

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS - CCA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

BEATRIZ ZANATA SIQUEIRA

**MONITORAMENTO DA ATIVIDADE MICROBIANA E ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS COM O PESTICIDA AMICARBAZONE EM SOLO
AGRÍCOLA**

Araras - SP
2021

BEATRIZ ZANATA SIQUEIRA

**MONITORAMENTO DA ATIVIDADE MICROBIANA E ENSAIOS
ECOTOXICOLÓGICOS COM O PESTICIDA AMICARBAZONE EM SOLO
AGRÍCOLA**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à disciplina Monografia 2 do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

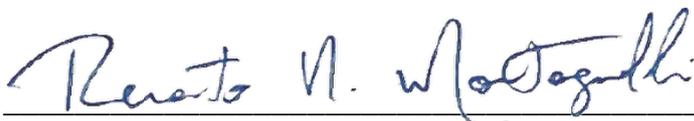
Araras - SP
2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias – CCA

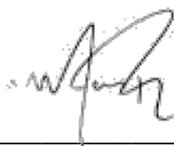
Folha de aprovação

Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa do Trabalho de Conclusão de Curso da candidata Beatriz Zanata Siqueira, realizada em 18/06/2021:



Profº. Dr. Renato Nallin Montagnoli

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Araras



Profª. Drª. Márcia Maria Rosa Magri

Universidade Federal de São Carlos – *campus* Araras



Me. Guilherme Dilarri

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – *campus* Rio Claro

Dedico este trabalho à minha família e à Deus, os quais foram meu suporte durante toda a minha jornada acadêmica.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a minha família, e principalmente aos meus pais, que me deram todo o suporte durante todo o curso, graças ao seus esforços consegui chegar ao fim de mais uma etapa de minha vida. Agradeço ao meu orientador Renato, por toda a colaboração e ajuda nos momentos mais difíceis de minha pesquisa, sem seu apoio nada seria possível. Sou grata a minha companheira de vida acadêmica Larissa, que esteve comigo durante todos estes anos passando pelas mais diversas situações. Agradeço ao meu namorado João Victor por toda ajuda e apoio que prestou durante essa etapa tão complicada para mim. Sou grata a Universidade Federal de São Carlos – *campus Araras* pela oportunidade e por todo o acolhimento que recebi durante estes cinco anos de curso. Por fim, agradeço a minha Banca Examinadora, que aceitou avaliar e contribuir com minha pesquisa.

RESUMO

A biorremediação é um processo utilizado no tratamento de áreas contaminadas por compostos químicos, na qual microrganismos são utilizados para a biodegradação dessas substâncias, promovendo a descontaminação de determinados ambientes. Atualmente os agrotóxicos são utilizados para o mantimento de grandes produções, porém impactam o ambiente de forma negativa, com os resíduos que ficam depositados no solo. O principal objetivo do trabalho foi verificar a eficácia da comunidade microbiana em biodegradar e detoxificar um solo contaminado pelo herbicida amicarbazone, o qual é muito utilizado em culturas de cana-de-açúcar. Para isso, foi utilizado o método da respirometria de Bartha e Pramer para a quantificação de CO₂ gerado a partir da atividade microbiana ao longo de 60 dias, sendo avaliadas três concentrações distintas (20 mg/L, 200 mg/L e 2000 mg/L) do herbicida. Posteriormente foi realizada uma modelagem matemática cinética para análise dos resultados, identificando que o ensaio contendo 200 mg/L produziria o máximo de 712,96 mg de CO₂ acumulado. Após o processo de biodegradação, foi realizado um teste de ecotoxicidade em sementes de *Lactuca sativa*, no qual foi observada uma considerável diminuição da toxicidade do herbicida nas concentrações de 200 e 2000 mg/L, sendo possível observar um maior crescimento das raízes das plântulas, as quais eram anteriormente muito afetadas pelo herbicida. Os resultados obtidos encorajam futuras pesquisas sobre análise do comportamento do amicarbazone com o meio ambiente.

Palavras-chave: Herbicida. Biorremediação. Respirometria. Ecotoxicidade.

ABSTRACT

Bioremediation is a process used in the treatment of areas contaminated by chemical compounds, in which microorganisms are used for the biodegradation of these substances, promoting the decontamination of certain environments. Pesticides are currently used to maintain large productions, but they negatively impact the environment, with the residues that are deposited in the soil. The main objective of the work was to verify the effectiveness of the microbial community in biodegrading and detoxifying a soil contaminated by the herbicide amicarbazone, which is widely used in sugarcane crops. For this, the Bartha and Pramer respirometry method was used to quantify CO₂ generated from microbial activity over 60 days, with three different tools being evaluated (20 mg/L, 200 mg/L and 2000 mg/L) make herbicide. Subsequently, a kinetic mathematical modeling was performed to analyze the results, identifying that the test containing 200 mg/L would produce a maximum of 712.96 mg of accumulated CO₂. After the biodegradation process, an ecotoxicity test was performed on *Lactuca sativa* seeds, there was no decrease in the toxicity of the herbicide in the 200 and 2000 mg/L installations, and it was possible to observe a greater growth of the seedling roots, such as which were previously heavily affected by the herbicide. The results obtained encourage future research on the analysis of the behavior of amicarbazone with the environment.

Keywords: Herbicide. Bioremediation. Respirometry. Ecotoxicity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. OBJETIVOS	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 TESTE DE ECOTOXICIDADE EM <i>LACTUCA SATIVA</i> PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HERBICIDA	14
3.2 COLETA DA AMOSTRA	15
3.3 RESPIROMETRIA	15
3.4 TESTES DE ECOTOXICIDADE DO HERBICIDA PRÉ E PÓS BIODEGRADAÇÃO	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	19
4.1 TESTE DE ECOTOXICIDADE EM <i>LACTUCA SATIVA</i> PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HERBICIDA	19
4.2 RESPIROMETRIA	20
4.3 TESTES DE ECOTOXICIDADE DO HERBICIDA PRÉ E PÓS BIODEGRADAÇÃO.....	23
CONCLUSÕES	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1. INTRODUÇÃO

A microbiologia é a ciência voltada ao estudo dos microrganismos. Ela está associada a dois grandes temas, o primeiro remete ao entendimento do mundo microbiano e o segundo ao uso da microbiologia para o benefício da humanidade e do planeta, ambos estão interconectados (MADIGAN et al., 2016).

