está sendo degradado no solo e também verificar se as condições climáticas, o manejo do solo e a presença de elementos poluentes estão ou não comprometendo a atividade microbiana durante a decomposição e a mineralização do carbono no solo (DA SILVEIRA; DOS SANTOS FREITAS, 2007).

A atividade microbiana representa todas as reações metabólicas celulares, incluindo suas interações com os organismos do solo (SIQUEIRA et al., 1994). A hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) é um método que avalia a atividade hidrolítica total do solo. O FDA é hidrolisado por várias enzimas microbianas, sendo a maioria extracelulares (lipases, proteases e esterases) representando a atividade que essas enzimas exercem no solo (SILVA et al., 2004).

Outro parâmetro importante de se analisar é a atividade da desidrogenase. São enzimas intracelulares, produzidas por microrganismos vivos, indicam a capacidade oxidativa da microbiota e desempenha papel importante na degradação da matéria orgânica (DICK, 1997). Alguns pesquisadores recomendam o seu uso nos testes com agrotóxicos, pois a desidrogenase

permite avaliar com sensibilidade a atividade microbiana em um ou dois dias em experimentos de laboratório (CHILDS, 2007).

A enumeração de microrganismos pode ser avaliada através de contagens ou a partir da estimativa da biomassa microbiana. Representam a população de organismos cultiváveis no solo e são um indicativo de efeitos positivos, neutros ou negativos sobre esta parte da microbiota do solo. Pode ser realizada pela técnica do número mais provável (NMP) em placas de 96 poços em Caldo Soja Tripticaseína (TSB) (CHILDS, 2007).

2.4 IMPACTO DOS HERBICIDAS SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO

A microbiota do solo pode ser afetada de forma direta ou indiretamente através da ampliação de pesticidas em áreas agrícolas. Segundo a literatura, quanto menor a solubilidade em água de uma molécula de pesticida, maior é a capacidade de sorção desta no solo. Porém, para o glifosato, produto utilizado neste trabalho, essa regra não se encaixa, pois é uma molécula muito solúvel em água e extremamente sorvida. A sorção do glifosato relaciona-se com as forças de van der Waals, ou seja, pode apresentar carga positiva e negativa ao mesmo tempo e também com a formação de ligação covalente, fazendo com que o glifosato permaneça no solo como resíduo-ligado (PRATA; LAVORENTI, 2002).

O glifosato possui uma característica muito peculiar de ser adsorvido pelas partículas de solo e permanecer inativo até sua completa degradação (GIESY, 2000). Alguns estudos realizados em solos brasileiros mostram que, em Latossolo argiloso, a meia vida do glifosato é influenciada pelo histórico de aplicação do produto, onde há uma pequena variação, mas geralmente em solos tropicais é muito curta, ficando em torno de 12 dias no solo sem histórico de aplicação e de 22 dias no mesmo solo, após 11 anos de aplicação do produto (ARAÚJO et al., 2003).

Ao analisar a meia-vida de um certo produto no solo, é preciso reconhecer que muitos desses valores se referem a pesquisas em laboratório. Em condições de campo, certamente existem fatores que contribuem na alteração desses valores. Nesse sentido, quando realizamos uma aplicação, devemos considerar que somente uma parte da dose que aplicamos vai atingir o solo, pois a outra parte do produto é absorvida pelas plantas. Depois é liberado de forma gradativa, podendo ser bastante lento, pois é influenciado pela relação C/N, que no caso de algumas plantas é bastante alta (GALLI; MONTEZUMA, 2005).

Outros estudos apontam que a influência de repetidas aplicações de glifosato influencia no aumento do tempo da meia-vida do glifosato extraível e do mineralizável. Desse modo, percebe-se um efeito negativo do herbicida sobre a atividade microbiana do solo por haver maior efeito residual (ANDRÉA, 2003).

Em experimento realizado por Faria (2014), em um solo classificado como Latossolo Vermelho Amarelo, observou-se que os herbicidas sulfentrazone e tebuthiuron reduziram a respiração do solo, e o metilarsonato monossódico, tebuthiuron, clomazone influenciam negativamente no carbono da biomassa microbiana, sendo o clomazone o herbicida que causou o maior impacto na atividade da microbiota.

Outro trabalho, realizado por Zilli (2008) em Latossolo Vermelho distroférico, onde foi utilizado como herbicidas o glifosato e o imazaquim, mostraram que ambos os herbicidas não ocasionaram alterações significativas no teor de carbono da biomassa microbiana do solo, na respiração basal do solo e no quociente metabólico, porém, a comunidade bacteriana foi afetada.

Existem vários estudos mostrando grande variabilidade de resultados, alguns revelam efeitos de inibição e outros de estimulação da atividade microbiana. É recorrente a dificuldade ao realizar estudos onde avaliam os impactos dos pesticidas sobre a microbiota e processos biológicos do solo, pois estes são afetados por inúmeros fatores, relacionados ao próprio herbicida, a forma de aplicação, o tipo de solo, o manejo e a população de microrganismos existentes no local (MOREIRA; SIQUEIRA 2006).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Para a implantação do experimento foi coletado solo na profundidade de 0 a 10 cm (Horizonte A), de uma área sem histórico recente de contaminação conhecido por agrotóxicos, localizada na Área Experimental da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), município de Cerro Largo/RS. O solo é classificado pelo Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos como Latossolo Vermelho, com classe textural argilosa (EMBRAPA, 2006).

A área utilizada para a coleta do solo se encontrava durante 6 anos em pousio e alguns dias antes do início do experimento, foram implantadas algumas árvores frutíferas, sendo então este solo pouco cultivado e manejado.

O solo foi submetido à secagem (22 ± 5 °C por 2 dias) e peneirado utilizando peneira com malha de 2 mm (COLLA et al., 2014), posteriormente homogeneizado, este solo foi utilizado para a montagem dos microcosmos.

Uma amostra do solo foi encaminhada para caracterização química no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), *Campus* Santa Maria (Tabela 1).

Tabela 1: Resultado da análise do solo utilizado no experimento. Cerro Largo, RS.

Camada	pH em água	Ca (cmol _c dm ³)	Mg (cmol _c dm ³)	Al (cmol _c dm ³)	H+Al (cmol _c dm ³)	CTC ef. (cmol _c dm ³)	Saturação por Al (%)	Satur. por bases (%)	N (%)
0-10	5,0	3,7	1,3	0,5	6,2	6,2	8,1	47,7	0,167
Camada	Índice SMP	MO (%)	Argila (%)	Textura	P-Mehlich (mg dm ⁻³)	K (cmol _c dm ³)	CTC pH7 (cmol _c dm ³)	K (mg dm ⁻³)	C (%)
0-10	5,7	2,8	64	1	10,7	0,675	11,9	264	1,768

3.2 PREPARO DO CONTAMINANTE

Amostra do herbicida foi adquirida de um agricultor que gentilmente cedeu a quantidade desejada para este experimento. Para o cálculo da dose utilizada, foi considerada a dose máxima indicada na bula do produto, Glifosato Atanor 48[®] (35,6% de equivalente ácido de Glifosato), sendo esta de 6 L/ha. A partir disso, procedeu-se os cálculos referentes a capacidade dos microcosmos. Foi calculada para dose recomendada e dez vezes a dose recomendada, sendo 2,37 mg ia/kg de solo (0,03 mL do produto comercial) e 23,70 mg ia/kg de solo (0,3 mL do

produto comercial), respectivamente. O solo foi alocado em bandejas e adicionado o contaminante utilizando micropipetas.

