



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
CAMPUS CERRO LARGO
CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA

CAROLINA GRINGS SERAFINI

**APLICAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA EM SOLO: EFEITOS SOBRE
INDICADORES MICROBIANOS E ANÁLISE DE SUA ATENUAÇÃO**

CERRO LARGO

2021

CAROLINA GRINGS SERAFINI

**APLICAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA EM SOLO: EFEITOS SOBRE
INDICADORES MICROBIANOS E ANÁLISE DE SUA ATENUAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Joner Daroit

CERRO LARGO

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS

Serafini, Carolina Grings
Aplicação do Herbicida Atrazina em Solo: Efeitos
Sobre Indicadores Microbianos e Análise de sua ATenuação
/ Carolina Grings Serafini. -- 2020.
59 f.

Orientador: Doutor Daniel Joner Daroit

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária, Cerro
Largo, RS, 2020.

1. Agrotóxico. 2. Contaminação. 3. Microrganismos. 4.
Atividade microbiana. 5. Dissipação. I. Daroit, Daniel
Joner, orient. II. Universidade Federal da Fronteira
Sul. III. Título.

CAROLINA GRINGS SERAFINI

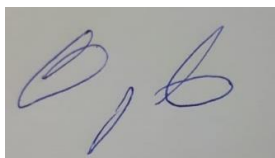
**APLICAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA EM SOLO: EFEITOS SOBRE
INDICADORES MICROBIANOS E ANÁLISE DE SUA ATENUAÇÃO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como requisito para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul.

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

18/01/2021

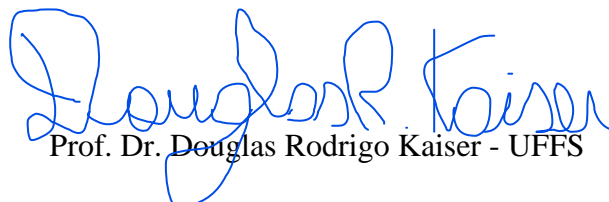
BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Daniel Joner Daroit – UFFS
Orientador



Prof. Dra. Liziara da Costa Cabrera - UFFS



Prof. Dr. Douglas Rodrigo Kaiser - UFFS

Dedico esse trabalho à minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, João Pedro e Regina, pelo apoio, força e motivação para nunca desistir.

Agradeço à Universidade Federal da Fronteira Sul, pela oportunidade de realização da graduação, e disponibilização de toda estrutura física e materiais necessários para a realização desta pesquisa.

Agradeço às minhas colegas e companheiras de pesquisa Isabela, Gabriele e Naiara, que estiveram comigo durante esta jornada e me auxiliaram no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador, professor Dr. Daniel Joner Daroit, por todo apoio, confiança e empenho nas orientações prestadas.

Agradeço à minha colega e amiga Anelise, pela companhia diária de todos esses anos de graduação, por partilhar inúmeros momentos de alegrias e tristezas. E a todos os colegas que estiverem comigo nessa caminhada.

Agradeço a professora, Dr. Liziara da Costa Cabrera, por todo auxílio prestado nas análises de cromatografia, realizadas neste experimento.

Agradeço ao professor, Dr. Douglas Rodrigo Kaiser, pela colaboração e tempo prestado nas coletas de solo, e no desenvolvimento dos cálculos para aplicação do herbicida.

A quem não mencionei, mas fez parte do meu percurso eu deixo um profundo agradecimento porque com toda certeza tiveram um papel determinante nesta etapa da minha vida.

RESUMO

A atrazina é um dos principais herbicidas utilizados na prática agrícola. Seu uso indiscriminado representa problemática crescente, com potenciais riscos aos ecossistemas e à saúde humana. A microbiota desempenha funções essenciais para dinâmica da matéria orgânica e dos nutrientes nos solos, sendo que sua capacidade degradadora é empregada na biorremediação de xenobióticos como a atrazina. Neste sentido, foram investigados os efeitos da atrazina sobre a microbiota do solo, bem como a atenuação deste herbicida. Solo sem histórico de contaminação por atrazina foi usado para preparar microcosmos controle (T1) e microcosmos contaminados com atrazina (T2, 7,39 mg kg⁻¹, dose recomendada e T3, 36,94 mg kg⁻¹, cinco vezes a dose recomendada). Os microcosmos foram incubados por 67 dias, com avaliações periódicas de indicadores microbianos e da atenuação da atrazina. A respiração do solo, indicativa da atividade microbiana, apresentou maiores taxas no início das incubações (dias 1-4), e nos solos contaminados, porém no decorrer dos experimentos, as taxas respiratórias foram similares ao controle. A respiração cumulativa final foi superior em T3, e similar entre T1 e T2. O carbono da biomassa microbiana não foi afetado pela atrazina em T2 quando comparado ao T1; já em T3 a biomassa foi inferior a T1 aos 31 dias, recuperando-se para valores similares a T1 após 67 dias. O quociente metabólico, indicador do estresse microbiano, foi superior em T3 no 1º dia de incubação; subsequentemente, os valores foram similares entre tratamentos. Efeitos transitórios também foram observados sobre a hidrólise de diacetato de fluoresceína (que mensura a atividade hidrolítica total do solo), sobre a atividade de desidrogenase (que avalia a capacidade oxidativa da microbiota), e sobre a contagem de bactérias heterotróficas cultiváveis do solo. Mesmo que os indicadores microbianos usados tenham retornado a valores de controle, as variações observadas, particularmente em T3, podem indicar efeitos sobre a diversidade microbiana, que devem ser investigados. A dissipação da atrazina atingiu 80% e 59% em T2 e T3, respectivamente, após 67 dias. Em termos absolutos, mais atrazina foi dissipada em T3, mas também mais atrazina persistiu neste tratamento, o que pode representar potencial risco à qualidade do solo e da água. A incubação dos solos em meio líquido contendo atrazina (5 mg L⁻¹) resultou, após 7 dias, em dissipações de 35% e maior que >99% para solos oriundos dos microcosmos T2 e T3, respectivamente. Tal comportamento indica a existência de microrganismos com a habilidade de degradar a atrazina no solo investigado, que podem ter atuado na dissipação do herbicida. Investigações acerca de microrganismos degradadores ganham relevância no contexto da aplicabilidade na biorremediação de solos contaminados por atrazina.

Palavras-chave: Agrotóxico. Contaminação. Microrganismos. Atividade microbiana. Dissipação.

ABSTRACT

Atrazine is one of the main herbicides used in agricultural practice. Its indiscriminate use represents a growing problem, with potential risks to ecosystems and human health. The microbiota performs essential functions related to the dynamics of organic matter and nutrients in soils, and its degrading capacity is used in the bioremediation of xenobiotics such as atrazine. In this sense, the effects of atrazine towards soil microbiota were investigated, as well as the attenuation of this herbicide. Soil without a history of atrazine contamination was used to prepare control microcosms (T1) and microcosms contaminated with atrazine (T2, 7.39 mg kg⁻¹, recommended dose; T3, 36.94 mg kg⁻¹, five-times the recommended dose). Microcosms were incubated for 67 days, with periodic evaluations of microbial indicators and atrazine attenuation. Soil respiration, indicative of microbial activity, showed increased rates at the beginning of incubations (days 1-4), particularly higher in contaminated soils; in the course of the experiments, respiratory rates were similar to control. The final cumulative respiration was higher at T3, and similar between T1 and T2. The microbial biomass carbon was not affected by atrazine in T2 when compared to T1; in T3, biomass was lower than T1 at day 31, recovering to values similar to T1 after 67 days. The metabolic quotient, an indicator of microbial stress, was higher in T3 at day 1; subsequently, values were similar between treatments. Transient effects have also been observed for fluorescein diacetate hydrolysis (which measures the total soil hydrolytic activity), dehydrogenase activity (which assesses the oxidative capacity of the microbiota), and enumeration cultivable heterotrophic soil bacteria. Even though the microbial indicators used have returned to control values, the observed variations, particularly in T3, may indicate effects on microbial diversity, which should be investigated. Atrazine dissipation reached 80% and 59% in T2 and T3, respectively, after 67 days. In absolute values, more atrazine was dissipated in T3, but also more atrazine persisted in this treatment, which may represent a potential risk to soil and water quality. Incubation of soils in liquid medium containing atrazine (5 mg L⁻¹) resulted, after 7 days, in dissipations of 35% and >99% for soils from microcosms T2 and T3, respectively. This suggests the existence of atrazine-degrading microorganisms in the investigated soil, which may have acted in herbicide dissipation. Investigations regarding degrading microorganisms gain relevance in the context of their applicability in the bioremediation of atrazine-contaminated soils.

Keywords: Pesticide. Contamination. Microorganisms. Microbial activity. Dissipation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Fórmula estrutural da atrazina.....	19
Figura 2 - Produção diária de CO ₂ por experimento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.....	35
Figura 3 - Produção cumulativa de C-CO ₂ por experimento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.....	36
Figura 4 - Carbono da biomassa microbiana nos três tratamentos, avaliado no 1º, 31º e 67º dia de incubação.....	37
Figura 5 - Quociente metabólico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.....	38
Figura 6 - Atividade hidrolítica total do solo nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.....	39
Figura 7 - Atividade relativa de desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.....	40
Figura 8 - Contagem de bactérias heterotróficas totais nos três tratamentos, ao longo de 67 dias de incubação.....	41
Figura 9 - Dissipação da atrazina (%) extraída dos dois tratamentos contaminados, ao longo de 67 dias de incubação.....	42
Figura 10 - Atrazina residual (%) extraída durante cultivos em meio líquido (0, 3 e 7 dias) que usaram como inóculos os solos (T2 e T3) ao final dos experimentos em microcosmos.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do solo utilizado nos experimentos.....	24
Tabela 2 - Valores da exatidão (Rec) e precisão intermediária (RSD) do método.....	31

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 OBJETIVOS	14
1.1.1 Objetivo geral	14
1.1.2 Objetivos específicos	14
1.2 JUSTIFICATIVA	14
2 REFERENCIAL TEÓRICO	16
2.1 AGROTÓXICOS	16
2.2 O HERBICIDA ATRAZINA	17
2.2.1 A atrazina no ambiente e seus efeitos	18
2.3 BIODEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DA ATRAZINA	21
3 METODOLOGIA	23
3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO	23
3.2 PREPARO DO CONTAMINANTE	24
3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS	24
3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.....	25
3.5 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS	25
3.6 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO	26
3.6.1 Quociente metabólico	27
3.7 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE.....	28
3.8 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO	28
3.9 DISSIPAÇÃO DA ATRAZINA	29
3.9.1 Otimização do método QuEChERS modificado para extração do herbicida em amostras de solo	29
3.9.2 Preparo das soluções	29
3.9.3 Validação do método cromatográfico	30
3.9.4 Condições cromatográficas	31
3.10 DISSIPAÇÃO DE ATRAZINA EM MEIO LÍQUIDO, USANDO SOLO DOS MICROCOSMOS.....	31
3.11 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS.....	32
3.12 ANÁLISE DOS DADOS	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA.....	33

4.2 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM).....	35
4.3 QUOCIENTE METABÓLICO	37
4.4 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO	39
4.5 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE.....	40
4.6 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS	42
4.7 DISSIPACÃO DA ATRAZINA	43
4.8 DISSIPACÃO DA ATRAZINA EM MEIO LÍQUIDO, USANDO O SOLO REMANESCENTE DOS MICROCOSMOS.....	46
5 CONCLUSÃO.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

A expansão populacional e o aumento no consumo de alimentos, vem estimulando sérios impactos ambientais, originados pelo uso intensivo de agroquímicos, destinados ao controle de pragas e doenças, ou como fertilizantes no solo (BENEVIDES; MARINHO, 2015).

Desde 2009, o Brasil ocupa uma das primeiras colocações em relação ao uso mundial de agrotóxicos, condição essa que expõe a saúde da população, através da contaminação do meio ambiente, água e dos alimentos ingeridos, e principalmente das atividades de contato direto com estes produtos químicos (ARAÚJO; OLIVEIRA, 2017). Nos solos, o uso excessivo de agrotóxicos também causa crescente preocupação devido aos efeitos sobre organismos não-alvo, o que pode afetar negativamente a biodiversidade (SINGH; SINGH, 2016).

A atrazina é um dos herbicidas mais usados na produção agrícola, devido à sua ampla eficiência a campo e baixo custo. Sua aplicação está voltada para o controle de ervas daninhas de folhas largas, principalmente nas culturas de milho, cana-de-açúcar, sorgo e em pastagens (ROMAN, 2007). A toxicidade da atrazina aos humanos e outros seres vivos, associada ao aumento das taxas de aplicação agrícola e à sua estabilidade química, ameaçam o funcionamento dos ecossistemas e tornam este herbicida um dos principais problemas globais de poluição dos solos e da água (GAO et al., 2018; LIN et al., 2018).

Os microrganismos desempenham importantes funções relacionadas aos fluxos de carbono, nitrogênio, fósforo e enxofre nos solos, provendo uma série de serviços ecossistêmicos, como a ciclagem de carbono e nutrientes e a disponibilização de nutrientes nestas matrizes ambientais (HUANG et al., 2020).

A microbiota dos solos, representada por bactérias e fungos, também atua como a principal degradadora de contaminantes ambientais (ANDRIGHETTI, 2011). A capacidade de microrganismos em degradar contaminantes serve de alicerce para os processos tecnológicos de biorremediação ambiental. Dentre estes processos está a biorremediação *in situ*, onde o tratamento da matriz contaminada é realizado no próprio local, sendo classificada como atenuação natural, bioestimulação e bioaugmentação (EPA, 2006).

Na atenuação natural, ou atenuação intrínseca, os microrganismos nativos do local são encarregados de degradar os contaminantes orgânicos sem a intervenção humana no processo, valendo-se da ambientação natural da microbiota do solo à presença do composto xenobiótico (PERELO, 2010). Logo, há a óbvia dependência da presença de microrganismos metabolicamente competentes à degradação do contaminante. Ainda, fatores abióticos,

relacionados ao contaminante e à matriz ambiental, afetam a disponibilidade das moléculas a serem biodegradadas e a atividade microbiana (ODUKKATHIL; VASUDEVAN, 2013).

Assim, buscou-se analisar os efeitos de diferentes concentrações de atrazina, aplicadas em amostras de solo sem histórico de contaminação, sobre indicadores microbianos durante experimentos de atenuação natural monitorada.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos de duas concentrações de atrazina sobre indicadores microbiológicos e a atenuação deste herbicida em amostras de um Latossolo Vermelho sem histórico de contaminação.

1.1.2 Objetivos específicos

- Mensurar a respiração do solo com e sem a aplicação de atrazina;
- Enumerar a população microbiana heterotrófica cultivável total do solo em condições de aplicação e sem aplicação de atrazina;
- Avaliar o efeito da atrazina sobre o carbono da biomassa microbiana e o quociente metabólico;
- Determinar a atividade hidrolítica total e a atividade de desidrogenase em solos com e sem a aplicação de atrazina;
- Mensurar a atenuação da atrazina nos solos contaminados;
- Investigar o potencial de degradação da atrazina pela microbiota do solo em meio mineral líquido.

1.2 JUSTIFICATIVA

Considerando a expansão na produção de alimentos e o fato da atrazina ser eficaz no controle de plantas daninhas em grandes culturas, tem-se constatado uma intensa utilização deste herbicida a cada ano, indicando assim a primordialidade do conhecimento em relação à sua dinâmica.

Tratando-se de consciência ambiental, os fatores avaliados envolvem o risco que o herbicida causa ao ambiente, juntamente com seus resíduos e acumulação na água e no solo (HANG et al., 2007). Tipicamente, o tempo necessário para que 50% do herbicida disposto seja dissipado é conceituado de cerca de 60 dias, mas varia amplamente de acordo com as características do solo (KRUTZ et al., 2010).

