



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E AMBIENTE

BEATRIZ ZANATA SIQUEIRA

**ANÁLISES SINÉRGICAS MICROBIANAS DE LINHAGENS SELECIONADAS
PARA A BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA AMICARBAZONE E TESTES COM
CANA-DE-AÇÚCAR**

Dissertação apresentada como exigência para obtenção do Título de Mestre em Agricultura e Ambiente no Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente da Universidade Federal de São Carlos.

Orientador: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

ARARAS
2023

Zanata Siqueira, Beatriz

ANÁLISES SINÉRGICAS MICROBIANAS DE
LINHAGENS SELECIONADAS PARA A
BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA AMICARBAZONE E
TESTES COM CANA-DE-AÇÚCAR / Beatriz Zanata
Siqueira -- 2023.
54f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São
Carlos, campus Araras, Araras
Orientador (a): Renato Nallin Montagnolli
Banca Examinadora: Renato Nallin Montagnolli, Márcia
Maria Rosa Magri, Matheus Mantuanelli Roberto
Bibliografia

1. Agrotóxico. 2. Biorremediação. 3. Ecotoxicidade. I.
Zanata Siqueira, Beatriz. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Helena Sachi do Amaral - CRB/8
7083



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Agrárias
Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Beatriz Zanata Siqueira, realizada em 14/11/2023.

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli (UFSCar)

Profa. Dra. Marcia Maria Rosa Magri (UFSCar)

Prof. Dr. Matheus Mantuanelli Roberto (Uniararas)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente.

À Deus

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de expressar minha gratidão a Deus pelo constante sustento, orientação e força durante todo este período. Sem sua graça e apoio, essa jornada não teria sido possível.

Ao meu noivo, minha gratidão pelo seu apoio incansável nesta jornada, sua presença constante e sua crença em mim. Seu encorajamento me deu confiança para enfrentar cada obstáculo. Sua dedicação e otimismo foram fundamentais. Ter você ao meu lado fez toda a diferença, e estou ansiosa para compartilhar mais conquistas ao seu lado.

À minha querida família, meu profundo agradecimento por estarem ao meu lado em todos os momentos, pelo amor incondicional, compreensão e apoio. Vocês foram minha fonte de inspiração e motivação, e sou eternamente grata por isso.

Ao meu orientador, o Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli, agradeço a orientação, paciência e dedicação. Suas orientações e conhecimento contribuíram significativamente para o sucesso desta pesquisa.

À equipe do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente e à UFSCar – Centro de Ciências Agrárias, agradeço por proporcionarem a oportunidade de desenvolver este estudo.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola e Molecular (LAMAM), onde desenvolvi minha pesquisa e a todos os integrantes que comigo compartilharam de muitos momentos durante esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo financiamento desta pesquisa (código de financiamento 001), meu agradecimento.

RESUMO

A agricultura tem grande destaque na economia do nosso país, mas gera grandes impactos ambientais causados pelo uso excessivo de agrotóxicos. A busca por aumentar a produção agrícola muitas vezes negligencia esses impactos, prejudicando a microbiota do solo, levando a busca de técnicas para a mitigação dos danos. A pesquisa teve como objetivo avaliar o uso de linhagens microbianas na biorremediação de um solo agrícola contaminado com herbicida amicarbazone, utilizado no cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), além de verificar a influência das linhagens na produtividade da espécie estudada. Foram realizados ensaios de respirometria, a fim de verificar a viabilidade da microbiota em degradar o herbicida. Posteriormente as linhagens isoladas foram submetidas aos ensaios de colorimetria, utilizando o indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), o qual tem função de medir a atividade catabólica na degradação de poluentes. Além disso foram realizados testes de inoculação das linhagens em solo de cultivo de cana-de-açúcar, o que enfatiza as interações complexas entre microrganismos do solo, herbicidas e crescimento das plantas, bem como o teste para entender a relação do agrotóxico estudado com o capim-corda-de-viola (*Ipomoea purpurea*). A partir dos testes respirométricos foi possível verificar que a microbiota presente no solo teve potencial para degradar o herbicida, através da diferença da produção de CO₂ do controle (176,24 mg) em relação ao Grupo Herbicida 200mg/L (209,38 mg). No ensaio colorimétrico, observou-se que as leveduras selecionadas foram capazes de degradar o herbicida, tendo como melhor resultado o consórcio dos três microrganismos. Já, quando inoculadas no solo, pôde-se observar que a interação entre microrganismos A e B inibiu notavelmente gemas de cana-de-açúcar, enquanto no tratamento contendo o microrganismo C foi possível verificar um crescimento positivo, sugerindo que ele não é ágil em degradar o herbicida como também observado no ensaio colorimétrico. Em relação ao teste realizado com o capim, foi possível verificar que a inoculação conjunta resultou em um aumento significativo no comprimento final das plântulas em comparação com os tratamentos que receberam apenas o herbicida. Em suma, foi possível concluir que os microrganismos são capazes de degradar o herbicida, tendo as linhagens A e B maior capacidade, contudo acredita-se que o produto desta degradação seja maléfico para o desenvolvimento da cana-de-açúcar, influenciando negativamente no crescimento. Sendo assim, os resultados evidenciam o potencial dos estudos de biorremediação na agricultura, ilustrando a capacidade da microbiota presente no ambiente.

Palavras-chave: Agrotóxico, biorremediação, colorimetria, ecotoxicidade, respirometria.

ABSTRACT

Agriculture plays a significant role in our country's economy, but it generates substantial environmental impacts due to the excessive use of pesticides. The pursuit of increased agricultural production often overlooks these impacts, harming soil microbiota and prompting the search for techniques to mitigate the damage. The research aimed to assess the use of microbial strains in the bioremediation of agricultural soil contaminated with the herbicide amicarbazone, commonly used in sugarcane cultivation (*Saccharum officinarum*). Additionally, it sought to examine the influence of these strains on the productivity of the studied species. Respirometry assays were conducted to verify the viability of soil microbiota in degrading the herbicide. Subsequently, the isolated strains underwent colorimetric tests using the redox indicator 2,6-dichlorophenol-indophenol (DCPIP), which measures catabolic activity in pollutant degradation. Inoculation tests of the strains in sugarcane cultivation soil were also performed, emphasizing the complex interactions among soil microorganisms, herbicides, and plant growth. This included testing the relationship between the studied pesticide and purple morning glory (*Ipomoea purpurea*). Based on the respirometric tests, it was observed that the soil microbiota had the potential to degrade the herbicide, as evidenced by the difference in CO₂ production between the control (176.24 mg) and the Herbicide 200mg/L Group (209.38 mg). In the colorimetric assay, selected yeasts were capable of degrading the herbicide, with the consortium of three microorganisms yielding the best result. When inoculated in the soil, it was observed that the interaction between microorganisms A and B notably inhibited sugarcane buds, while the treatment containing microorganism C showed positive growth, suggesting its limited efficiency in degrading the herbicide, as observed in the colorimetric assay. Regarding the test with the grass, it was evident that joint inoculation resulted in a significant increase in the final length of seedlings compared to treatments that received only the herbicide. In conclusion, it was determined that microorganisms have the capacity to degrade the herbicide, with strains A and B demonstrating higher efficacy. However, it is believed that the by-products of this degradation may be detrimental to sugarcane development, negatively impacting growth. Thus, the results highlight the potential of bioremediation studies in agriculture, illustrating the capability of the microbiota present in the environment.

Keywords: Pesticide, bioremediation, colorimetry, ecotoxicity, respirometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Área de coleta das amostras	23
Figura 2. Esquema de um respirômetro de Bartha e Pramer	24
Figura 3. Esquema dos testes de antagonismo com as 3 linhagens microbianas	27
Figura 4. Resultado dos tratamentos realizados com gráficos gerados pelo SigmaPlot 11.0 ..	34
Figura 5. Microrganismos A, B e C isolados	37
Figura 6. Resultado dos tratamentos do teste de antagonismo	38
Figura 7. Testes colorimétricos após a montagem	40
Figura 8. Testes colorimétricos após 24 horas da montagem	40
Figura 9. Testes de crescimento das gemas de cana-de açúcar quando inoculadas as linhagens em solo	43
Figura 10. Competência rizosférica da levedura B	45
Figura 11. Competência rizosférica da levedura A	46
Figura 12. Testes de crescimento do capim corda-de-viola quando inoculadas as três linhagens em solo	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Componentes para a produção do meio Bushnell Haas para ensaio colorimétrico	28
Tabela 2. Tratamentos utilizados no ensaio colorimétrico	29
Tabela 3. Esquema dos tratamentos realizados na etapa de adição dos microrganismos selecionados em solo	30
Tabela 4. Esquema dos tratamentos realizados na etapa de análise de degradação pelos microrganismos selecionados	32
Tabela 5. Parâmetros obtidos através dos experimentos de respirometria.	35
Tabela 6. Resultados do teste colorimétrico após as 24 horas	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD – Batata Dextrose

BDA – Batata Dextrose Ágar

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BH - Bushenell Haas

DCPIP - 2,6-diclorofenol-indofenol

KOH – Hidróxido de Potássio

MO – Matéria Orgânica

PVC - Policloreto de Polivinila

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 HISTÓRICO DE UTILIZAÇÃO DE AGROTÓXICOS NO BRASIL	16
2.2 AGROTÓXICOS	17
2.3 EXPOSIÇÃO À XENOBIÓTICOS	18
2.4 HERBICIDA AMICARBAZONE	19
2.5 BIORREMEDIAÇÃO	20
3. OBJETIVOS	22
3.1 OBJETIVO GERAL	22
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
4. MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 COLETA DO SOLO	23
4.2 RESPIROMETRIA	23
4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	26
4.4 ENSAIOS DE ANTAGONISMO	27
4.5 TESTES SINÉRGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	27
4.6 ADIÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS EM SOLO E INTERAÇÃO COM <i>Saccharum officinarum</i>	29
4.7 ENSAIO DE COMPETÊNCIA DAS LINHAGENS NA RIZOSFERA DE CANA- DE-AÇÚCAR	31
4.8 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA PELAS LINHAGENS SELECIONADAS EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE <i>Ipomoea</i> <i>purpurea</i>	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 RESPIROMETRIA	34
5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS	36
5.3 ENSAIOS DE ANTAGONISMO	38
5.4 TESTES SINÉRGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	39
5.5 ADIÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS EM SOLO E INTERAÇÃO COM <i>Saccharum officinarum</i>	42
5.6 ENSAIO DE COMPETÊNCIA DAS LINHAGENS NA RIZOSFERA DE CANA- DE-AÇÚCAR	44

5.7 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA PELAS LINHAGENS SELECIONADAS EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE <i>Ipomoea purpurea</i>	46
6. CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS	50

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma atividade de destaque na economia de nosso país. Como consequência, temos o uso excessivo dos agrotóxicos, os quais contaminam o ambiente causando grandes impactos ambientais (BORSOI et al., 2014; LOPES; ALBUQUERQUE, 2018; OLIVEIRA et al., 2018; SPADOTTO et al., 2004). Nessa esfera, nota-se que a intensificação da produção de alimentos frequentemente leva ao uso de agrotóxicos, com a intenção de combater surtos de pragas (insetos e ervas daninhas), todavia, o uso inadequado e indiscriminado desses produtos aumentou os riscos para a saúde humana e o ambiente (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018).

Essa situação infelizmente não é trazida como uma adversidade quando se trata da busca por uma alta produtividade. Para isso usam-se agrotóxicos para os mais diversos tipos de melhoria nas plantações, o que afeta diretamente a microbiota do solo, a qual acaba por ter a sua biodiversidade degradada. Esses efeitos nocivos no solo, com a interferência no equilíbrio microbiano, comprometem a decomposição dos compostos orgânicos e a ciclagem de nutrientes (DEMARTELAERE et al., 2021).

A presença de agrotóxicos nos solos pode ser decorrente da aplicação em plantas para controle de pragas por meio de tratores ou de forma aérea, ou ainda podem ser transportados de uma área para outra por meio da ação dos ventos, pois ficam presentes na atmosfera (MORRO; SCHNITZLER, 2021). A pulverização de químicos agrícolas é feita em uma área alvo específica, compreendendo a folhagem das plantas, todavia, o solo poderá ser atingido durante a aplicação e, nesse processo, o solo pode ser contaminado (CONTIERO; BIFFE; CATAPAN, 2018).

Portanto, os agrotóxicos incorporados ao solo entram em um ecossistema dinâmico e são degradados, alterando não apenas a composição física e química, como também substâncias biologicamente ativas, envolvendo a quantidade total de microrganismos do solo (CARDOSO; ANDRADE, 2016). Como os microrganismos têm como base a ação essencial na transformação e liberação de nutrientes para as plantas, a composição de nutrientes pode ser alterada e a fertilidade do solo pode se comprometer (SPADOTTO, 2004).

Consequentemente, o que acontece acaba sendo controverso à vontade dos agricultores, pois a mortalidade da microbiota existente acarreta numa baixa produtividade, o que já tem sido observado em algumas áreas (SOUZA et al., 2005). Isso ocorre, pois um dos mais importantes fatores que influenciam a relação entre solo e planta é a biodiversidade da microbiota presente no solo (SILVA et al., 2019).

Com isso, uma das diversas alternativas utilizadas na mitigação dos impactos ambientais é a biorremediação, a qual consiste na utilização de plantas ou microrganismos que têm como papel biodegradar substâncias presentes no solo, diminuindo consideravelmente a poluição do local, principalmente nas áreas que sofrem com a inserção constante de agroquímicos (ALENCAR, 2020).

Um dos métodos utilizados para analisar a atividade microbiana em processo de biodegradação de um composto, é o descrito por Bartha e Pramer (1965), o qual consiste em um sistema semifechado com duas câmaras, onde na primeira ocorre a biodegradação e a liberação de dióxido de carbono (CO_2), o qual é produto da descarboxilação de um substrato orgânico, sendo possível, com este método. O CO_2 produzido segue para a segunda câmara contendo hidróxido de potássio (KOH), solução na qual ele se solubiliza. Tal solução é titulada para que se quantifique a atividade metabólica de respiração aeróbia concluindo se a microbiota presente no solo é capaz de degradar o composto analisado (MELLO et al., 2007).

