

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL**

**EFEITO DO BIOESTÍMULO E DO BIOAUMENTO SOBRE A  
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLOS**

**EDNALDO AMARO DOS SANTOS FILHO**

**RECIFE**

**2014**

**EDNALDO AMARO DOS SANTOS FILHO**

**EFEITO DO BIOESTÍMULO E DO BIOAUMENTO SOBRE A  
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>Ester Ribeiro Gouveia  
Co-orientadora: Dr.<sup>a</sup>Fernanda Leitão Vaz

**RECIFE**

**2014**

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Santos Filho, Ednaldo Amaro dos

Efeito do bioestímulo e do bioaumento sobre biodegradação de paclobutrazol em solos / Ednaldo Amaro dos Santos Filhos. – Recife: O Autor, 2014.

60 folhas: il.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia

Coorientadora: Fernanda Leitão Vaz

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, 2014.

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas e solo 2. Produtos químicos agrícolas – Aspectos ambientais 3. Biodegradação I. Gouveia, Ester Ribeiro (orient.) II. Vaz, Fernanda Leitão (coorient.) III. Título.

631.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-105

**EDNALDO AMARO DOS SANTOS FILHO**

**EFEITO DO BIOESTÍMULO E DO BIOAUMENTO SOBRE A  
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes  
UFPB

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leonor Alves de Oliveira da Silva  
UFPE

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Ribeiro Gouveia  
UFPE

Recife, 25 de fevereiro de 2014.

Dedico este trabalho a minha família, por todo  
amor e incentivo que me foi concedido.

## **AGRADECIMENTOS**

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por tudo.

Agradeço a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para realização desta pesquisa, em especial:

Aos meus pais, Ednaldo e Ivone, e aos meus irmãos, Eleine, Fernanda, Robson, Alison e Erika pelo apoio, motivação e conforto que sempre me concederam;

À Maria Clara, que desde antes da seleção do mestrado acreditava na minha capacidade;

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ester Ribeiro Gouveia pela orientação, paciência e por ter concedido a oportunidade de trabalhar com o tema estudado;

À Dr.<sup>a</sup> Fernanda Leitão Vaz pela co-orientação, paciência e disponibilidade para ajudar em todas as horas que precisei;

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos, Bruno, Mariana, Caio, Jhonata, Davi pela amizade e grande ajuda no decorrer do trabalho;

Aos colegas do mestrado pela amizade e incentivo em todos os momentos difíceis;

Ao secretário do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial, Klayton Cabral da Silva, pela ajuda e presteza.

Obrigado!

## RESUMO

Paclobutrazol é um regulador do crescimento de plantas que tem baixa mobilidade no solo e, portanto se acumula. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do bioestímulo e do bioaumento na biodegradação de paclobutrazol em solos não saturados. Através da aplicação de um planejamento fatorial  $2^4$ , as influências da adição de glicerol, meio mineral, inóculo e o tipo de solo foram quantificadas. A adição de glicerol, meio mineral e inóculo aumentou a biodegradação. O maior crescimento foi obtido com adição de glicerol e meio mineral. O meio mineral foi o fator que apresentou o maior efeito sobre a biodegradação. O tipo de solo não foi significativo. Um modelo linear empírico para prever a eficácia do tratamento foi construído com base nos resultados do planejamento fatorial com o valor de  $R^2$  de 98,58 %. A biodegradação máxima (95-96%) foi obtida pela adição do meio mineral e inóculo para ambos os solos utilizados. A estratégia de bioestímulo pela adição do meio mineral foi mais eficiente do que o bioaumento independente do solo utilizado.

**Palavras-chave:** Paclobutrazol. Biodegradação. *Pseudomonas* spp. Planejamento fatorial.

## ABSTRACT

Paclobutrazol is growth regulator of plants that has low mobility in soil and therefore has accumulated. The aim of this study was to evaluate the effect of biostimulation and bioaugmentation on biodegradation of paclobutrazol in unsaturated soils. Batch experiments were conducted on the degradation of paclobutrazol in non saturated soils. By applying a 2<sup>4</sup> factorial design of experiments, the influence of addition of glycerol, mineral medium, inoculum and the kind of soil were quantified. Addition of glycerol, mineral medium and inoculum increased the biodegradation. Higher growth was obtained with addition of glycerol and mineral medium. Mineral medium was the factor that showed the highest effect on biodegradation. Kind of soil was the effect not significant. An empirical linear model predicting the treatment efficiency was built based on the results of the factorial design with an R<sup>2</sup> value of 98.58 %. Maximum biodegradation (95 - 96 %) was obtained with addition of mineral medium and inoculum for both soils utilized. The strategy for biostimulation with addition of the mineral medium was more efficient than the bioaugmentation independent of the soil used.