Estudos demonstram que a atrazina há pouco tempo aplicada é a mais acessível à degradação microbiana; porém o herbicida não é integralmente mineralizado, permanecendo adsorvido ao solo. Esta observação indica que a cinética de biotransformação da atrazina é complexa, iniciando com uma taxa de degradação mais acelerada, mas decrescente ao longo do tempo (JABLONOWSKI et al., 2010).

Assim, quando empregada continuamente a longo prazo, solos agrícolas possivelmente retêm a atrazina e seus resíduos, o que pode acarretar em lixiviação deste produto e conseqüente contaminação de águas subterrâneas (JABLONOWSKI et al., 2009). Levando em consideração as notáveis quantidades empregadas anualmente, investigações demonstram a elevada persistência da atrazina nos solos, refletindo em um grande potencial de ameaça ao ambiente e à saúde dos seres humanos (JABLONOWSKI et al., 2011).

Considerando o potencial danoso dos agrotóxicos e a relevante participação de microrganismos como agentes de biodegradação, investigações nesta temática apresentam-se potencialmente relevantes buscando melhor compreender os efeitos de agrotóxicos sobre a microbiota dos solos e a atenuação de xenobióticos (ANDRIGHETTI, 2011).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AGROTÓXICOS

No Brasil os agrotóxicos são definidos pela Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto nº 4.074/2002:

Agrotóxicos e afins – produtos e agentes de processos físico, químico ou biológico, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantações, de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

A formulação comercial de um agrotóxico envolve a obtenção de um ou mais ingrediente ativo, seguido de diluentes e aditivos. O ingrediente ativo é o responsável pelo combate à praga ou doença que se deseja reprimir, ou seja, condiz aos produtos químicos utilizados, tanto na forma sólida quanto líquida. Sua concentração é expressa em gramas por litro do produto comercial, em porcentagem, ou partes por milhão em peso unitário. O diluente é empregado na formulação para melhorar a eficiência do ingrediente ativo sobre o alvo a ser tratado, uma vez que sua função é manter a separação e suspensão do mesmo, aumentando a segurança na manipulação do produto. Os aditivos são substâncias surfactantes que modificam as propriedades físicas, químicas e biológicas dos agrotóxicos proporcionando uma maior eficácia do produto (SANTOS, 2000).

Cerca de 400 ingredientes ativos agrotóxicos possuem registro para uso agrícola no Brasil, com aproximadamente 3.500 produtos formulados a partir desses ingredientes liberados para comercialização no país (AENDA, 2020). De acordo com a vigente legislação, é dever do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) exercer a análise do ideal desempenho agrônomo, ao Ministério da Saúde avaliar e realizar a classificação toxicológica e ao Ministério do Meio Ambiente verificar sua periculosidade ambiental (PERES; MOREIRA, 2003).

A classificação dos agrotóxicos envolve múltiplas categorias, podendo variar, de acordo com sua classe química, danos causados à saúde humana e ao meio ambiente e, principalmente, à sua aplicabilidade (BRASIL, 2011; RODRIGUES, 2012). Ao referir-se à classificação química, leva-se em consideração o ingrediente ativo do produto, e o modo que age sobre o alvo desejado. Já associado à sua finalidade, destacam-se as três principais classes mais

comercializadas mundialmente, os fungicidas, herbicidas e os inseticidas, utilizados na agricultura para o controle de fungos, plantas daninhas ou invasoras, e insetos, respectivamente (SOUZA, 2016). Quanto aos danos causados à saúde humana, esses produtos são agrupados de acordo com a sua toxicidade, categorizados de extremamente tóxicos a até improváveis de causar dano agudo (ANVISA, 2019). No que se refere à potencial de periculosidade ambiental, os agrotóxicos são classificados desde produto altamente perigoso a até pouco perigoso para o meio ambiente (IBAMA, 2020).

A utilização dos agrotóxicos no Brasil teve seu início com a chamada Revolução Verde, que intensificou o uso de produtos químicos para melhorar as práticas agrícolas, consequentemente aumentando sua produção (RIBAS; MATSUMURA, 2009). Nas últimas décadas, o Brasil expandiu significativamente o uso desses produtos. Em números absolutos de uso, o incremento do uso de pesticidas pode ser parcialmente explicado por modificações relevantes na dimensão da produção agrícola e da extensão das áreas cultivadas. No entanto, há tendência crescente no uso de agrotóxicos quando são consideradas tanto as quantidades aplicadas por área cultivada, quanto as quantidades de pesticidas aplicadas por habitante (MORAES, 2019).

Em 2018, 549 mil ton de agrotóxicos e afins foram comercializados no Brasil. Dentre as regiões brasileiras responsáveis pelo maior uso de agrotóxicos no ano de 2018 estão a região Centro-Oeste (32,3%), Sul (24,3%) e Sudeste (23,1%). As informações disponíveis dão conta de que o estado do Rio Grande do Sul é o terceiro colocado nas vendas de agrotóxicos, totalizando 64 mil toneladas (11,6%), apenas atrás dos estados de Mato Grosso (17,9%) e São Paulo (14,8%). A nível nacional, dentre os princípios ativos comercializados, destacam-se o glifosato e seus sais, em 1º lugar (217.592 ton), seguido do 2,4-D (52.426 ton), enquanto a atrazina aparece em 5º lugar (23.429 ton) (IBAMA, 2018).

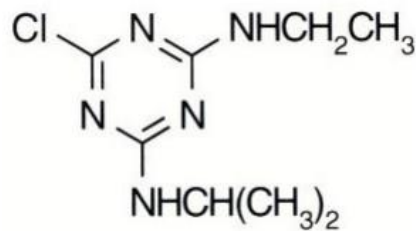
2.2 O HERBICIDA ATRAZINA

Herbicidas são agentes químicos ou biológicos com a habilidade de eliminar ou suprimir o crescimento de espécies vegetais específicas, especialmente plantas daninhas e plantas invasoras que se desenvolvam em áreas cultivadas com culturas agrícolas (ROMAN et al., 2007). Os princípios ativos desta categoria de agrotóxicos frequentemente agem impedindo a atividade de enzimas ou proteínas nas células vegetais, estimulando inúmeras alterações que, na maioria das vezes culminam com a morte da planta (OLIVEIRA JR et al., 2011)). No Brasil,

os herbicidas são os agrotóxicos mais consumidos e, dentre estes, está a atrazina (IBAMA, 2018).

A atrazina (Fig. 1), cuja denominação química é 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina, é um herbicida pertencente ao grupo das triazinas. Vem sendo amplamente utilizada no Brasil, essencialmente no controle de ervas daninhas em cultivos de milho, sorgo e cana-de-açúcar (BLANCO et al., 2013).

Figura 1 - Fórmula estrutural da atrazina.



Fonte: ANVISA, 2019.

Nas plantas suscetíveis, a atrazina atua bloqueando a fotossíntese. Mais especificamente, interrompe o transporte de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I na membrana dos tilacóides dos cloroplastos, ocasionando a interrupção da produção de ATP e NADPH₂, fundamentais à fixação de CO₂. Ainda, com a interrupção do transporte de elétrons, o elevado estado energético das clorofilas conduz à formação de radicais livres que, por sua vez, iniciam processos de peroxidação lipídica. Estes processos acarretam a destruição de membranas lipídicas, levando à necrose celular e tecidual (OLIVEIRA JR., 2011).

Em geral, a atrazina é aplicada tanto na pré-emergência quanto na pós-emergência das plantas a serem controladas. Na primeira condição, sua ação ocorre depois da germinação das sementes e emergência das plantas, ou seja, com o início dos processos fotossintéticos; na segunda situação, a atrazina é posta em contato direto com as folhas da planta a ser controlada, atingindo os cloroplastos (MARCHI et al., 2008).

2.2.1 A atrazina no ambiente e seus efeitos

De acordo com a Resolução 001/86 do CONAMA (BRASIL, 1986), impacto ambiental “é qualquer transformação das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, decorrente de qualquer ação de atividades humanas que possam afetar a saúde, a segurança e o

bem-estar da população; as atividades sociais e econômicas; a biota; as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente e a qualidade dos recursos ambientais”.

Os agrotóxicos podem atingir os recursos naturais e não só os organismos-alvo, contaminando a fauna e a flora local. Estimativas indicam que menos de 1% dos agrotóxicos aplicados atuam, de fato, sobre os organismos-alvo, ou seja, mais de 99% destes princípios ativos atingem o ambiente, podendo contaminar o solo e a água, afetando de forma adversa organismos benéficos e a saúde humana (CARNEIRO et al., 2015). Após a aplicação, os agrotóxicos são submetidos a diversos processos físicos, químicos e biológicos nos solos. Em conjunto com as características do pesticida, tais processos determinam sua dissipação e persistência (ODUKKATHIL; VASUDEVAN, 2013).

A atrazina é considerada um herbicida de baixa toxicidade e de periculosidade ambiental moderada (CARMO et al., 2013). Os produtos formulados contendo atrazina como único princípio ativo, usados na agricultura, estão especialmente categorizados como “pouco tóxicos” ou “improváveis de causar dano agudo” no contexto toxicológico, e como “perigosos” ou “muito perigosos” ao meio ambiente (AGROFIT, 2020).

O tempo de meia-vida da atrazina no solo é de cerca de 60 dias (KRUTZ et al., 2010). Contudo, o tempo de meia-vida depende dos fatores abióticos e bióticos do meio, sendo comumente reportado como variando entre 41 e 231 dias. A estabilidade química e as baixas taxas de degradação da atrazina, somadas ao incremento da aplicação agrícola, indicam a persistência deste herbicida como agente de poluição dos solos (MERINI et al., 2009; SINGH et al., 2018).

No ambiente terrestre, a atrazina pode afetar negativamente plantas não-alvo, sejam culturas agrícolas, pelo efeito residual do herbicida anteriormente aplicado na mesma área, mas também a vegetação natural circundante (VIEGAS et al., 2012). Efeitos tóxicos da atrazina vêm sendo descritos para representantes da fauna edáfica, como anelídeos e colêmbolos (JANSCH et al., 2006; FRAMPTON et al., 2006). A atrazina pode também ocasionar impactos negativos sobre a microbiota dos solos. Considerando que a atividade microbiana é fundamental à dinâmica da matéria orgânica e à ciclagem de nutrientes nos solos, tais efeitos podem ameaçar a sustentabilidade dos solos (SINGH et al., 2018; HUANG et al., 2020).

Além disso, a atrazina pode ser carregada por escoamento superficial até corpos hídricos. Este herbicida, devido à sua elevada mobilidade, ainda é capaz de migrar do solo superficial até camadas mais profundas, contaminando assim as águas subterrâneas (CHEREMISINOFF; ROSENFELD, 2011). Neste sentido, xenobióticos com tempos de meia-vida mais longos no

solo usualmente apresentam potencial superior para contaminar lençóis freáticos (REBELO; CALDAS, 2014).

A Portaria de Consolidação Nº 5 do Ministério da Saúde estabelece, como padrão de potabilidade da água, o valor máximo permitido para atrazina de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2017). No Brasil, conforme a Resolução CONAMA 357/05, a concentração máxima de atrazina em águas doces é de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2005). Para águas subterrâneas, os limites de atrazina são estabelecidos pela Resolução CONAMA 396/08 conforme o uso preponderante, quais sejam, consumo humano ($2 \mu\text{g L}^{-1}$), dessedentação de animais ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) e irrigação ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), respectivamente (BRASIL, 2008).

A atrazina vem sendo encontrada em águas superficiais e subterrâneas no Brasil (CALDAS et al., 2019), incluindo concentrações acima daquelas permitidas pela legislação (DIAS et al., 2018). Por exemplo, investigação em áreas urbanas e rurais de duas cidades do Mato Grosso, indicou que a concentração de atrazina variou da não detecção a até $9,3 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas superficiais, e da não detecção a até $18,9 \mu\text{g L}^{-1}$ para águas subterrâneas (NOGUEIRA et al., 2012).

Em outros países, a atrazina é um dos principais poluentes encontrados em águas superficiais e subterrâneas, incluindo a água usada para consumo humano (LOOS et al., 2010; GALINDO-MIRANDA et al., 2019; SOUZA et al., 2020; WANG et al., 2020). Cabe destacar que, mesmo em baixas concentrações, a presença de pesticidas indica que o ambiente está exposto, e isso pode acarretar em efeitos sobre a biota (CALDAS et al., 2019).

Os efeitos tóxicos da atrazina vêm sendo investigados em ambientes aquáticos. Considerando o mecanismo de ação da atrazina, organismos que realizam fotossíntese (algas e plantas aquáticas) podem ser diretamente afetados (DELORENZO et al., 2001; RAMAKRISHNAN et al., 2010). Efeitos nocivos também são descritos para invertebrados aquáticos (SINGH et al., 2018). Em revisão da literatura, Solomon et al. (1996) indicaram que representantes do fitoplâncton estão entre os organismos mais sensíveis à atrazina, seguidos de plantas aquáticas, invertebrados bênticos, zooplâncton e peixes.

Particularmente, em peixes e anfíbios de água doce, embora não tenha sido encontrada relação direta com a mortalidade, a exposição à atrazina reduziu taxas de crescimento, a imunidade e comportamentos anti-predação, bem como afetou a morfologia e a função das gônadas, incluindo modificações na produção de hormônios sexuais (ROHR; MCCOY, 2010).

A presença da atrazina em ecossistemas aquáticos impacta a reprodução de sua fauna e flora, interferindo na estrutura das comunidades. Tais alterações afetam, consequentemente, as cadeias alimentares destes ambientes. A atuação frente a organismos fotossintetizantes pode

alterar indiretamente, por exemplo, a sobrevivência, crescimento e/ou reprodução de herbívoros e predadores (ALBUQUERQUE et al., 2020).

Estudos realizados no Brasil indicam que a maior incidência de intoxicação aguda por agrotóxicos ocorre em trabalhadores rurais, devido à exposição ocupacional (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Quanto às intoxicações crônicas, não há, aparentemente, associação causal entre atrazina e câncer em humanos (BOFFETTA et al., 2013). Os efeitos crônicos da atrazina em humanos são controversos. Embora a exposição através do consumo de água, alimentos e outras exposições não ocupacionais seja considerada de menor importância, a coleta de dados mais apurados da exposição da população à atrazina é necessária. Por exemplo, investigadores encontraram relação positiva entre o consumo de água contendo atrazina e nascimentos prematuros (RINSKY et al., 2012).

Investigações com modelos animais indicam o potencial da atrazina em atuar como disruptor endócrino, ou seja, em interferir no sistema hormonal, especialmente no sistema reprodutivo. Neste sentido, estudos epidemiológicos com diferentes populações humanas indicam tal possibilidade (WIRBISKY; FREEMAN, 2015).

2.3 BIODEGRADAÇÃO E BIORREMEDIAÇÃO DA ATRAZINA

A contaminação ambiental pela atrazina, devido ao seu extenso uso e toxicidade, coloca em risco os ecossistemas. Logo, a busca de soluções para reparar a contaminação dos solos torna-se relevante (GAO et al., 2018). Após a aplicação no solo, os agrotóxicos podem ser convertidos em formas mais simples ou serem completamente mineralizados por meio de processos físicos, químicos e biológicos. A degradação da atrazina em solos ocorre, majoritariamente, através da atuação de microrganismos (SENE et al., 2010).

Diversos microrganismos, individualmente ou em consórcios, apresentam a capacidade de degradar a atrazina, onde as moléculas do herbicida são utilizadas especialmente como fontes de nitrogênio. A completa biodegradação da atrazina envolve processos catalisados por enzimas microbianas, que atuam na descloração e desalquilação, seguidas da ruptura do anel heterocíclico, resultando em CO₂ e amônia (SENE et al., 2010).