3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS

Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro estéreis, com tampa de fechamento hermético com capacidade de 3,5 L. Foram adicionados 1,250 kg de solo em cada frasco, contemplando uma camada de 7,5 cm (REIMER; FARENHORST; GAULTIER, 2005). A umidade foi previamente ajustada para 60% da capacidade de campo, conforme Tedesco et al. (1995), através da adição de água destilada estéril.

O solo utilizado foi revolvido com espátula estéril para a homogeneização. Para cada contaminação foram mantidos microcosmos em quadruplicata, além de microcosmos sem a adição do herbicida, também em quadruplicata e, dois frascos sem solo (brancos), totalizando 14 microcosmos, distribuídos da seguinte forma:

Tratamentos:

SA – Controle (sem contaminação);

DR – Dose Recomendada;

10 X – Dez Vezes a Dose Recomendada.

As incubações foram realizadas por 28 dias em temperatura ambiente, sem incidência de luz. Esse fator foi determinado devido a meia vida do glifosato no solo ser relativamente curta, sendo que em latossolo ela pode chegar a 12 dias (ARAÚJO, 2003).

Foram registradas periodicamente ao longo do experimento temperaturas mínima e máxima (Figura 2). A umidade gravimétrica foi monitorada ao longo do período de incubação do solo a partir de pesagens dos microcosmos. Havendo necessidade, água destilada estéril foi adicionada aos microcosmos. Durante a incubação foram realizados revolvimentos periódicos, em ambiente estéril, para a homogeneização e aeração dos microcosmos.

Para todas os parâmetros a seguir, com exceção da atividade respiratória, foram retiradas amostras compostas, ou seja, há repetições dentro de uma mesma amostra. Posteriormente seguiu-se com o procedimento das análises.



Figura 2: Registro das temperaturas ao longo do experimento.

3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos foi avaliada com base na liberação cumulativa de C-CO₂ (ALEF, 1995). A liberação do CO₂ pode, indiretamente, indicar a potencial degradação do contaminante (JACQUES et al., 2007, LABUD et al., 2007). Os microcosmos foram equipados com um sistema para a captação do CO₂ liberado, constituído de um recipiente plástico contendo 20 mL de NaOH (0,5 mol L⁻¹) (Figura 3). Dois frascos sem solo, porém contendo recipiente com NaOH, foram utilizados como provas em branco.



Figura 3: Microcosmo hermeticamente fechado contendo recipiente com NaOH.

Os microcosmos foram mantidos hermeticamente fechados, sendo somente abertos periodicamente para a retirada dos recipientes contendo NaOH e o CO₂ capturado, bem como para a imediata substituição por novo recipiente contendo NaOH.

Aos recipientes retirados foi adicionado 1 mL de solução de BaCl₂ (30%, m v⁻¹) e duas gotas de fenolftaleína 1%. Após, a quantidade residual de NaOH foi titulada com HCl (0,5 mol L⁻¹). Amostras de solo dos microcosmos foram utilizadas para determinação da massa seca de solo. A quantidade de CO₂ liberado foi determinada pela seguinte equação (STOTZKY, 1965; COLLA et al., 2014):

$$C\text{-CO}_2 \text{ (mg kg}^{-1} \text{ solo seco)} = [(B - T) \times eq \times MHCl \times Fc] / Mc$$

onde:

B = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação da prova em branco;

T = volume (mL) de HCl 0,5 mol L⁻¹ usado na titulação do tratamento (microcosmos);

eq = equivalente-grama do carbono (igual a 6);

MHCl = concentração molar da solução padronizada de HCl;

Fc = fator de correção da molaridade de ácido/base (mol L⁻¹ HCl / mol L⁻¹ NaOH);

Mc = massa de solo seco (em kg) no microcosmo.

A respiração foi avaliada diariamente nos primeiros 10 dias do experimento e, posteriormente, a cada dois dias. Os resultados são apresentados na forma de respiração acumulada.

3.5 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

O diacetato de fluoresceína (FDA) é um composto incolor utilizado para avaliar a atividade hidrolítica em solos. Este substrato é hidrolisado tanto por enzimas extracelulares quanto parietais, liberando como produto a fluoresceína que é mensurada em espectrofotômetro (ADAM; DUNCAN, 2001).

Amostras de solo (2,0 g) foram coletadas semanalmente dos microcosmos, de forma asséptica, e acondicionadas em frascos Erlenmeyer (125 mL). Em seguida, foram adicionados 15 mL de tampão fosfato (60 mmol L⁻¹; pH 7,6) e 0,2 mL de solução de FDA (1000 µg mL⁻¹, preparada em acetona), em triplicata. Os frascos foram fechados, agitados manualmente e então

incubados em agitador orbital (30 °C; 100 rpm) por 20 min. A reação foi finalizada com a adição de 15 mL de solução de clorofórmio/metanol (2:1, v v⁻¹) e os frascos agitados vigorosamente.

Após, o conteúdo foi alocado em tubos de centrífuga (50 mL) e centrifugados por 10 min a 7.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, filtrado utilizando papel filtro, e a absorbância do filtrado foi mensurada em espectrofotômetro a 490 nm. Foram realizados controles contendo solo e tampão, mas sem FDA. Estes controles foram utilizados como “zero” para a mensuração da absorbância. A quantidade de fluoresceína liberada (μg fluoresceína g⁻¹ solo seco) foi determinada através de curva padrão de fluoresceína (ADAM; DUNCAN, 2001).

3.6 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

A atividade de desidrogenase foi estimada semanalmente, durante a incubação dos microcosmos, pela redução de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). Cinco gramas de solo foram acondicionados em tubos do tipo Falcon de 50 mL e, na sequência, foram adicionados 5 mL de tampão Tris-HCl (100 mmol L⁻¹; pH 8,0) contendo TTC (1%, m v⁻¹), em triplicata. Foram realizados controles com solo e tampão, mas sem a adição de TTC.

As amostras foram incubadas a 30 °C por 16 h. O produto da ação da desidrogenase (2,3,5-trifenilformazan) foi extraído com a adição de 20 mL acetona. Para tanto, após a adição da acetona, os tubos foram mantidos no escuro por 2 h e agitados manualmente a cada 20 min. Logo após, foram mensuradas as absorbâncias dos sobrenadantes a 485 nm. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), referente ao tempo de incubação dos microcosmos onde foi observada máxima absorbância (100%).

3.7 CARBONO DA MASSA MICROBIANA

No início e no fim do experimento, o carbono (C) da biomassa microbiana no solo dos microcosmos foi determinado pelo método modificado da fumigação-extração (VANCE et al., 1987). A fumigação foi realizada através da adição de clorofórmio isento de etanol diretamente a amostras de solo (BROOKES et al., 1982; WITT et al. 2000). O clorofórmio, além de matar os microrganismos, rompe as células microbianas, liberando constituintes microbianos citoplasmáticos para o solo, permitindo assim sua extração (JENKINSON; POWLSON, 1976).

Os procedimentos a seguir foram realizados em capela de exaustão. Amostras de solo (20 g), em triplicata, foram adicionadas 1 mL de clorofórmio isento de etanol em frascos que

foram mantidos hermeticamente fechados. Após incubação no escuro, por 24 h, os frascos foram abertos para evaporação do clorofórmio. Procedeu-se, então, a extração do carbono orgânico com 50 mL de solução aquosa de sulfato de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). Amostras de solo não submetidas à fumigação foram, logo após a pesagem, adicionadas da solução extratora.

Seguindo-se à extração, o carbono dissolvido no extrato foi submetido à oxidação por via úmida, utilizando uma mistura de dicromato de potássio (2 mL), ácido sulfúrico (10 mL) e ácido ortofosfórico (5 mL) concentrados, com aquecimento externo. Após o resfriamento foram adicionadas 70 mL de água destilada e quatro gotas de difenilamina (1% m/v em ácido sulfúrico). O excesso de dicromato foi então titulado com sulfato ferroso amoniacal (BROOKES; JOERGENSEN, 2005).