Com a análise microbiológica do solo também é possível analisar as diversas espécies que vivem ali, e que podem interagir com compostos poluentes. Assim, tendo a ciência de quais linhagens específicas são capazes de biodegradar substâncias, elas podem ser utilizadas em solo com a metodologia de bioaugmentação em consórcio com a inoculação desses microrganismos (BEE et al., 2015). Essas metodologias, em conjunto, consistem em uma das técnicas mais utilizadas na recuperação de áreas degradadas (JERÔNIMO et al., 2012; MARIANO, 2006; MONTAGNOLLI, 2015; TOMASSONI et al., 2014).

Existem outras diversas formas de analisar a relação da microbiota com um solo contaminado, e uma delas consiste nos testes feitos com os microrganismos na inserção de químicos em seus ambientes naturais. A microbiota do solo vive em constante interação entre as espécies existentes, sendo possível encontrar situações de sinergismo, antagonismo, mutualismo, parasitismo e saprofitismo (CANCHIS et al., 2020).

Nos ambientes reais encontramos relações complexas geradas pela diversidade microbiana, onde há um benefício metabólico quando temos diversas espécies microbianas processando um poluente (LOPES; ALBUQUERQUE, 2018). Devido ao fato dessa pesquisa tratar da mitigação de impactos ambientais utilizando microrganismos, ela terá como foco a análise de efeitos sinérgicos e antagônicos da microbiota presente na área analisada. O sinergismo como ferramenta utilizada em análises, consiste na relação de duas ou mais espécies de microrganismos, que juntas, potencializam o efeito da biodegradação de um ou mais poluentes do ambiente, já o antagonismo mostra-se presente quando os microrganismos estudados atuam melhor sozinhos do que em consórcio (PROCEDI, 2019).

Assim, o presente estudo avaliou a viabilidade do uso de linhagens microbianas para biorremediar um solo contaminado com o herbicida amicarbazone, e analisar os efeitos destas linhagens na promoção do crescimento de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*). Esse trabalho foi baseado na hipótese de que a inoculação de microrganismos degradadores do herbicida Amicarbazone, o qual é demasiadamente utilizado na cultura de cana-de-açúcar, poderia atuar na degradação deste agrotóxico promovendo a diminuição de impactos ambientais e, potencialmente, auxiliar no crescimento da cana-de-açúcar.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Histórico de utilização de agrotóxicos no Brasil

Os produtos agroquímicos, que englobam agrotóxicos e fertilizantes, aliados ao uso de maquinários especializados, constituem um elemento essencial na estratégia introduzida pela Revolução Verde nas décadas de 1960 e 1970. Essa abordagem tinha como principal objetivo impulsionar e aprimorar a agricultura, especialmente em regiões pouco exploradas do Brasil (ARAÚJO; MASCARENHAS; SILVA, 2020).

Navas, Hirai e Oliveira (2021) afirmam que especificamente no Brasil, houve uma ampla difusão do conceito de Revolução Verde na agricultura, sendo oferecidos incentivos para que os agricultores adotassem modelos agroquímicos. Como resultado, observou-se a expansão da monocultura, o avanço do desmatamento, a adoção de sementes transgênicas, a intensificação da exploração do solo, a exposição dos trabalhadores a substâncias tóxicas e o uso excessivo de produtos químicos.

Sendo assim, a Revolução Verde ficou conhecida por aumentar os níveis de produtividade no campo, por meio de mecanismos como o subsídio de créditos agrícolas, a influência das indústrias agroindustriais, as empresas de maquinaria (como tratores) e de produtos agroquímicos, e o estabelecimento de uma estrutura agrícola voltada para a exportação (DUTRA; SOUZA, 2017).

Com o intuito de impulsionar a produção de agroquímicos nacionalmente, foi implementado em 1975 o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas. Nesse programa, conforme afirmado por Porto e Soares (2012), o Governo Federal destinou mais de US\$ 200 milhões para a criação e desenvolvimento de indústrias nesse setor, resultando em mudanças substanciais na configuração da infraestrutura industrial do país.

Além disso, foi estabelecida uma conexão entre o crédito rural e a utilização desses produtos nas plantações, e a tributação sobre os produtos químicos foi deliberadamente reduzida. Esses fatores, combinados com a ampliação das áreas agrícolas do país e influenciados por outros elementos, incluindo a estabilização da moeda durante os anos 1990, culminaram na transformação do Brasil em um dos maiores consumidores de agrotóxicos em escala global (ARAÚJO; MASCARENHAS; SILVA, 2020).

Em 2022, o setor agropecuário contribuiu com R\$ 675,5 bilhões do Produto Interno Bruto (PIB) (IBGE, 2023). No período de 2019 a 2022, aproximadamente dois mil novos produtos agrotóxicos receberam autorização para serem comercializados no Brasil, conforme informado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) (PASSOS, 2023).

Dos 504 ingredientes ativos dos defensivos agrícolas com aprovação para uso no país até agosto de 2022, um total de 107 (21,2%) provém de fontes biológicas, como microrganismos, semioquímicos e feromônios, enquanto os restantes 397 são compostos químicos fabricados industrialmente. Dentro desse grupo, 146 ingredientes (36,8%) não eram autorizados para uso na União Europeia (HESS; NODARI, 2022).

Diante desse cenário, segundo Navas, Hirai e Oliveira (2021) não se pode ignorar que há um reduzido número de corporações globais que domina o setor de cultivos e produtos agroquímicos, uma realidade que culmina na centralização de poder e, até mesmo, na capacidade de moldar as regulamentações e políticas dos países. Isso estabelece as bases para a consolidação do modelo de produção alimentar (e biocombustíveis) que se apoia nesse conjunto tecnológico, cujos efeitos sociais e ambientais muitas vezes são negligenciados. Especialmente à luz da exaltada expansão do agronegócio e do constante apelo pela necessidade de aumentar a produção de alimentos a um custo menor, essa dinâmica merece atenção.

Nesse contexto, particularmente quando se trata dos agrotóxicos, embora haja uma ampla investigação dos potenciais impactos na saúde humana e no ecossistema através de vários estudos, não é evidente uma trajetória definitiva em relação à transformação desse padrão de produção. Esse modelo foi adotado pela indústria agropecuária brasileira, seguindo a tendência que também foi implementada em outras nações (ARAÚJO; MASCARENHAS; SILVA, 2020).

2.2 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são amplamente utilizados na agricultura para reduzir o ataque de insetos, pragas e para minimizar as perdas na produção agrícola. Nesse contexto, o solo, como resultado da interação com seu meio, tende a alcançar um equilíbrio natural, que se transforma quando algum dos componentes de seu ambiente varia. Todavia, é com a intervenção direta do homem, com o uso de agrotóxicos, que é possível evidenciar os prejuízos, incluindo o impacto do solo, com a sua modificação e degradação (OLIVEIRA et al., 2018).

Interessante notar que Carvalho e Podolan (2022) consideram o agrotóxico como um agente politraumático, uma vez que possui a capacidade de induzir danos em diversos tipos de ambientes de maneira simultânea: (I) no ambiente natural, quando contamina solos e os rios, por exemplo; (II) no ambiente artificial, ao se espalhar pelo ar sobre pequenas comunidades próximas a áreas de cultivo; e (III) no meio ambiente cultural, ao prejudicar ecossistemas naturais, impactando negativamente o ecoturismo. Além disso, essa substância também chega à mesa da população, que muitas vezes desconhece a nocividade dos produtos usados na

produção dos alimentos. Por último, é inegável que também afeta (IV) o ambiente de trabalho, comprometendo a saúde e a vida de milhões de trabalhadores e suas famílias.

O solo é um componente imprescindível do meio ambiente, justamente porque é a partir dele que a vida se desenvolve, razão pela qual é considerado um recurso essencial. Esse recurso é empregado para os mais diversos fins: cultivo, pecuária, florestas, mineração, dentre outras atividades. Nesse viés, pode-se afirmar que a terra fornece importantes funções ambientais, dentre elas estão às atividades agrícolas, armazenamento de nutrientes, além de abrigar matéria orgânica de restos de animais e plantas, portanto, o solo é considerado um sistema em transformação (DUTRA; SOUZA, 2017).

Entretanto, as características do solo podem se transformar em decorrência, sobretudo da agricultura, pois cada vez mais se faz uso de agrotóxicos para obter alimentos em larga escala e para o processamento de produtos químicos, como o etanol. Além da exposição de solos a compostos poluentes, o ser humano tem enfrentado crescente contato a um maior número de xenobióticos, caracterizado por substâncias químicas presentes no ambiente em concentrações não naturais, sendo compostos químicos alheios ao sistema biológico. Kustner, Suarez e Ramos (2018) elucidam que a exposição a agentes químicos ambientais pode levar a mudanças prejudiciais nos processos de reprodução, funcionamento e/ou comportamental do homem, com provável influência em muitas manifestações patológicas.

2.3 Exposição à xenobióticos

As atividades produtivas usam a exposição à xenobióticos consideravelmente, situação que está levando a uma degradação cada vez maior. Morales e González (2021) sublinham que esta exposição é praticamente inevitável, no cotidiano, pois são ingeridos alimentos como frutas e vegetais, água e bebidas como refrigerantes, vinhos e sucos que possuem resíduos de xenobióticos. Observa-se que nas últimas décadas, a presença de xenobióticos aumentou consideravelmente devido à expansão urbana e às atividades humanas, principalmente afetando a água e solo. As fontes de contaminação por xenobióticos são variadas e englobam: (I) setores da indústria química e farmacêutica, (II) processos de branqueamento de celulose, (III) a liberação de resíduos provenientes da indústria de mineração, como metais pesados, (IV) acidentes que resultam em derramamentos da indústria do petróleo e (V) a emissão de agrotóxicos na prática da agricultura intensiva.

Nesse contexto, quando se trata dos efeitos dos agrotóxicos no solo, cabe destacar a degradação microbiana, e, conseqüentemente, como sua mortalidade reflete na baixa produtividade. Frente a isso, a degradação pode estar ligada a processos físicos, biológicos ou

químicos. Estudos que abordam a alteração ou perda das propriedades do solo chamam a atenção para a degradação biológica, pois se manifesta pela perda ou diminuição da microbiota e tem sido associada à degradação da matéria orgânica. Frente a isso, os compostos xenobióticos, podem causar a inativação e morte de microrganismos que estão presentes no solo (BORSOI et al., 2014).

2.4 Herbicida Amicarbazone

Em função do uso frequente de diversos agrotóxicos, os efeitos da degradação passam a ser visíveis, incluindo a contaminação do solo. Dentre muitos contaminantes existentes, está o herbicida amicarbazone, que pertence ao grupo químico das triazolinonas, sendo, sua aplicação, indicada na produção de cana-de-açúcar, uma vez que proporciona o controle das plantas daninhas dicotiledôneas e monocotiledôneas (TOLEDO et al., 2009).

Segundo Rodrigues e Almeida (2005) o amicarbazone tem como função inibir a fotossíntese das plantas daninhas, agindo na reação de Hill (fotossistema II), causando o bloqueio do transporte de elétrons, além de interromper a fixação de CO₂ e a produção de ATP e NADPH, sendo considerados componentes indispensáveis para o crescimento das plantas.

Por sua vez, Gimenes (2004) explica que o amicarbazone é um herbicida sistêmico que pertence ao grupo químico das triazolinonas e, conforme especifica o fabricante, é resistente à seca e possui significativo período residual. Sua solubilidade em água é elevada, da ordem de 4.600 ppm, bem como apresenta baixa a moderada capacidade de adsorção, variando entre 32,4 e 42,6 mg g⁻¹ de solo.

As aplicações de amicarbazone são divididas em pré-emergência, na qual ocorre à absorção pelas raízes com deslocamento via xilema pelo fluxo de transpiração, bem como a aplicação pós-emergência, prevalecendo à ação de contato, com predomínio da absorção foliar (TOLEDO et al., 2004).

Devido à grande quantidade de cana-de-açúcar produzida no território nacional, o amicarbazone tornou-se um componente de uso extensivo, evidenciando um grande potencial de risco ao meio ambiente, incluindo mudanças nas comunidades microbianas (TOLEDO et al., 2019). Somando-se a isso, conforme especificam Araldi et al. (2011), cada cultivo pode ter uma resposta distinta ao mesmo herbicida mesmo que na mesma concentração, tendo como implicações problemas de fitotoxicidade, por exemplo. Em situações envolvendo a cana-de-açúcar, há registros de diminuição na produtividade do canavial.

Essa intoxicação, a depender do tipo e das características do herbicida usado, além de prejudicar a fotossíntese em sua fase inicial (transporte de elétrons no fotossistema II), pode

afetar a produção e a qualidade da matéria-prima da cana-de-açúcar (VELINI et al., 2000). Por essas razões, é necessário identificar métodos sustentáveis e eficientes para mitigar esses impactos ambientais.

2.5 Biorremediação

Para mitigar esses impactos ambientais, o uso de linhagens microbianas para biorremediar um solo contaminado com o herbicida torna-se um recurso para a recuperação desses espaços, revertendo à degradação dos solos por meio da ação de microrganismos que faz a degradação de contaminantes sem a necessidade de utilizar produtos químicos, ou seja, trata-se de uma tecnologia sustentável, que implica na degradação ou transformação de moléculas poluentes em compostos menos tóxicos (MARIANO, 2006).

Dessa forma, a biorremediação foi identificada como uma técnica efetiva que elimina ou transforma diversos contaminantes em compostos menos prejudiciais, ou seja, o uso de agentes biológicos altera ou decompõe poluentes-alvo. Esse processo é considerado como uma alternativa plausível para o tratamento de matrizes contaminadas, como o solo (TOMASSONI et al., 2014).

A biorremediação pode acontecer de maneira intrínseca ou natural, sem interferência de tecnologias ativas de remediação. Por outro lado, ela pode ser bioestimulada com o implemento de nutrientes, oxigênio e surfactantes, bem como pode ser bioampliada (bioaumento) com a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (BISOGNIN et al., 2018). Mello, Morita e Manfredini (2008) frisam que a biorremediação é uma técnica que tem por finalidade o tratamento que utiliza organismos (bactérias, fungos, vegetais) para biodegradar, diminuir ou eliminar os contaminantes no solo. A sua aplicação é favorecida por ser ecologicamente apropriada, com custos baixos, simples aplicação em grande escala, baixo consumo de energia e não provoca alterações no equilíbrio dos ecossistemas, mantendo a conservação ambiental.