Neste sentido, a biorremediação representa uma importante abordagem que vem recebendo crescente atenção (SINGH; SINGH, 2016). A biorremediação é um conjunto de tecnologias que utiliza organismos vivos e/ou seus componentes a fim de degradar ou transformar contaminantes em substâncias inertes, como dióxido de carbono, água e sais

inorgânicos, ou em outros subprodutos que podem ser menos tóxicos do que os contaminantes originais (EPA, 2006; ROSA; FRACETO; MOSCHINI-CARLOS, 2012).

Pelo fato de utilizar apenas a capacidade fisiológica de alguns organismos para degradar compostos potencialmente nocivos, a biorremediação é considerada uma tecnologia limpa e de baixo custo (DEON et al., 2012). As técnicas de biorremediação podem ser classificadas de acordo com o local onde acontece a biodegradação. Quando a técnica é realizada no próprio local denomina-se *in situ*, e é denominada *ex situ* quando o compartimento contaminado é removido para ser remediado fora do local de contaminação (BERTICELLI et al., 2016).

Outra forma de classificar os processos de biorremediação é em função do tipo de modificação que é realizada no ambiente contaminado, podendo haver somente o monitoramento da contaminação ao longo do tempo (atenuação natural), a adição de nutrientes inorgânicos e/ou orgânicos (bioestimulação) e de microrganismos biodegradadores (bioaugmentação) (BERTICELLI et al., 2016).

Independentemente da abordagem, estratégias de biorremediação se valem da elevada biodiversidade microbiana, que é traduzida em uma enorme capacidade fisiológica e metabólica, para a degradação de contaminantes (SINGH; SINGH, 2016). As características do solo são determinantes para a eficiência da eliminação destes contaminantes. A umidade, temperatura, aeração, pH e quantidade de matéria orgânica, dentre outros, determinam de forma direta o crescimento e atividade dos microrganismos, além da disponibilidade do xenobiótico à degradação (CARMO et al., 2013).

Embora alguns microrganismos possam degradar herbicidas, estes princípios ativos podem apresentar efeitos deletérios sobre a microbiota (FLOCH et al., 2011). Particularmente, Huang et al. (2020) demonstraram que a contaminação do solo com atrazina inibiu a atividade dos microrganismos e diminuiu a diversidade microbiana. Deste modo, a avaliação das respostas dos microrganismos frente a contaminações pode auxiliar na compreensão, predição e monitoramento do destino destes xenobióticos (SINGH; SINGH, 2016).

3 METODOLOGIA

3.1 COLETA, CARACTERIZAÇÃO E PREPARO DAS AMOSTRAS DE SOLO

Foram coletadas amostras de solos, na profundidade de 0 a 10 cm (Horizonte A), de uma área sem histórico recente de aplicação de 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).

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). Após homogeneização, este solo foi utilizado para a montagem de microcosmos.

Uma amostra do solo foi encaminhada para caracterização física e química no Departamento de Solos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Campus Santa Maria. Outra amostra foi encaminhada para análises de granulometria e de capacidade de campo no Laboratório de Física do Solo da Universidade Federal da Fronteira Sul - *Campus* Cerro Largo. Os resultados destas análises são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas do solo utilizado nos experimentos.

Atributo	Profundidade (0-20 cm)
Matéria Orgânica (%)	2,80
Argila (%)	56,28
Areia Fina (%)	4,12
Areia Grossa (%)	6,29
Silte (%)	33,31
P disponível (mg dm ³)	14,20
K disponível (mg dm ³)	312,00
CTC ^a efetiva (cmol _c dm ³)	8,90
CTC pH7 (cmol _c dm ³)	14,30
Al (cmol _c dm ³)	0,10
Mg (cmol _c dm ³)	1,50
Ca (cmol _c dm ³)	6,50
H + Al (cmol _c dm ³)	5,50
pH (em água, 1:1)	5,20
Índice SMP ^b	5,80
CC ^c (g de água g ⁻¹ de solo)	0,31

^a CTC: Capacidade de Troca de Cátions; ^b SMP: Método Shoemaker, Mac Lean e Pratt; ^c CC: Capacidade de Campo.

3.2 PREPARO DO CONTAMINANTE

O agrotóxico comercial Primóleo[®] (Syngenta), contendo atrazina como único ingrediente ativo (i.a.) herbicida (400 g L^{-1}), foi gentilmente cedido por um produtor rural, na quantidade suficiente para os experimentos. Para o cálculo da dose de atrazina a ser utilizada, foi considerada a dose máxima indicada na bula do produto comercial (6 L ha^{-1}). A partir disso, procedeu-se os cálculos referentes à dose recomendada ($7,39 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$ de solo) e cinco vezes a dose recomendada ($36,94 \text{ mg i.a. kg}^{-1}$ de solo).

3.3 MONTAGEM E INCUBAÇÃO DOS MICROCOSMOS

Os microcosmos foram montados utilizando frascos de vidro com tampa de fechamento hermético e capacidade de 3,5 L. Foram adicionados 1.000 g de solo em cada frasco, com a umidade previamente ajustada para 60% da capacidade de campo (TEDESCO et al., 1995), através da adição de água destilada estéril.

Ao solo acondicionado nos frascos foi adicionado a quantidade do produto comercial para atingir as doses de atrazina referentes à dose recomendada e cinco vezes este valor. O solo foi revolvido com espátula estéril para a homogeneização. Para cada contaminação foram mantidos microcosmos em quadruplicata, microcosmos sem a adição do herbicida (em quadruplicata). E três frascos sem solo (brancos), totalizando 15 microcosmos, assim distribuídos:

T1 – Controle (sem contaminação);

T2 – Dose Recomendada do Produto Comercial;

T3 – Cinco Vezes a Dose Recomendada do Produto Comercial.

As incubações foram realizadas por 67 dias em temperatura ambiente, sem incidência de luz. Esse tempo foi determinado pois, embora a meia-vida da atrazina no solo seja relativamente longa (41 a 231 dias), tempos de meia-vida usualmente menores são estimados em microcosmos.

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.

3.4 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

A atividade respiratória microbiana nos microcosmos foi avaliada com base na liberação de C-CO₂ (ALEF, 1995). 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). Três frascos sem solo, contendo recipiente com NaOH, foram utilizados como brancos.

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

Aos recipientes retirados foi adicionado 2 mL de solução de BaCl₂ (30%, m v⁻¹) e duas gotas de fenolftaleína 1%. Após o NaOH residual foi titulado com HCl (0,5 mol L⁻¹). Amostras de solo dos microcosmos foram utilizadas para determinação da massa seca. A quantidade de CO₂ liberado foi determinada pela seguinte equação (STOTZKY, 1965; COLLA et al., 2014):

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

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 8 dias do experimento e, posteriormente, a cada três dias.

3.5 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS

Amostras compostas de solo (1 g), frequentemente coletadas de forma asséptica a partir dos microcosmos, passaram por diluições decimais seriadas, de 10⁻¹ a 10⁻¹⁰, em salina estéril (8,5 g L⁻¹ NaCl). Posteriormente, 20 µL destas diluições foram inoculadas, em triplicata, em 180 µL de Caldo Soja Trypticaseína (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.

3.6 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA DO SOLO

Nos dias 0, 31 e 67 do experimento foi mensurado o carbono da biomassa microbiana (CBM) no solo dos microcosmos pelo método modificado de 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 uma fácil extração, sendo empregado principalmente também pois não altera a composição orgânica da amostra (JENKINSON; POWLSON, 1976).

As técnicas empregadas 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 mol L⁻¹). Amostras de solo não submetidas à fumigação foram, logo após a pesagem, adicionadas da solução extratora. Após, o sobrenadante foi filtrado através de papel filtro (25 µm).

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 na chapa a 300 °C. Após o resfriamento foram adicionadas 70 mL de água destilada e quatro gotas de difenilamina (1%, m v⁻¹, em ácido sulfúrico). O excesso de dicromato foi então titulado com sulfato ferroso amoniacal (BROOKES; JOERGENSEN, 2005).

Com a finalidade de 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.

A proporção 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 CMB do solo foi calculado pela seguinte fórmula:

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

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).

3.6.1 Quociente metabólico

O quociente metabólico ($q\text{CO}_2$) foi calculado pela razão entre respiração e o carbono da biomassa microbiana (ANDERSON; DOMSCH, 1993). Os valores encontrados foram expressos em $\text{mg C-CO}_2 \text{ mg C mic}^{-1} \text{ dia}^{-1}$, conforme a fórmula:

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

3.7 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

A mesma foi estimada nos tempos 0, 8, 16, 31, 52 e 67 dias, durante a incubação dos microcosmos, pelo restringimento de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC). 5 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 24 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, os tubos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 min e, por fim, foram mensuradas as absorbâncias dos sobrenadantes a 485 nm e 546 nm. Os resultados foram expressos como atividade relativa (%), referente ao tempo de incubação dos microcosmos onde foi observada máxima absorbância (100%).

3.8 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

Amostras compostas de cada tratamento (2 g) foram coletadas 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 diacetato de fluoresceína (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.

Em seguida, o conteúdo foi destinado a tubos de centrífuga (50 mL) e centrifugado por 10 min a 5.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, filtrado utilizando papel filtro, e a absorbância do filtrado foi avaliada em espectrofotômetro a 490 nm. Foram realizados controles contendo solo e tampão, mas sem FDA. Tampão fosfato (60 mmol L⁻¹; pH 7,6), foi utilizado como “zero” para a avaliação da absorbância. A quantidade de fluoresceína liberada (µg fluoresceína g⁻¹ solo seco) foi determinada através de curva padrão de fluoresceína (ADAM; DUNCAN, 2001).

3.9 DISSIPACÃO DA ATRAZINA

3.9.1 Otimização do método QuEChERS modificado para extração do herbicida em amostras de solo

A investigação de agrotóxicos em solos exige um preparo de amostra que, suprima o máximo de interferentes e permita a detecção de concentrações em baixos níveis. O método utilizado, denominado QuEChERS acetato, teve seu protocolo baseado nos procedimentos propostos por Silva et al. (2009) e Gebrehiwot et al. (2019), os quais eliminaram a etapa de *clean-up*, substituindo por diluição do extrato na fase móvel.

Os ensaios foram realizados em triplicata de cada tratamento, nos tempos 0, 8, 16, 31, 52 e 67 dias, com as amostras compostas, retiradas dos microcosmos no mesmo dia da análise.

Inicialmente, 5 g de solo foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon de 50 mL. Em seguida, foram adicionados 5 mL de água ultrapura e, 10 mL de acetonitrila acidificada com ácido acético 1%, seguida de agitação manual. Após, 3 g de sulfato de magnésio ($MgSO_4$) e, 1,5 g de acetato de sódio (CH_3COONa) foram incorporados, agitando-se manualmente e em Vortex por 1 minuto. A mistura foi então centrifugada a 5000 rpm durante 5 min. Posteriormente, 1 mL do sobrenadante foi retirado e, diluído a 10 mL em uma solução constituída por água ultrapura e metanol (70:30, v/v) em tubos do tipo Falcon de 15 mL, seguida de agitação manual. O composto final é retirado com o auxílio de uma seringa de plástico e, filtrado em filtro de seringa de 0,22 μm e, injetado no sistema cromatográfico.

3.9.2 Preparo das soluções

Solução estoque do padrão comercial do agrotóxico atrazina foi preparado em uma solução na concentração de 400.000 $mg L^{-1}$. Posteriormente, realizou-se uma diluição em água deionizada e preparou-se 10 mL de uma solução de 1.000 $mg L^{-1}$ (obtida da solução de 400.000 $mg L^{-1}$). Essas soluções estoque foram armazenadas em frascos âmbar, ao abrigo da luz e sob refrigeração a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}C$ em freezer.

A partir da solução estoque foram preparadas as soluções de trabalho, por diluição em água deionizada, na concentração de 1 $mg L^{-1}$. Essa mistura foi preparada em balão volumétrico calibrado de 25 mL, sendo então transferido para frasco âmbar e armazenado a temperatura de $-20\text{ }^{\circ}C$ em freezer.

A partir da diluição desta solução de trabalho foram preparadas as soluções para construção das curvas analíticas, em diferentes concentrações variando de 0,25 a 1.000 $\mu\text{g L}^{-1}$, selecionando-se no mínimo cinco concentrações para construção da curva.

3.9.3 Validação do método cromatográfico

O método desenvolvido, foi validado empregando figuras de mérito como, seletividade, linearidade e faixa de trabalho, precisão, exatidão, limite de detecção e quantificação. Parâmetros estes, sugeridos para validação de métodos analíticos pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia), DOQ-CGCRE-008, de 2020.

A seletividade foi determinada com a injeção do solvente e de água ultra pura, verificando que não havia outro sinal no mesmo tempo de retenção da atrazina. A linearidade do método foi realizada verificando as curvas de calibração e os coeficientes de determinação (r^2) e correlação (r) obtidos foram superiores a 0,9. Para exatidão e precisão intermediária foram avaliados dois níveis de concentração (18,9 e 37,8 mg kg^{-1}) em triplicatas em dois dias diferentes (Tabela 1). As concentrações escolhidas foram em função da previsão de níveis esperados no experimento. Os valores foram obtidos como percentual de recuperação de um nível fortificado, conforme equação a seguir:

$$R = \frac{C_1 - C_2}{C_3} \times 100$$

onde:

R = recuperação do analito (%);

C_1 = concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = concentração do padrão do agrotóxico;

A precisão intermediária como desvio padrão relativo (RSD) foi dado pela fórmula a seguir, considerando as réplicas obtidas no mesmo dia ($n=3$) em dias diferentes ($n=6$).

$$\text{DPR} = \frac{D_p}{C_{MD}} \times 100$$

onde:

DPR = desvio padrão relativo (%);

D_p = desvio padrão ($\mu\text{g L}^{-1}$);

C_{MD} = concentração média determinada ($\mu\text{g L}^{-1}$);

As recuperações foram em torno de 85% com RSD menores que 12%. É recomendado para validação de métodos que os valores estejam entre 70-120% de recuperação com RSD menores que 20% (INMETRO, 2020).

Tabela 2 - Valores da exatidão (Rec) e precisão intermediária (RSD) do método.

Dia 1				Dia 2			
18,9 mg kg ⁻¹		37,8 mg kg ⁻¹		18,9 mg kg ⁻¹		37,8 mg kg ⁻¹	
Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)	Rec (%)	RSD (%)
84,8	4	87,2	12,4	84,9	8,21	88,9	1,2

Para determinação do limite de quantificação do método (LQ) foi testado o menor nível de concentração com Rec % entre 70-120 e RSD % menor que 20. Assim o LQ foi definido como 0,189 mg kg⁻¹.

3.9.4 Condições cromatográficas

A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna analítica Athena com C₁₈ (50 mm x 2,1 mm d.i x 3,0 μm). A temperatura do forno da coluna foi estabilizada em 30 °C e a fase móvel foi composta por uma mistura binária de água ultrapura (A) e metanol (B), ambos com ácido fórmico grau HPLC 0,1% e formiato de amônia 5 mmol L⁻¹. O modo de eluição da fase móvel foi isocrático numa proporção 70:30 (metanol:água ultrapura) a uma vazão de 0,2 mL min⁻¹, volume de injeção de 10 μL . O tempo de retenção da atrazina foi de 2,4 minutos. Tempo total da corrida 3,8 minutos. Razão massa carga (m/z) de 216 no modo de ionização positiva.