Para a padronização da molaridade exata da solução de sulfato ferroso amoniacal, utilizou-se a seguinte equação:

$$M_1 = [(M_2 \times V_2) \times 6] / V_1$$

onde:

M_1 = molaridade exata padronizada do sulfato ferroso amoniacal;

M_2 = molaridade exata do dicromato de potássio ($0,066 \text{ mol L}^{-1}$);

6 = razão estequiométrica ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$);

V_1 = volume de sulfato ferroso amoniacal gasto na titulação da amostra controle (branco);

V_2 = volume da alíquota de dicromato de potássio utilizada.

O teor de C nos extratos de solo foi calculado pela seguinte equação:

$$C (\text{mg C kg}^{-1} \text{ solo}) = [(V_b - V_a) \times M \times 0,003 \times V_1 \times 10^6] / (P_s \times V_2)$$

onde:

C = carbono extraído do solo;

V_b (mL) = volume do sulfato ferroso amoniacal utilizado para a titulação da solução controle (branco);

V_a (mL) = volume do sulfato ferroso amoniacal utilizado para a titulação da amostra;

M = molaridade exata do sulfato ferroso amoniacal;

V_1 = volume do extrator (K_2SO_4) utilizado;

V_2 = alíquota do extrato utilizada para a titulação;

P_s (g) = massa de solo seco.

O cálculo do carbono da biomassa microbiana (BMS-C) do solo é dado pela fórmula

$$\text{BMS-C (mg C microbiano kg}^{-1}\text{ solo seco)} = \text{FC} \times k_c^{-1}$$

onde:

FC = diferença entre a quantidade de C (mg kg⁻¹ solo) recuperada no extrato da amostra fumigada e aquela recuperada no extrato da amostra não fumigada;

k_c = fator de correção, igual a 0,33 (SPARLING; WEST, 1988).

3.7.1 Quociente metabólico

O quociente metabólico (*q*CO₂) foi calculado pela razão entre respiração e o carbono da biomassa microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Os valores encontrados foram expressos em mg C-CO₂ mg C mic⁻¹ dia⁻¹, conforme a fórmula:

$$q\text{CO}_2 = \text{C-CO}_2 \text{ (mg C-CO}_2 \text{ kg}^{-1}\text{ solo seco dia}^{-1}) / \text{BMS-C (mg C microbiano kg}^{-1}\text{ solo seco)}$$

3.8 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS

Amostras de solo, semanalmente coletadas de forma asséptica a partir dos microcosmos, passaram por diluições decimais seriadas, de 10⁻² a 10⁻⁸, em salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl). Posteriormente, 25 µL destas diluições foram inoculadas, em triplicata, em 200 µL de Caldo Soja Tripticaseína (TSB) estéril, contidos em poços de placas de poliestireno de 96 poços estéreis. As placas foram incubadas por 5 dias a 30 °C, envoltas em papel alumínio para proteger da luz. Avaliações foram realizadas através da verificação da turbidez do meio, indicando crescimento microbiano. O Número Mais Provável (NMP) de microrganismos heterotróficos das amostras foi obtido a partir de tabela de referência (BLODGETT, 2010). A quantificação de microrganismos foi expressa como Log NMP g⁻¹ solo seco, considerando o volume de amostra e o fator de diluição.

3.9 ANÁLISE DOS DADOS

Os cálculos referentes às fórmulas descritas foram realizados utilizando o software Microsoft Excel 2013 (Microsoft, EUA). Os resultados das repetições foram utilizados para cálculo de médias e erro padrão. Foram submetidos também à análise de variância (teste F), sendo as médias comparadas pelo teste de Tukey considerando-se o nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os tratamentos empregados para a aplicação no solo do herbicida glifosato, conduzidos em microcosmos, foram realizados no intuito de verificar o potencial de contaminação ou não, do referido herbicida, em diferentes doses em um solo sem histórico de aplicação de agrotóxicos.

4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

O resultado referente à respiração acumulada ao longo de 28 dias de incubação dos microcosmos pertencentes aos três tratamentos está apresentado na Figura 4. Observou-se que todos os tratamentos com contaminação apresentaram níveis de atividade respiratória superiores ao controle, sem adição do herbicida (SA), que acumulou apenas 80,50 mg C-CO₂ kg solo⁻¹. Com relação aos tratamentos contaminados, foram similares, sendo que a maior dose aplicada (10 X) apresentou atividade mais elevada 124,65 mg C-CO₂ kg solo⁻¹.

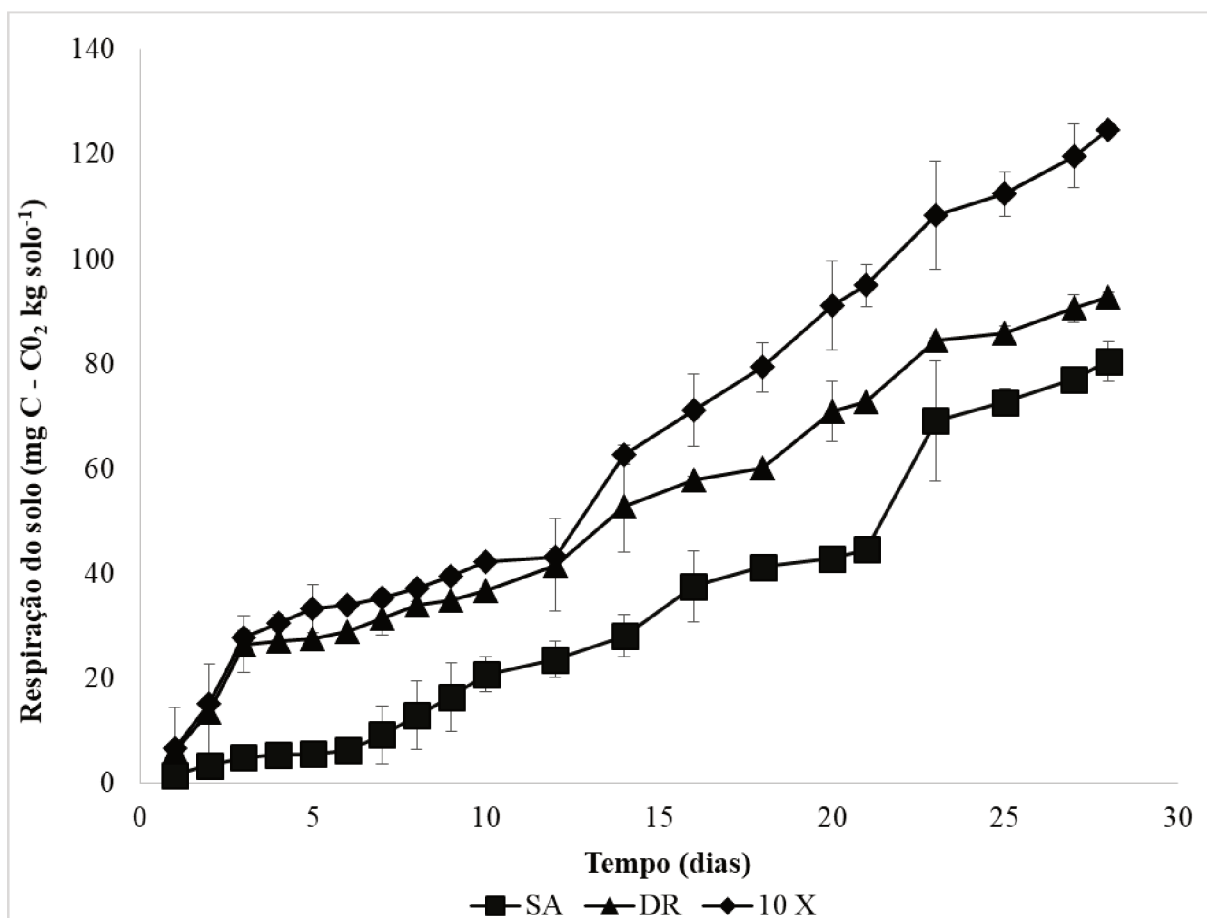


Figura 4: Produção cumulativa de CO₂ por tratamento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.