Entre as diversas alternativas utilizadas na microbiologia está a biorremediação. Este processo consiste em uma ferramenta que faz a utilização de plantas, microrganismos ou agentes adsortivos como carvão ativado e polímeros, a fim de remediar ou reduzir compostos químicos que poluem o ambiente, sendo muito utilizado, então, no tratamento de áreas contaminadas por agrotóxicos (ALENCAR, 2020).

Dentre os muitos contaminantes existentes, temos os agrotóxicos como os fungicidas, inseticidas, herbicidas, entre outros. Na última década, o Brasil teve um aumento de 190% no mercado de agrotóxicos, o que colocou o país em primeiro lugar no ranking mundial de consumo desde 2008 (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018). Muitos agrotóxicos são pulverizados nas culturas, e entre eles está o herbicida amicarbazone, o qual é indicado na produção de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*).

O amicarbazone é recomendado em aplicações pré- e pós-emergência de culturas. Se trata de um herbicida considerado pouco tóxico, porém perigoso ao ambiente, sendo recomendado a aplicação de 1,5 á 2 Kg por hectare (AGROLINK, 2021). Em outras palavras, ele pode ser aplicado junto à semeadura da cultura e após a germinação de plantas daninhas que possam influenciar no desenvolvimento da cana-de-açúcar, para que não haja competição por espaço e nutriente entre ambas (CAVENAGHI et al., 2007). Dessa forma, esse pesticida torna-se um componente frequentemente utilizado, dada a quantidade de cana-de-açúcar produzida no território nacional.

Devido ao frequente uso de diversos agrotóxicos, a aplicação de uma técnica desenvolvida torna-se necessária, para que haja análise da existência de biodegradantes do contaminante. Assim, o trabalho presente tem o intuito de utilizar da respirometria de Bartha e Pramer (1965) para analisar a ação dos

microrganismos existentes no solo agrícola capazes de biodegradar o composto estudado.

O método de respirometria de Bartha e Pramer (1965) é amplamente utilizado (MARIANO, 2006; SILVA, 2009; FIGUEIREDO et al., 2019;). A técnica consiste em um sistema fechado entre duas câmaras que são interligadas, onde na primeira ocorre a biodegradação do composto contaminante e produção de dióxido de carbono (CO_2), o qual segue para a câmara seguinte, que possui uma solução de hidróxido de potássio (KOH). Quando se titula o KOH que entrou em contato com o CO_2 , é possível quantificar a atividade metabólica de respiração aeróbia, e, assim, se está ocorrendo a degradação dos compostos contaminantes (MELLO et al., 2007).

Para que compostos químicos sejam degradados, há a interferência de muitos outros fatores físicos, químicos e biológicos. Dentre os físicos, pode-se citar o local em que o composto está inserido (solo, água ou sedimento), a temperatura e a incidência de luz. Os fatores químicos influenciadores são o pH, a umidade, teor de oxigênio e, principalmente, a composição química da substância estudada. Já em relação aos fatores biológicos estão as características da microbiota, como a diversidade e o metabolismo do microrganismo degradante (GAYLARD, 2005; LYNDALL et al., 2010).

A proposta trazida no presente trabalho é de extrema importância para o ambiente. Com o impacto dos agrotóxicos no meio ambiente, é evidenciado o prejuízo causado nos insetos, no solo nos peixes e em diversos outros organismos, pelo uso destes contaminantes, muitas vezes, por alterarem seu habitat natural. Os agrotóxicos contaminam não só os organismos e solo, mas também a água, os rios, bacias fluviais, lençóis freáticos, que infelizmente acabam chegando até nós podendo prejudicar a saúde da população (LOPES e ALBUQUERQUE, 2018).

Sabendo que é possível quantificar a degradação de um composto através do aumento da respiração dos microrganismos, já que a atividade microbiana tem como produto final o CO_2 (KIEFT e ROSACKER, 1991), o presente trabalho traz a reprodução da situação de campo em laboratório com o

método da respirometria, no qual são adicionadas concentrações distintas do contaminante em solo, mantendo o controle da temperatura, a fim de que se possam fazer medidas periódicas para a verificação da degradação do amicarbazone. Dessa forma, tornam-se relevantes os estudos que se direcionem para o comportamento ambiental da microbiota para potencial bioprospectivo de otimização da biodegradação de contaminantes.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Verificar a eficácia da comunidade microbiana em biodegradar e detoxificar um solo contaminado pelo herbicida amicarbazone.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar a biodegradação de microrganismos de solo ao herbicida amicarbazone;

- Determinar a influência de concentrações diferentes de amicarbazone na atividade microbiana de solo;

- Testar a toxicidade antes e depois da biodegradação do herbicida baseada no crescimento de *Lactuca sativa*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TESTES DE ECOTOXICIDADE EM *LACTUCA SATIVA* PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HERBICIDA

Foram forradas com papel filtro um conjunto de 15 placas de Petri de 9 cm de diâmetro. Em cada uma delas foram dispostas 20 sementes com espaçamento razoável para que não houvesse competição por espaço e umidade entre as plântulas, de acordo com Fantin et al. (2009). Esses ensaios foram realizados em triplicatas. As sementes utilizadas nas etapas 3.1 e 3.4 (teste de ecotoxicidade pré e pós-biodegradação) pertenciam ao mesmo lote (121919-003 – Isla) e eram livres de defensivos químicos agrícolas.