3.10 DISSIPACÃO DE ATRAZINA EM MEIO LÍQUIDO, USANDO SOLO DOS MICROCOSMOS

O teste de degradação em meio líquido foi realizado a partir da metodologia descrita por Wang et al. (2016). Após os 67 dias de incubação, o solo dos microcosmos foi coletado, e

amostras compostas (10 g), em triplicata, foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer, contendo 100 mL de solução mineral (em mmol L⁻¹: K₂PO₄, 7,01; KH₂PO₄, 2,94; MgSO₄, 0,81; CaCl₂, 0,18; NaCl, 1,71) e 5 mg L⁻¹ de atrazina (adicionada na forma de produto comercial). Os frascos foram incubados a 30 °C, com agitação orbital (180 rpm).

Após 0, 3 e 7 dias de incubação, procedeu-se à coleta das culturas líquidas, transferindo o meio para tubos do tipo Falcon e, em seguida, realizou-se a centrifugação (5000 rpm; 5 min). Os sobrenadantes foram retirados com o auxílio de uma seringa de plástico e, após filtração (0,22 µm), os filtrados foram injetados no sistema cromatográfico.

A dissipação da atrazina foi calculada como porcentagem da concentração inicial do herbicida (tempo 0). Ressalta-se que, além da atrazina adicionada (5 mg L⁻¹), os solos dos tratamentos T2 e T3 também possuíam a atrazina residual dos experimentos em microcosmos.

3.11 DESTINO DOS RESÍDUOS GERADOS

Todos os resíduos gerados ao longo deste trabalho foram acondicionados em recipientes fechados, devidamente rotulados e mantidos em locais apropriados, até a coleta para o tratamento correto por empresa contratada pela UFFS.

3.12 ANÁLISE DOS DADOS

Os cálculos referentes às fórmulas descritas foram realizados utilizando o *software* Microsoft Excel 2013 (Microsoft, EUA). Os resultados são expressos como médias ± desvio padrão. O teste de Tukey foi empregado para comparações entre médias, considerando nível de significância de 95% ($p < 0.05$), utilizando o *software* SASM-Agri (CANTERI et al., 2001).

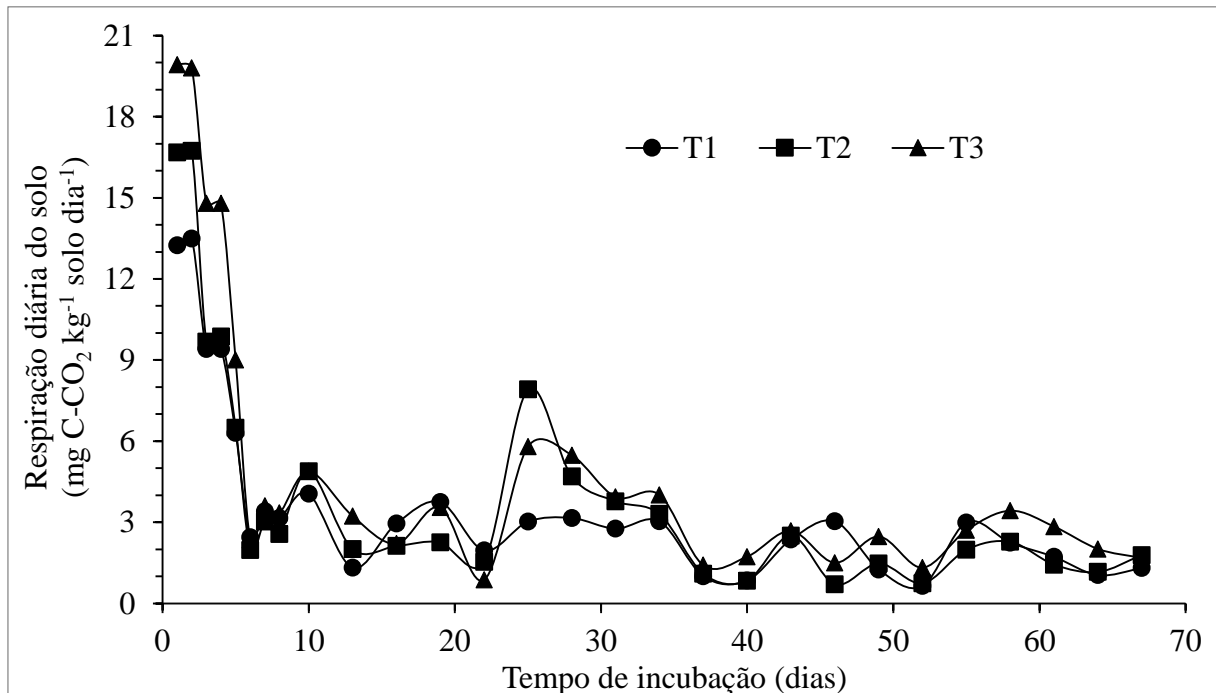
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ATIVIDADE RESPIRATÓRIA

A respiração do solo, mensurada através da liberação de dióxido de carbono, é um dos parâmetros mais empregados para quantificar a atividade microbiana dos solos, e pode ser usado como um indicador de alterações na dinâmica do solo e das comunidades microbianas (DADALTO et al., 2015). No presente estudo, a atividade respiratória foi avaliada como forma de determinar o impacto da contaminação por atrazina na microbiota do solo.

A Figura 2 apresenta os dados referentes à respiração diária do solo ao longo de 67 dias de incubação dos microcosmos referentes aos três tratamentos. Observa-se que a maior taxa de liberação de C-CO₂ ocorreu nos estágios iniciais do experimento (dias 1-4).

Figura 2 – Produção de CO₂ por experimento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.

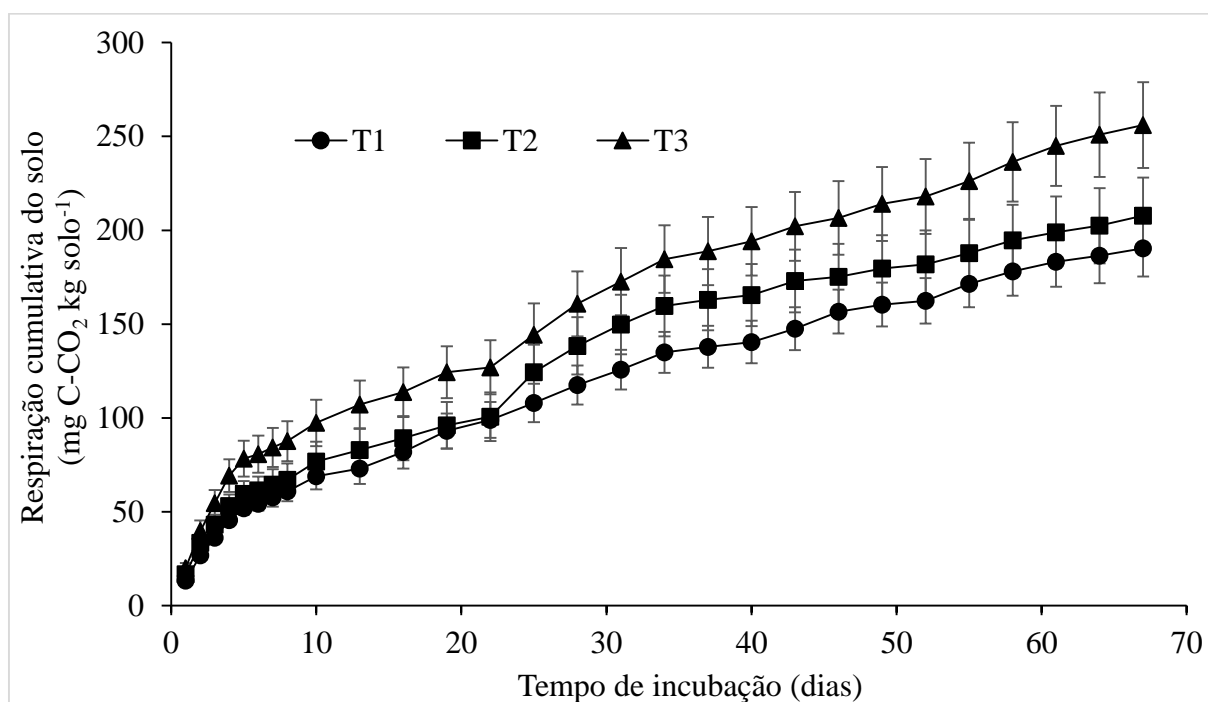


A aplicação de atrazina na dose recomendada (T2) resultou em taxas superiores de respiração ($p < 0,05$) em relação aos controles (T1) nos 2 primeiros dias de incubação; após este período, as taxas foram similares a T1 na maior parte dos pontos avaliados. As taxas respiratórias mais elevadas ocorreram nos tratamentos com cinco vezes a dose recomendada (T3), mensuradas entre os dias 1 e 4, com diferença ($p < 0,05$) em relação ao T1 (Fig. 2).

Nota-se que, ao longo do tempo de incubação, os resultados de evolução diária de CO₂ em todos os tratamentos tenderam à estabilização, com valores similares entre controles e tratamentos com atrazina, indicando menor atividade microbiana em relação aos tempos iniciais de incubação. Picos de atividade respiratória ocorreram em T2 e T3 aos 25 e 28 dias de incubação, o que não foi observado em T1 (Fig. 2).

A Figura 3 ilustra a respiração cumulativa do solo durante o período de incubação. Não houve diferenças ($p > 0,05$) entre T1 e T2 neste parâmetro. Contudo, o total acumulado de C-CO₂ no T3 foi superior ($p < 0,05$) quando comparado com aqueles de T1 e T2 (Fig. 3). Especificamente, 190,32 mg C-CO₂ kg solo⁻¹ foram liberados a partir de T1, 205,62 mg C-CO₂ kg solo⁻¹ a partir de T2, e 253,40 mg C-CO₂ kg solo⁻¹ a partir de T3 ao final do experimento.

Figura 3 - Produção cumulativa de C-CO₂ por experimento respirométrico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.



Em estudo anterior, a aplicação de atrazina (1 mg kg⁻¹) a solo com histórico de uso deste herbicida, não afetou a respiração cumulativa do solo (AGUILERA et al., 2009). Ngigi et al. (2013) observaram que a liberação cumulativa de CO₂ (período de 60 dias) não foi alterada pela adição de atrazina (25 mg kg⁻¹). Contudo, Bastos e Magan (2009) observaram que em solo contaminado com atrazina (0,5 mg kg⁻¹) houve maior taxa de respiração do que o solo sem contaminação.

Em avaliação, realizada por CHEN et al., 2014, utilizando atrazina nas doses de 2 e 10 mg kg⁻¹, a respiração do solo foi superior em relação aos solos não contaminados (CHEN et al., 2014). Incrementos na liberação acumulada de C-CO₂ foram observados após 64 dias de incubação de solos expostos à atrazina (5 mg kg⁻¹) (MAHÍA et al., 2008). A respiração cumulativa do solo também foi superior em tratamentos com a aplicação de atrazina (1, 2 e 3 mg kg⁻¹), em relação ao solo controle (BRICEÑO et al., 2010). Estes autores reportaram, de modo similar ao presente estudo, que a atrazina resultou em efeito temporário sobre a respiração do solo.

Radivojević et al. (2008) observaram que a atrazina (8 e 40 mg kg⁻¹) resultou em tendência de maiores taxas de respiração do solo, avaliadas durante 30 dias, quando comparadas àquelas dos solos controle; contudo, aos 60 dias de incubação, os tratamentos com atrazina tenderam a diminuir a respiração do solo, ressaltando que tais efeitos foram transitórios. Efeitos transientes da atrazina (20 mg kg⁻¹) foram observados por Accinelli et al. (2002); contudo, não houve efeito quando da aplicação de atrazina em dose inferior (2 mg kg⁻¹), concluindo que este herbicida não provoca efeitos negativos sobre a atividade microbiana.

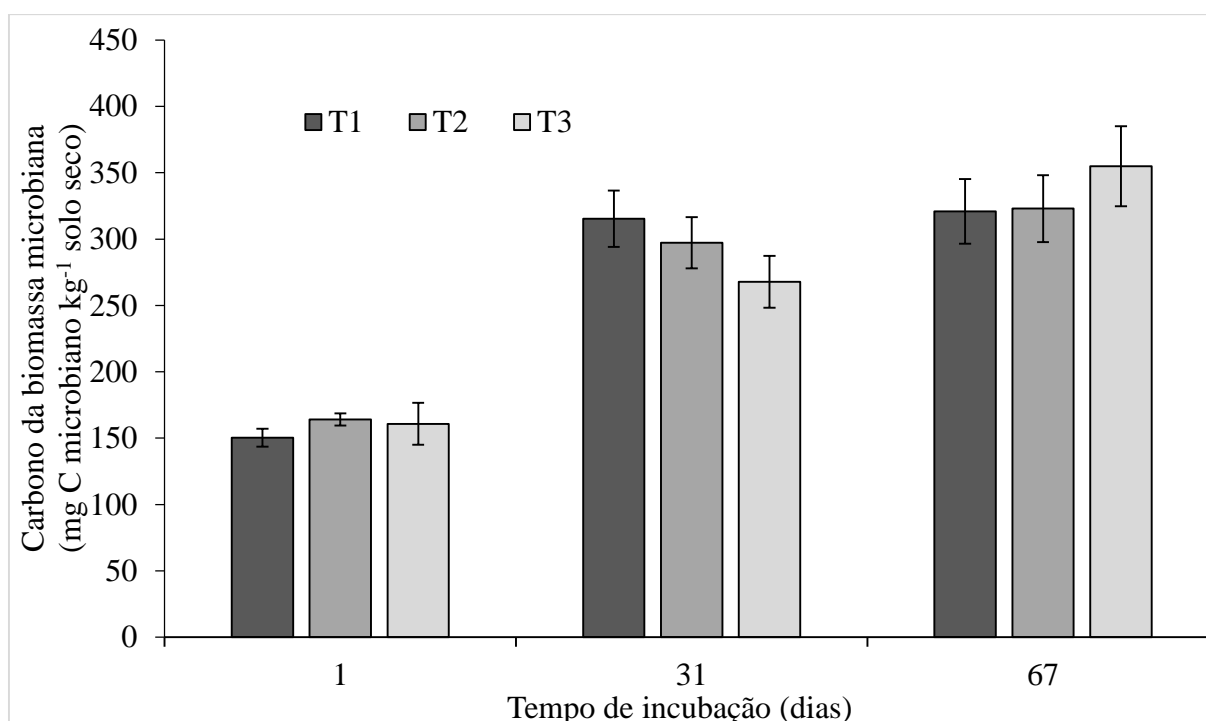
Uma maior respiração, indicando atividade microbiana mais intensa, pode sugerir que microrganismos foram capazes de utilizar a atrazina como substrato para suas necessidades fisiológicas e metabólicas (MORENO et al., 2007). A adição de herbicidas como a atrazina pode também estimular a mineralização da matéria orgânica nativa do solo (HANEY et al., 2002; MAHÍA et al., 2008). No entanto, elevações na respiração do solo podem resultar da potencial toxicidade da atrazina aos microrganismos. Por este mecanismo, a microbiota não suscetível aos efeitos tóxicos poderia atuar na mineralização da biomassa microbiana morta pelo efeito direto do herbicida (BONFLEUR et al., 2015).

4.2 CARBONO DA BIOMASSA MICROBIANA (CBM)

A Figura 4 apresenta os resultados referentes ao carbono da biomassa microbiana (CBM), avaliados após 1, 31 e 67 dias de incubação dos microcosmos. A biomassa microbiana é responsável pelas transformações bioquímicas que ocorrem nos solos, atuando diretamente na ciclagem de nutrientes e regulação das transformações da matéria orgânica, sendo utilizada como indicadora da qualidade dos solos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Além disso, é usualmente sensível a perturbações no solo e, por isso, empregada na detecção de potenciais distúrbios provocados pela aplicação de compostos químicos, como os herbicidas (PERTILE et al., 2020).