A atividade respiratória representa a degradação do material e é avaliada pela produção de CO₂ ou pelo consumo de O₂ em amostras de solo (GARCIA et al.1994). Alguns autores consideram essa técnica como a mais sensível dentro das técnicas para quantificação de respiração (PAUL; CLARK, 1996).

A temperatura de incubação durante os 28 dias de experimento foi monitorada, apresentando média mínima de 17,5 °C e máxima de 20,7 °C. Essa temperatura não é a ideal, pois a atividade microbiana é muito mais elevada em temperaturas altas. As elevadas temperaturas do solo são essenciais para que os microrganismos especializados possam degradar pesticidas e outros contaminantes no solo (BRADY; WEIL, 2009).

O maior acúmulo de CO₂ verificado nos microcosmos contaminados com o herbicida em relação ao controle (Figura 4) já foi constatado em diversos estudos. Araújo et al., (2003), estudaram, *in vitro*, mudanças na atividade microbiana de solos com e sem glifosato aplicado. O glifosato foi aplicado a uma taxa de 2,16 mg kg⁻¹ de solo durante um período de 32 dias, e os autores observaram aumento de 10 a 15% no CO₂ envolvido.

Esse comportamento também foi evidenciado em outros trabalhos. De Souza (1999), sob doses crescentes do glifosato e do imazapyr (0; 4; 8 e 12 L ha⁻¹ do produto comercial Roundup e Arsenal, respectivamente), em solos latossólicos, sob três conteúdos de umidade (40, 70 e 100% do equivalente de umidade). Os resultados obtidos concluíram que a microbiota do solo foi capaz de utilizar o glifosato e o imazapyr como fontes de carbono.

Após 28 dias de incubação, apesar da respiração diária ter reduzido e logo aumentado novamente, os microcosmos ainda não apresentavam sinais de tendência a estabilização da respiração acumulada.

Em outro estudo, Wardle, Parkison (1990), utilizando três herbicidas pós-emergentes (2,4-D, picloram e glifosato) nas concentrações de 0, 2, 20 e 200 µg g⁻¹, mostrou que todos os herbicidas causaram o aumento da respiração microbiana, mas apenas por 9 dias após a aplicação, e apenas para concentrações de 200 µg g⁻¹, indicando assim que a produção de CO₂ está relacionada com a decomposição direta do herbicida no solo.

De forma similar, Dallmann (2010), avaliando o impacto do glifosato na microbiota do solo nas concentrações 960 g ia ha⁻¹, 1.920 g ia ha⁻¹ e 3.840g ia ha⁻¹ aplicados 28 dias após a semeadura (DAS) cultivado com soja geneticamente modificada resistente ao glifosato (GM RR) conduzido a campo num solo classificado como Pdozólico vermelho-amarelo distrófico, indicaram que as condições utilizadas no experimento exerceram efeito sobre o CO₂ liberado,

com as maiores doses de herbicida apresentando maiores taxas de respiração em comparação ao controle.

4.2 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

A atividade hidrolítica microbiana do solo é uma medida da atividade das enzimas do solo sendo a maior parte delas enzimas extracelulares. Utilizam diacetato de fluoresceína (FDA) como substrato enzimático (ADAM; DUNCAN, 2001).

A Figura 2 apresenta os resultados referentes à atividade hidrolítica total do solo nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação. A hidrólise do FDA foi utilizada com o objetivo de avaliar a atividade microbiana frente à contaminação com o glifosato. Foi possível observar que a atividade hidrolítica total do solo controle (SA) se manteve inferior aos demais tratamentos durante as primeiras avaliações, sendo que posteriormente houve uma elevação. Com relação aos tratamentos com aplicação do glifosato, o tratamento com a dose recomendada (DR) apresentou-se maior nas avaliações iniciais e em seguida houve um decréscimo. Já o tratamento com maior dose do herbicida (10 X) se manteve, inicialmente, intermediário, e mais tarde similar ao controle (SA), porém não houve diferença significativa entre os tratamentos ($p > 0,05$).

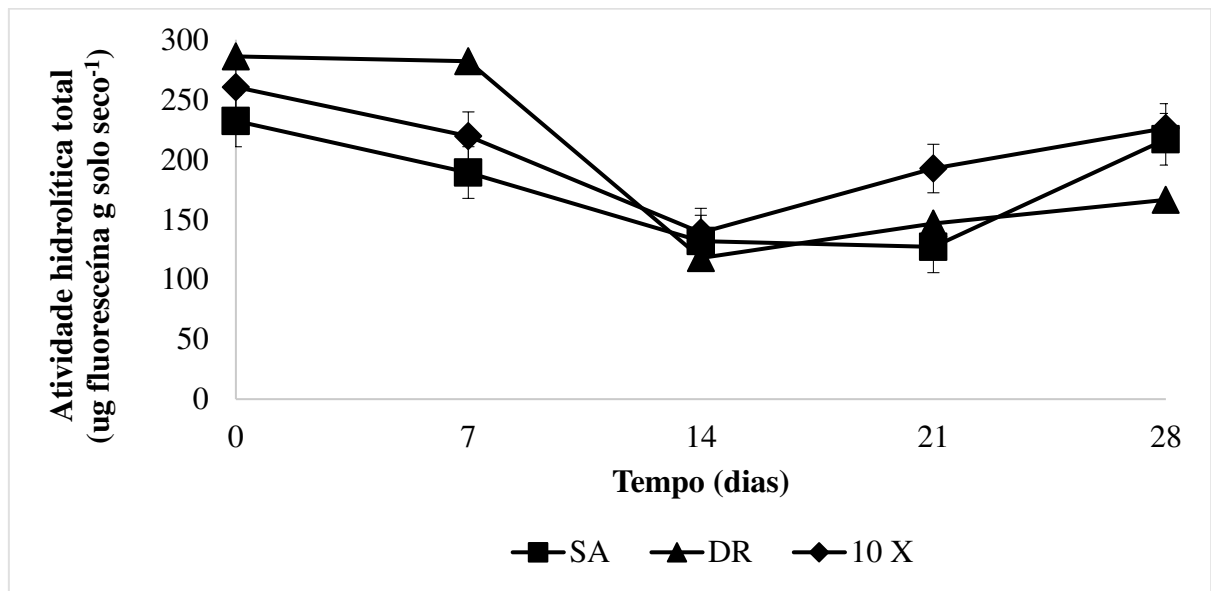


Figura 5: Atividade hidrolítica total do solo nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.

Estudos feitos por Scopel (2014) onde avaliaram a capacidade de biodegradação do glifosato em solos de pomares de macieira, com diferentes históricos de aplicação do produto durante 32 dias, bem como quantificando os resíduos de glifosato e seu metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), no início e no final do período. Os resultados evidenciaram que houve degradação do glifosato pelos microrganismos edáficos durante o período avaliado com formação do metabólito AMPA. Ocorreu um aumento significativo da atividade microbiana analisada pela técnica FDA para a maioria dos solos analisados. Os solos que receberam aplicação de glifosato antes da incubação evidenciaram atividade microbiana maior do que os solos sem aplicação. A partir desses resultados, supõe-se que os microrganismos utilizaram o glifosato como fonte de nutriente.