Nota-se, dessa forma, que a estratégia da biorremediação poderá minimizar os efeitos ambientais e participar de forma significativa na eliminação ou diminuição acentuada dos níveis de contaminação nos solos gerada pelo abuso de herbicidas empregados na agricultura. Diante dessa premissa, o desenvolvimento de estudos frente a essa tecnologia poderá oportunizar o aperfeiçoamento do uso dessa técnica, principalmente em um país com extensas áreas agrícolas, priorizando a minimização dos impactos ambientais e a descontaminação do solo (TOMASSONI et al., 2014).

Os elementos que compõem uma biorremediação efetiva são nitratos, fosfatos, sulfatos, formas amoniacais, H₂O, gás carbônico e outros produtos inorgânicos derivados do processo de mineralização. Estes compostos não proporcionam toxicidade e podem ser utilizados no ambiente sem prejudicar os organismos vivos, desde que com cautela (MARIANO, 2006).

Os procedimentos relativos à biorremediação podem receber a classificação conforme o tratamento e a fase adotada. A depender do local de tratamento, os processos de biorremediação são denominados *in situ* (situação em que é feito no próprio local) ou *ex situ* (quando ocorre a remoção do contaminante para tratamento em outro lugar). Para cada processo deve ser considerado qual tipo e quantidade de poluente, os valores para a execução, além da concentração final ao término do tratamento, porque é partir dessas especificidades que se possibilitará o posterior uso desse espaço (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Por conseguinte, para que a técnica de biorremediação produza bons resultados, é necessário haver entendimento relativo aos fatores específicos do lugar para que seja adotada a estratégia mais apropriada (atenuação natural, bioestimulação ou bioaumentação), a escolha do procedimento adequado vai depender das condições proporcionadas pelo local, da estrutura da comunidade microbiana e da toxidade presente do composto químico (TOMASSONI et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade do uso de linhagens microbianas, em culturas puras e consórcios, para a biorremediação de um solo do cultivo de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) contaminado com o herbicida amicarbazone, além dos potenciais efeitos de promoção de crescimento da cana-de-açúcar.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e bioprospectar nos grupos microbianos predominantes das amostras ambientais as linhagens com potencial para a biodegradação de amicarbazone;
- Determinar os efeitos sinérgicos dos isolados microbianos de solo entre si e com o herbicida;
- Determinar possíveis efeitos antagônicos entre os isolados;
- Investigar as condições de estabelecimento de nicho das linhagens selecionadas na rizosfera de *Saccharum officinarum*;
- Quantificar os efeitos das linhagens sobre a promoção do crescimento da *Saccharum officinarum*.
- Analisar a degradação pelas linhagens selecionadas em relação ao crescimento de *Ipomoea purpurea*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO SOLO

As amostras de solo foram coletadas da área de plantação de cana-de-açúcar da Universidade Federal de São Carlos – *campus* de Araras ($22^{\circ}18'56.2''\text{S}$ $47^{\circ}22'53.4''\text{W}$), como mostra o marcador vermelho na **Figura 1**. O critério para a escolha deste local foi o fato do solo dispor do intenso cultivo de cana-de-açúcar possuindo, assim, uma microbiota adaptada a esta cultura, além do herbicida estudado ser utilizado no local.

Figura 1: Área de coleta das amostras.



Fonte: Maxar Technologies, 2021.

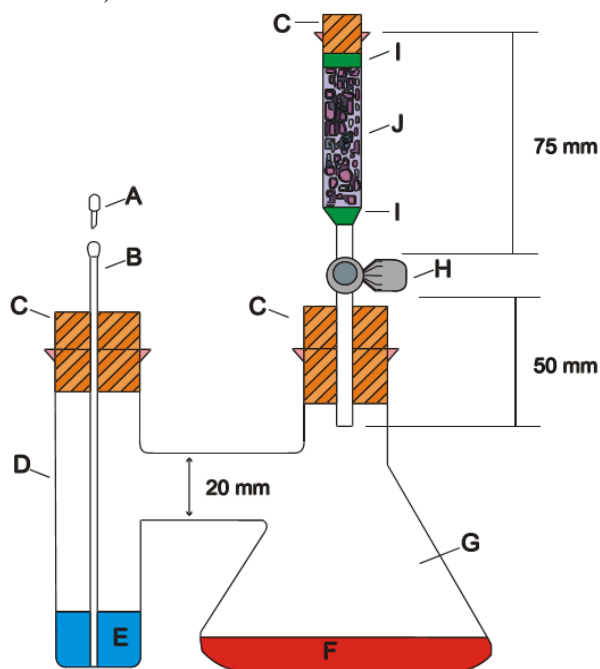
Foi coletada uma amostra de solo rizosférico classificado por Yoshida e Stolf (2016) como latossolo vermelho distroférico, o qual possui coloração avermelhada escura. Este foi coletado na época em que a cana-de-açúcar plantada na região estava em sua fase adulta com raízes firmes ao solo, em uma profundidade de 10 a 15 cm. Posteriormente o solo foi peneirado, para que se obtivesse a homogeneização do tamanho das partículas e retirada de possíveis detritos, como galhos, palhas da cana-de-açúcar, sujeiras, dentre outros.

4.2 RESPIROMETRIA

O método utilizado nesta etapa foi desenvolvido por Bartha e Pramer (1965) e teve como intuito realizar a obtenção de dados de CO_2 produzido a fim de que se pudesse quantificar a atividade microbiana dentro dos respirômetros, analisando a biodegradação do agrotóxico inserido (**Figura 2**) – CETESB (1990). A concentração de aplicação utilizada do herbicida foi

a de 200 mg/L, que advém de resultados preliminares, nos quais foi possível verificar que nesta concentração obteve-se uma elevada taxa de degradação por parte da microbiota presente no solo.

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: Solo analisado. 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.

O experimento foi realizado em triplicata, sendo três respirômetros denominados controle e três com a concentração selecionada do herbicida. Em cada uma das câmaras maiores (**Figura 2G**), foram adicionados 50 g de solo e 5 mL de água destilada para os três respirômetros Controle (**Figura 2F**). Já para os respirômetros nomeados de Grupo Herbicida 200 mg/L, foram também inserido 50 g de solo na câmara maior junto a 5 mL de uma solução com concentração de 200 mg/L de amicarbazone. Posteriormente, na câmara menor (**Figura 2D**), foram adicionados 10 mL de KOH, o qual foi produzido a partir da diluição de 11,2 g de KOH em 1000 mL de água isenta de CO₂ (ABNT 1999).

Após a montagem dos respirômetros, as válvulas foram devidamente fechadas, e os frascos permaneceram incubados em BOD a 30 °C, durante os 60 dias de experimento, sendo retirados apenas para a realização das leituras de CO₂ produzido, as quais foram realizadas a cada 7 dias, a partir do método de titulação (SIQUEIRA, 2021).

Os valores obtidos nas titulações de cada um dos respirômetros foram anotados, e após os 60 dias de experimento foram analisados. Primeiramente, foi realizado o cálculo de CO₂ gerado semanalmente através da **Equação 1** (ABNT 1999). Os resultados obtidos foram somados em sequência para se obter o valor de CO₂ acumulado, a fim de que a partir disso fosse possível elaborar uma curva referente a atividade microbiana em relação ao herbicida amicarbazone. Posteriormente, estes resultados foram inseridos na plataforma SigmaPlot 11.0 para a realização da análise estatística dos dados e criação dos gráficos referentes à respirometria, através de uma modelagem matemática descrita na **Equação 2** (MONTAGNOLLI, 2009).

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.

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

Fonte: Montagnolli, 2015.

Equação 2: Equação utilizada no SigmaPlot 11.0 para análise dos dados, na qual B é o CO₂ produzido, Bmax é a produção máxima de CO₂, Bo é a produção inicial de CO₂, r é a taxa máxima de produção associada à atividade microbiana e t é o tempo.

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

Fonte: Montagnolli, 2015.

Ao empregar a **Equação 2** para ajustar os dados cinéticos relativos à produção de CO₂, é proposto estabelecer o conceito do limiar de *Bmax* em 0,99 nesse contexto. Este valor é adotado como um modo pragmático, considerando que o *Bmax* teórico é representativo do ponto de saturação máxima do sistema. Em outras palavras, é um valor conceitualmente atingido em um ponto infinito no tempo. A escolha do limiar de 0,99 assegura uma aproximação ao ponto efetivo de estabilização no processo de biodegradação, indicativo do momento em que a produção de CO₂ alcança um patamar constante. Esse parâmetro marca o encerramento do ciclo de biodegradação do herbicida amicarbazone, evidenciando uma produção de CO₂ que se aproxima do seu máximo prático, sugerindo que o sistema não está mais gerando quantidades de CO₂ significativas provenientes da degradação do herbicida. Essa escolha do limiar, portanto, proporciona uma representação mais precisa e significativa do comportamento da função conforme seu perfil sigmoidal.

Os dados obtidos foram modelados matematicamente com o objetivo de prever o comportamento da comunidade microbiana frente ao herbicida. O modelo preditivo proporciona informações importantes sobre a biodegradação, como a quantidade máxima de CO₂ gerada e a resposta metabólica da comunidade microbiana ao poluente. Além disso, a modelagem matemática permite a previsão do comportamento do sistema em diferentes concentrações de herbicida, identificando possíveis limitações ao processo de biodegradação. Essa abordagem é uma ferramenta valiosa para a interpretação dos resultados obtidos e o planejamento de experimentos futuros, promovendo uma melhor compreensão dos processos de biodegradação nos ensaios.

4.3 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

Para que fosse realizada a análise dos microrganismos degradantes, replicando exatamente o que ocorria nos respirômetros ao longo do tempo, também foram montados em mesma quantidade de frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 50 g de solo e a mesma quantidade de solutos apresentados na etapa acima. Os mesmos foram abertos a cada 15 dias, sendo retiradas 10 g de solo, as quais eram transferidas para outros frascos contendo 100 mL de solução salina (0,85%) autoclavados anteriormente para o posterior plaqueamento.

Após o processo de respirometria, 1 mL do conteúdo de cada frasco Erlenmeyer, separado com a amostra de solo na solução salina (0,85%), foi depositado em um tubo Falcon com 9 mL de meio nutriente Batata Dextrose (BD – glicose e infusão de batata, para que fossem mantidos em incubadora *shaker* (Solab) a 30°C com agitação de 100 rpm por 24 horas promovendo, assim, o aumento da quantidade de células. Posteriormente foi feita uma diluição seriada (10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵), sendo transferidos 100 µL, de cada tubo Falcon, para placas de Petri com meio nutriente BDA (Ágar Batata Dextrose) acrescido de cloranfenicol, a fim de inibir o crescimento de bactérias no meio pelo fato de se ter dado preferência ao estudo dos fungos (MADIGAN et al., 2016).

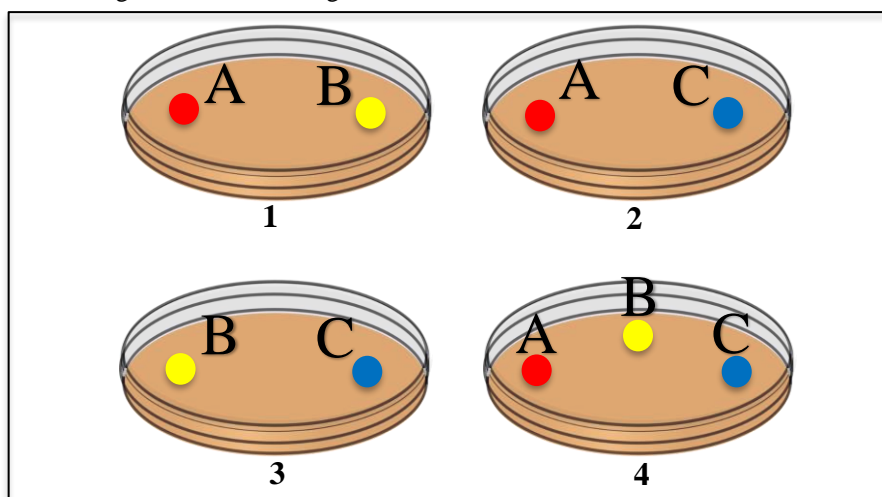
As placas de Petri foram mantidas em incubadora 30°C, e, então, foram observadas a partir de 48 horas. Quando as colônias começaram a crescer, elas foram observadas para que houvesse a seleção de três linhagens de microrganismos. Os principais requisitos para essa escolha foram a quantidade de colônias, o tamanho em diâmetro das colônias e as características morfológicas das mesmas, estando fora do escopo do trabalho a identificação das linhagens selecionadas. Após a seleção, as linhagens foram nomeadas como A, B e C, de acordo respectivamente com a persistência de crescimento, e, assim, utilizadas em todas as fases subsequentes deste trabalho, além de serem ferramentas de investigação em projetos futuros.

4.4 ENSAIOS DE ANTAGONISMO

Para esta etapa, foi utilizado o método de crescimento misto, no qual os microrganismos são cultivados simultaneamente no mesmo meio de cultura, permitindo a interação entre eles. Todos os aspectos foram avaliados, como a sobrevivência e o crescimento dos microrganismos, observando se há inibição de um dos microrganismos pelo outro ou se eles são capazes de coexistir (BEZERRA, 2022).

Para a realização destes testes, foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais receberam meio nutriente BDA para o crescimento dos microrganismos e uma alçada de cada uma das linhagens anteriormente isoladas, sendo, em seus versos, feitas divisões com caneta retroprojetor. As espécies foram testadas em consórcio, sendo os grupos denominados: linhagens A e B, linhagens A e C, linhagens B e C e, por fim, as linhagens A, B e C (**Figura 3**). Posterior à montagem, todas as placas foram envoltas em plástico filme PVC para evitar contaminação, e ficaram incubadas durante 5 dias a uma temperatura de 30°C em uma incubadora BOD (BEZERRA, 2021). Após o tempo de incubação, o desenvolvimento dos microrganismos foi analisado e fotografado para posterior análise desses resultados.

Figura 3: Esquema dos testes de antagonismo com as 3 linhagens microbianas (A, B e C). 1: linhagens A e B; 2: linhagens A e C; 3: linhagens B e C; 4: linhagens A, B e C.