Inicialmente (dia 1), a biomassa microbiana se mostrou semelhante ($p > 0,05$), independente do tratamento. Após 31 dias de incubação, em todos os tratamentos ocorreu incremento do CBM. Nesta avaliação, T1 e T2 apresentaram-se similares, enquanto que no T3 houve diferença, com redução em relação ao T1. Ao final dos 67 dias de incubação, o CBM em T1 e T2 permaneceu constante em relação à mensuração realizada aos 31 dias. Em contrapartida, houve acréscimo acentuado do CBM em T3 (Fig. 4). Embora com valores médios maiores, o CBM em T3 após 67 dias foi similar ($p > 0,05$) em relação a T1 e T2.

Figura 4 - Carbono da biomassa microbiana nos três tratamentos, avaliado no 1º, 31º e 67º dia de incubação.



Um dia após a aplicação, Radivojević et al. (2008) não observaram efeito da atrazina (8 e 40 mg kg⁻¹) sobre o CBM do solo, com tendência de efeitos positivos sobre este parâmetro durante maiores tempos de incubação. Considerando a potencial toxicidade da atrazina, decréscimos no CBM seriam esperados imediatamente após a aplicação do herbicida. Incrementos posteriores no CBM poderiam resultar da adaptação dos microrganismos à presença da atrazina (RADIVOJEVIĆ et al., 2008).

Gao et al. (2018) não observaram efeito da atrazina (10 mg kg⁻¹) sobre o CBM. Avaliação do CBM aos 62 dias após aplicação de atrazina (25 mg kg⁻¹) também resultou em

valores similares aos controles (NGIGI et al., 2013). Ausência de efeito sobre o CBM foi reportado em solos com a aplicação de atrazina de até 200 mg kg⁻¹ (ACCINELLI et al., 2002).

Sam et al. (2017) demonstraram efeitos positivos da atrazina sobre o CBM, sugerindo que a atrazina foi utilizada como fonte de carbono e nitrogênio por parte da microbiota do solo. Contudo, em investigação de parâmetros microbianos após a aplicação de atrazina ao solo (2,25 mg kg⁻¹), Bonfleur et al. (2015) detectaram decréscimo significativo do CBM, avaliado aos 21 e 62 dias, indicando efeitos nocivos sobre a comunidade microbiana e a ineficiência na adaptação metabólica à presença do contaminante.

A aplicação de atrazina (10-40 mg kg⁻¹) resultou em ampla variação no CBM durante 95 dias de incubação, sendo que os valores foram usualmente maiores do que aqueles detectados no solo controle (WANG et al., 2015). Considerando a ampla variação (de até 196% em relação ao solo controle), estes autores indicaram que a atrazina causou severos danos à estabilidade da biomassa microbiana do solo.

Efeitos positivos ou negativos da atrazina (5 mg kg⁻¹) foram observados sobre o CBM (MAHÍA et al., 2008). Segundo estes autores, o fato de os valores mensurados estarem na mesma ordem de magnitude em relação aos solos não contaminados indica que a biomassa microbiana não foi modificada de modo substancial pela atrazina.

Mesmo que o CBM indique a ausência de efeito da atrazina (T2), ou a gradual recuperação da biomassa microbiana (T3), o herbicida pode ter atuado de forma distinta sobre grupos microbianos. Enquanto que alguns grupos podem ter sofrido com efeitos tóxicos, outros representantes da microbiota capazes de utilizar a atrazina podem ter sido selecionados e estimulados à multiplicação. Logo, embora o CBM seja um indicador sensível das condições do solo, apresenta limitações visto que não permite avaliar variações na estrutura da comunidade microbiana (MARTIN-LAURENT et al., 2003; MORENO et al., 2007).

4.3 QUOCIENTE METABÓLICO

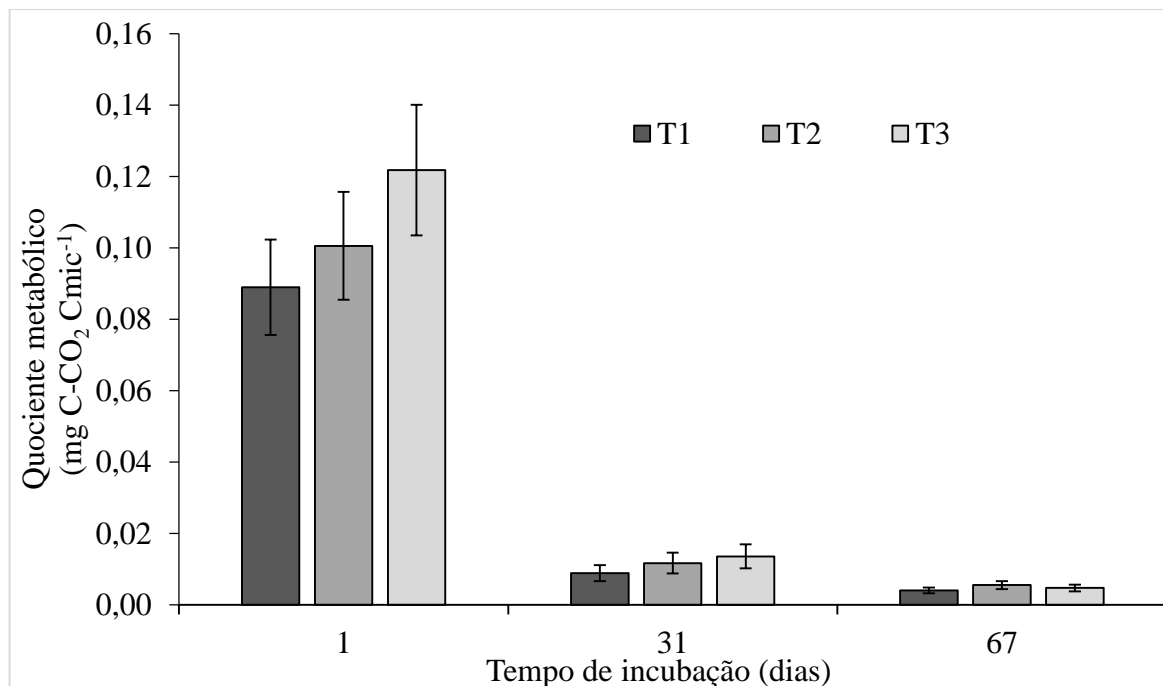
A razão entre a respiração do solo e o CBM, conhecida como qCO₂, reflete o estado fisiológico da microbiota e vem sendo usado como indicador do estresse da comunidade microbiana, inclusive visando representar a magnitude da resposta frente a pesticidas. Por esta avaliação, valores mais elevados de qCO₂ indicam maior estresse da microbiota frente a distúrbios (ISLAM; WEIL, 2000; MAHÍA et al., 2008).

A Figura 5 apresenta os valores do qCO₂ nos três tratamentos, avaliados durante a incubação dos microcosmos (dias 1, 31 e 67). Os tratamentos, T1, T2 e T3 apresentaram

inicialmente (dia 1) valores mais elevados de quociente metabólico, sendo o T3 superior ($p < 0,05$) em relação aos controles (T1); no entanto T2 e T1 apresentaram qCO_2 similares entre si.

Em contrapartida, os valores de qCO_2 decresceram evidentemente aos 31 dias de incubação, com valores similares entre solos com e sem contaminação. Ausência de diferenças entre T1 e tratamentos com atrazina também foi evidenciada ao final da incubação (Fig. 5).

Figura 5 - Quociente metabólico nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.



Efeitos variados da atrazina foram detectados por Mahía et al., 2008, dependendo do solo e, para um mesmo solo, do tempo de avaliação (MAHÍA et al., 2008). Para Moreno et al., 2007, doses de atrazina de até 50 mg kg⁻¹, os valores de qCO_2 foram similares ao solo sem contaminação. Tanto no solo controle quanto nos solos contaminados, os maiores valores de qCO_2 foram observados no início dos experimentos, diminuindo subsequentemente até 45 dias de incubação (MORENO et al., 2007). Já Sam et al. (2017) reportaram menores valores de qCO_2 em solo com aplicação de atrazina do que no solo controle. Por outro lado, a atrazina (2,25 mg kg⁻¹) resultou em maiores valores de qCO_2 , avaliados 21 e 63 dias após aplicação (BONFLEUR et al., 2015).

O maior qCO_2 , identificado especialmente no T3 logo após a contaminação, sugere efeito negativo inicial sobre a microbiota. Nesta situação, os microrganismos necessitam utilizar maior parte de seus recursos energéticos para sobrevivência e manutenção em resposta

ao possível estresse causado pela atrazina, do que para a síntese de biomassa (MORENO et al., 2007; BONFLEUR et al., 2015).

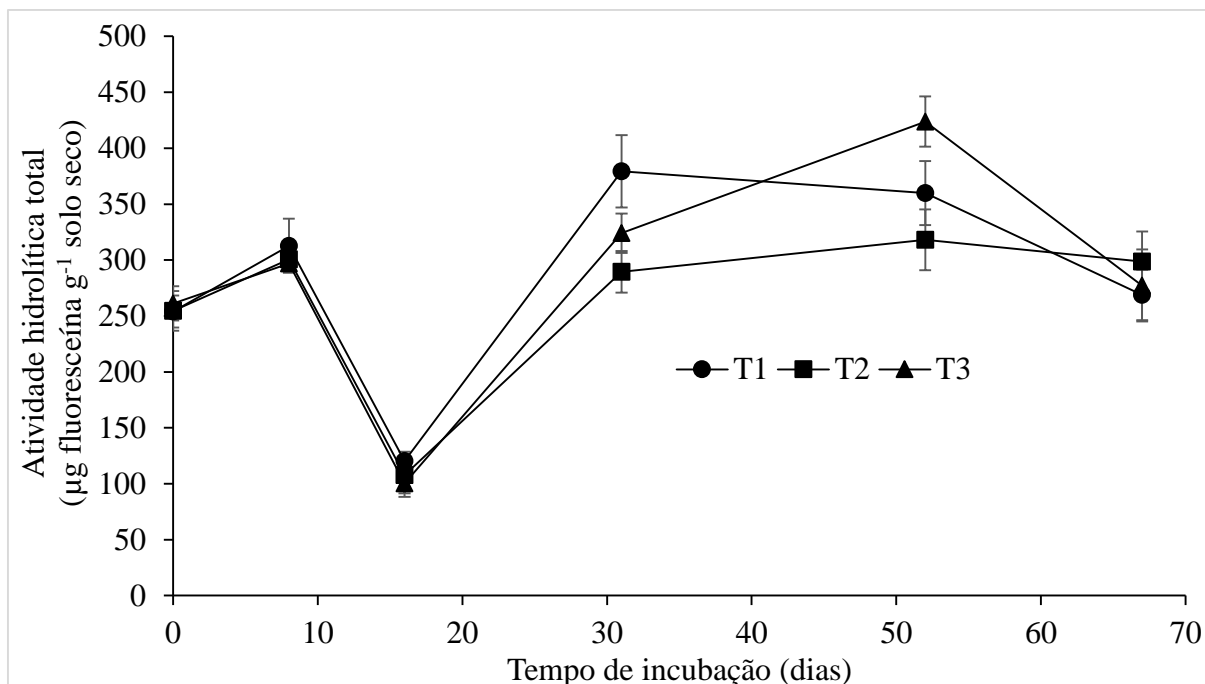
A diminuição do qCO_2 para valores similares ao controle, sugere a ausência de efeito significativo da atrazina, indicando a adaptação dos microrganismos às condições do meio (PERTILE et al., 2020), que pode estar relacionada à maior eficiência na utilização de substratos, incluindo a atrazina (MAHÍA et al., 2008; SAM et al., 2017).

4.4 ATIVIDADE HIDROLÍTICA MICROBIANA DO SOLO

A Figura 6 apresenta os resultados referentes à hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA), comumente empregada como um indicador da atividade hidrolítica total da microbiota dos solos. O FDA é hidrolisado por diversas enzimas extracelulares, como esterases, lipases e proteases (ADAM; DUNCAN, 2001), sendo usado no monitoramento da qualidade biológica do solo (OLIVEIRA, 2014).

Foi possível observar que a atividade hidrolítica total do solo se manteve no mesmo nível em todos os tratamentos entre os dias 0 e 16. O solo controle (T1) apresentou maior atividade hidrolítica mensurada no dia 31, quando comparado aos tratamentos com herbicida ($p < 0,05$). Contudo, após 52 dias de incubação, o tratamento com maior concentração do herbicida (T3) apresentou a maior atividade hidrolítica ($p < 0,05$). Ao final dos experimentos, a atividade hidrolítica apresentou-se similar entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Fig. 6).

Figura 6 - Atividade hidrolítica total do solo nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.



Similarmente ao presente estudo, efeitos transientes da atrazina (2 e 20 mg kg^{-1}) foram reportados sobre a atividade hidrolítica do solo (ZELLES et al., 1985). Aguilera et al. (2009) também observaram variações na hidrólise de FDA durante a incubação de solos com ou sem contaminação por atrazina (1 mg kg^{-1}); contudo, na comparação entre presença e ausência do herbicida, não foram observadas diferenças significativas (AGUILERA et al., 2009).

Floch et al. (2011) observaram efeitos significativos da atrazina (100 mg kg^{-1}) e outros pesticidas sobre a atividade hidrolítica do solo; no entanto, pelas flutuações observadas em relação ao solo controle, não foi possível estabelecer relação entre os pesticidas e a atividade hidrolítica, possivelmente pela ampla gama de enzimas capazes de hidrolisar o FDA.

4.5 ATIVIDADE DE DESIDROGENASE

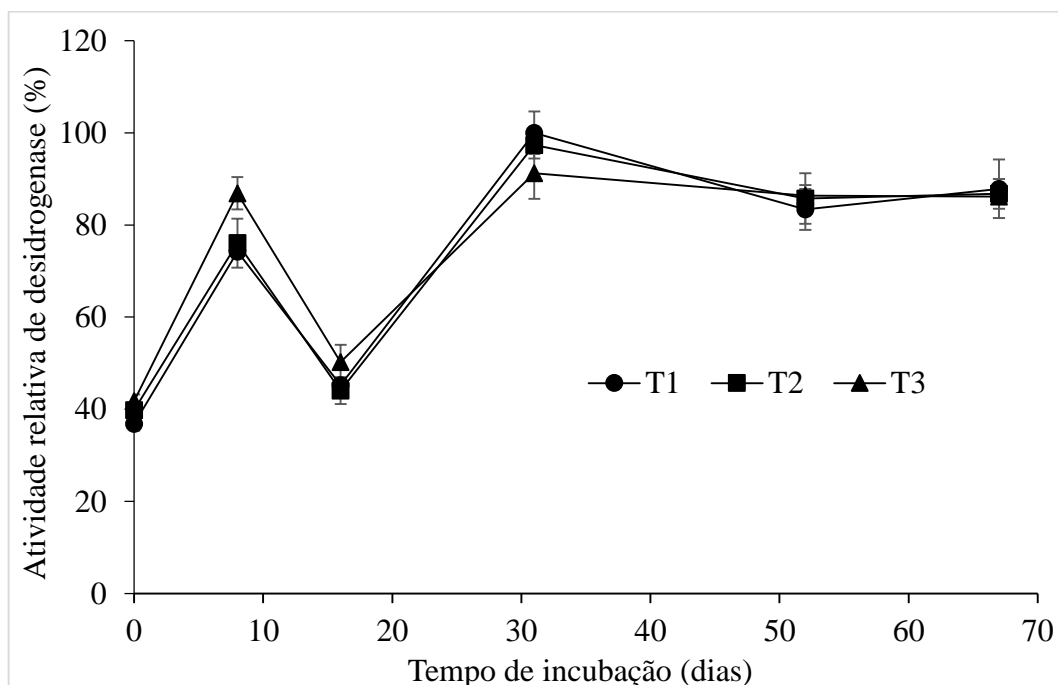
A atividade de desidrogenase reflete a atividade oxidativa total da microbiota do solo. Estas enzimas, presentes em microrganismos ativos, são intracelulares e atuam na oxidação de compostos orgânicos (MORENO et al., 2007). A mensuração desta atividade é considerada como um parâmetro sensível para a avaliação da toxicidade em solos (HUANG et al, 2009).