Em estudo realizado em sistema fechado (sacos plásticos) utilizando solos Podzólico vermelho-amarelo e Latossolo vermelho, ambos com e sem histórico de aplicação do glifosato e em doses recomendadas, observou-se que a atividade enzimática apresentou resultados superiores em relação ao controle, sugerindo que o glifosato é utilizado pelos microrganismos do solo para seu crescimento. Também foi notou que os solos com histórico de aplicação do glifosato apresentaram atividade microbiana maior se comparados com os solos sem histórico, evidenciando que os solos com histórico de aplicação possuem uma microbiota mais eficiente e que proporcionam adaptação dos microrganismos à presença do produto (ARAÚJO, 2002).

Tal comportamento também foi evidenciado em solos argentinos. Zabaloy et al. (2008) ao investigar os impactos de três herbicidas pós-emergentes (glifosato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e metsulfuron-metil), em dose recomendada e 10x a dose, usando incubações de solo de curto prazo (3 semanas), verificou que somente o herbicida 2,4-D mostrou efeitos transitórios nos solos, inibindo a hidrólise do FDA.

4.3 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

A atividade da desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação é apresentada na Figura 3. No tempo zero, a atividade da desidrogenase foi similar em todos os tratamentos. Após a primeira semana houve uma elevação da atividade em SA e, no mesmo período, ocorreu um declínio em DR e 10 X se comparando com o controle. No 14º dia, todos os tratamentos obtiveram um decréscimo e a partir do 21º dia, o tratamento controle se manteve mais elevado do que os demais tratamentos em todas as avaliações seguintes. No entanto, novamente não se verificou diferença significativa entre os tratamentos, nem em relação ao controle ($p > 0,05$).

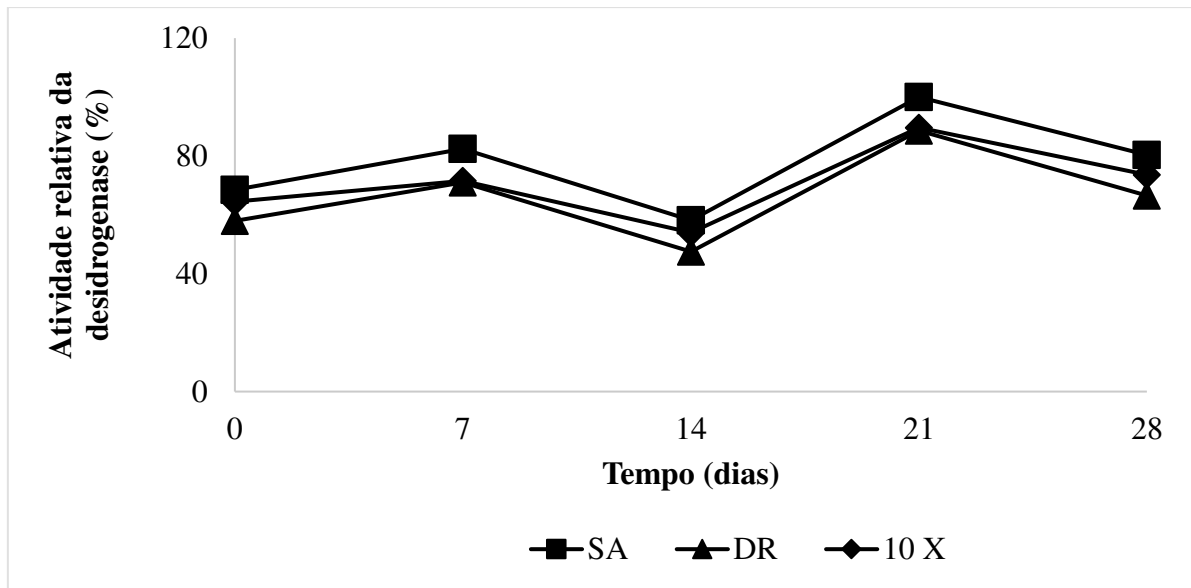


Figura 6: Atividade da desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.

Resultados de estímulo foram detectados em trabalhos de Childs et.al. (2007), onde nos tratamentos de metolachlor 2x, imazethapyr 2x e glifosato 10x estariam indicando efeitos de promoção da atividade oxidativa do solo. Para o glifosato, existem referências de incrementos temporários na atividade da microbiota do solo (HANEY et al., 2000; BUSSE et al., 2001).

As desidrogenases ocorrem em todas as células microbianas, e sua mensuração está relacionada à capacidade oxidativa de microrganismos (ANDREONI et al., 2004). Dessa maneira, se houver decréscimos na atividade da desidrogenase estaria indicando uma diminuição da atividade microbiana, que conseqüentemente relaciona-se ao efeito inibitório do herbicida sobre a microbiota (OGBOLOSINGHA et al., 2015). Foi o que aconteceu na Figura 6, em todo o período avaliado a atividade da desidrogenase se manteve inferior ao solo controle (SA), porém, sem diferença significativa.

4.4 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA E QUOCIENTE METABÓLICO

A Tabela 2 apresenta os dados referentes ao carbono da biomassa microbiana nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação. A BMS-C mostrou tendência de diminuição logo após a aplicação das diferentes concentrações de glifosato em comparação ao tratamento sem a adição do herbicida.

Após 28 dias de incubação SA, DR e 10X apresentaram elevação, sendo o BMS-C em 10X superior ao tratamento controle, e a BMS-C em DR inferior ao controle. Em contrapartida,

após 28 dias houve aumento acentuado do BMS-C em ambos os tratamentos com glifosato (DR e 10X). Ao final dos 28 dias de incubação, o BMS-C no controle se manteve similar ao inicial; porém ambos os tratamentos (DR e 10X) aumentaram em relação aos valores iniciais, com uma biomassa maior no microcosmo com maior dose do herbicida (10X), no entanto, não se constatou diferença significativa nos tratamentos aplicados ($p>0,05$).

Tabela 2: Carbono da biomassa microbiana nos três tratamentos avaliados no 1° e 28° dias de incubação.

Tratamentos	1	28
	mg C kg solo seco ⁻¹	
Sem aplicação	155,73	164,61
Dose recomendada	92,66	158,62
10 X a Dose recomendada	101,69	194,44

Segundo Nguyen (2016), as aplicações de glifosato em conjunto com as variáveis do solo influenciam de forma significativa a biomassa microbiana e sua atividade. Um estudo realizado por Haney (2000) mostrou que o glifosato estimulou significativamente a atividade microbiana do solo, medida pela mineralização de C e N, mas não afetou a biomassa microbiana do solo, nas doses 47, 94, 140 e 234 $\mu\text{g ia g}^{-1}$ de solo sendo similar ao observado na Tabela 2.

Dallmann (2010), também avaliou o nível de carbono orgânico total (COT) e verificou que este não diferiu ($p<0,05$) com a aplicação do glifosato, corroborando com os resultados encontrados neste experimento onde também não houve diferença significativa.

O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), quantificado através da razão entre a quantidade de CO_2 liberado pela respiração e a quantidade de carbono da biomassa microbiana em função do tempo, representando o estresse da população, quanto maior o quociente, maior o estresse (ISLAM; WEIL, 2000). A Tabela 3 apresenta os valores do $q\text{CO}_2$ nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.

O tratamento controle (SA) apresentou, de início, os menores valores para o quociente e, ao final dos 28 dias de incubação, mostrou-se intermediário. Inicialmente, os microcosmos contaminados com glifosato apresentaram os maiores valores do quociente metabólico no início do experimento ($0,0659-0,0644 \text{ mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$), mas similares entre si (Tabela 3), potencialmente indicando estresse inicial da população microbiana.