Fonte: Autoria própria, 2023.

4.5 TESTES SINÉRGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Nesta etapa do trabalho foram realizados testes de colorimetria, método este que é capaz de avaliar a biodegradação baseado no indicador redox 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP), o qual fornece dados sobre a utilização de compostos químicos como fonte de energia por microrganismos (BIDOIA et al., 2010). Este indicador mede a atividade metabólica microbiana

que, quando exposta a um único substrato de interesse, promove a descoloração do DCPIP de forma diretamente correspondida a degradação do poluente estudado (MONTAGNOLLI, 2019).

O DCPIP é um indicador que tem sua coloração alterada quando é reduzido, passando de azul para incolor, assim, é possível analisar a atividade microbiana. Isso ocorre, pois a molécula do DCPIP possui nitrogênio, que funciona como um aceptor de elétrons o que determina a mudança de coloração (MONTAGNOLLI et al., 2015). No caso do presente trabalho, quando o herbicida é degradado o DCPIP recebe os elétrons interceptados quando liberados aos carreadores de elétrons ao longo das rotas metabólicas oxidativas ficando, assim, incolor.

Foram testadas as três linhagens microbianas previamente selecionadas individualmente e em consórcios distintos. Os experimentos foram observados durante 3 dias até que a solução mudasse de cor. Para a realização do ensaio, foi produzida uma solução do indicador DCPIP dissolvendo o reagente em água destilada autoclavada, obtendo-se uma solução de concentração 1 g/L, a qual foi homogeneizada e mantida em frasco âmbar protegida de luz.

Cada tubo de ensaio utilizado neste experimento foi esterilizado e tampado com algodão. Posteriormente, em cada um dos tubos foram pipetados 7,5 mL de meio mínimo salino BH (Bushnell Haas) preparado a partir de 1 L de uma base de tampão fosfato conforme os componentes da **Tabela 1**, bem como o herbicida amicarbazone na concentração de 200 mg/L, e as linhagens selecionadas.

Tabela 1 – Componentes para a produção do meio Bushnell Haas para ensaio colorimétrico.

	MgSO ₄ (g.L-1)	CaCl ₂ (g.L-1)	KH ₂ PO ₄ (g.L-1)	K ₂ HPO ₄ (g.L-1)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g.L-1)	FeCl ₃ (g.L-1)
Bushnell Haas	0,2	0,02	1,0	1,0	1,0	0,05

Fonte: Autoria própria, 2023.

A **Tabela 2** apresenta as concentrações de cada componente utilizado nos ensaios de colorimetria. Todas as soluções descritas foram colocadas nos tubos, que posteriormente, foram agitados em agitador de tubos (vórtex) por 30 segundos em alta rotação para homogeneização. Os tubos, então, foram armazenados em incubadora *Shaker* Solab a 28 °C, temperatura compatível com a variação sazonal média do solo amostrado, e com agitação de 180 rpm a fim de garantir biodisponibilidade do herbicida, além de se obter oxigenação contínua do conteúdo líquido dos frascos por dissolução, sendo observados por um período de

24 horas até a sua descoloração, sendo essa, posteriormente, classificada como: -, +, ++, +++ para nenhuma, pouca, média e completa descoloração respectivamente.

Tabela 2 – Tratamentos aplicados às linhagens selecionadas para colorimetria (indicador redox DCPIP) do processo de biodegradação de amicarbazone

ENSAIOS	DCPIP (µl)	MEIO (mL)	HERBICID A (µl)	INÓCULO A (alçada)	INÓCULO B (alçada)	INÓCULO C (alçada)
Controle DCPIP	400,0	7,5	-	-	-	-
Controle Herbicida	400,0	7,5	50,0	-	-	-
Controle A	400,0	7,5	-	1	-	-
Controle B	400,0	7,5	-	-	1	-
Controle C	400,0	7,5	-	-	-	1
Controle AB	400,0	7,5	-	1	1	-
Controle AC	400,0	7,5	-	1	-	1
Controle BC	400,0	7,5	-	-	1	1
Controle ABC	400,0	7,5	-	1	1	1
Isolado A + HERB	400,0	7,5	50,0	1	-	-
Isolado B + HERB	400,0	7,5	50,0	-	1	-
Isolado C + HERB	400,0	7,5	50,0	-	-	1
Isolado AB + HERB	400,0	7,5	50,0	1	1	-
Isolado AC + HERB	400,0	7,5	50,0	1	-	1
Isolado BC + HERB	400,0	7,5	50,0	-	1	1
Isolado ABC + HERB	400,0	7,5	50,0	1	1	1

Fonte: Autoria própria, 2023.

4.6 ADIÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS EM SOLO E INTERAÇÃO COM *Saccharum officinarum*

Para determinar o ambiente mais propício ao desenvolvimento das gemas de cana-de-açúcar, conduziu-se um teste para avaliar o progresso delas em relação a três tipos diferentes de solo: solo amostral, terra vegetal e solo amostral enriquecido com esterco bovino. O objetivo era identificar qual desses ambientes proporcionava o melhor crescimento das gemas. As bandejas de germinação utilizadas no plantio foram mantidas a uma temperatura de 38 °C em uma incubadora BOD, conforme descrito por Rodrigues (2013), sendo regados todos os dias

para manter a umidade do solo, monitorando-se o desenvolvimento das plântulas ao longo de um período de 10 dias.

Uma vez selecionado o substrato, iniciou-se o processo de adição dos microrganismos em solo. Para isso, precisou-se produzir soluções contendo uma concentração maior de células ($1,8 \times 10^9$ células em suspensão/mL) para posteriormente serem inoculadas. Para a produção dessas soluções foram colocadas 3 alçadas de cada linhagem em 40 mL de meio nutriente BD, sendo, no total 3 tubos Falcon para cada uma das linhagens. Os tubos já contendo os microrganismos foram mantidos por 24 horas em *shaker* (Solab) a 30 °C com agitação de 180 rpm. Posteriormente, as soluções foram centrifugadas e o meio descartado, para, assim, serem acrescentadas 10 mL de solução salina em cada um dos tubos, totalizando 30 mL de suspensão celular para cada uma das linhagens.

Ao todo foram 16 tratamentos (**Tabela 3**), sendo usados 5 células da bandeja para cada um, totalizando 80 células. Os tratamentos foram nomeados: Controle (solo e gema); Controle herbicida (solo, gema e herbicida); Controle das leveduras A, B e C (solo, gema e os isolados A, B e C respectivamente); Controle Sinérgico AB, AC, BC e ABC (solo, gema e os sinérgicos correspondentes); Levedura + Herbicida A, B, C (solo, gema, herbicida e isolados A, B e C, respectivamente); e por fim os Sinérgicos + Herbicida AB, AC, BC e ABC (solo, gema, os sinérgicos correspondentes e o herbicida). Bem como o teste anterior, os frascos também foram mantidos a 38 °C em BOD, e o desenvolvimento das plântulas foi analisado, bem como também foi realizado a medição do comprimento das mesmas no último dia de experimento. Posteriormente os dados obtidos foram analisados no software R (R CORE TEAM, versão 2023.06.1+524), no qual foi possível plotar os gráficos.

Tabela 3 – Esquema dos tratamentos realizados na etapa de adição dos microrganismos selecionados em solo.

	Água	Herbicida (200 mg/L)	Levedura A	Levedura B	Levedura C
Controle	X				
Controle Herbicida		X			
Controle A	X		X		
Controle B	X			X	
Controle C	X				X
Controle Sinérgico AB	X		X	X	
Controle Sinérgico AC	X		X		X
Controle Sinérgico BC	X			X	X

Fonte: Autoria própria, 2023.

Tabela 3 (continuação) – Esquema dos tratamentos realizados na etapa de adição dos microrganismos selecionados em solo.

Controle Sinérgico ABC	X		X	X	X
Levedura A + Herbicida		X	X		
Levedura B + Herbicida		X		X	
Levedura C + Herbicida		X			X
Sinérgico AB + Herbicida		X	X	X	
Sinérgico AC + Herbicida		X	X		X
Sinérgico BC + Herbicida		X		X	X
Sinérgico ABC + Herbicida		X	X	X	X

Fonte: Autoria própria, 2023.

4.7 ENSAIO DE COMPETÊNCIA DAS LINHAGENS NA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Nesta etapa o intuito foi verificar a eficácia e a persistência das linhagens microbianas inoculadas na rizosfera de cana-de-açúcar. Para isso, após a finalização da etapa acima, foi retirada uma porção do solo próximo a raiz de cada umas das gemas já germinadas. O produto obtido foi transferido para solução salina (0,85%), a fim de que todas as células se desprendessem. Posteriormente foi feita uma diluição seriada (10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}), das quais foram inoculados 100 µl em placas de Petri contendo meio nutriente BDA com cloranfenicol. As placas foram incubadas a 30°C em incubadora BOD e analisadas a partir de 48 horas.

Após o período de incubação, foi realizada a análise para verificar a presença e identificar as três linhagens microbianas previamente selecionadas e inoculadas na etapa anterior. Essa análise baseou-se na observação de suas características morfológicas. Os resultados obtidos foram essenciais para confirmar se os microrganismos escolhidos possuíam, de fato, a capacidade de persistir e estabelecer-se na rizosfera da cultura de cana-de-açúcar. O estudo dessa interação entre as linhagens microbianas e a planta cultivada foi importante para compreender o desenvolvimento da cultura, bem como para avaliar o potencial desses microrganismos como agentes benéficos e promotores do crescimento vegetal (CARDOSO e ANDREOTE, 2016).

4.8 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA PELAS LINHAGENS SELECIONADAS EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE *Ipomoea purpurea*

Foi realizado um ensaio em placas de Petri, contendo uma lâmina fina de solo, no qual foram inoculados os microrganismos selecionados e o herbicida. Esse ensaio analisou a velocidade de degradação do herbicida pelas linhagens selecionadas, levando em consideração a possibilidade de que ele não fosse rapidamente degradado antes mesmo de desempenhar seu papel. Devido ao fato de o amicarbazone ter como alvo principal variadas espécies, foi selecionada a corda de viola (*Ipomoea purpurea*) considerada uma daninha nas plantações de cana-de-açúcar. Assim, foram colocadas 5 sementes em cada uma das placas.

No total foram 16 tratamentos (**Tabela 4**), que foram denominados: controle, controle herbicida, A, B, C, AB, AC, BC, ABC, A + herbicida, B + herbicida, C + herbicida, AB + herbicida, AC + herbicida, BC + herbicida, ABC + herbicida, os quais tinham os microrganismos correspondentes e 1,5 mL da solução de 200 mg/L do herbicida estudado. Após a montagem dos ensaios, as placas foram embaladas em saco preto plástico, para não haver a interferência da luz no desenvolvimento das plantas, e levadas à estufa a 28 °C por 120 horas (RAS, 2009). É válido lembrar que a corda de viola é fotoblástica negativa, significando que o embalo das placas não trouxe nenhuma adversidade ao experimento.

Tabela 4 – Esquema dos tratamentos realizados na etapa de análise de degradação pelos microrganismos selecionados.

	Sementes	Solo	Água	Herbicida	Levedura A	Levedura B	Levedura C
Controle	X	X	X				
Controle Herbicida	X	X		X			
Controle A	X	X	X		X		
Controle B	X	X	X			X	
Controle C	X	X	X				X
Controle AB	X	X	X		X	X	
Controle AC	X	X	X		X		X
Controle BC	X	X	X			X	X
Controle ABC	X	X	X		X	X	X
A + herbicida	X	X		X	X		
B + herbicida	X	X		X		X	
C + herbicida	X	X		X			X
AB + herbicida	X	X		X	X	X	
AC + herbicida	X	X		X	X		X
BC + herbicida	X	X		X		X	X
ABC + herbicida	X	X		X	X	X	X

Fonte: Autoria própria, 2023.

Além disso, também foi realizado um teste que envolveu a medição dos hipocótilos e das raízes das plantas após a germinação. Neste teste, foram feitos três tratamentos distintos, os quais foram: o sinérgico composto pelos três microrganismos com a adição do herbicida em uma concentração de 200 mg/L, e dois grupos controle, sendo que um recebeu apenas água e outro submetido ao tratamento com o herbicida amicarbazone, também na concentração de 200 mg/L. Posteriormente os dados obtidos foram analisados no software R (R CORE TEAM, versão 2023.06.1+524), no qual foi possível plotar gráficos.

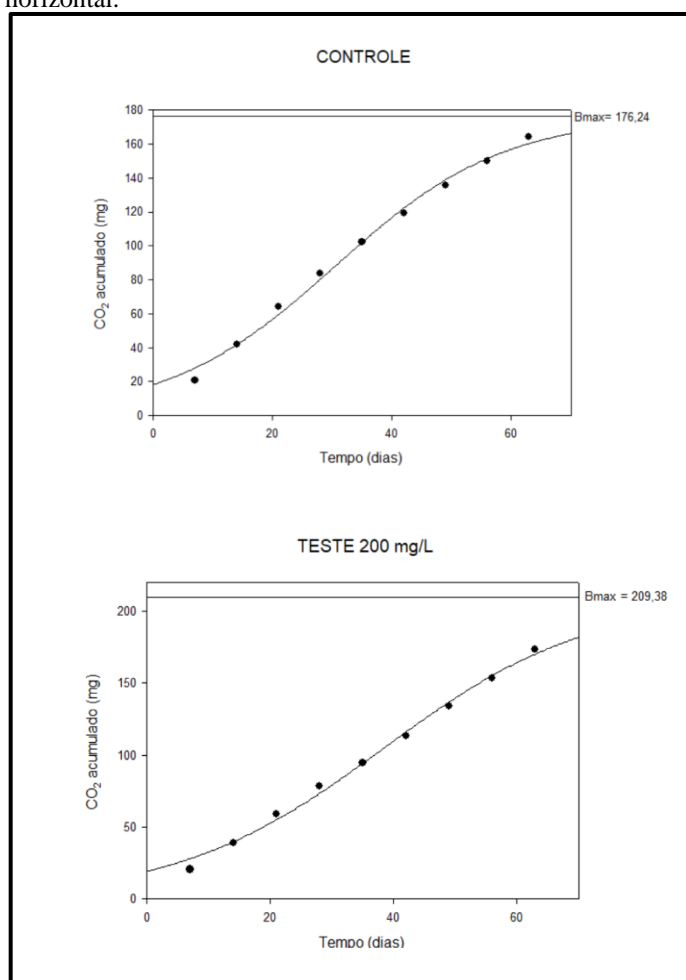
Dessa forma, tornou-se possível verificar, por meio da germinação ou ausência dela, se o aumento da quantidade de células das três linhagens previamente selecionadas no ambiente afetava a velocidade de degradação do herbicida no solo e, conseqüentemente, se provocava alguma adversidade no desenvolvimento das plântulas. Durante o estudo, pôde-se observar o crescimento e desenvolvimento das plântulas, permitindo uma melhor compreensão da capacidade de degradação dos microrganismos utilizados. Esses resultados são valiosos para avaliar a eficácia e segurança desses microrganismos como agentes de degradação do herbicida e seu potencial para aplicação em práticas agrícolas sustentáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESPIROMETRIA

Na **Figura 4**, pode-se observar a curva de aumento da biodegradação do herbicida por meio da análise de CO₂ acumulado, a qual está diretamente relacionada ao processo de decomposição do herbicida ao longo do experimento. Além disso, os gráficos da **Figura 4** apresentam a localização do *Bmax*, o que se trata da produção máxima prevista de CO₂, de acordo com o modelo cinético aplicado aos dados experimentais do período de 60 dias.