Após a disposição das sementes sobre o papel filtro, foram separadas em grupos de 3 placas cada, totalizando 5 grupos. O primeiro grupo chamado Controle recebeu 1,5 mL de água destilada. Cada um dos grupos restantes receberam 1,5 mL de uma concentração distinta do herbicida, sendo 20 mg/L para o grupo um, 80 mg/L para o grupo dois, 140 mg/L para o grupo três e 200 mg/L para o grupo quatro. Após estes processos, os conjuntos de placas foram envoltos em plástico filme PVC, para que não houvesse contaminação por microrganismos e/ou depósito de ovos por insetos. Posteriormente foram depositadas em uma bandeja coberta com um saco de plástico preto para que não houvesse interferência da luz no crescimento das plântulas. O material foi mantido a 23°C.

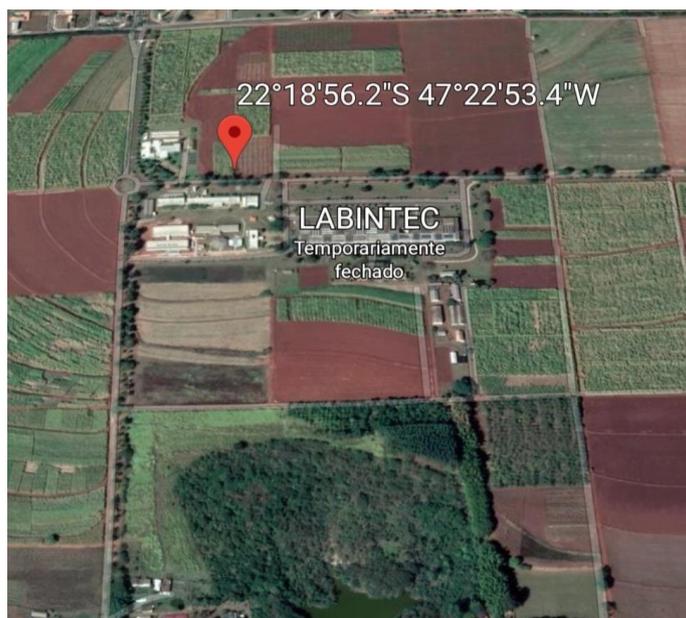
Após 120 horas, todas as plântulas que germinaram passaram por medições, sendo levado em consideração o comprimento de hipocótilo e raiz de cada uma. Uma concentração do herbicida foi selecionada (200 mg/L), já que afetava importantemente o desenvolvimento das plântulas, e assim, deu-se continuação ao presente trabalho.

O método utilizado nesta etapa esteve em conformidade com as Regras de Análise de Sementes propostas por RAS (2009).

3.2 COLETA DA AMOSTRA

As amostras de solo para realização do experimento foram coletadas do terreno de plantação de cana-de-açúcar da Universidade Federal de São Carlos - *campus* de Araras (22°18'56.2"S 47°22'53.4"W), como mostra o marcador vermelho na **Figura 1**.

Figura 1 - Área de coleta das amostras. Escala 1:100 metros.



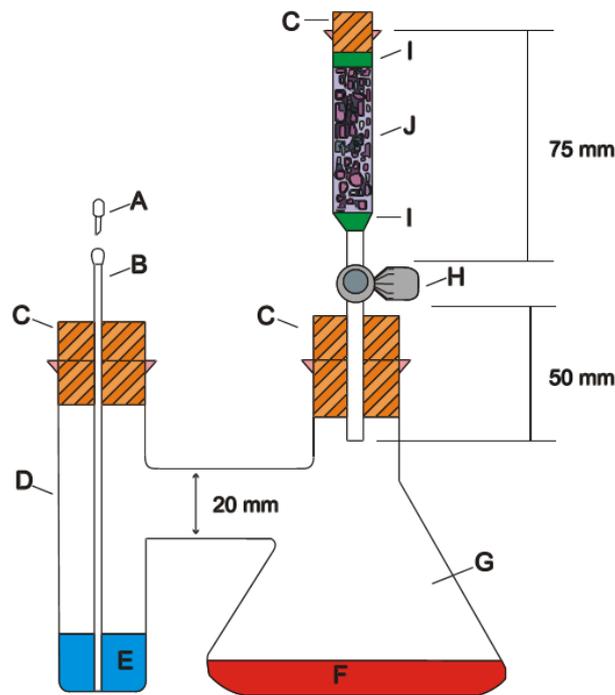
Fonte: Maxar Technologies, 2021.

A coleta foi realizada numa profundidade de 0 a 10 cm. O solo retirado possuía uma aparência fina e seca, de cor vermelha escura. Havia ainda a palha da cana recentemente colhida, devido a isso o solo foi peneirado para se obter a homogeneização do tamanho das partículas.

3.3 RESPIROMETRIA

A Respirimetria de Bartha e Pramer (1965) foi utilizada para quantificar a atividade microbiana nas amostras (referida no restante do texto dessa pesquisa apenas como respirometria). Para a obtenção dos dados de CO₂ produzido nas amostras, foi utilizado o sistema da **Figura 2** (CETESB, 1990).

Figura 2 - Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer. A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm).



Fonte: CETESB, 1990

Seguindo as normas da ABNT (1999), na câmara menor de cada um dos 12 respirômetros utilizados foram colocadas 10 mL de KOH, o qual foi feito a partir da diluição de 11,2 g de KOH em 1000 mL de água isenta de CO₂, a qual teve de ser fervida previamente por 30 minutos. Já na câmara maior, foram colocadas 50 g de solo da amostra coletada, o qual foi regado com 5 mL de solutos distintos para cada grupo de três respirômetros. Para o Controle foi utilizada água destilada. Para os grupos um, dois e três, foram selecionadas diferentes concentrações do herbicida Amicarbazone, sendo 20 mg/L, 200 mg/L e 2000 mg/L, respectivamente. As concentrações foram definidas em virtude da concentração selecionada na primeira etapa do projeto, sendo essas dez vezes menor (20 mg/L) e dez vezes maior (2000 mg/L) que a concentração selecionada (200 mg/L) na **etapa 3.1**. Para que houvesse confiabilidade nos resultados, esta etapa foi desenvolvida em triplicata.