Os microcosmos com menor dose de aplicação (DR) apresentaram qCO_2 inferior (0,0129 mg C-CO₂ mg C mic⁻¹ dia⁻¹) em relação àqueles com maior dose (10X) e controle ao final dos 28 de incubação (Tabela 3).

Tabela 3: Quociente metabólico nos três tratamentos avaliados no 1º e 28º dias de incubação.

Tratamentos	1	28
	mg C - CO ₂ mic ⁻¹ dia ⁻¹	
Sem aplicação	0,0099	0,0208
Dose recomendada	0,0659	0,0129
10 X a Dose recomendada	0,0644	0,0253

Os valores do tratamento com maior dose do herbicida (10X) diminuíram ao final do experimento, explicados pelos teores relativamente baixos de CO₂ emitidos nos experimentos respirométricos e o alto valor de biomassa microbiana. Tal fato também foi observado no tratamento com menor dose de glifosato (DR). Nesse sentido, se observa também na Tabela 3, que, ao final dos experimentos, o qCO_2 nos tratamentos com aplicação do glifosato foi reduzido em 80% na DR e em torno de 60% no tratamento 10 X, em relação ao tempo inicial.

Trabalhos realizados por Barwald Bonh (2011), corroboram parcialmente com o relatado acima onde a aplicação isolada ou sequencial de glifosato na cultura da soja em Argissolo Vermelho Amaelo distrófico, aumenta a atividade microbiana, a taxa de respiração basal e o quociente metabólico. Conforme a tabela 3, este último parâmetro, houve uma ligeira diminuição, evidenciando que a população ali presente conseguiu se recompor, porém doses mais elevadas (10x) a população permaneceu em estresse.

Segundo Castilho (2016), nenhuma dose de glifosato (240; 420; 740 e 1440 kg ha⁻¹) afetou o carbono da biomassa microbiana e nem na respiração microbiana após um período de 28 dias de incubação. O mesmo ocorreu para qCO_2 , indicando assim, que os tratamentos testados não causaram impacto significativo nos microrganismos do solo da Floresta Nacional de Carajás.

Dallmann et al. (2010), também encontrou aumento nos valores do quociente metabólico ($p < 0,05$) para doses maiores do herbicida, que segundo ele, este fato pode ser explicado pela relação entre os maiores valores da atividade respiratória e de carbono da biomassa microbiana.

4.5 ENUMERAÇÃO DE MICRORGANISMOS HETEROTRÓFICOS TOTAIS

A técnica do NMP foi utilizada para estimar o tamanho das populações microbianas e monitorar seu crescimento ou redução ao longo de 28 dias de incubação dos microcosmos. No período avaliado, os números de microrganismos heterotróficos (Figura 4) sofreram um decréscimo logo ao sétimo dia de monitoramento em todos os tratamentos, incluindo o controle, com relação ao tempo zero (dia em que os microcosmos foram montados e o solo contaminado com o herbicida). Após esse período, os números de heterotróficos totais em SA sempre mantiveram uma pequena elevação, chegando ao final do período de incubação com 10,35 log NMP g⁻¹ solo.

Os microcosmos DR e 10 X apresentaram contagens variadas, sendo que no 21º dia de avaliação o tratamento com a maior dose ultrapassou o controle (SA). No final do período de incubação, o tratamento DR manteve-se com valores inferiores (7,77 log NMP g⁻¹ solo), já o tratamento 10 X conservou-se com números intermediários entre os tratamentos (9,40 log NMP g⁻¹ solo). Também se constatou que não houve diferença significativa entre os tratamentos realizados ($p > 0,05$).

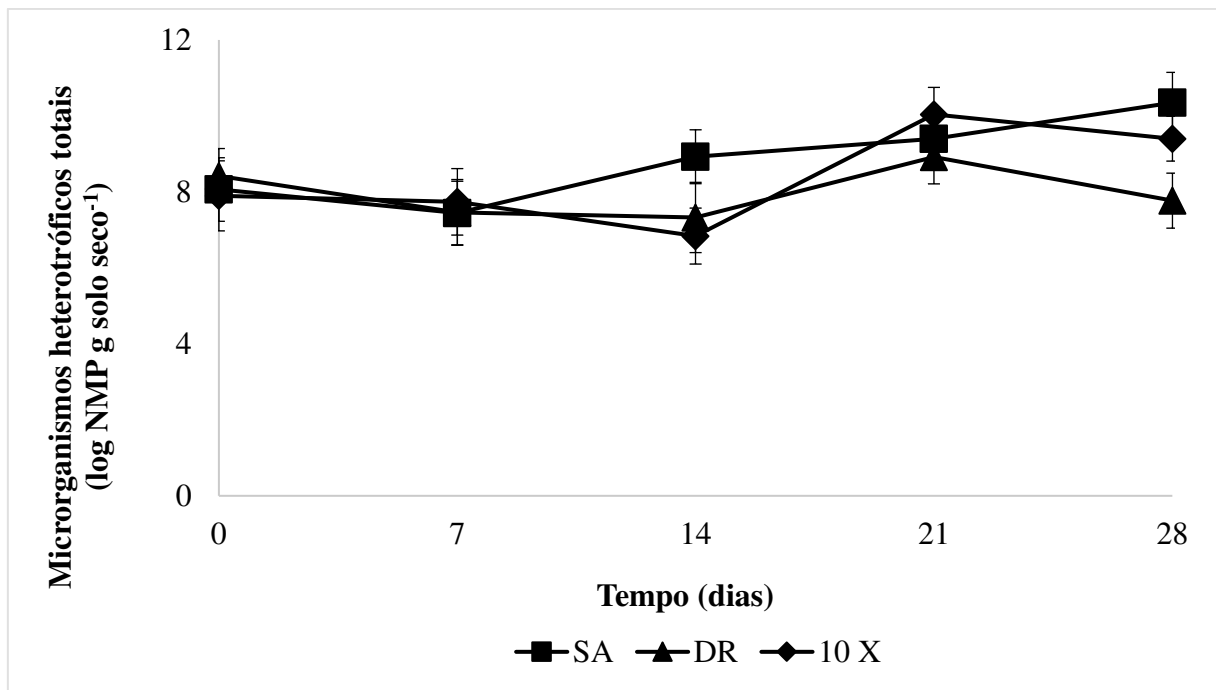


Figura 7: Contagem de microrganismos heterotróficos totais pelo NMP nos três tratamentos ao longo de 28 dias de incubação.

O glifosato pode apresentar efeito positivo às bactérias do solo como efeito bioestimulador sobre os microrganismos do solo, provavelmente ao fato de que as moléculas do herbicida podem se converter em fontes de nutrientes, como C, N e P para os microrganismos do solo (GOMEZ et al., 2009).

Outro estudo realizado por Araújo, Monteiro e Abarkeli (2003), mostrou que a contagem do número mais provável (NMP) após 32 dias de incubação, na dose 2,16 mg kg⁻¹ de solo, o número de actinomicetos e fungos aumentou, enquanto o número de bactérias apresentou uma ligeira redução, sendo similar a analisada na Figura 7.

Quando ocorre a aplicação de herbicida, o aumento inicial das populações dos microrganismos é rotineiro. A microbiota do solo mineraliza os herbicidas utilizando-os como fonte de energia permitindo o aumento da população. De um modo geral, são seguidos de decréscimos. Dessa forma, as populações microbianas embora tolerantes aos herbicidas aplicados são susceptíveis aos produtos resultantes da interação solo-herbicida (WANG et al., 2010).