Figura 4: Produção acumulada de CO₂ no interior dos frascos respirométricos nos ensaios Controle (acima) e Teste 200 mg/L (abaixo). A curva corresponde ao ajuste ao modelo matemático. O valor limite para *Bmax* foi indicado por uma linha horizontal.



Fonte: Autoria própria, gerado pelo software SigmaPlot 11.0, 2023.

A partir da análise do perfil cinético de biodegradação, foi possível observar uma alta taxa de biodegradação no controle, resultado este que não era esperado. Contudo, devido ao fato de a amostra de solo ter sido coletada de uma área de intenso cultivo, levanta-se a hipótese

que a microbiota presente no solo utilizou da matéria orgânica (MO) presente como fonte de energia, liberando uma alta concentração de CO₂ (FIERER et al., 2003).

A observação da taxa de biodegradação do tratamento Grupo Herbicida 200 mg/L em comparação ao Controle, onde não foi adicionado o herbicida, é um importante resultado para a compreensão dos processos de biodegradação. O fato de que a taxa de produção de CO₂ foi maior no Grupo Herbicida 200 mg/L do que no Controle sugere que os microrganismos presentes no solo possuem a capacidade de degradar o herbicida. Além disso, essa observação pode levar a uma discussão mais ampla sobre o potencial de biodegradação de compostos químicos, e como a compreensão desses processos pode ser utilizada para aprimorar a remediação ambiental (RENER et al., 2022).

Além da taxa de CO₂ acumulado, também foi possível analisar outros parâmetros de ajuste da modelagem matemática utilizada. Na **Tabela 5** é possível observar informações como o *Bmax*, termo este que se refere ao ponto limite de degradação. É possível observar que a taxa de *Bmax* do Grupo herbicida (209,38 mg) é maior que a do Controle (176,24 mg), mostrando que a presença do herbicida aumenta a capacidade de degradação e da emissão de CO₂ pelos microrganismos presentes no solo.

O “T de *Bmax*”, que também é apresentado na **Tabela 5**, por sua vez, refere-se ao tempo que levaria de experimentação para se alcançar o *Bmax*, o qual para o primeiro tratamento levariam 68 dias para alcançar a taxa de *Bmax*, e para o segundo tratamento, precisaria de 65 dias. Sendo assim, considera-se que a atividade microbiana é mais intensa na presença do amicarbazone. Além disso, entender o tempo que o herbicida levaria para ser degradado é um dado extremamente importante para se levar em conta aplicações mais racionais em campo.

Tabela 5 – Parâmetros obtidos através dos experimentos de respirometria. *Bmax*: valor máximo de produção de CO₂; T de *Bmax*: quantidade de dias para alcançar o *Bmax*; R²: precisão dos ajustes dos dados; BO e B: produção inicial e final, respectivamente, de CO₂ ao longo do experimento.

	Controle	Teste (200mg/L)
<i>Bmax</i> (mg)	176,24	209,38
T de <i>Bmax</i> (dias)	68	65
R ²	0,9939	0,9943
BO (mg)	20,8	20,5
B (mg)	164,167	173,367

Fonte: Autoria própria, 2023.

O termo R² refere-se a precisão do ajuste dos dados ao modelo matemático realizado, o qual, quanto mais próximo de 1,0 melhor a exatidão dos resultados. Além disso, ainda é trazido

na **Tabela 5** outros dois termos. O primeiro deles é o BO, que significa o valor de produção inicial de CO₂. Como descrito, a taxa inicial do tratamento Controle foi de 20,8 mg. Já o tratamento Grupo Herbicida teve sua taxa de produção de CO₂ inicial em 20,5 mg, a qual foi menor que o Controle. Sendo assim entende-se que é mais fácil para a microbiota autóctone utilizar da matéria orgânica já presente no solo como de forma costumeira.

No entanto, a taxa de produção final de CO₂ teve o resultado inverso. Ainda na **Tabela 5**, o termo B refere-se as taxas finais de produção do CO₂, as quais foram 164,167 mg para o tratamento Controle e 173,367 mg para o Grupo Herbicida. Sinalizando então, que a atividade microbiana é maior na presença do herbicida, do que em comparação ao tratamento Controle, que apesar de possuir MO disponível, ainda assim possui uma menor taxa de degradação final.

Sendo assim, pôde-se concluir que mesmo que o desempenho em degradar o herbicida no início não tenha sido tão bom, ao final do experimento a maior taxa de produção de CO₂ ocorreu no tratamento que obtinha o amicarbazone, comprovando, mais uma vez, a capacidade dos microrganismos em degradá-lo.

Devido ao fato de os herbicidas serem amplamente utilizados na agricultura, a degradação de suas substâncias se faz extremamente importante. Através dos estudos realizados neste trabalho, bem como em outros encontrados na literatura (MEIRELLES et al., 2022; MORAIS FILHO; CORIOLANO, 2016; SOUSA, 2021), é possível se utilizar da capacidade metabólica dos microrganismos presentes no solo para sua remediação quando encontra-se contaminado por químicos.

Além disso, novos estudos na área de biodegradação de compostos são de extrema relevância, já que, a partir deles, é possível a descoberta e identificação de espécies de microrganismos, como nesta pesquisa, e, até mesmo plantas, na degradação de poluentes. É importante ressaltar que a microbiota é a primeira afetada na aplicação de agrotóxicos, sendo indispensável a conscientização para diminuição na utilização destes produtos e a constante busca por uma agricultura sustentável deve ser sempre colocada em pauta (MARTINS e SILVA, 2021).

5.2 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS

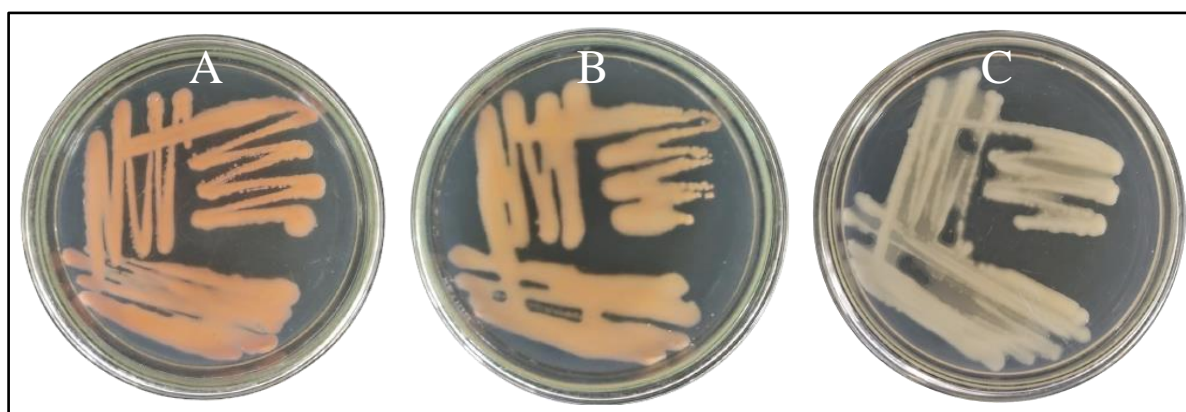
Após todo o processo de cultivo dos microrganismos presentes no solo coletado, os mesmos foram selecionados ao longo do tempo na comunidade microbiana autóctone. Como descrito acima, foi analisada a persistência de crescimento do microrganismo durante todo o processo. Foi possível identificar algumas espécies que persistiram ao longo dos dias, podendo identificá-las por conta das morfologias das colônias como tamanho, bordas (regulares ou

disformes), cor (rosada, avermelhado, esverdeada) e textura (filamentosa, rugosa, cremosa, entre outras).

A persistência de microrganismos em um processo de poluição de um determinado ambiente está ligada a diversos fatores, como temperatura, pH, umidade e principalmente a composição e concentração do poluente presente (ANDRADE, 2010). Vem crescendo o número de estudos que investigam a persistência de atividade microbiana em solos contaminados (ANDRADE; SILVEIRA, 2004; BRAGA, 2013; PORTILHO, 2014).

No contexto do delineamento experimental deste estudo, observou-se uma detecção significativamente maior de espécies de leveduras. Com base nessa observação, foram identificadas três linhagens proeminentes que foram nomeadas como A, B e C, conforme ilustrado na **Figura 5**.

Figura 5: Microrganismos selecionados e isolados, denominados A, B e C respectivamente.



Fonte: Autoria própria, 2023.

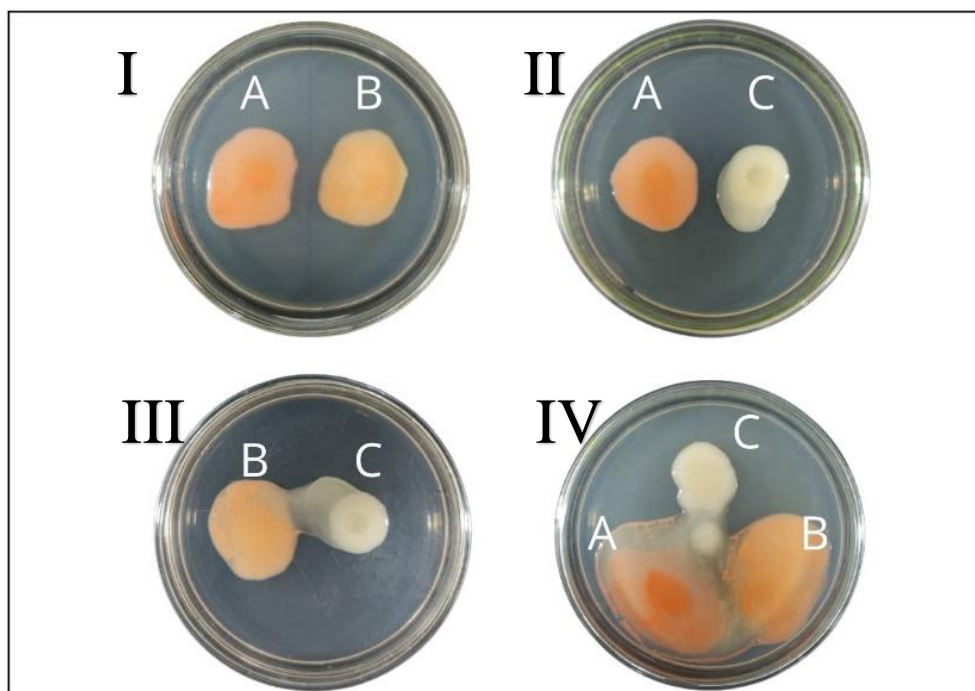
Já se tem conhecimento de algumas espécies de microrganismos com capacidade de sobreviver em solos contaminados como bactérias do gênero *Pseudomonas*, espécies diversas de leveduras, entre outros. Esses microrganismos, possuem alguns mecanismos de adaptação como produção de enzimas que degradam poluentes, produção de biofilmes que formam uma espécie de capa protetora, entre outras diversas adaptações (CAVALCANTE et al., 2022).

Após serem visualizadas em microscópio óptico, foi possível identificar que os microrganismos selecionados eram leveduras, pertencente a classe dos ascomicetos. Também se observou, como citado acima, que as linhagens B e C produzem uma espécie de um ‘gel’, o qual, acredita-se ser uma adaptação que permite que suas células persistam no ambiente. Após o completo isolamento dos microrganismos escolhidos, eles foram e ainda serão utilizados no presente trabalho.

5.3 ENSAIOS DE ANTAGONISMO

Após as 120 horas de incubação foi possível verificar a interação dos microrganismos (**Figura 6**), concluindo que eles não possuem interações antagônicas, mas sim interações sinérgicas. Foi possível verificar que nos tratamentos A com B e A com C não houve tanta interação entre os isolados, mas também não houve interferência em seus crescimentos. Em contrapartida, nos tratamentos B com C e no sinérgico A, B e C, foi possível verificar uma alta interação entre os microrganismos selecionados.

Figura 6: Resultado dos tratamentos do teste de antagonismo entre as linhagens selecionadas, sendo: linhagens A e B (I) sem interação ou competição, linhagens A e C (II) sem interação ou competição, linhagens B e C (III) com interação e, por fim o sinérgico das três linhagens A, B e C (IV) com interação.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Sabe-se que os microrganismos, assim como outros seres vivos interagem das mais diversas formas na natureza, com relações de competição, mutualismo, antagonismo, entre outras. Contudo, a interação entre os microrganismos em solo afeta diretamente a produtividade agrícola impactando a saúde do solo e plantas. Sendo assim, entender a relação que esses seres têm entre si e com o ambiente estudado, é importante, já que a partir dele é possível organizar-se e guiar as práticas agrícolas para opções mais sustentáveis (SANTOS et al., 2020). As linhagens aqui selecionadas se relacionaram de forma sinérgica, resultado este extremamente relevante para as etapas subsequentes da pesquisa.

A partir do que se observou nesta etapa do trabalho, foi possível verificar e comprovar que os microrganismos são capazes de coexistir no ambiente em que foram expostos, sem interferirem no crescimento uns dos outros. Diante deste contexto, a meta central da presente pesquisa se tornou ainda mais tangível, já que os indivíduos isolados apresentaram uma resposta positiva quando submetidos em um mesmo ambiente.