Após a montagem do experimento, as válvulas presentes nos respirômetros foram devidamente fechadas, e após 7 dias deu-se início as

titulações regulares para a análise de quantificação de CO₂, sendo repetidas uma vez por semana durante 60 dias corridos. As titulações foram realizadas utilizando frascos Erlenmeyer de 100 mL, nos quais foram adicionados 2 gotas de fenolftaleína e 1 mL de uma solução de cloreto de bário (BaCl₂), a qual foi feita diluindo 12,2 g de cloreto de bário bi-hidratado (BaCl₂.2H₂O) em 100 mL de água destilada em um balão volumétrico de 100 mL. Além dos dois compostos citados, também foram retiradas as 10 mL de KOH dos respirômetros com uma seringa, e a câmara foi lavada com 10 mL de água isenta de CO₂ por 3 vezes, seguindo as normas estabelecidas pela ABNT (1999).

Após isso, essa solução gerada foi titulada com ácido clorídrico (HCl), que foi produzido diluindo-se 8,5 mL de HCl concentrado p.a em água destilada até completar 1000 mL totais. Após as titulações, a alça lateral de cada respirômetro voltou a receber 10 mL de KOH para que o processo de respiração continuasse e o monitoramento pudesse ser feito periodicamente (ABNT 1999).

Os valores gastos de HCl das titulações de cada respirômetro foram anotados, e após os 60 dias de experimento deu-se início a análise dos mesmos. Primeiramente foi realizado o cálculo de CO₂ gerado através da **Equação 1** (MONTAGNOLLI, 2015). Os valores obtidos foram somados em sequência para se obter o valor de CO₂ acumulado, para que houvesse uma curva mais nítida sobre a respiração. Posteriormente, estes resultados foram inseridos na plataforma SigmaPlot 11.0 para a realização da análise estatística dos dados e criação dos gráficos referentes a respirometria, através de uma modelagem matemática descrita na **Equação 2** (MONTAGNOLLI, 2015).

Equação 1 – Equação utilizada para calcular a emissão de CO₂, na qual GCO₂ é a geração de gás carbônico, A é o volume de HCl gasto (em ml) na titulação do branco; B é o volume de HCl gasto (em ml) na titulação da amostra; 50 é o fator para transformar equivalente em μmol de CO₂ e 0,044 é o fator para transformar μmol em mg de CO₂.

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * 0,044$$

Equação 2 - Equação utilizada no SigmaPlot 11.0 para análise dos dados, na qual B é o CO₂ produzido, B_{max} é a produção máxima de CO₂, B₀ é a produção inicial de CO₂, r é a taxa máxima de produção associada à atividade microbiana e t é o tempo para alcançar o B_{max}.

$$B = B_{max} / \left(1 + \left[\frac{B_{max} - B_0}{B_0} \right] e^{-rt} \right)$$

3.4 TESTES DE ECOTOXICIDADE DO HERBICIDA PRÉ E PÓS BIODEGRADAÇÃO

Foram retirados os solos presentes nos respirômetros e uma fina camada (1 a 1,5 cm) de cada um deles foi passada para suas respectivas placas de Petri de 9 cm de diâmetro a fim de verificar a ecotoxicidade do herbicida pós-biodegradação. Nelas foram dispostas 20 sementes de *L. sativa* e o solo foi regado com 1,5 mL de água destilada (RAS, 2009). Também foram colocados em outras 12 placas de Petri o solo amostral com objetivo de verificar a toxicidade pré-biodegradação. Em cada placa também foram dispostas 20 sementes de *L. sativa* e cada uma foi regada com 1,5 mL de água destilada para as 3 denominadas Controle e as outras com 1,5 mL das concentrações utilizadas ao longo do trabalho: 20 mg/L, 200 mg/L e 2000 mg/L (RAS, 2009).

Após a montagem das placas, elas foram envoltas em plástico filme PVC, para que não houvesse contaminação por microrganismos e/ou depósito de ovos por insetos, posteriormente foram colocadas em uma bandeja recoberta por um saco plástico preto para que não houvesse interferência de luz, e mantidas a 23°C por 120 horas. Posteriormente, todas as plântulas que germinaram foram medidas, levando em consideração o comprimento de hipocótilo e raiz de cada uma, bem como no primeiro experimento do trabalho presente (etapa denominada 3.1). Após serem efetuadas as medidas, os resultados foram analisados e fez-se a comparação das plântulas que foram dispostas em solo contaminado, com as que foram dispostas em solo que passou pelo processo de biodegradação, a fim de verificar se de fato foi possível diminuir o efeito tóxico do composto após a biodegradação.

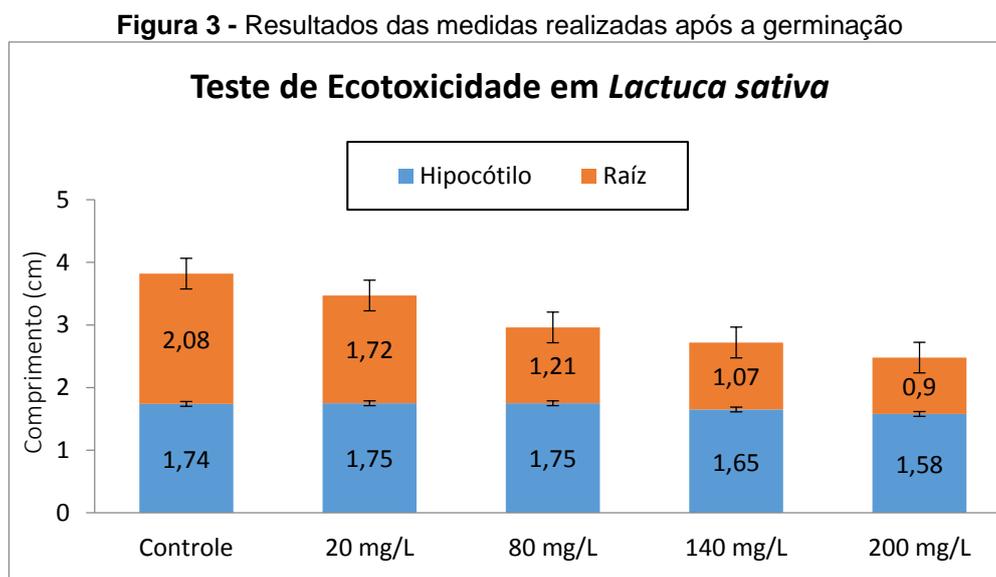
Para uma melhor análise, foram elaborados gráficos levando em consideração a média dos tamanhos de raiz e hipocótilo das plântulas das