A atividade da desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação é apresentada na Figura 7. No tempo zero, a atividade de desidrogenase foi similar entre tratamentos. Diferenças entre T1 e T2 não foram significativas ao longo de 67 dias. Avaliações realizadas no 7º dias de incubação revelaram elevação da atividade em T3. A partir do 16º dia, não houve diferenças entre os tratamentos ($p > 0,05$) (Fig. 7).

Huang et al. (2009), em experimentos de oito semanas, utilizando solo sem aplicação e com aplicação de atrazina (5 e 50 mg kg⁻¹), reportaram tendência de decréscimo da atividade de desidrogenase no solo tratado em relação ao controle sem atrazina. Tortella et al. (2013), em estudo com biomistura (turfa:solo:palha; 1:1:2), considerada como uma estratégia de degradação de agrotóxicos, observaram que a atividade de desidrogenase foi menor com a aplicação de atrazina (40 mg kg⁻¹) do que na biomistura sem atrazina. Radivojevic et al. (2008) reportaram que a aplicação de atrazina ao solo (8 e 40 mg kg⁻¹) diminuiu a atividade de desidrogenase durante 30 dias de incubação; contudo, a atividade mensurada foi similar àquela dos controles após 60 dias.

Moorman et al. (2001) indicaram não haver efeito significativo da atrazina (200 mg kg⁻¹) sobre a atividade de desidrogenase do solo. Accinelli et al. (2002) observaram que os efeitos da atrazina sobre a atividade de desidrogenase do solo dependeram da dose aplicada. Ausência de efeito foi detectada na menor dose (2 mg kg⁻¹), estimulação na dose intermediária (20 mg kg⁻¹), e depressão da atividade na maior concentração (200 mg kg⁻¹).

Figura 7 - Atividade relativa de desidrogenase nos três tratamentos ao longo de 67 dias de incubação.



A ausência de efeito, ou estimulação da atividade de desidrogenase do solo devido à aplicação de atrazina (0,2-1000 mg kg⁻¹), indicou que este parâmetro foi sensível em resposta à aplicação de atrazina no estudo de Moreno et al. (2007). No entanto, a falta de efeito

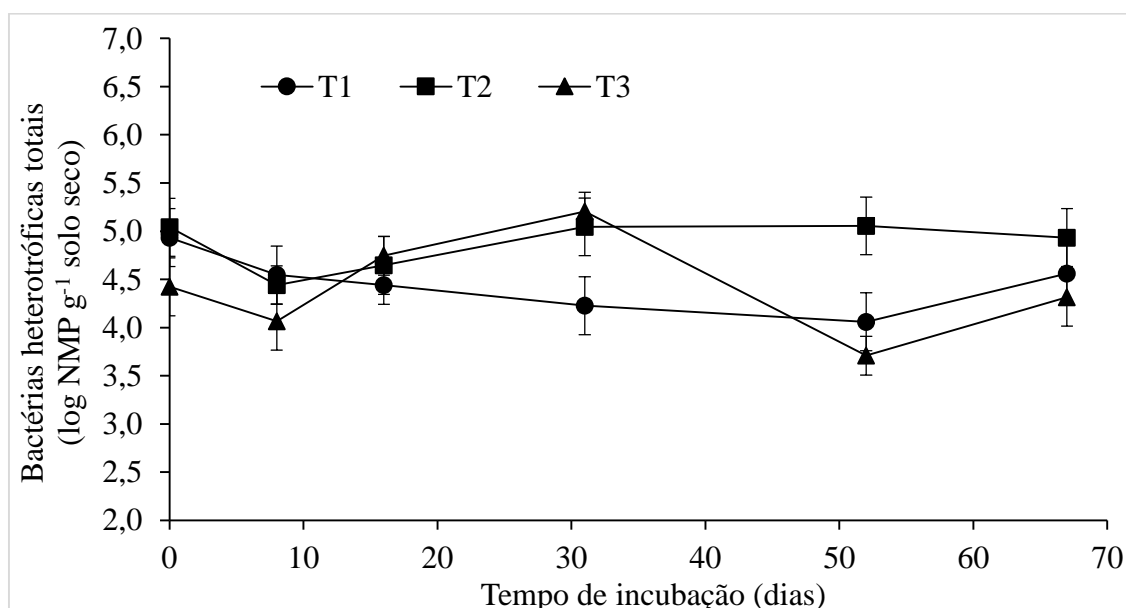
consistente da atrazina sobre a atividade de desidrogenase indica a dificuldade de estabelecer uma relação de causa e efeito entre contaminantes orgânicos e atividades enzimáticas (HUANG et al, 2009). No presente estudo (Fig. 7), a aplicação de atrazina nas doses testadas não afetou negativamente, de forma aparente, a vitalidade da microbiota do solo.

4.6 ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS HETEROTRÓFICAS TOTAIS

A técnica do NMP foi utilizada para estimar o tamanho das populações bacterianas cultiváveis, visando monitorar seu crescimento ou redução em resposta à aplicação de atrazina. A Figura 8 demonstra os resultados da contagem de bactérias heterotróficas totais nos três tratamentos ao longo dos 67 dias de incubação.

Logo após a contaminação (tempo “zero”), a contagem em T3 foi inferior a T1 e T2. Esta tendência foi mantida na avaliação realizada aos sete dias de incubação, mas aos 16 dias não foram detectadas diferenças entre os tratamentos. Subsequentemente, diferença significativa foi observada na contagem realizada aos 31 dias de incubação, sendo que os valores nos tratamentos com atrazina foram superiores àqueles em T1. Aos 52 dias, tal diferença foi mantida apenas para T2, sendo que T1 e T3 apresentaram contagens similares. Finalmente, ao final do experimento (67 dias), as contagens foram similares entre tratamentos, com tendência de valores superiores para T2 (Fig. 8).

Figura 8 - Contagem de bactérias heterotróficas totais nos três tratamentos, ao longo de 67 dias de incubação.



Contagens bacterianas inferiores ao solo controle foram reportadas após a aplicação de atrazina na dose recomendada, em avaliações realizadas por até oito semanas (STANLEY et al., 2013). Resultados similares foram encontrados em outras investigações (AYANSINA; OSO, 2006; SEBIOMO et al., 2011). Gao et al. (2018) demonstraram que a atrazina (10 mg kg⁻¹) não afetou contagens bacterianas até os 28 dias de incubação; entretanto, contagens inferiores ao solo controle foram detectadas entre os dias 42 e 70.

A aplicação de atrazina (200 mg kg⁻¹) resultou em aumento das contagens de bactérias aos 63 dias de incubação, mas tal efeito não foi observado após 189 dias (MOORMAN et al., 2001). Em estudo de longa duração (5 anos), a aplicação de atrazina em doses recomendadas elevou as contagens de bactérias no solo avaliado (OLADELE; AYODELE, 2017). Ros et al. (2006) indicaram que a atrazina, em doses de 1 e 10 mg kg⁻¹, não afetou as contagens bacterianas dos solos em experimentos realizados por 45 dias; contudo, doses maiores (100 e 1000 mg kg⁻¹) causaram incrementos nas contagens.

O comportamento das contagens realizadas aos 0 e 7 dias de incubação (Fig. 8) sugere que, na maior concentração testada (T3), a atrazina apresentou efeito inibitório sobre bactérias do solo (GAO et al., 2018). O aumento das contagens aos 31 dias (T2 e T3) indica a potencial utilização da atrazina como fonte nutricional pelos microrganismos (ROS et al., 2006). Em T3, a queda nas contagens realizadas nos dias 52-67, quando comparadas àquela realizada no dia 31 (Fig. 8), pode indicar a suscetibilidade das bactérias cultiváveis ao acúmulo de metabólitos potencialmente tóxicos (GAO et al., 2018).

É necessário ressaltar que, por esta técnica de avaliação, o comportamento observado (Fig. 8) se refere somente à contagem de bactérias cultiváveis. Isso implica na impossibilidade de inferir sobre efeitos sobre bactérias não cultiváveis e, do mesmo modo que para o carbono da biomassa microbiana (Fig. 4), não explicita efeitos sobre o comportamento de grupos microbianos específicos. Por exemplo, o incremento das contagens em T2 indica efeito positivo da atrazina (Fig. 8). No entanto, mesmo nestes casos, a estrutura da comunidade microbiana dos solos, sua funcionalidade e diversidade, podem ser reduzidas (ROS et al., 2006; GAO et al., 2018; HUANG et al., 2020).

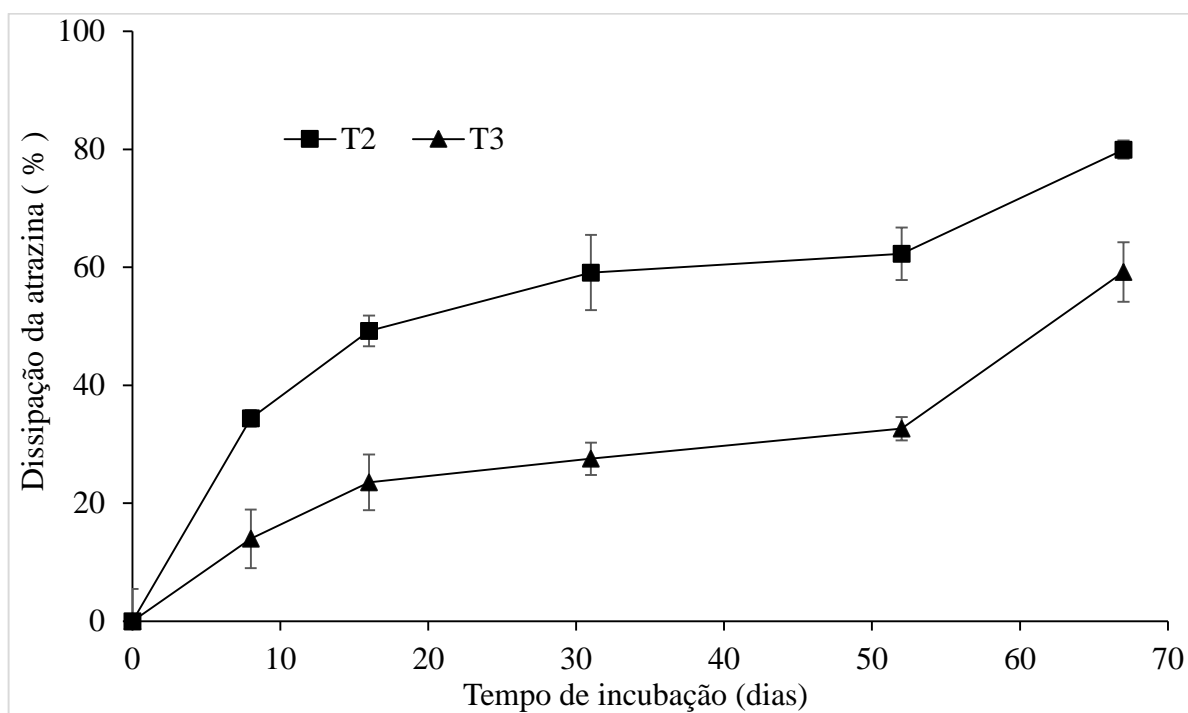
4.7 DISSIPACÃO DA ATRAZINA

Nos diferentes tratamentos, a atrazina residual foi extraída das amostras de solo durante a incubação dos microcosmos. O método foi padronizado em todas as extrações, na tentativa

de minimizar e/ou uniformizar possíveis perdas durante o processo. Os dados referentes à degradação são apresentados na forma de percentuais ao longo do tempo. A massa extraída no tempo zero foi considerada como 100% do contaminante, a partir do qual as extrações posteriores foram calculadas.

O percentual de herbicida extraído do solo de cada tratamento foi sempre inferior em cada amostragem sucessiva, indicando sua dissipação, conforme apresentado na Figura 9. O maior percentual de redução de massa foi verificado no tratamento com menor concentração de atrazina (T2), onde ocorreu uma dissipação de 49% após 18 dias e de 80% ao final dos experimentos. No tratamento com maior concentração de atrazina (T3), a dissipação atingiu 23% após 18 dias e 59% após 67 dias.

Figura 9 - Dissipação da atrazina (%) extraída dos dois tratamentos contaminados, ao longo de 67 dias de incubação.



Nos solos, a atrazina apresenta longos tempos de meia-vida (41-231 dias) (SINGH et al., 2018). O tempo de meia-vida reportado para a atrazina (1 mg kg^{-1}), em solos nunca expostos a este herbicida, foi de cerca de 32-36 dias (KRUTZ et al., 2008). A partir de gráficos semilogarítmicos da porcentagem de atrazina residual *versus* tempo de incubação (não mostrados), o tempo de meia-vida da atrazina em T2 foi de 35 dias ($R^2 = 0,90$) e em T3 de 64 dias ($R^2 = 0,86$).

Em solo contaminado com atrazina (1 mg kg^{-1}), a dissipação foi de 40% após 21 dias (MERINI et al., 2009). No estudo de Briceño et al. (2010), a dissipação de atrazina atingiu 20% após 10 dias, 80% após 60 dias, e a atrazina não foi detectada aos 80 dias de incubação, independentemente da dose (1 e 2 mg kg^{-1}). Já para Wang et al. (2015), a aplicação de atrazina ao solo ($10\text{-}40 \text{ mg kg}^{-1}$) resultou em dissipações inferiores a 15% após 95 dias.

Contudo, outros estudos indicam taxas de dissipação mais rápidas. Após a aplicação de atrazina (5 mg kg^{-1}), a dissipação aos 28 dias foi de 20%, alcançando 91% aos 56 dias (HUANG et al., 2020). Em avaliação realizada por 28 dias, a dissipação da atrazina (10 mg kg^{-1}) atingiu ~57% (LIN et al., 2018), similarmente ao reportado por Gao et al. (2018). Estes últimos autores indicaram 82% de dissipação após 56 dias. Para Aguilera et al. (2009), a dissipação do herbicida (1 mg kg^{-1}) foi > 95%, conforme avaliado 30 dias após a aplicação.

Embora inferior em porcentagem, a Fig. 9 indica que, em valores absolutos, a dissipação da atrazina em T3 foi superior àquela em T2, como também reportado por Moreno et al. (2007) e Gan et al. (1996). Na dose de 2 mg kg^{-1} , a dissipação da atrazina em solo com histórico de aplicação deste herbicida foi inferior (~83%), quando comparada aos ~94% de dissipação da atrazina aplicada na dose de 10 mg kg^{-1} , após 28 dias (CHEN et al., 2014). Segundo Moreno et al. (2007), maiores doses iniciais de atrazina podem influenciar a taxa de biodegradação por microrganismos capazes de utilizar o herbicida como fontes de carbono e nitrogênio.

A partir destes resultados (Fig. 9), a participação microbiana na dissipação da atrazina não é possível de ser afirmada com completa certeza. No entanto, os microrganismos usualmente desempenham papel essencial neste processo, embora a dissipação da atrazina também ocorra de forma abiótica (LIN et al., 2018; HUANG et al., 2020). Destaca-se, também, que potenciais metabólitos originados da dissipação da atrazina, como deetilatraxina (DEA), deisopropilatraxina (DIA) e hidroxiatraxina (HA) (BRICEÑO et al., 2010) não foram possíveis de serem mensurados. Ainda, a atrazina residual determinada foi aquela extraível do solo; contudo, a atrazina e/ou seus metabólitos podem associar-se à fração sólida do solo, permanecendo como moléculas não-extraíveis (BONFLEUR et al., 2015).