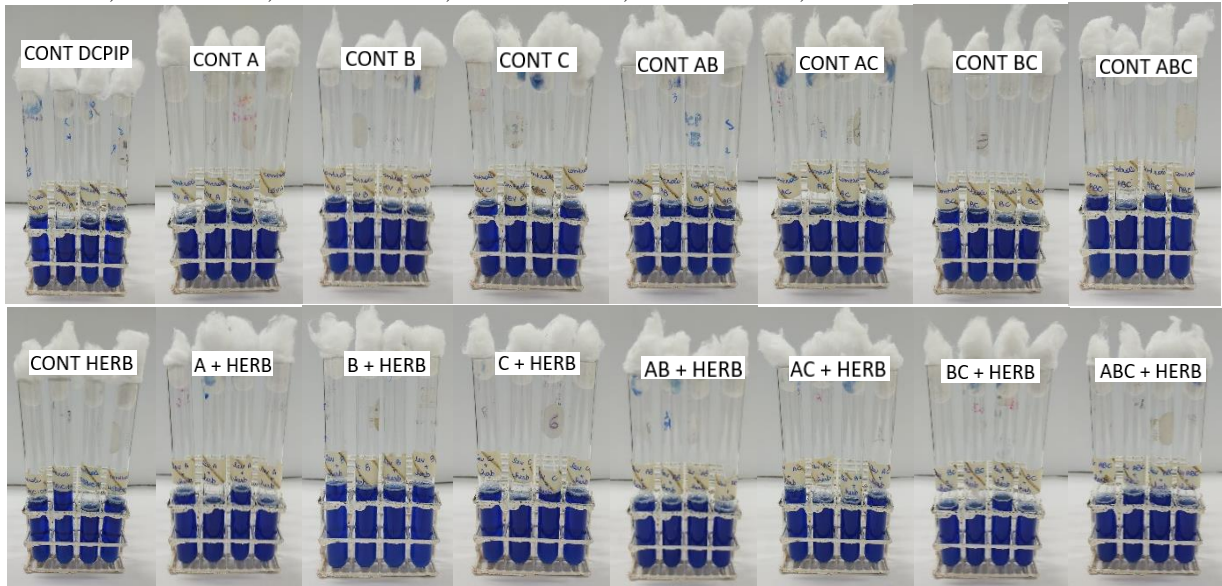
Testes como este são importantes, pois além de compreender como diversos microrganismos se comportam quando colocados no mesmo meio, competindo por espaço e alimento, também dão encorajamento na produção e desenvolvimento de novas tecnologias que permitam a análise da saúde do solo, em relação a atividade microbiana presente (SANTOS, 2020). Considerando as condições experimentais desta pesquisa e o fato de as linhagens selecionadas serem bioprospectadas para as etapas futuras no experimento visando sua compatibilidade com a cultura de cana-de-açúcar, pode-se afirmar que o teste foi bem-sucedido.

5.4 TESTES SINÉRGICOS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

Sabendo que os microrganismos não obtiveram comportamentos antagônicos, devido aos resultados da etapa 5.3, e que no ensaio de respirometria foi possível quantificar a produção de CO₂, nesta análise foi o momento de avaliar a capacidade de degradação do herbicida pelos isolados através da descoloração, ou seja, através do método colorimétrico. Após alguns testes pilotos, verificou-se que o tempo para a efetiva degradação do herbicida era de 24 horas, então, devido a isso, este ensaio foi padronizado a este período.

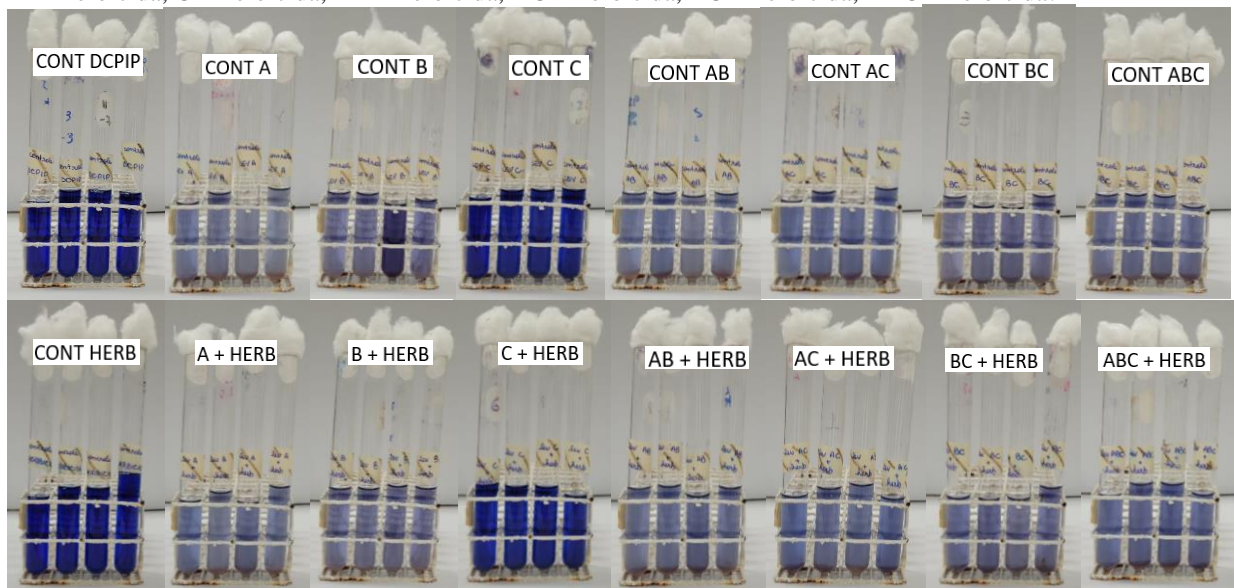
Após os testes serem devidamente montados (**Figura 7**), esperou-se o período de 24 horas, sendo possível observar a descoloração dos tubos (**Figura 8**). A partir disso, foi elaborada uma tabela (**Tabela 6**) para melhor compreensão dos resultados, facilitando a discussão dos mesmos.

Figura 7: Testes colorimétricos após a montagem na seguinte seqüência: controle DCPIP, controle A, controle B, controle C, controle AB, controle AC, controle BC, controle ABC, controle herbicida, A + herbicida, B + herbicida, C + herbicida, AB + herbicida, AC + herbicida, BC + herbicida, ABC + herbicida.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 8: Testes colorimétricos após 24 horas da montagem na seguinte seqüência: controle DCPIP, controle A, controle B, controle C, controle AB, controle AC, controle BC, controle ABC, controle herbicida, A + herbicida, B + herbicida, C + herbicida, AB + herbicida, AC + herbicida, BC + herbicida, ABC + herbicida.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Tabela 6 - Resultados dos tratamentos após as 24 horas, considerando – (destacado em vermelho) para falta de descoloração, + (destacado em roxo), ++ (destacado em azul) e +++ (destacado em verde) para pouco, média e muito descoloração respectivamente.

TRATAMENTOS	ATIVIDADE MICROBIANA	OBSERVAÇÃO
Controle DCPIP	-	-
Controle Herbicida	-	Herbicida não tem influência na descoloração do DCPIP
Controle A	++	-
Controle B	++	-
Controle C	+	-
Controle AB	++	Elevada turbidez
Controle AC	++	Média turbidez
Controle BC	++	Média turbidez
Controle ABC	+++	Elevada turbidez
A + HERB	+++	-
B + HERB	+++	-
C + HERB	+	-
AB + HERB	+++	-
AC + HERB	+++	-
BC + HERB	+++	-
ABC + HERB	+++	Pouca turbidez

Fonte: Autoria própria, 2023.

Após a elaboração da tabela foi possível observar que os tratamentos controles, contendo os isolados, também obtiveram uma descoloração relevante. Acredita-se que esse fenômeno ocorre devido ao processo pelo qual as células mortas presentes no ambiente servem como fonte de alimento para as células que ainda estão em atividade. Esse comportamento sugere uma adaptação das células em um ambiente onde os recursos nutricionais são escassos, já que o meio BH utilizado é considerado baixo em nutrientes, tendo apenas a função de manter a viabilidade dos microrganismos.

Os tratamentos contendo o herbicida foram os que obtiveram melhor descoloração, bem como transparência nos tubos, diferentemente dos grupos controles que ficaram turvos com o passar das horas. Entretanto, os dois tratamentos contendo a linhagem C não obtiveram descoloração alguma, ficando na mesma tonalidade que os controles (DCPIP e Herbicida), podendo-se afirmar que o microrganismo isolado não é capaz de degradar o herbicida. Além disso, também foi possível afirmar que o herbicida amicarbazone não tem nenhum tipo de interação com o DCPIP, já que os controles permaneceram corados até o fim do experimento.

A biodegradação de um composto químico no ambiente está condicionada à presença de uma população microbiana capaz de metabolizar tanto a molécula original quanto seus subprodutos de degradação (CÁUPER et al., 2021). Alguns poluentes podem ser biodegradados por microrganismos, ou ainda por meio da ação sinérgica de consórcios microbianos, nos quais

cada microrganismo atua individualmente em diferentes etapas do processo de biodegradação (GAYLARDE et al., 2005).

No contexto desta pesquisa, foi possível verificar bons resultados nos consórcios contendo apenas duas linhagens. No entanto, os resultados encontrados, concluem que o melhor obtido foi no consórcio dos três isolados, onde se teve maior e mais rápida descoloração. Sendo assim, a atividade associada entre as linhagens é promissora para o processo de biorremediação de um solo contaminado pelo herbicida amicarbazone.

Tais resultados corroboram a conclusão do teste de respirometria, sendo possível, desta vez visualmente, identificar rapidamente a biodegradação do agrotóxico estudado pelos microrganismos isolados do solo anteriormente contaminado. Sendo assim, o método de colorimetria utilizado foi de extrema importância, pois além de ser uma técnica de baixo custo e de fácil reprodutibilidade, é extremamente flexível, podendo ser usada em diversos estudos com as mais diversas substâncias e microrganismos.

5.5 ADIÇÃO DOS MICRORGANISMOS SELECIONADOS EM SOLO E INTERAÇÃO COM *Saccharum officinarum*

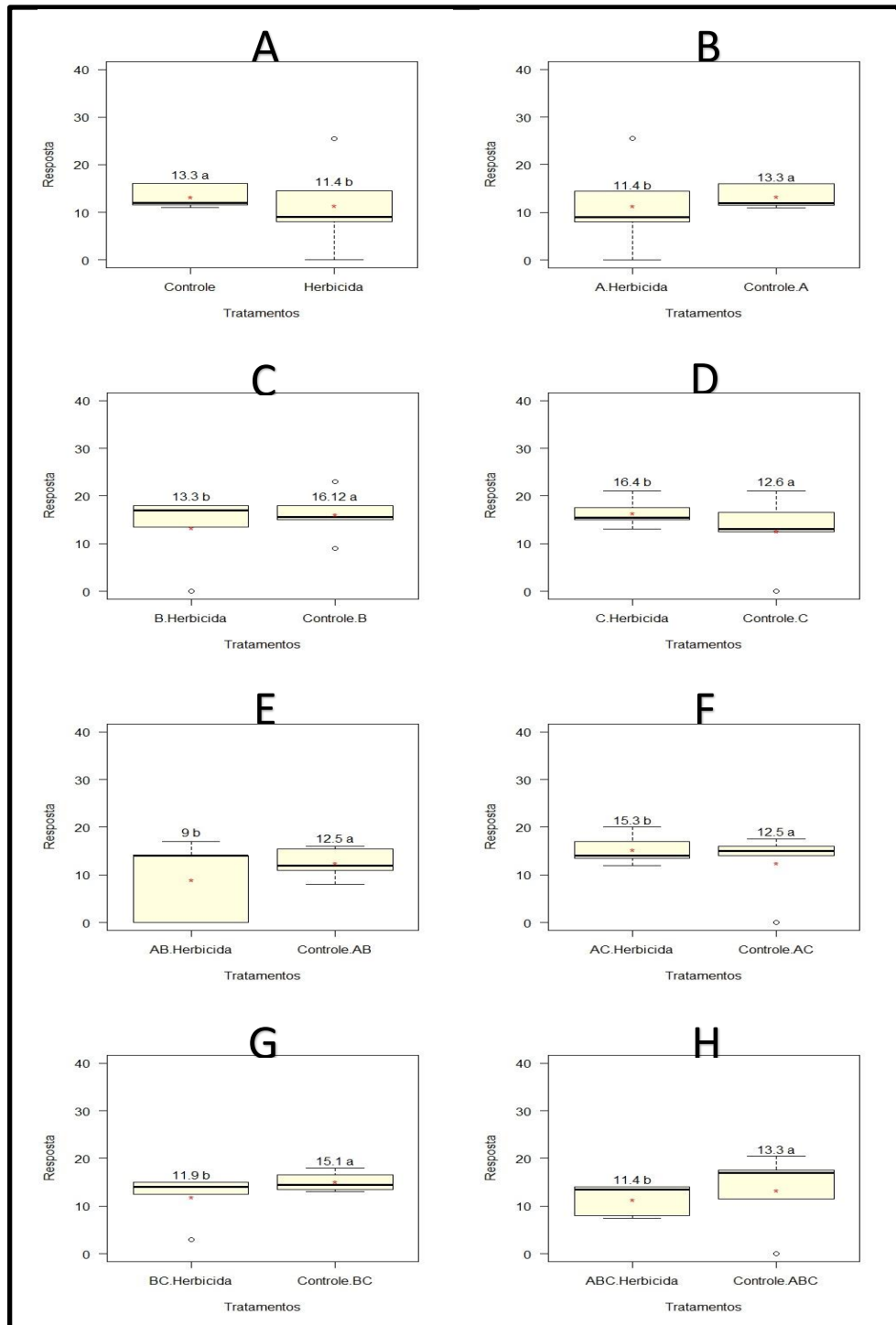
No estudo realizado sobre os tratamentos de controle (**Figura 9A**), foi possível observar que o herbicida impactou de forma negativa o desenvolvimento inicial da cana-de-açúcar, resultando em uma taxa média de germinação e crescimento das plântulas mais baixa. No tratamento envolvendo a levedura A (**Figura 9B**), observou-se que a combinação do microrganismo com o herbicida afetou negativamente o desenvolvimento da planta. De maneira similar, no caso do tratamento com a levedura B (**Figura 9C**), a combinação do microrganismo com o herbicida também prejudicou o progresso da planta.