triplicatas. Também levou-se em consideração o desvio padrão nos gráficos, a fim de estimar a variabilidade dos dados obtidos.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. TESTE DE ECOTOXICIDADE EM *LACTUCA SATIVA* PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DO HERBICIDA

De acordo com as Regras de Análise de Sementes (2009), após 120 horas da montagem do experimento, as placas de Petri foram abertas e as plântulas que germinaram passaram por medições. Na **Figura 3**, é possível analisar o gráfico que mostra que quanto maior a concentração do herbicida, menor é o desenvolvimento da raiz, contudo em relação ao crescimento do hipocótilo, não foi possível observar diminuições relevantes, como é possível notar nas barras de erro.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Para melhor transparecer os dados trazidos no gráfico (**Figura 3**), é possível observar, na **Figura 4**, uma notável diferença nos tamanhos das raízes de uma planta cultivada com água destilada (A) com 4 cm de comprimento, e uma com o herbicida na concentração de 2000 mg/L (B) com apenas 0,5 cm de comprimento.

Figura 4 - Comparação da plântula cultivada com água destilada (A) com a plântula cultivada com 200 mg/L de Amicarbazone (B)



A partir dos dados analisados, foi possível concluir que o herbicida Amicarbazone afeta o desenvolvimento da raiz das plântulas, possuindo uma ação fitotóxica para a espécie estudada (*L. sativa*), o que prejudica a fixação de plantas daninhas em solo agrícola (SOARES *et al.*, 2011). Observando seus comprimentos totais, ou seja, a soma de hipocótilos e raízes de cada plântula, conclui-se que o herbicida causa uma diminuição crescente da massa total dos vegetais, quanto maior for a concentração utilizada (DA SILVA *et al.*, 2017)

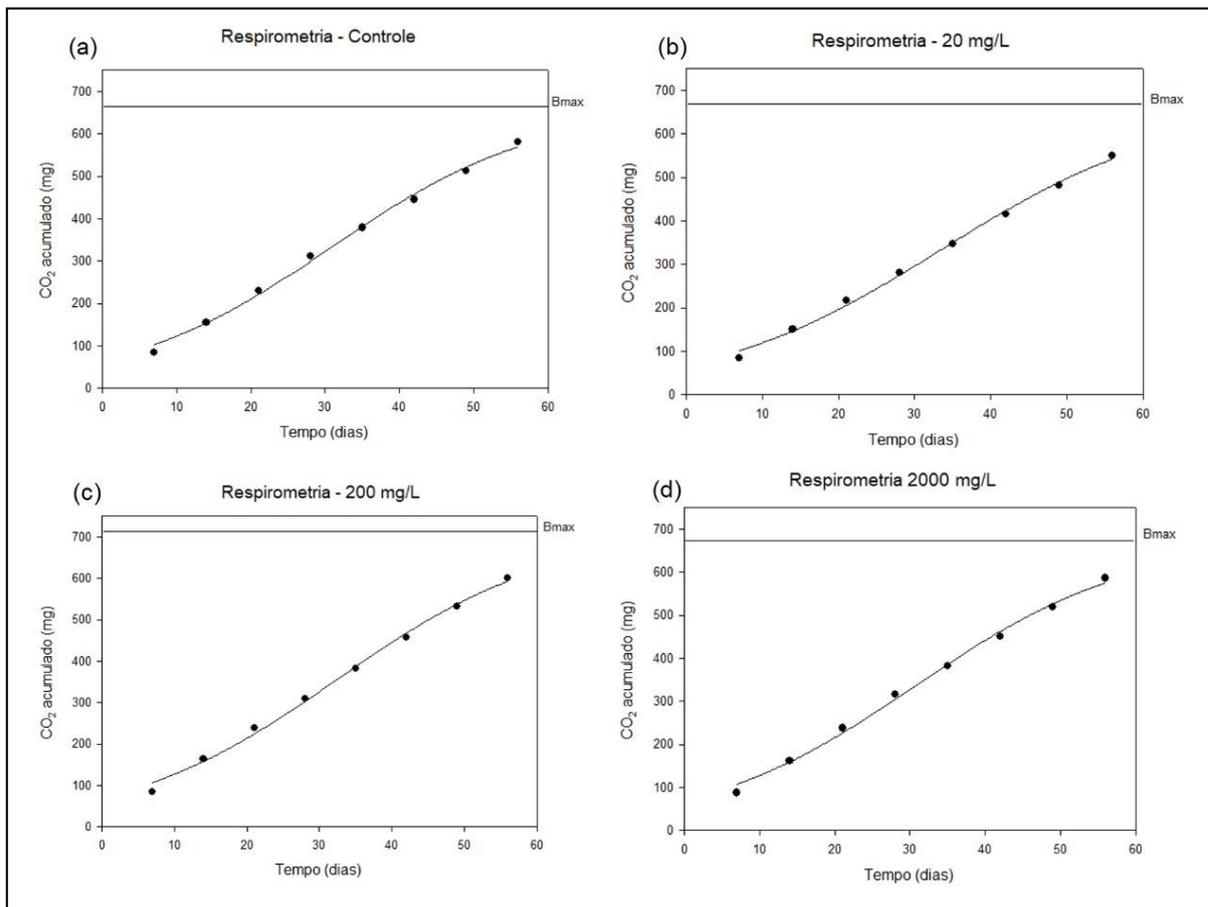
Devido ao fato da maior diferença constatada estar na maior concentração utilizada no experimento (200 mg/L), esta foi escolhida para que se desse continuidade ao trabalho. Para ter variações de concentrações para o experimento da etapa seguinte, a concentração escolhida foi variada em outras duas diferentes concentrações, as quais foram 20 mg/L e 2000 mg/L.