Destaca-se que, também em valores absolutos, a quantidade remanescente de atrazina foi superior em T3 do que em T2 (Fig. 9). Na perspectiva ambiental, tal persistência é motivo de preocupações, tanto relacionadas à contaminação e sustentabilidade dos solos, mas também à potencial contaminação das águas (WANG et al., 2015; SINGH et al., 2018). O solo empregado na presente investigação não apresentava histórico de aplicações prévias de atrazina. Contudo, taxas de dissipação mais elevadas são normalmente relatadas em solos com sucessivas aplicações deste herbicida, devido à adaptação da microbiota dos solos à utilização da atrazina,

o que pode ser ambientalmente benéfico, mas causar impacto negativo na perspectiva agrônômica de controle de plantas daninhas (LEAL et al., 2019).

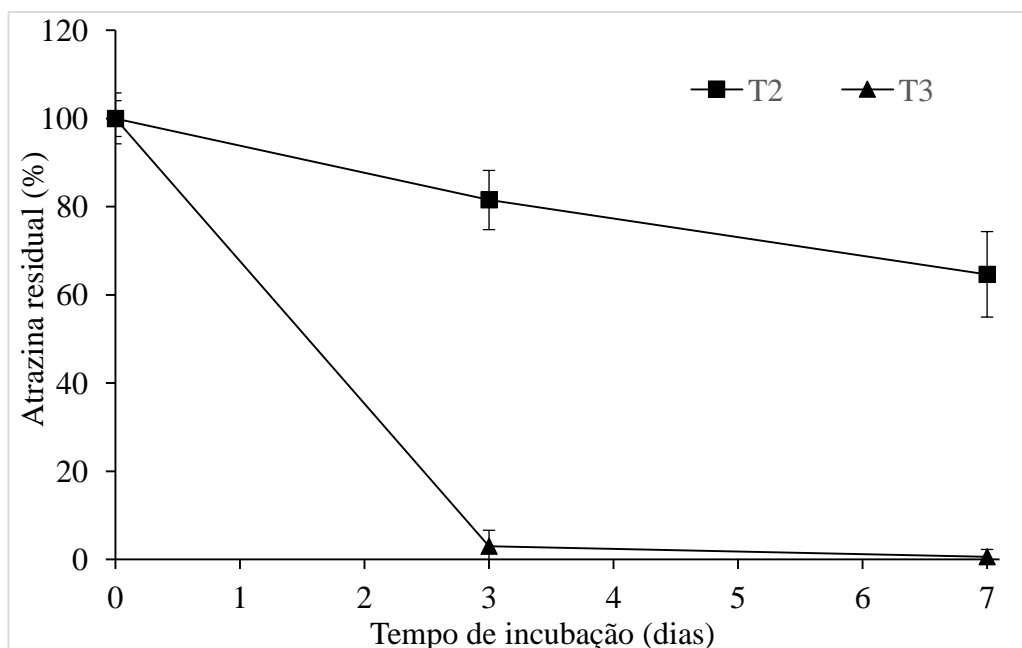
Ao avaliar solo sem histórico de contaminação por atrazina, Sagarkar et al. (2013) demonstraram que a atenuação natural (intrínseca) foi mais lenta do que em solos com histórico de contaminação. No caso de solos sem este histórico, onde se enquadra a presente investigação, a atenuação intrínseca é usualmente lenta e pouco eficiente (LIN et al., 2018). Embora a atenuação natural possa ser empregada como estratégia de biorremediação em solos com histórico de contaminação, tal abordagem depende de avaliações acerca da microbiota efetivamente capaz de degradar a atrazina (SAGARKAR et al., 2013).

Ademais, estratégias de bioestimulação e bioaumentação parecem ser mais apropriadas para a descontaminação de solos (com ou sem histórico de aplicações), visto que costumam acelerar as taxas de degradação da atrazina (SAGARKAR et al., 2013, 2014). Contudo, diferentes abordagens de bioestimulação/bioaumentação dependem de avaliações prévias. Por exemplo, Huang et al. (2020), realizaram estudo comparativo de biorremediação de atrazina no solo usando aditivos orgânicos (bioestimulação) e não usando (atenuação natural). Estes autores avaliaram que a atenuação natural apresentou os melhores resultados de degradação de atrazina, justificado pela atuação da atrazina como principal nutriente para a microbiota. No caso da adição de compostos orgânicos, estes podem ter atuado tanto na adsorção da atrazina, tornando-a menos acessível aos microrganismos, quanto como fontes preferenciais de nutrientes à microbiota, o que retardou a degradação do herbicida.

4.8 DISSIPACÃO DA ATRAZINA EM MEIO LÍQUIDO, USANDO O SOLO REMANESCENTE DOS MICROCOSMOS

O solo remanescente dos microcosmos (T2 e T3; 67 dias) foi utilizado neste ensaio. A atrazina, como produto formulado comercial, foi adicionada (5 mg L^{-1}) a estes solos em meio mineral. O herbicida residual foi então extraído dos meios de cultivo líquidos aos 0, 3 e 7 dias de incubação. Os resultados referentes à dissipação são apresentados na forma de percentuais, referentes ao tempo “zero” (100%), durante as incubações (Fig. 10).

Figura 10 - Atrazina residual (%) extraída durante cultivos em meio líquido (0, 3 e 7 dias) que usaram como inóculos os solos (T2 e T3) ao final dos experimentos em microcosmos.



Nos experimentos realizados com o solo dos microcosmos com dose recomendada do herbicida (T2), o percentual residual de atrazina extraída dos meios líquidos foi de 18% após 3 dias de incubação, atingindo 35% de dissipação após 7 dias. No entanto, as maiores taxas de dissipação foram observadas para os ensaios em meio líquido usando solo de T3, onde somente 3% do conteúdo inicial de atrazina restaram após 3 dias de incubação, com dissipação >99% aos 7 dias (Fig. 10).

Pelo curto período de incubação empregado nestes experimentos, indica-se a participação de processos microbianos na dissipação da atrazina, ou seja, o solo utilizado alberga, possivelmente, microrganismos com potencial para a degradação da atrazina. As taxas mais elevadas de dissipação com o uso do solo T3 sugerem que os microrganismos nestes solos podem estar mais adaptados à contaminação e, com isso, levar a uma atenuação mais rápida do herbicida (DUTTA; SINGH, 2013).

Especificamente, Ngigi et al. (2012) indicaram diferentes atenuações da atrazina em solos distintos, com maiores potenciais de dissipação naqueles solos com histórico de contaminação. Estes autores isolaram bactérias a partir dos solos, sendo que diversos isolados bacterianos demonstraram a capacidade de degradar a atrazina. De fato, a capacidade de diferentes bactérias e consórcios microbianos em degradar a atrazina adquire especial relevância considerando a problemática da contaminação ambiental por este herbicida e, com isso, a necessidade de remediação (DEHGHANI et al., 2013; WANG et al., 2016; GÓNGORA-ECHEVERRÍA et al., 2020).

5 CONCLUSÃO

A atrazina, aplicada ao solo na dose recomendada ou em dose cinco vezes maior, provocou efeitos transitórios (positivos/negativos) sobre os parâmetros microbianos avaliados durante 67 dias de incubação em microcosmos. Maiores desvios, em relação ao solo controle, ocorreram especialmente no solo tratado com dose cinco vezes superior à recomendada.

O caráter transiente dos efeitos da atrazina, demonstrado sobre a biomassa, contagem e atividade dos microrganismos e enzimas do solo, indica que efeitos deletérios da atrazina sobre a microbiota não são esperados no curto prazo. Contudo, impactos sobre a diversidade e estabilidade da comunidade microbiana do solo devem ser avaliados.

No solo investigado, sem histórico de uso de atrazina, os resultados apontam para uma atenuação intrínseca mais efetiva deste herbicida quando aplicado na dose recomendada. Indica-se uma persistência ambiental superior da atrazina na maior dose empregada, fato este que deve ser analisado na perspectiva dos riscos à saúde e qualidade do solo, bem como da potencial contaminação das águas.

A dissipação da atrazina durante a incubação dos microcosmos, somada especialmente à rápida atenuação do herbicida em meio líquido, observada para os solos previamente contaminados, sugere a existência de microrganismos com habilidade de degradar a atrazina. Tal observação revela-se pertinente, pois demonstra que parte da microbiota autóctone foi capaz de adaptar-se à presença do herbicida, participando de processos de descontaminação.

Ao final desta investigação, surgem como perspectivas, especialmente (i) o isolamento de bactérias degradadoras de atrazina a partir do solo; (ii) avaliações dos efeitos de repetidas aplicações de atrazina sobre indicadores microbianos; (iii) determinação de efeitos sobre a diversidade microbiana; e (iv) investigações acerca da atenuação da atrazina utilizando estratégias de bioaugmentação e/ou bioestimulação (in)orgânica.

REFERÊNCIAS

- ACCINELLI, C.; SCREPANTI, C.; DINELLI, G.; VICARI, A. Short-time effects of pure and formulated herbicides on soil microbial activity and biomass. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 82, p. 519-527, 2002.
- 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.
- AENDA – Associação Brasileira de Defensivos Pós-Patente. **Produtos – Cultura a Cultura**. Disponível em: <https://www.aenda.org.br/wp-content/uploads/2020/11/Produto_31out2020.xlsx>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- AGROFIT. Ministério da Agricultura. **Sistema de agrotóxicos fitossanitários**. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 16 nov. 2020.
- AGUILERA, P.; BRICEÑO, G.; CANDIA, M.; MORA, M. L.; DEMANET, R.; PALMA, G. Effect of dairy manure rate and the stabilization time of amended soils on atrazine degradation. **Chemosphere**, v. 77, p. 785-790, 2009.
- ALBUQUERQUE, F. P.; OLIVEIRA, J. L.; MOSCHINI-CARLOS, V.; FRACETO, L. F. An overview of the potential impacts of atrazine in aquatic environments: Perspectives for tailored solutions based on nanotechnology. **Science of the Total Environment**, v. 700, artigo 134868, 2020.
- 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.
- 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.
- ANDRIGHETTI, Marília Scopel. **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**. 2011. 109 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- ANVISA, 2019. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/ptbr#/visualizar/370636#/visualizar/370636#/visualizar/370636#/visualizar/370636#/visualizar/370636#/visualizar/370636#/visualizar/370636>>. Acesso em: 20 out. 2020.
- ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agribusiness and pesticides: impacts on the health of agricultural workers in northeastern Brazil. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15, n. 1, p. 117-129, 2017.
- AYANSINA, A. D. V.; OSO, B. A. Effect of two commonly used herbicides on soil microflora at two different concentrations. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 129-132, 2006.

BASTOS, A. C.; MAGAN, N. *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 389-394, 2009.

BENEVIDES, J. A. J.; MARINHO, G. Degradação de pesticidas por fungos - uma revisão. **Holos**, v. 2, p. 110-129, 2015.

BERTICELLI, Ritielli et al. Compostagem como alternativa de biorremediação de áreas contaminadas. **Revista CIATEC-UPF**, v. 8, n. 1, 2016.

BLANCO, F. M. G.; ALMEIDA, S. D. B.; MATALLO, M. B. Herbicide-soil interactions applied to maize crop under Brazilian conditions (Cap. 3). In: PRICE, A. J.; KELTON, J. A. (Eds.). **Herbicides – Current research and case studies in use**. Rijeka: Intech, 2013. p. 47-73.

BLODGETT, R. **Bacterial Analytical Manual, Appendix 2 Most Probable Number from Serial Dilutions**. Food and Drug Administration (FDA), 2010. Disponível em: <<https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-appendix-2-most-probable-number-serial-dilutions>>. Acesso em: 10 ago. 2020.

BOFFETTA, P.; ADAMI, H.-O.; BERRY, C.; MANDEL, J. S. Atrazine and cancer: a review of the epidemiologic evidence. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 22, p. 169-180, 2013.

BONFLEUR, E. J.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B.; LAVORENTI, A. The effects of glyphosate and atrazine mixture on soil microbial population and subsequent impacts on their fate in a tropical soil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, artigo 21, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde, **Modelo de atenção integral à saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília, 2011. Disponível em: <https://executivanutricao.files.wordpress.com/2011/04/modelodeatencao4_2011.pdf>. Acesso em: 02 out. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Atrazina, 2019**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/a14.pdf/76773817-be41-4334-9846-77bd559f9e80>>. Acesso em: 03 out. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para elaboração de rótulo e bula de agrotóxicos, afins e preservativos de madeira, 2018**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/4016300/GUIA++Elabora%C3%A7%C3%A3o+de+R%C3%B3tulo++Bula++vers%C3%A3o+28-9-2017+DIARE.pdf/85a0fb5f-a18b-478c-b6ea-e6ae58d9202a?version=1.0>>. Acesso em: 03 out. 2020.

BRASIL. **Decreto n, 4074 de dezembro de 2002**. Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br>>. Acessado em 02 out. 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria de consolidação nº 5**. Brasília, DF, 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 357/2005**. Brasília, DF, 2005.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 396/2008**. Brasília, DF, 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 001/1986**. Brasília, DF, 1986.

BRICEÑO, G.; JORQUERA, M. A.; DEMANET, R.; MORA, M. L.; DURÁN, N.; PALMA, G. Effect of cow slurry amendment on atrazine dissipation and bacterial community structure in an agricultural Andisol. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 2833-2839, 2010.

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.

CALDAS, S. S.; ARIAS, J. L. O.; ROMBALDI, C.; MELLO, L. L.; CERQUEIRA, M. B. R.; MARTINS, A. F.; PRIMEL, E. G. Occurrence of pesticides and PPCPs in surface and drinking water in southern Brazil: Data on 4-year monitoring. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, p. 71-80, 2019.

CANTERI, M. G.; ALTHAUS, R. A.; VIRGENS FILHO, J. S.; GIGLIOTI, E. A.; GODOY, C. V. SASM-Agri: Sistema para análise e separação de médias em experimentos agrícolas pelos métodos Scott-Knott, Tukey e Duncan. *Revista Brasileira de Agrocomputação*, v. 1, p.18-24. 2001.

CARMO, D. A., A. P. B., PIRES, J. M. B., OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. *Revista Ambiente e Água – Na Interdisciplinary Journal of applied Science*, v. 8, p. 133-143, 2013.

CARNEIRO, Fernando Ferreira et al. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. EPSJV/Expressão Popular, 2015.

CHEN, Q.; WANG, H.; YANG, B.; HE, F. The combined effects of atrazine and lead (Pb): Relative microbial activities and herbicide dissipation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 102, p. 93-99, 2014.

CHEREMISINOFF, N. P.; ROSENFELD, P. E. **Handbook of pollution prevention and cleaner production: best practices in the agrochemical industry**. v. 3. Oxford: William Andrew Publishing, 2011. p. 215-231.

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.

DADALTO, Juliana P. et al. Sistema de preparo do solo e sua influência na atividade microbiana. **Engenharia Agrícola**, v. 35, n. 3, p. 506-513, 2015.

DEHGHANI, M.; NASSERI, S.; HASHEMI, H. Study of the bioremediation of atrazine under variable carbon and nitrogen sources by mixed bacterial consortium isolated from corn field soil in Fars Province of Iran. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2013, artigo 973165, 2013.

DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I.; ROSS, P. E. toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry** 20, 84-98, 2001.

DEON, M. C. et al. Biorremediação de solos contaminados com resíduos oleosos através de bioaumentação e atenuação natural. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 33, p. 73–82, 2012.

DIAS, A. C. L.; SANTOS, J. M. B.; SANTOS, A. S. P.; BOTTREL, S. E. C.; PEREIRA, R. O. Ocorrência de Atrazina em águas no Brasil e remoção no tratamento da água: revisão sistemática. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, p. 234-253 2018.