Por outro lado, no tratamento envolvendo a levedura C (**Figura 9D**), foi observado um padrão oposto. A combinação do microrganismo com o herbicida resultou em um crescimento médio mais alto. Este tratamento exibiu a maior média de crescimento entre todos os tratamentos, superando os demais. No tratamento AB (**Figura 9E**), o grupo de controle, no qual não foram adicionados os microrganismos A e B, apresentou resultados superiores ao teste que foi submetido à adição do herbicida, o que acabou resultando no menor crescimento médio em comparação com todos os outros tratamentos realizados.

Ao analisar o tratamento AC (**Figura 9F**), o efeito sinérgico dos microrganismos A e C combinados com o herbicida apresentou um desenvolvimento da cana-de-açúcar melhorado em comparação com o grupo de controle sem o herbicida, bem como ocorreu no tratamento com a levedura C. Já os tratamentos BC e ABC (**Figura 9G e 9H**), indicaram, assim como outros

tratamentos descritos acima que a combinação dos microrganismos com o herbicida, impactou negativamente o crescimento da planta comparado com seus respectivos controles.

Figura 9: Comprimento das plântulas em diferentes condições de inoculações das linhagens selecionadas, sendo: A: controles e herbicida; B: tratamentos com a inoculação da levedura A; C: tratamentos com a inoculação da levedura B; D: tratamentos com a inoculação da levedura C; E: tratamentos com a inoculação das leveduras A e B; F: tratamentos com a inoculação das leveduras A e C; G: tratamentos com a inoculação das leveduras B e C; H: tratamentos com a inoculação das três linhagens de leveduras.



Fonte: Autoria própria, gerado pelo software R (R CORE TEAM, 2023.06.1+524), 2023.

Em resumo, o estudo destacou a complexa interação entre o herbicida e diferentes cepas de leveduras no que diz respeito ao desenvolvimento da cana-de-açúcar. A cepa de levedura C, quando combinada com o herbicida, teve um impacto positivo no crescimento, enquanto a presença conjunta de certos microrganismos com o herbicida geralmente resultou em resultados inferiores. Essas descobertas ressaltam a relação complexa entre as interações planta-microrganismo e agentes estressores externos, como herbicidas, em contextos agrícolas.

Em conclusão, os resultados deste estudo destacam a sensibilidade da gema de cana-de-açúcar ao herbicida e como essa sensibilidade é modulada pela presença de diferentes cepas de leveduras. Ficou evidente que o herbicida afeta significativamente o desenvolvimento inicial das plântulas, resultando em taxas de germinação e crescimento mais baixas. No entanto, essa influência pode variar dependendo da interação específica com as leveduras.

Enquanto as leveduras A e B parecem amplificar os efeitos prejudiciais à plântula, a levedura C mostrou um potencial notável para melhorar o desenvolvimento das plantas quando combinada com o herbicida. Essa resposta divergente destaca a complexidade das interações entre microrganismos e plantas, assim como a importância de considerar essas relações ao implementar estratégias de manejo agrícola, mesmo se tratando de um experimento em laboratório com condições controladas e baixa concentração utilizada do herbicida.

Em suma, a adição das leveduras A e B, tanto de forma isolada quanto em consórcio com o herbicida, resulta em um impacto negativo no desenvolvimento da planta. No entanto, a introdução da levedura C em conjunto com o herbicida apresenta um efeito definitivamente positivo, conduzindo a um significativo aumento no crescimento da planta.

Em um contexto mais amplo, esse estudo reforça a necessidade de uma abordagem holística para a agricultura, considerando não apenas os efeitos diretos dos produtos químicos, mas também os impactos das interações biológicas no ambiente agrícola. Isso poderia levar a práticas mais sustentáveis e eficazes de manejo de culturas, minimizando os efeitos negativos no ecossistema enquanto otimiza o rendimento das colheitas (DIAS; VIDAL, 2019).

5.6 ENSAIO DE COMPETÊNCIA DAS LINHAGENS NA RIZOSFERA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Sabe-se que a comunidade microbiana presente na rizosfera desempenha grandes efeitos na comunidade vegetal, agindo na produtividade e nas características gerais das plantas, trazendo uma resposta de retroalimentação que causa uma mudança da biomassa da comunidade microbiana (ZAK et al., 2003). Com isso, a planta acaba moldando a biomassa

microbiana que se aproxima das raízes, promovendo a intensificação de funções microbianas na rizosfera (CARDOSO; ANDREOTE, 2016).

A competência rizosférica é uma habilidade de microrganismos que se estabelecem na área próxima às raízes das plantas, conhecida como rizosfera, a qual possui um ambiente complexo onde ocorrem interações vitais entre plantas e microrganismos. Essa competência não apenas envolve ocupação de espaço, mas também interações com plantas e microrganismos, afetando a nutrição, crescimento e resistência das plantas. O estudo da competência rizosférica é fundamental para entender as relações cruciais entre plantas e microrganismos nesse ambiente específico (LOBO JUNIOR et al., 2019).

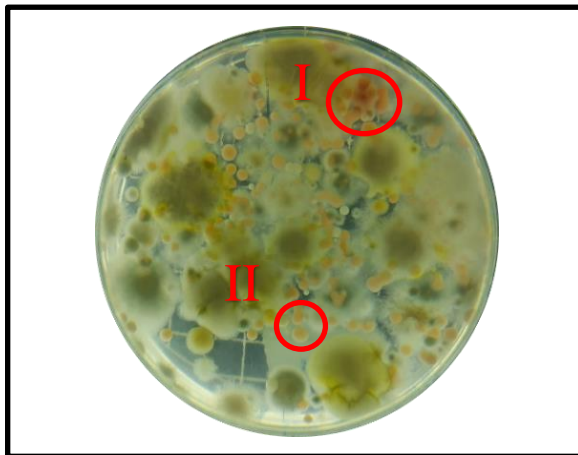
No âmbito deste estudo, os resultados obtidos revelaram diferenças no crescimento das diferentes cepas de leveduras avaliadas, destacando a influência da competência rizosférica nesse contexto. Foi notável que a levedura B (**Figura 10**) demonstrou um bom desempenho, tendo relevante destaque em seu crescimento, o qual foi significativamente superior em comparação com as outras cepas. Esse crescimento robusto da levedura B pode sugerir uma alta competência rizosférica, permitindo-lhe prosperar nas condições da rizosfera. Por outro lado, a cepa A exibiu um aumento de crescimento, embora mais modesto em comparação com a levedura B (**Figura 11**). Em contraste, a cepa C apresentou um crescimento praticamente insignificante, indicando uma possível falta de adaptação às interações rizosféricas.

Figura 10: Agrupamentos de colônias da levedura B se destacando, comprovando sua competência rizosférica.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Figura 11: Agrupamentos de colônias da levedura A (I) em menor quantidade, e B (II) em grande quantidade quando comparada com as outras duas cepas.



Fonte: Autoria própria, 2023.

Esses resultados, portanto, não apenas corroboram uma disparidade notável na capacidade de crescimento entre as diferentes leveduras testadas, mas também ressaltam a importância da competência rizosférica na determinação do sucesso ou insucesso desses microrganismos na rizosfera das plantas. A levedura B, por sua vez, pareceu capitalizar a competência rizosférica para sua vantagem, enquanto a cepa C demonstrou uma necessidade de adaptação ou interações mais favoráveis nesse ambiente específico.

5.7 ANÁLISE DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA PELAS LINHAGENS SELECIONADAS EM RELAÇÃO AO DESENVOLVIMENTO DE *Ipomoea purpurea*

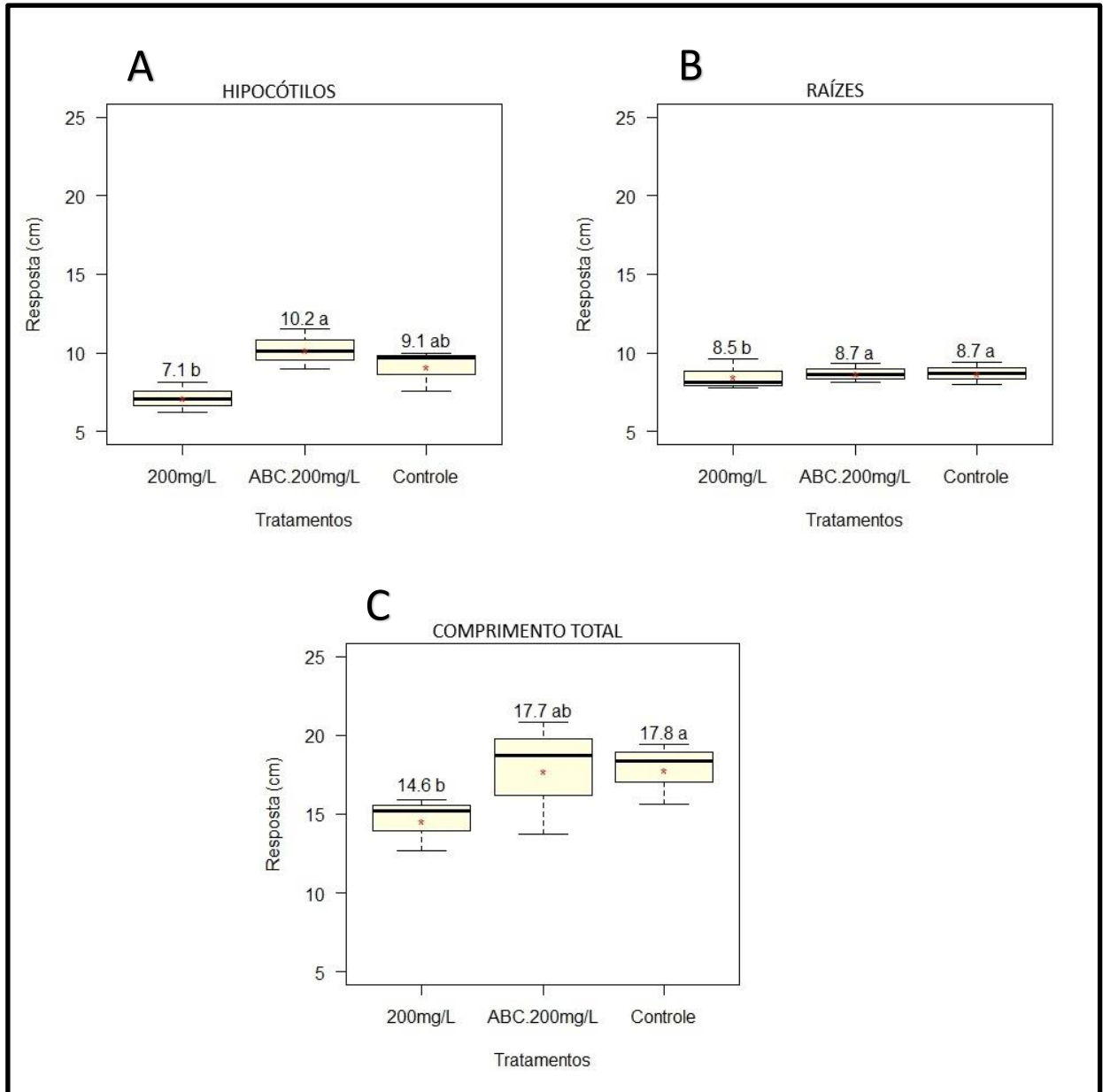
Ao examinarmos exclusivamente o crescimento dos hipocótilos (**Figura 12A**), observou-se que o tratamento que combinou os microrganismos com o herbicida apresentou os resultados mais promissores. Logo em seguida, o grupo de controle exibiu um desempenho relativamente bom. Por outro lado, o tratamento que consistiu apenas na aplicação do herbicida demonstrou a menor média de crescimento, o que estava em linha com as expectativas dadas as propriedades adversas do herbicida sobre a planta estudada (CARVALHO et al., 2011).

Quanto à avaliação das raízes isoladamente (**Figura 12B**), tanto o grupo controle quanto o tratamento que combinou o herbicida com os três microrganismos manifestaram médias de crescimento idênticas. Já o tratamento somente com o herbicida exibiu uma média menor que os anteriores, embora essa diferença não tenha sido tão significativa.

Ao considerarmos o comprimento total da planta (**Figura 12C**), que abrange tanto as raízes quanto os hipocótilos, fica evidente que o grupo controle alcançou a maior média de

desenvolvimento. O tratamento que envolveu a combinação do herbicida com os microrganismos seguiu em termos de desempenho, enquanto o tratamento baseado unicamente no herbicida registrou a menor média de crescimento.

Figura 12: Comprimento das plântulas nos diferentes tratamentos realizados sendo: A: trata-se dos resultados da medição dos hipocótilos das plantas; B: trata-se dos resultados da medição das raízes das plantas; C: trata-se dos resultados da medição completa, considerando a medida do hipocótilo e raiz das plantas.



Fonte: Autoria própria, gerado pelo software R (R CORE TEAM, 2023.06.1+524), 2023.

Esses resultados ressaltam a influência positiva da introdução dos microrganismos em conjunto com o herbicida, mitigando os efeitos negativos deste sobre o crescimento da planta. O grupo de controle, sem a exposição ao herbicida, demonstrou o desenvolvimento mais

robusto, destacando a importância da presença dos microrganismos no contexto do cultivo das plantas sob condições desafiadoras.

Em síntese, os resultados desta análise apontam para uma clara relação entre a presença de microrganismos, o uso do herbicida e o desenvolvimento da planta estudada. Ficou evidente que a introdução dos microrganismos em conjunto com o herbicida teve um efeito positivo sobre o crescimento dos hipocótilos, atenuando os efeitos negativos causados pelo herbicida quando usados isoladamente. Isso sugere uma potencial interação sinérgica entre os microrganismos e o herbicida, resultando em benefícios para o crescimento das plantas.

Quando focamos exclusivamente nas raízes, observamos uma tendência similar, onde os tratamentos que envolveram os microrganismos e o herbicida em conjunto alcançaram um nível de crescimento equiparável ao grupo de controle, indicando uma possível mitigação dos efeitos adversos do herbicida.