4.2 RESPIROMETRIA

Ao fim do período de titulações, os dados foram analisados e passados para a ferramenta SIGMAPLOT 11.0, pois com o uso do programa estatístico, foi possível obter eficácia para se descrever e analisar os resultados. Assim, na **Figura 5**, é possível analisar a curva de crescimento da biodegradação do herbicida através da análise da taxa de CO₂ acumulado, a qual está relacionada com a decomposição do herbicida (WARDLE e PARKINSON, 1990) durante os 60 dias de experimento. Os gráficos trazem também o local que se encontraria

o B_{max} (produção máxima de CO_2), termo utilizado para o ponto máximo de respiração.

Figura 5 - Gráfico gerados com a ferramenta SigmaPlot 11.0 dos quatro tratamentos realizados, sendo Controle (a), 20 mg/L (b), 200 mg/L (c) e 2000 mg/L (d)



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

No tratamento denominado Controle (**Figura 5a**), houve uma relevante taxa de biodegradação, o que primordialmente não era esperado. Porém, o fato da amostra ter sido coletada após a colheita de cana-de-açúcar, de uma área com intensa cultivação, é possível levantar a hipótese de que já havia matéria orgânica, além de outros agrotóxicos utilizados no cultivo, que foram suficientes para a microbiota pré existente biodegradar estes compostos e, assim, liberar CO_2 (REIS et al., 2008).

Já no tratamento denominado 20 mg/L (**Figura 5b**), pôde-se observar uma taxa de respiração pouco maior que a observada no Controle (**Figura 5a**). Dessa forma, foi possível verificar que com esta concentração não se obteve uma resposta de importante notoriedade, mesmo que ainda maior que o

tratamento citado acima. Assim, conclui-se que a concentração não foi suficiente para se detectar uma resposta via respirometria (BASILE, 2008).

Foi possível verificar estatisticamente pelo procedimento de comparação múltipla entre pares (método de Holm-Sidak) que as diferenças nos valores médios entre os grupos de tratamento, conforme análise de variância paramétrica (ANOVA) são maiores do que seria esperado ao acaso, existindo uma diferença estatisticamente significativa ($P = <0,001$).

Assim, era esperado que a taxa de biodegradação fosse cada vez maior em relação ao aumento da concentração. Contudo, a maior taxa de respiração microbiana encontrada foi visualizada na concentração de 200 mg/L (**Figura 5c**), concluindo-se que esta, dentre as concentrações testadas no experimento, foi o ponto ótimo de biodegradação nas amostras de solo, a qual permitiu à microbiota a capacidade de suporte em biodegradar o químico.

Já na concentração denominada 2000 mg/L (**Figura 5d**), pôde-se notar que, mesmo com maior quantidade de carbono disponível, foi gerado um efeito tóxico para a microbiota do solo, já que a taxa de biodegradação foi menor que a da concentração descrita acima. Os estudos *in vitro* presentes na literatura salientam que quando utilizados em altas concentrações, os herbicidas são potencialmente tóxicos para os microrganismos, sendo constante a comprovação de efeitos inibitórios na atividade microbiana ou na diminuição da quantidade de microrganismos (CHILDS, 2007).

Além da taxa de CO₂ acumulado, também foi possível analisar outros pontos estatísticos da pesquisa. Na **Tabela 1** é possível observar informações sobre os quatro tratamentos realizados. O termo *Bmax* utilizado, como dito anteriormente, refere-se ao ponto limite em que a respiração microbiana se normalizaria, ou seja quando atingido o *Bmax*, a respiração tende ao infinito sem alterações na concentração de CO₂ emitido. O “T de *Bmax*” por sua vez, refere-se ao tempo que levaria de experimentação para se alcançar o *Bmax*, sendo assim, entender o tempo que o herbicida levaria para ser degradado é extremamente importante para se aplicar em campo. E, por fim, o “R²” refere-se a precisão do ajuste dos dados ao modelo matemático realizado.

Tabela 1 - Valor máximo de produção de CO₂ e o tempo previsto nos tratamentos realizados

	CONTROLE	20 mg/L	200 mg/L	2000 mg/L
Bmax (mg)	664,07	669,13	712,96	674,51
T de Bmax (dias)	96	105	101	97
R ²	0,9952	0,9962	0,9956	0,9953

Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Analisando as informações demonstradas na **Tabela 1**, é possível concluir que caso fosse dado seguimento a respirometria, teríamos um maior aumento da taxa de respiração nos respirômetros que obtinham a concentração de 200 mg/L. Essa taxa de *Bmax* seria alcançada se caso o experimento perdurasse por 101 dias no total. Também é possível analisar quantos dias seriam precisos para alcançar os outros valores máximos de respiração dos tratamentos. É válido ressaltar que assim que os valores de *Bmax* fossem alcançados, eles tenderiam ao infinito no mesmo valor.