Esse comportamento pode ser comparado ao de Araújo (2002), onde se observou que nos solos sem histórico de aplicação apresentou pequena diminuição do número de bactérias após o período de 32 dias com aplicação de glifosato. Já em solos com histórico de aplicação, mostram que não houve diminuição no número de bactérias, após o período de incubação, sugerindo, desta forma, uma comunidade bacteriana já adaptada em Latossolo e Podzólico.

De Castro Júnior et al. (2006) também avaliaram a quantificação da população de bactérias do solo com glifosato e de acordo com os resultados obtidos, a adição do herbicida não exerceu efeito negativo na população de bactérias e fungos. Não houve diferença significativa entre os tratamentos sem ou com adição do glifosato, assim como entre o número de microrganismos quantificados no solo com aplicação do produto puro e o comercial.

5 CONCLUSÃO

Nas condições experimentais utilizadas, os resultados demonstram que em Latossolo Vermelho sem histórico recente de aplicação do herbicida glifosato, a respiração do solo apresentou tendência de incremento pela adição de glifosato. Outros parâmetros analisados, como a atividade hidrolítica microbiana, atividade de desidrogenase, e contagens de heterotróficos totais não diferiram significativamente entre o controle e os tratamentos com glifosato.

Tendência de diminuição inicial do carbono da biomassa microbiana foi observado com a aplicação de glifosato. De forma similar, o qCO_2 indicou tendência de maior estresse da microbiota do solo logo após a aplicação de glifosato. No entanto, para ambos parâmetros, os efeitos observados se mostraram transitórios. Essas observações evidenciam que mesmo utilizando a maior dose do herbicida indicada na bula, 6 L/ha e, ainda a aplicando na dose dez vezes maior (60 L/ha), não houve interferência (negativa ou positiva) sobre a microbiota do solo avaliado.

Sendo assim, mesmo em um solo com poucas condições de qualidade e manejo não se verificou interferência relevante das doses do herbicida aplicado no solo. Neste sentido, os efeitos de aplicações de glifosato sobre parâmetros da microbiota do solo devem ser melhor investigados a médio e longo prazo e em diferentes condições de solo. Sugere-se que estudos subsequentes possam avaliar o efeito do glifosato em solos melhor estruturados, com rotação de cultura, e elevados índices de matéria orgânica, para comparações.

6 REFERÊNCIAS

- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, n. 7-8, p. 943-951, 2001.
- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. 1. ed. London: Academic Press, 1995. p. 214-219.
- ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina: IAPAR, 1985. 482p.
- AMARAL, E.I. **Avaliação da exposição ambiental ao glifosato na área agrícola da Serrinha do Mendanha**. 2009. Tese de Doutorado.
- ANDERSON, T.H.; DOMSCH, K.H. The metabolic quotient from CO₂ (qCO₂) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, p. 393-395, 1993.
- ANDRÉA, M. M. de; PERES, T. B.; LUCHINI, L. C.; BAZARIN, S.; PAPINI, S.; MATALLO, M. B.; SAVOY, V. L. T. Influence of repeated applications of glyphosate on its persistence and soil bioactivity. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 38, n. 11, p. 1329-1335, 2003.
- ANDREONI, V.; CAVALCA, L.; RAO, M. A.; NOCERINO, G.; BERNASCORRI, S.; COLOMBO, M.; GIANFREDA, L. Bacterial communities and enzymes activities of PAH polluted soils. *Chemosphere*, Dordrecht, v.57, n.5, p.401-412, 2004.
- ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, Oxford, v. 52, p. 799-804, 2003.
- ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- BARWALD BOHM, G.M. Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, 2011.
- BLODGETT, R. **Bacterial Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions**. Food and Drug Administration (FDA), 2010. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm109656.htm>> Acesso em: nov. 2018.
- BOHNER, T.O.L.; ARAÚJO, L.E.B.; NISHIJIMA, T. O impacto ambiental do uso de agrotóxicos no meio ambiente e na saúde dos trabalhadores rurais. **Revista Eletrônica do Curso de Direito da UFSM**, v. 8, p. 329-341, 2013.
- BRADY, N.C.; WEIL, R.R. **Elementos da natureza e propriedades dos solos**. Bookman Editora, 2009.

BROOKES, P. C.; POWLSON, D. S.; JENKINSON, D. S. Measurement of microbial biomass phosphorus in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 14, n. 4, p. 319-329, 1982.

BROOKES, P.C.; JOERGENSEN, R.G. Microbial biomass measurements by fumigation extraction. In: BLOEM, J.; HOPKINS, D.W.; BENEDETTI, A. **Microbiological methods for assessing soil quality**. 1. ed. Wallingford: CABI, 2005. cap. 7, p. 77-83.

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

CASSAL, V.B. Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública. *Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)*, v. 18, n. 1, p. 437-445, 2014.

CASTILHO, A. F. et al. The impact of glyphosate herbicides on soil microbial activity from the Carajás National Forest. *Revista de Ciências Agrárias/Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, v. 59, n. 3, p. 302-309, 2016.

CHILDS, G.M.F. Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado. 2007. ix, 60 f. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2007.

COLLA, T. S.; ANDREAZZA, R.; BÜCKER, F.; SOUZA, M. M.; TRAMONTINI, L.; PRADO, G. R.; FRAZZON, A. P. G.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Bioremediation assessment of diesel-biodiesel-contaminated soil using an alternative bioaugmentation strategy. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 21, n.4, p. 2592-2602, 2014.

DA SILVEIRA, A.P.D.; DOS SANTOS FREITAS, S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agronômico, 2007.

DALLMANN, C.M. Impacto da aplicação de glifosato na microbiota do solo cultivado com soja geneticamente modificada. *Revista Thema*, v. 7, n. 1, 2010.

DE AMARANTE JUNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. *Química Nova*, p. 589-593, 2002.

DE ARAÚJO, A.S.F. Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, 2003.

DE ARAÚJO, A.S.F.; MONTEIRO, R.T.R. Indicadores biológicos de qualidade do solo. *Bioscience Journal*, v. 23, n. 3, 2007.

DE CASTRO JÚNIOR, J.V.; SELBACH, P.A.; ZÁCHAAYUB, M.A. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 16, 2006.

DE FARIA, V.H.F. Glifosato: desenvolvimento de metodologia para determinação em soja e milho e avaliação de parâmetros laboratoriais em trabalhadores expostos a agrotóxicos. 2013.

DE SOUZA, A. Respiração microbiana do solo sob doses de glyphosate e de imazapyr. *Planta Daninha*, v. 1, n. 3, p. 387-398, 1999.

DÖRR, F. **Efeito do herbicida glifosato sobre o crescimento e produção de metabólitos secundários em *Microcystis aeruginosa* e *Cylindrospermopsis raciborskii***. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). Centro Nacional de Pesquisa de Solos. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro, 2006. 306 p.

FARIA, A.T. Efeitos de herbicidas na atividade da microbiota rizosférica e no crescimento da cana-de-açúcar. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 4, 2014.

FLORIDO, F.G. **Controle de plantas competidoras na restauração ecológica**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

GALLI, A. J. B.; MONTEZUMA, M.C. **Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura**. Acadcom, 2005.

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

GIESY, J. P.; DOBSON, S.; SOLOMON, K. R. Ecotoxicological Risk Assessment for Roundup Herbicide. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, Nova York, v. 167, pp. 35-120, 2000.

GREGORICH, E.G.; CARTER, M.R.; ANGERS, D.A.; MONREAL, C.M. & ELLERT, B.H. Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils. *Canadian J. Soil Sci.*, 74:367-375, 1994.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. *Plant amino acids: biochemistry and biotechnology*. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

HANEY, R. L. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. **Weed Science**, v. 48, n. 1, p. 89-93, 2000.