DOQ-CGCRE-008 - REVISÃO 08. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. INMETRO, Rio de Janeiro, ABR/2020.

DUTTA, A.; SINGH, N. Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, p. 860-868, 2013.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisas de Solos. **Manual de métodos de análise de solo**. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997.

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

EPA. In Situ and Ex Situ Biodegradation Technologies for Remediation of Contaminated Sites. **EPA Engineering Issue**, 2006.

FLOCH, C.; CHEVREMONT, A.-C.; JOANICO, K.; CAPOWIEZ, Y.; CRIQUET, S. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 256-263, 2011.

FRAMPTON, G. K.; JÄNSCH, S.; SCOTT-FORDSMAND, J. J.; RÖMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P. J. Effects of pesticides on soil invertebrates in laboratory studies: a review and analysis using species sensitivity distributions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, 2480-2489, 2006.

GALINDO-MIRANDA, J. M.; GUÍZAR-GONZÁLEZ, C.; BECERRIL-BRAVO, E. J.; MOELLER-CHÁVEZ, G.; LEÓN-BECERRIL, E.; VALLEJO-RODRÍGUEZ, R. Occurrence of emerging contaminants in environmental surface waters and their analytical methodology – a review. **Water Supply**, v. 19, p. 1871-1884., 2019.

GAN, J.; BECKER, R. L.; KOSKINEN, W. C.; BUHLER, D. D. Degradation of atrazine in two soils as a function of concentration. **Journal of Environmental Quality**, v. 25, p. 1064-1072, 1996.

GAO, J.; SONG, P.; WANG, G.; WANG, J.; ZHU, L.; WANG, J. Responses of atrazine degradation and native bacterial community in soil to *Arthrobacter* sp. strain HB-5. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 159, p. 317-323, 2018.

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, Virgilio R. et al. Pesticide bioremediation in liquid media using a microbial consortium and bacteria-pure strains isolated from a biomixture used in agricultural areas. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110734, 2020.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; KRUTZ, L. J.; HONS, F. M. Soil carbon and nitrogen mineralization as affected by atrazine and glyphosate. **Biology and Fertility of Soils**, v. 35, p. 35-40, 2002.

HANG, S.; NASSETTA, M.; CAÑAS, A. I.; RAMPOLDI, E. A.; FERNÁNDEZ-CANIGIA, M. V.; DÍAZ-ZORITA, M. Changes in the atrazine extractable residues in no-tilled Mollisols. **Soil & Tillage Research** 96, 243-249, 2007.

HUANG, H.; ZHANG, C.; RONG, Q.; LI, C.; MAO, J.; LIU, Y.; CHEN, J.; LIU, X. Effect of two organic amendments on atrazine degradation and microorganisms in soil. **Applied Soil Ecology**, v. 152, artigo 103564, 2020.

HUANG, H.; ZHANG, S.; WU, N.; LUO, L.; CHRISTIE, P. Influence of *Glomus etunicatum/Zea mays* mycorrhiza on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 41, p. 726-734, 2009.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Relatórios de Comercialização de Agrotóxicos - Boletim Anual de Produção, Importação, Exportação e Vendas de Agrotóxicos no Brasil**. Brasília – DF, 2018. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>>. Acessado em 01 de out. de 2020.

IBAMA, INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Histórico de comercialização**. Disponível em: <<http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatoriosdecomercializacao-de-agrotoxicos#historicodecomercializacao>>. Acessado em 01 de out. de 2020.

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.

JABLONOWSKI, N. D.; HAMACHER, G.; MARTINAZZO, R.; LANGEN, U.; KÖPPCHEN, S.; HOFMANN, D.; BURAUDEL, P. Metabolism and persistence of atrazine in several field soils with different atrazine application histories. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** 58, 12869-12877, 2010.

JABLONOWSKI, N. D.; KÖPPCHEN, S.; HOFMANN, D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution** 157, 2126-2131, 2009.

JABLONOWSKI, N. D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P. Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. **Environmental Science and Pollution Research** 18, 328-331, 2011.

JÄNSCH, S.; FRAMPTON, G. K.; RÖMBKE, J.; VAN DEN BRINK, P. J.; SCOTTFORDSMAND, J. J. Effects of pesticides on soil invertebrates in model ecosystem and field studies: a review and comparison with laboratory toxicity data. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, p. 2490-2501, 2006.

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.

KRUTZ, L. J.; SHANER, D. L.; ACCINELLI, C.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HENRY, W. B. Atrazine dissipation in *s*-triazine-adapted and nonadapted soil from Colorado and Mississippi: implications of enhanced degradation on atrazine fate and transport parameters. **Journal of Environmental Quality**, v. 37, p. 848-857, 2008.

KRUTZ, L. J.; SHANER, D. L.; WEAVER, M. A.; WEBB, R. M. T.; ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N.; HUANG, Y.; THOMSON, S. J. Agronomic and environmental implications of enhanced *s*-triazine degradation. **Pest Management Science** 66, 461-481, 2010. LEAL, D. P. B. et al. Atrazine degradation patterns: the role of straw cover and herbicide application history. **Scientia Agricola**, v. 76, n. 1, p. 63-71, 2019.

LIN, Z.; ZHEN, Z.; REN, L.; YANG, J.; LUO, C.; ZHONG, L.; HU, H.; LIANG, Y.; LI, Y.; ZHANG, D. Effects of two ecological earthworm species on atrazine degradation performance and bacterial community structure in red soil. **Chemosphere**, v. 196, p. 467-475, 2018.

LOOS, R.; LOCORO, G.; COMERO, S.; CONTINI, S.; SCHWESIG, D.; WERRES, F.; BALSAA, P.; GANS, O.; WEISS, S.; BLAHA, L.; BOLCHI, M.; GAWLIK, B. M. Pan-European survey on the occurrence of selected polar organic persistent pollutants in ground water. **Water Research**, v. 44, p. 4115-4126, 2010.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde em Debate**, v. 42, p. 518-534, 2018.

MAHÍA, J.; CABANEIRO, A.; CARBALLAS, T.; DÍAZ-RAVIÑA, M. Microbial biomass and C mineralization in agricultural soils as affected by atrazine addition. **Biology and Fertility of Soils**, v. 45, p. 99-105, 2008.

MARCHI, G.; MARCHI, E. C. S.; GUIMARÃES, T. G. **Herbicidas: mecanismos de ação e uso**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2008.

MARTIN-LAURENT, F.; PIUTTI, S.; HALLET, S.; WAGSCHAL, I.; PHILIPPOT, L.; CATROUX, G.; SOULAS, G. Monitoring of atrazine treatment on soil bacterial, fungal and atrazine-degrading communities by quantitative competitive PCR. **Pest Management Science**, v. 59, p. 259-268, 2003.

MERINI, L. J.; BOBILLO, C.; CUADRADO, V.; CORACH, D.; GIULIETTI, A. M. Phytoremediation potential of the novel atrazine tolerant *Lolium multiflorum* and studies on the mechanisms involved. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3059-3063, 2009.

MOORMAN, T. B.; COWAN, J. K.; ARTHUR, E. L.; COATS, J. R. Organic amendments to enhance herbicide biodegradation in contaminated soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 541-545, 2001.

MORAES, R. F. **Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória**. Rio de Janeiro: IPEA, 2019.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2. ed. Lavras: Editora UFLA, 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.

NGIGI, A. N.; GETENGA, Z. M.; ULRIKE DÖRFLER, U.; BOGA, H. I.; KURIA, B.; NDALUT, P.; SCHROLL, R. Effects of carbon amendment on *in situ* atrazine degradation and total microbial biomass. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 48, p. 40-48, 2013.

NGIGI, Anastasiah N. et al. Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 8, p. 769-778, 2012.

NOGUEIRA, E. N.; DORES, E. F. G. C.; PINTO, A. A.; AMORIM, R. S. S.; RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI C. Currently used pesticides in water matrices in Central-Western Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society** 23, 1476-1487, 2012.

ODUKKATHIL, G.; VASUDEVAN, N. Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 12, p. 421-444, 2013.

OLADELE, S.; AYODELE, O. Glyphosate, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride and atrazine induces changes in soil organic carbon, bacterial and fungal communities in a tropical alfisol. **Eurasian Journal of Soil Science**, v. 6, p. 238-248, 2017.

OLIVEIRA JÚNIOR, Rubem Silvério de. Mecanismos de ação de herbicidas. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: **Omnipax**, v. 1, p. 141-192, 2011.

OLIVEIRA, K. B. et al. Análise de atividade microbiana do solo em diferentes sistemas de manejo e profundidades pelo método de hidrólise de diacetato de fluoresceína. In: **Embrapa Soja-Artigo em anais de congresso (ALICE)**. In: JORNADA ACADÊMICA DA EMBRAPA SOJA, 9, 2014, Londrina. Resumos expandidos. Londrina: Embrapa Soja, 2014, 2014.

PERELO, Louisa Wessels. In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of hazardous materials**, v. 177, n. 1-3, p. 81-89, 2010.

PERES, Frederico; MOREIRA, Josino Costa. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. SciELO-Editora FIOCRUZ, 2003.

PERTILE, M.; ANTUNES, J. E. L.; ARAUJO, F. F.; MENDES, L. W.; VAN DEN BRINK, P. J.; ARAUJO, A. S. F. Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. **Scientific Reports**, v 10, artigo 7694, 2020.

RAMAKRISHNAN, B.; MEGHARAJ, M.; VENKATESWARLU, K.; NAIDU, R.; SETHUNATHAN, N. The impacts of environmental pollutants on microalgae and cyanobacteria. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology** 40 699-821, 2010.

REBELO, R. M.; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agrotóxicos. **Química Nova** 37, 1199-1208, 2014.

RIBAS P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos pesticidas: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, p. 149-158, 2009.

RIBAUDO, Marc; BOUZAHER, Aziz. **Atrazine: environmental characteristics and economics of management**. 1994.

RINSKY, J. L.; HOPENHAYN, C.; GOLLA, V.; BROWNING, S.; BUSH, H. M. Atrazine exposure in public drinking water and preterm birth. **Public Health Reports**, v; 127, p. 72-80, 2012.

RODRIGUES, L. **Estudo de Agrotóxicos Usados em Agricultura Através da Técnica de Difração de Raios X**. 75p. Dissertação (Engenharia Nuclear). Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, Rio de Janeiro, 2012.

ROHR, J. R.; MCCOY, K. A. A qualitative meta-analysis reveals consistent effects of atrazine on freshwater fish and amphibians. **Environmental Health Perspectives** 118, 20-32, 2010.

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

ROS, M.; GOBERNA, M.; MORENO, J. L.; HERNANDEZ, T.; GARCÍA, C.; INSAM, H.; PASCUAL, J. A. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. **Applied Soil Ecology**, v. 34, p. 93-102, 2006.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio ambiente e sustentabilidade**. Porto Alegre, RS: Bookman, 2012. 412 p.

SAGARKAR, S. et al. Soil mesocosm studies on atrazine bioremediation. **Journal of Environmental Management**, v. 139, p. 208–216, 2014.

SAGARKAR, Sneha et al. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 108-115, 2013.

SAM, A. T.; ASUMING-BREMPONG, S.; NARTEY, E. K. Microbial activity and metabolic quotient of microbes in soils amended with biochar and contaminated with atrazine and paraquat. **Acta Agriculturae Scandinavica, Section B**, v. 67, p. 492-509, 2017.

SANTOS, Fernando. **Aplicação de pesticidas em agricultura**. Departamento de Fitotecnia e Engenharia Rural, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, 2000.

SEBIOMO, A.; OGUNDERO, V. W.; BANKOLE, S. A. Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, p. 770-778, 2011.

SENE, L.; CONVERTI, A.; SECCHI, G. A. R.; SIMÃO, R. C. G. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53, 487-496, 2010.

SILVA, C. A.; RIBEIRO, C. A. O.; KATSUMITI, A.; ARAÚJO, M. L. P.; ZANDONÁ, E. M.; SILVA, G. P. C.; MASCHIO, J.; ROCHE, H.; ASSIS, H. C. S. Evaluation of waterborne exposure to oil spill 5 years after an accident in Southern Brazil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 400-409, 2009.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, p. 245-261, 2016.

SINGH, S.; KUMAR, V.; CHAUHAN, A.; DATTA, S.; WANI, A. B.; SINGH, N.; SINGH, J. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemical Letters**, v. 16, p. 211-237, 2018.

SOLOMON, K. R.; BAKER, D. B.; RICHARDS, R. P.; DIXON, K. R.; KLAINE, S. J.; LA POINT, T. W.; KENDALL, R. J.; WEISSKOPF, C. P.; GIDDINGS, J. M.; GIESY, J. P.; HALL JR., L. W.; WILLIAMS, W. M. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. **Environmental Toxicology and Chemistry** 15, 31-76, 1996.

SOUZA, Aline Habibe de et al. **Desafios e reflexões na contemporaneidade: um estudo sobre a indústria de Agrotóxicos**. 2016.

SOUZA, R. N.; SEIBERT, D.; QUESADA, H. B.; BASSETTI, F. J.; FAGUNDES-KLEN, M. R.; BERGAMASCO, R. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 135, p. 22-37, 2020.

STANLEY, H. O.; MADUIKE, E. M.; OKERENTUGBA, P. O. Effect of herbicide (atrazine and paraquat) application on soil bacterial population. **Sky Journal of Soil Science and Environmental Management**, v. 2, p. 101-105, 2013.

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. TAN, H. et al. Remediation of hexavalent chromium contaminated soil by nano-FeS coated humic acid complex in combination with Cr-resistant microflora. **Chemosphere**, v. 242, p. 125251, 2020.

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.

TOFOLO, Camila et al. Contributing factors for farm workers' exposure to pesticides in the west of the state of Santa Catarina, Brazil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 36, n. 2, p. 153-159, 2014.

TORTELLA, G. R.; MELLA-HERRERA, R. A.; SOUSA, D. Z.; RUBILAR, O.; ACUÑA, J. J.; BRICEÑO, G.; DIEZ, M. C. Atrazine dissipation and its impact on the microbial communities and community level physiological profiles in a microcosm simulating the biomixture of on-farm biopurification system. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 459-467, 2013.

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.

VIEGAS, C. A.; CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; COSTA, C.; GIL, F. N.; SILVA, C.; LIMA, D.; RIBEIRO, R.; SOUSA, J. P. FIALHO, A. M. Bioremediation of soils contaminated with atrazine and other s-triazine herbicides: current state and prospects (Cap. 1). In: DANIELS, J. A. (Ed.) **Advances in Environmental Research**. v. 6. New York: Nova Science Publishers, 2012. p. 1-49.

WANG, A.; HU, X.; WAN, Y.; MAHAI, G.; JIANG, Y.; HUO, W.; ZHAO, X.; LIANG, G.; HE, Z.; XIA, W.; XU, S. A nationwide study of the occurrence and distribution of atrazine and its degradates in tap water and groundwater in China: Assessment of human exposure potential. **Chemosphere**, v. 252, artigo 126533, 2020.

WANG, H. et al. Biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. C3, isolated from the herbicide-contaminated corn field. **International journal of environmental science and technology**, v. 13, n. 1, p. 257-262, 2016.

WANG, Z.-G.; HU, Y.; XU, W. H.; ZHANG, Y. Impact of atrazine on the microbial biomass and diversity of black soils. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 24, p. 3390-3397, 2015.

WIRBISKY, S. E.; FREEMAN, J. L. Atrazine exposure and reproductive dysfunction through the Hypothalamus-Pituitary-Gonadal (HPG) axis. **Toxics**, v. 3, p. 414-450, 2015.

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.

ZELLES, L.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Side effects of some pesticides on non-target soil microorganisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 20, p. 457-488, 1985.