4.3 TESTES DE ECOTOXICIDADE DO HERBICIDA PRÉ E PÓS BIODEGRADAÇÃO.

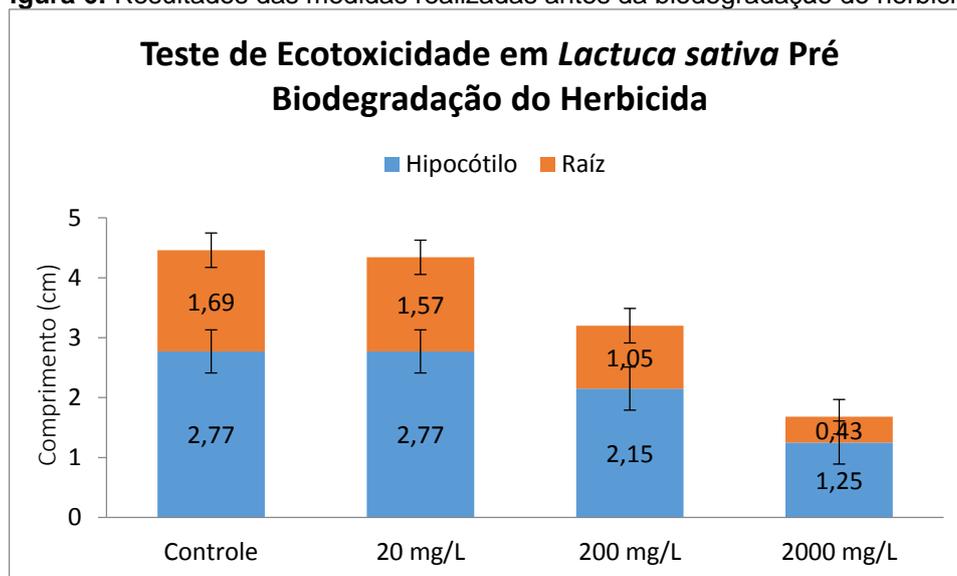
Para que o Amicarbazone exerça sua atividade sobre plantas daninhas, este deve ser introduzido diretamente no solo, como foi realizado nesta etapa da pesquisa (Toledo et al. 2009). Após a medição de todas as plântulas germinadas, foi possível traçar os gráficos correspondentes as duas situações. A **Figura 6** determina os resultados obtidos no experimento de pré-biodegradação. Já a **Figura 7** determina os resultados coletados após a biodegradação do herbicida, ou seja, após passar pelo processo de biodegradação no interior dos respirômetros.

Analisando as **Figuras 6 e 7**, é possível notar uma importante diferença, principalmente nos tratamentos de 200 mg/L e 2000 mg/L. Os dados obtidos na **Figura 7** mostram que a ação ecotoxicológica do herbicida diminuiu em comparação à **Figura 6**, onde as raízes que cresciam em média 1,05 cm e 0,43

cm para os tratamentos de 200 e 2000 mg/L respectivamente, aumentaram para 1,59 cm e 1,27 cm.

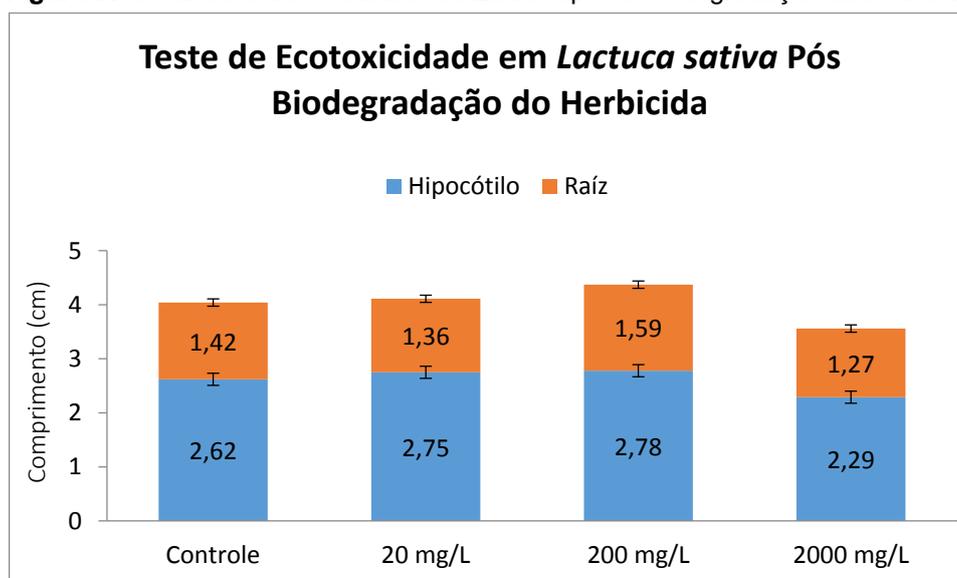
No que diz respeito aos tratamentos Controle e 20 mg/L, era esperado que mantivessem o comprimento realizado na primeira etapa do trabalho, porém, segundo um estudo realizado na EMBRAPA – MG (2021), mesmo as sementes sendo do mesmo lote, pode ter havido uma alteração em sua viabilidade.

Figura 6: Resultados das medidas realizadas antes da biodegradação do herbicida



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

Figura 7: Resultados das medidas realizadas após a biodegradação do herbicida



Fonte: Elaborado pela autora (2021)

De acordo com a **Figura 7**, conclui-se que após a biodegradação houve um aumento no desenvolvimento das plântulas, principalmente em suas raízes, o que é possível ser visualizado nos valores mostrados. Isso se deve ao fato do herbicida utilizado ser absorvido pelo sistema radicular e transladado via xilema, o que explica o fato das raízes serem as mais afetadas (TOLEDO et al., 2004).

Após a análise, foi possível concluir que após a biodegradação realizada nos respirômetros, a ação ecotoxicológica do herbicida estudado sofreu uma considerável diminuição. Desta forma, é possível afirmar que a microbiota pré-existente no solo coletado foi eficaz no aumento da biodegradabilidade e na detoxificação do solo.

6. CONCLUSÕES

Ao fim do presente trabalho foi possível contemplar todos os objetivos específicos anteriormente almejados. Observou-se que a atividade microbiana foi diferente em cada uma das concentrações, e que o ponto ótimo de biodegradação do herbicida amicarbazone, dentre as concentrações testadas, foi alcançado na concentração de 200 mg/L.