HUNGRIA, M. Características biológicas em solos manejados sob plantio direto. In: REUNIÃO DE LA RED LATINOAMERICANA DE AGRICULTURA CONSERVACIONISTA, 5. Florianópolis, 1999. Anais. Florianópolis, EPAGRI, 2000. CD-ROOM.

IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Boletim de Comercialização de Agrotóxicos e Afins: histórico de vendas 2000-2016. Disponível em: <<https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 19.mai.2018.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Land use effects on soil quality in a tropical forest ecosystem of Bangladesh. *Agriculture Ecosystems and Environment*, v. 79, n. 1, p. 9-16, 2000.

IWATA, B. de F.; LEITE, L. F. C.; ARAÚJO, A. S. F.; BRASIL, E. L.; COSTA, C. DO N.; CAMPOS, L. P.; SANTOS, F. S. R. dos. Carbono total e carbono microbiano de um Latossolo

Vermelho-Amarelo sob sistemas agroflorestais e agricultura de corte e queima no cerrado piauiense. In: REUNIÃO BRASILEIRA DE MANEJO E CONSERVAÇÃO DO SOLO E DA ÁGUA, 18, 2010, Teresina. **Anais...** Teresina: EMBRAPA Meio-Norte, 2010. CDRom.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M. A.; CAMARGO, F. A. O., ANTONIOLLI, Z. I. Biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência e Natureza, UFSM**, v. 29, n. 1, p. 7-24, 2007.

JENKINSON, D. S.; POWLSON, D. S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil - I. Fumigation with chloroform. **Soil Biology Biochemistry**, v. 8, n. 3, p. 167-177, 1976.

JOBIM, P. F. [Is there an association between cancer mortality and agrotoxics use? A contribution to the debate]. *Cien Saude Colet*, v. 15, n. 1, p. 277-88, 2010.

JOBIM, P.F.C. Is there an association between cancer mortality and agrotoxics use?: A contribution to the debate. **Ciencia & saude coletiva**, v. 15, n. 1, p. 277-288, 2010.

KINNUTTILA, P.; KINNUTTILA, H. The Crystal and molecular structure of N-(phosphonomethyl)-glycine (glyphosate). **Acta Chemical Scandinavia B**, v.33, p. 623-626, 1979.

LABUD, V.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. **Chemosphere**, v. 66, n. 10, p. 1863-1871, 2007.

LIU, C.M.; McLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family Rhizobiaceae. **Applied and Environmental Microbiology**, v.57, n.6, p.1799-1804, 1991.

MONQUERO, P.A. Plantas transgênicas resistentes aos herbicidas: situação e perspectivas. **Bragantia**, v. 64, n. 4, 2005.

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

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. 2. ed. Lavras: UFLA, 2006. 729 p.

OGBOLOSINGHA, A., ESSIEN, E.; OHIRI, R. (2015). Variation of lipase, catalase and dehydrogenase activities during bioremediation of crude oil polluted soil. *J Environ Earth Sci* 5, 128-141.

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

PEDROSO, R.; SIQUEIRA, C.A. Plantas daninhas e a resistência a herbicidas. Disponível em: <<https://phytusclub.com/materiais-didaticos/plantas-daninhas-e-a-resistencia-a-herbicidas/>>. Data de acesso: 6 de julho de 2018.

PICCOLO, A.; CELANO, G.; CONTE, P. Adsorption of glyphosate by humic substances. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, p. 2442-2446, 1996.

PRATA, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. 2002. 149 p. Tese (Doutorado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Retenção e mobilidade de defensivos agrícolas no solo. In: ALLEONI, L. R. F.; REGITANO, J. B. (Org.). Apostila do Simpósio sobre Dinâmica de Defensivos Agrícolas no Solo: aspectos práticos e ambientais. ESALQ/USP, 2002. p. 57-69.

REIMER, M.; FARENHORST, A.; GAULTIER, J. Effect of manure on glyphosate and trifluralin mineralization in soil. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 40, n. 4, p. 605-617, 2005.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos – Uma breve revisão. *Biotemas*, v. 22(1), p. 7-16, 2009.

ROBERTSON, B. K; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic biodegradation possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. **Pesticide Science**, v.41, n.4, p.311-318, 1994.

ROMAN, E. S. **Como funcionam os herbicidas: da biologia à aplicação**. Berthier, 2007.

SCOPEL ANDRIGHETTI, M. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, 2014.

SCOPEL ANDRIGHETTI, M. Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, 2014. Seminário: Ciências Agrárias, Londrina, v. 32, n. 3, p. 919-930, jul. 2018.

SILVA, M.; SIQUEIRA, E.R.; DA SILVA COSTA, J.L. Hidrólise de diacetato de fluoresceína como bioindicador da atividade microbiológica de um solo submetido a reflorestamento. **Ciência Rural**, v. 34, n. 5, p. 1493-1496, 2004.

SILVA, W.B. Os riscos no uso indiscriminado de agrotóxicos: uma contaminação invisível. **Informativo Técnico do Semiárido**, v. 11, n. 1, 2017.

SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; GRISI, B.M.; HUNGRIA, M. & ARAUJO, R.S. Microrganismos e processos biológicos do solo: Perspectiva ambiental. Brasília, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 1994. 142p.

SPARLING, G. P.; WEST, A. W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: Calibration in situ using microbial respiration and ¹⁴C labeled cells. **Soil Biology Biochemistry**, v. 20, p. 337-343, 1988.

STEFFEN, G.P.K.; STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-lógica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

STOTZKY, G. Microbial respiration. In: BLACK, C. A.; EVANS, D. D.; WHITE, J. L. **Methods of soil analysis**, v. 2. Madison: American Society of Agronomy, 1965. p. 1551-1572.

TEDESCO, M. J.; GIANELLO, C.; BISSANI, C. A.; BOHNEN, H.; VOLKWEISS, S. J. **Análise de solos, plantas e outros materiais**. 2. ed. Porto Alegre: UFRGS, 1995.174 p.

TORSTENSSON, L. Role of microorganisms in decomposition. In HANCE, R.J., ed. **Interaction between herbicides and the soil**. London: Academic Press, 1980. 349 pg.

VANCE, E.D.; BROOKES, P.C. & JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.*, 19:703-707, 1987.

VARGAS, L.; ROMAN, E.S. **Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução**. Embrapa Trigo, 2006.

VEIGA, M.M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, p. 145-152, 2007.

WANG, Y. Tillage, residue burning and crop rotation alter soil fungal community and water-stable aggregation in arable fields. *Soil and Tillage Research*, v. 107, n. 2, p. 71- 79, 2010.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. **Plant and soil**, v. 122, n. 1, p. 21-28, 1990.

WITT, C.; GAUNT, J. L.; GALICIA, C. C.; OTTOW, J. C. G.; NEUE, H. U. A rapid chloroform-fumigation extraction method for measuring soil microbial biomass carbon and nitrogen in flooded rice soils. *Biology and Fertility of Soils*, v.30, p. 510-519, 2000.

WOLIŃSKA, A.; STEPNIEWSKA, Z. Dehydrogenase activity in the soil environment. In: CANUTO R.A. *Dehydrogenases*. 1. ed. Intech: Rijeka, 2012. cap. 8, p. 183- 210.

ZABALOY, María C. et al. Assessment of microbial community function and structure in soil microcosms exposed to glyphosate. **Applied Soil Ecology**, v. 61, p. 333-339, 2012.

ZABALOY, María C.; GARLAND, Jay L.; GÓMEZ, Marisa A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. **Applied Soil Ecology**, v. 40, n. 1, p. 1-12, 2008.

ZILLI, J.E. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 2, p. 633-642, 2008.