No que diz respeito ao comprimento total da planta, que considera tanto as raízes quanto os hipocótilos, destacou o grupo de controle como o de melhor desempenho, seguido pelo tratamento com os microrganismos e o herbicida. O tratamento com o herbicida isolado novamente apresentou a menor média de crescimento como era esperado.

Em última análise, esses resultados apontam para a importância da interação entre microrganismos e herbicidas no contexto do crescimento das plantas. Eles sugerem que essa interação pode ter um papel significativo em mitigar os efeitos negativos dos herbicidas e promover um desenvolvimento mais saudável das plantas (OLIVEIRA; BRIGHENTI, 2018). No entanto, mais estudos são necessários para compreender completamente os mecanismos subjacentes a essa interação e para explorar seu potencial em práticas agrícolas sustentáveis e eficazes.

6. CONCLUSÕES

Foi possível verificar nas curvas de respirometria o aumento da atividade microbiana na presença do herbicida amicarbazone, mostrando que a microbiota do solo agrícola tem pré-disposição para a biodegradação de agroquímicos, em especial o agrotóxico testado.

Os microrganismos selecionados não apresentavam interações antagônicas, mas sim sinérgicas, o que levou aos testes colorimétricos utilizando o indicador DCPIP. Verificou-se também que as linhagens selecionadas do solo são capazes de biodegradar o herbicida presente no ambiente, principalmente quando em consórcio.

A colaboração entre os microrganismos A e B revelou uma inibição no crescimento das gemas de cana-de-açúcar quando combinada com o herbicida, evidenciando a potencial sinergia de seus efeitos negativos. A inserção do microrganismo C no solo resultou na média de crescimento mais substancial das plantas, mesmo na coexistência com o herbicida. Esse resultado sugere que esse microrganismo possa não estar degradando o herbicida e, conseqüentemente, não esteja causando efeitos prejudiciais no crescimento das plantas, corroborando os resultados sobre a ausência de resposta de biodegradação do herbicida pela levedura C.

Já nos ensaios onde o capim corda-de-viola foi testado, foi revelado um efeito benéfico. A inoculação conjunta resultou em um aumento significativo no comprimento final das plântulas em comparação com os tratamentos que receberam apenas o herbicida. Sendo assim, conclui-se que os microrganismos podem ter desempenhado um papel fundamental na degradação do composto ativo do herbicida.

Os resultados sugerem o uso de microrganismos benéficos para mitigar os efeitos adversos dos herbicidas nas culturas, sendo necessárias investigações para compreender os mecanismos subjacentes a essas interações em diferentes contextos agrícolas. Ficou demonstrado o potencial dos estudos de biorremediação na agricultura, além da capacidade da microbiota existente no meio ambiente, sendo importante preservá-la e entender a relação que linhagens desenvolvem frente a poluentes.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, F. L. S. **Bioprospecção 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.
- ANDRADE, J. DE A., AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Rev. Ecl. Quím.**, São Paulo, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010. 2010.
- ANDRADE, S. A. L.; SILVEIRA, A. P. D. Biomassa e atividade microbianas do solo sob influência de chumbo e da rizosfera da soja micorrizada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [S.L.], v. 39, n. 12, p. 1191-1198, dez. 2004.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 14283**: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: Copyright, 1999. 8 p.
- ATLAS, R. N. Bioaugmentation to enhance microbial bioremediation. In: Biotreatment of industrial and hazardous waste. **Mcgraw-hill**, [s.l.], p. 19-38. 1993
- 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.
- BEE, A. et al. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL**, 28, 2015, Rio de Janeiro. Avaliação da bioaugmentação em solos contaminados com óleo diesel provenientes de postos de combustíveis. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental, 2015. p.15.
- BEZERRA, G. A et al. Seleção de bactérias promotoras de crescimento de plantas isoladas de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Agrárias**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 1757–1768, 2022. DOI: 10.5433/1679-0359.2022v43n4p1757.
- BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Formatex**, Rio Claro, p. 1277-1288, nov. 2010.
- BISOGNIN, R. P.; LOPEZ, D. A. R.; MULLER, M. V. G.; RIEGER, A. Análise do potencial microbiano de uma biopilha na biorremediação de solos contaminados por hidrocarbonetos de petróleo. **Rev. Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 3, p. 517-526, 2018.
- BORSOI, A. et al. Agrotóxicos: histórico, atualidades e meio ambiente. **Rev. Acta Iguazu**, v. 3, n. 1, p. 86-100, 2014.
- BRAGA, R. R., et al. Atividade microbiana de solos contaminados com Picloran e cultivados com *Urochloa brizantha*. Goiânia: **Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 17, 1 dez. 2013.
- CARDOSO, E. J. B. N; ANDREOTE, F. D. **Microbiologia do solo**. 2. ED. Piracicaba: ESALQ, 2016.
- CARVALHO, F. T.; QUEIROZ, J. R. G.; TOLEDO, R. E. B. Eficácia do herbicida amicarbazone no controle de cordas-de-viola na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum*

spp.). **Revista Brasileira de Herbicidas**, [S.l.], v. 10, n. 3, p. 183-189, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.rbherbicidas.com.br/index.php/rbh/article/view/102>>. Acesso em: Ago. 2023. doi:<https://doi.org/10.7824/rbh.v10i3.102>.

CÁUPER, L. L. B. et al. Potencial de biodegradação de petróleo por rizobactérias isoladas de solos Amazônicos, usando o indicador diclorofenol indofenol - DCPIP. **Educação Ambiental e Cidadania: Pesquisa e Práticas Contemporâneas**, [S.L.], v. 2, p. 246-256, 02 jun. 2021.

CAVALCANTE, F. et al. Actinobactérias benéficas do solo: potencialidades de uso como promotores de crescimento vegetal. **Enciclopédia Biosfera**. [S. l.], v. 19, n. 40, 2022. Disponível em: <https://conhecer.org.br/ojs/index.php/biosfera/article/view/5458>. Acesso em: 23 mar. 2023.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma técnica L6.350, 1990.

COLOMBINI, F. S. **Avaliação da vedura rizosférica *Torulaspora globosa* como indutora de resistência sistêmica em milho contra o patógeno *Fusarium verticillioides***. 2021. Trabalho de conclusão de curso – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos - SP, 2021.

CONTIERO, R.L.; BIFFE, D.F.; CATAPAN, V. **Tecnologia de Aplicação**. In: BRANDÃO FILHO, J.U.T.; FREITAS, P.S.L.; BERIAN, L.O.S.; GOTO, R.. Hortaliças-fruto. Maringá: EDUEM, 2018.

DEMARTELAERE, A. C. F. et al. Danos causados ao meio ambiente, animais e ao homem com a utilização de agrotóxico: revisão bibliográfica. **Brazilian Journal Of Development**, [S.L.], v. 7, n. 9, p. 94668-94695, 2021.

FIERER, N.; JACKSON, R. B.; VUONO, D. C.; GALLERY, R. E. Microbial biogeography: patterns in microbial diversity across space and time. **Nature Reviews Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.

GADANHOTO, B. P. **Controle biológico de fungos fitopatogênicos por *Phylosticta citricarpa* e sua aplicação para a biorremediação de solos contaminados por herbicida**. 2022. Tese (Mestrado em Agricultura e Ambiente) – Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências Agrárias, Araras/SP, 2022.

GAYLARDE, C. C., BELLINA, L. D. M., MANFIO, P. G. 2005. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Meio Ambiente: Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**. n. 34, 36-43

GIMENES, R. Dinamic: O novo herbicida da Hokko do Brasil para cana-deaçúcar. **Rev. STAB**, Piracicaba, v.22, n.4, p.23-24, 2004.

JERÔNIMO, C. E. M. et al. Bioaugmentação para degradação de efluentes do processamento da castanha de caju. **Holos**, Rio Grande do Norte, v. 3, n. 28, p. 47-59, 2012.

- LOBO JUNIOR, M et al. Uso de Trichoderma na cultura do feijão-comum. In: MEYER, Maurício Conrado et al. **Trichoderma: uso na aricultura**. Brasília: Embrapa, 2019. Cap. 17. p. 1-538.
- LOPES, C. V. A.; ALBUQUERQUE, G. S. C. de. Agrotóxicos e seus impactos na saúde humana e ambiental: uma revisão sistemática. **Rev. Saúde em Debate**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 117, p. 518-534, abr./jun., 2018.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. p. 1006. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente), Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro.
- MARTINS, R. S.; SILVA, E. A. Biodegradation of herbicides in soil: current knowledge and future perspectives. In: **Congresso Brasileiro de Ciência do Solo**, 36., 2021, Florianópolis. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2021. p. 1-10.
- MEIRELLES, G. B. et al. Conceitos e aplicações entre plantas e microrganismos na remediação de hidrocarbonetos. **Revista Estudo & Debate**, [S.L.], v. 29, n. 2, p. 149-159, 30 jun. 2022. <http://dx.doi.org/10.22410/issn.1983-036x.v29i2a2022.3085>.
- MELLO, G. S. L. de; MORITA, D. M.; MANFREDINI, S. Biodegradação de contaminantes orgânicos em latossolo. 2008, São Paulo: Programa de Pós-Graduação em Geografia Humana, 2008.
- 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.
- MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M, BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 297-305, 2009.
- MONTAGNOLLI, R. N., LOPES, P. R. M, BIDOIA, E. D Screening the Toxicity and Biodegradability of Petroleum Hydrocarbons by a Rapid Colorimetric Method. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 68, p. 342–353, 2015.
- MONTAGNOLLI, R. N. et al. Technical approaches to evaluate the surfactant-enhanced biodegradation of biodiesel and vegetable oils. **Environmental Monitoring And Assessment**, [S.L.], v. 191, n. 9, p. 565-582, 15 ago. 2019.

CORIOLOANO, A. C. F.; MORAIS FILHO, M. C. Biorremediação, uma alternativa na utilização em áreas degradadas pela indústria petrolífera. **Holos**, [S.L.], v. 7, p. 133-150, 12 nov. 2016.

OLIVEIRA, J. L. dos S.; LIMA, A. C. B. de; MININI, D.; SILVA, E. da. Usos, efeitos e potencial tóxico dos agrotóxicos na qualidade do solo. **Rev. Agrarian academy**, Goiânia, v.5, n. 9, p. 454-467, 2018.

OLIVEIRA, M. F.; BRIGHENTI, A. M. **Controle de Plantas Daninhas**: método físico, cultural, biológico e alelopatia. 21. ed Brasília: Embrapa, 2018. 198 p.

PORTILHO, I. I. R. et al. Persistência de inseticidas e parâmetros microbiológicos em solo sob sistemas de manejo. **Ciência Rural**, [S.L.], v. 45, n. 1, p. 22-28, 10 out. 2014.

PROCEDEI, A. Antagonismo e sinergismo na aplicação de herbicidas. + **Soja**, 2019. Disponível em: <<https://maissoja.com.br/antagonismo-e-sinergismo-na-aplicacao-de-herbicidas/>>. Acesso em: Outubro, 2021.

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

RENER, C. N. S. . et al. Caracterização do elemento químico arsênio e a biorremediação de solos contaminados. **Diversitas Journal**, [S. l.], v. 7, n. 2, 2022. DOI: 10.48017/dj.v7i2.2017. Disponível em: https://www.diversitasjournal.com.br/diversitas_journal/article/view/2017. Acesso em: 20 set. 2023.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. Londrina: Grafmake, 2005. RODRIGUES, C. Rede experimental do IAC (Instituto Agrônômico). **Canavieiros**, Sertãozinho/SP, nº 1, p. 28-41, fevereiro, 2013.

ROSA, C. A. et al. Metschnikowia: a case study of a successful yeast genus. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 37, n. 5, p. 393-410, 2010.

SANTOS, V. B. et al. Microbial interactions in the rhizosphere: implications for plant health and productivity. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 803-817, 2020.

SILVA, L. E. B. et al. Bioprospecção de fungos micorrízicos arbusculares em solos de cultivo de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em Girau do Ponciano Alagoas. **Diversitas Journal**, [s.l.], v. 4, n. 1, p. 05–14, 2019.

SIQUEIRA, B. Z. **Monitoramento da atividade microbiana e ensaios ecotoxicológicos com o pesticida Amicarbazone em solo agrícola**. 2021. Trabalho de conclusão de curso – Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de São Carlos - SP, 2021.

SOUZA, E. D.; CARNEIRO, M. A. C.; PAULINO, H. B. Atributos físicos de um Neossolo Quartzarênico e um Latossolo Vermelho sob diferentes sistemas de manejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, [s.l.], v. 40, n. 11, p. 1135-1139, Nov. 2005.

SOUZA, A. M. et al. Biodegradation of the herbicide glyphosate: pathways and mechanisms. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 1-15, 2021.

SPADOTTO, C. A, et al. **Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: Princípios e recomendações**. Jaguariúna, Embrapa Meio Ambiente, 2004.

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. **Rev. Planta daninha**, Viçosa-MG, v. 27, n. 2, p. 319–326, 2009.

TOMASSONI, F. et al. Técnica de biorremediação do solo. **Rev. Acta Iguazu**, Cascavel, v.3, n.3, p. 46-56, 2014.

VELINI, E. D.; MARTINS, D.; MANOEL, L. A.; MATSUOKA, S.; TRAVAIN, J. C.; CARVALHO, J. C. Avaliação da seletividade da mistura de oxyfluorfen e ametryne, aplicada em pré e pós-emergência, a dez variedades de cana-de-açúcar (cana planta). **Planta Daninha**, v. 18, n. 2, p. 123-134, 2000.

VIDAL, M.C.; DIAS, R.P. Bioinsumos a partir das contribuições da agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.18, n.1, p. 171-192, 2023. ISSN: 1980-9735. DOI: <https://doi.org/10.33240/rba.v18i1.23735>

YOSHIDA, F. A.; STOLF, R. Mapeamento digital de atributos e classes de solos da UFSCar - Araras/SP. **Ciência, Tecnologia & Ambiente**, Araras, v. 3, n. 1, p. 1-11, jul. 2016. Disponível em <https://www.revistacta.ufscar.br/index.php/revistacta/article/view/19/18>. Acesso em: Ago. 2023.

ZAK, D.R. et al. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links? **Ecology**, New York, v. 84, n. 8, p. 2042–2050, 2003.