Com os testes de ecotoxicidade pré e pós-biodegradação pôde-se notar um decréscimo acentuado no desenvolvimento das plântulas de *L. sativa*, principalmente no comprimento das raízes, bem como a crescente taxa de produção de CO₂. Dessa forma, concluiu-se que a microbiota pré-existente é eficaz em detoxificar o solo biodegradando o herbicida amicarbazone.

Esta pesquisa teve o intuito de contribuir com a comunidade científica, trazendo novas informações sobre um agrotóxico muito utilizado no dia-a-dia do campo. Ademais, este estudo foi desenvolvido com baixo custo, podendo ser reproduzido com facilidade. Com o aumento da produção nos campos, se fazem necessários estudos que analisem a interação entre as substâncias depositadas no meio com a natureza.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROLINK. **Bula Dinamic**: amicarbazona. Amicarbazona. Disponível em: https://www.agrolink.com.br/agrolinkfito/produto/dinamic_7136.html. Acesso em: 23 jun. 2021.
- ALENCAR, F. L. S. **Bioprosecção da *Chromobacterium violaceum* para a biorremediação do chumbo**: aplicações em biotecnologia e educação em saúde. Data do depósito. 2020. 386f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Meio Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal/RN, 2020.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14283**: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: Copyright, 1999. 8 p.
- BARTHA, R; PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, New Jersey, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.
- BASILE, A. G. **Desenvolvimento de teste ecotoxicológico com o fungo *Alternaria cassiae***: toxicidade aguda de agrotóxicos e avaliação de risco ambiental. 2008. 69f. Tese (Mestrado em Produção Vegetal – Agronomia) – Universidade Estadual Paulista: Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal/SP, 2008.
- CAVENAGHI, A. L. *et al.* Dinâmica do Herbicida Amicarbazone (dinamic) aplicado sobre palha da cana-de-açúcar, (*Saccharum officinarum*). **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.25, n. 4, p. 831-837, 2007.
- CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma técnica L6.350, 1990.
- CHILDS, G. M. F. **Efeitos de herbicidas na microbiota do solo em sistema fechado**. 2007. 69f. Tese (Doutorado em Agronomia – Produção Vegetal) - Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Faculdade de ciências agrárias e veterinárias, Jaboticabal/SP, 2007.
- SILVA, K. R. I. **Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos**. 2009. 193f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas/SP, 2009.
- DA SILVA, P. V. *et al.* Efeitos fitotóxicos sobre a cultura do alface ocasionados pela deriva simulada de herbicidas utilizados no milho. **Ensaios pioneiros**, São Paulo, v. 1, n.1, p. 1-13, 2017.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. Circular Técnica, 19. **Armazenagem das sementes**. EMBRAPA-MG 2021.
- FANTIN, A. C. M. *et al.* **Teste de sensibilidade em sementes de Rúcula (*Eruca sativa*) Alface (*Lactuca sp*) em contato com diferentes concentrações do pesticida Glifosato**. VI Congresso de Meio Ambiente da AUEM (Universidades Grupo de Montevideú) – Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2009.
- FIGUEIREDO, T. S.; SOLDERA, P. E. S.; FAGNANI, E. Adaptação da respirometria como ferramenta para prever a cinética da decomposição anaeróbia e a produção de CO₂ de efluente de abatedouro de bovinos. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA UNICAMP. XXVII., 2019, CAMPINAS. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da UNICAMP**, Campinas, n.27, out. 2019

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. D. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. n. 34. p.36-43, 2005.

KASEMODEL, M. C.; PORTO, A. L. M.; NITSCHKE, M. Biodegradação de compostos organoclorados. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1351-1356, 2014.

KIEFT, T. L.; ROSACKER, L. L. Application of respiration and adenylate-based soil microbiological assay to deep subsurface terrestrial sediments. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 23, p. 563-568, 1991.

LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Saúde Debate**, Rio de Janeiro, v. 117, n. 42, p. 518-534, abr-jun, 2018.

LYNDALL, J. *et al.* Probabilistic risk evaluation for triclosan in surface water, sediments, and aquatic biota tissues. **Integrated Environmental Assessment and Management**. p. 419–440, 2010.

MADIGAN, M. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016. 1006 p.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) - Universidade Estadual Paulista, Rio Claro/SP, 2006.

MELLO, G. S. L. *et al.* Feasibility of application of Bartha's respirometric method to determine biodegradation of pollutants or wastes in latosoils. **Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental**. Rio de Janeiro, v. 12, n. 1, p. 71-78, 2007.

MONTAGNOLLI, R. N. **Incêndios de petróleo e petroquímicos: biorremediação de áreas afetadas**. 2015. 267f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Microbiologia Aplicada - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Rio Claro/SP, 2015.

NEGRISOLI, E. *et al.* Controle de plantas daninhas pelo amicarbazone aplicado na presença de palha de cana-de-açúcar. **Planta daninha**, Viçosa, v. 25, n. 3, p. 603-611, Set. 2007.

RAS - **Regras para Análise de Semente**. Ministério da Agricultura. Brasília: SNAD/DNPV/CLAV, 2009. 365p.

SOARES, R. O. *et al.* Herbicidas de diferentes mecanismos de ação e a seletividade a cultivares de cana-de-açúcar. **Nucleus**, Ituverava, v. 8, n. 1, p. 337-350, abr. 2011.

TOLEDO, R.E.B. *et al.* Eficácia do herbicida amicarbazone aplicado sobre a palha ou no solo no controle de plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. **Planta daninha**, Viçosa, v. 27, n. 2, p. 319-326, June 2009.

TOLEDO, R. E. B. *et al.* **Dinamic (Amicarbazone), novo herbicida seletivo para o controle de plantas daninhas em pré e pós emergência na cultura da cana-de-açúcar**. XXIV Congresso brasileiro da ciência das plantas daninhas. São Pedro/SP, 2004.

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