**Keywords:** Paclobutrazol. Biodegradation. *Pseudomonas* spp. Factorial design.

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	i
LISTA DE TABELAS .....	iii
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	3
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	4
3.1 PACLOBUTRAZOL.....	4
3.2 INDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO .....	7
3.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS COMPOSTOS AGROQUÍMICOS E IMPACTO AMBIENTAL.....	10
3.4 O PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO E AS TECNOLOGIAS .....	13
3.5 BIODEGRADAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM SOLOS .....	15
<b>3.5.1 Fatores que influenciam a biodegradação</b> .....	17
3.6 PLANEJAMENTO FATORIAL NA BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS .....	19
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
4.1 SOLOS .....	21
4.2 MEIOS DE CULTURA .....	22
4.3 MICRO-ORGANISMOS .....	22
4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	22
<b>4.4.1 Ensaios de biodegradação</b> .....	22
<b>4.4.2 Preparo do inóculo para o bioaumentação</b> .....	24
4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS.....	25
<b>4.5.1 Umidade</b> .....	25
<b>4.5.2 Granulometria dos solos</b> .....	26
<b>4.5.3 Capacidade de campo</b> .....	26
<b>4.5.4 Quantificação do pH em água</b> .....	27
<b>4.5.5 Quantificação do crescimento microbiano</b> .....	27
<b>4.5.6 Quantificação do paclobutrazol</b> .....	29
<b>4.5.7 Quantificação de ergosterol</b> .....	33

<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS .....	35
5.2 EFEITO DO GLICEROL, MEIO MINERAL, INÓCULO E DOIS SOLOS SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO, pH E BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL ...	37
5.3 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL .....	42
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	49
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	50

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 3.1</b>	Estrutura química do paclobutrazol	4
<b>Figura 3.2</b>	Plantação de mangueira do Vale do São Francisco	5
<b>Figura 3.3</b>	Aspecto da redução do vigor vegetativo	7
<b>Figura 3.4</b>	Origem e os diferentes destinos das enzimas nos solos	9
<b>Figura 4.1</b>	Coleta das amostras de solo ao redor de uma mangueira	21
<b>Figura 4.2</b>	Esquema de preparação do inóculo utilizado nos ensaios com bioaumento	25
<b>Figura 4.3</b>	Esquema da técnica de contagem de células viáveis em placas	28
<b>Figura 4.4</b>	Incubador rotativo utilizado na extração de PBZ dos solos	29
<b>Figura 4.5</b>	Filtração durante a preparação de amostras para quantificação do PBZ	30
<b>Figura 4.6</b>	Evaporação durante a preparação de amostras para quantificação do PBZ	30
<b>Figura 4.7</b>	Extração em fase sólida do PBZ	31
<b>Figura 4.8</b>	Cromatógrafo líquido utilizado na quantificação de PBZ	32
<b>Figura 4.9</b>	Cromatograma de uma amostra padrão da Sigma com o pico do PBZ em torno de 5 minutos	32
<b>Figura 4.10</b>	Cromatograma de uma amostra padrão com o pico do ergosterol	34
<b>Figura 5.1</b>	Crescimento da microbiota dos solos obtido em todos os ensaios do planejamento fatorial	37
<b>Figura 5.2</b>	Variação de pH dos solos obtido em todos os ensaios do planejamento fatorial	39
<b>Figura 5.3</b>	Biodegradação de paclobutrazol nas condições do planejamento fatorial	40
<b>Figura 5.4</b>	Superfície de resposta para $X_1$ (glicerol) e $X_2$ (meio mineral) sobre a biodegradação do PBZ	45
<b>Figura 5.5</b>	Superfície de resposta para $X_1$ (glicerol) e $X_3$ (inóculo) sobre a biodegradação do PBZ	46

**Figura 5.6** Superfície de resposta para  $X_2$  (meio mineral) e  $X_3$  (inóculo) sobre a biodegradação do PBZ

47

**LISTA DE TABELAS**

	Página
<b>Tabela 4.1</b> Fatores e níveis do planejamento fatorial	23
<b>Tabela 4.2</b> Condições experimentais dos ensaios do planejamento fatorial	24
<b>Tabela 5.1</b> Granulometria dos solos	35
<b>Tabela 5.2</b> Características químicas, físicas e biológicas dos solos	36
<b>Tabela 5.3</b> Crescimento, variação de pH e biodegradação nos ensaios do planejamento fatorial	42
<b>Tabela 5.4</b> Efeitos principais e de interação e coeficientes do modelo empírico sobre a biodegradação nos ensaios do planejamento fatorial	43
<b>Tabela 5.5</b> Análise de variância do modelo empírico	44

## 1 INTRODUÇÃO

A poluição ambiental pode ser apontada como um grande problema dos países desenvolvidos e em desenvolvimento. Atualmente, devido ao grande aumento na quantidade de substâncias que estão sendo constantemente liberadas no ambiente, em muitos casos, se ultrapassou a capacidade natural dos sistemas para transformar ou eliminar o excesso destes compostos, ocasionando assim uma alteração no equilíbrio ambiental (SISINNO; FILHO, 2013). Neste contexto, deve-se destacar que os agrotóxicos ocupam uma posição peculiar entre as muitas substâncias químicas produzidas e utilizadas pelo homem. O impacto causado por esses compostos gera um conflito entre a necessidade de manter um nível de atividade de agrotóxico no ambiente e o desejo de degradá-los em moléculas menos tóxicas (BAKER; HERSON, 1994).

Os reguladores de crescimento vegetal são compostos químicos sintéticos utilizados em sistemas agrícolas com o propósito de controlar o crescimento vegetativo, aumentando a capacidade reprodutiva da planta (SILVA et al., 2003a). No Brasil, segundo a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, os reguladores de crescimento vegetal também são considerados como agrotóxicos. Entre estes reguladores de crescimento está o paclobutrazol (PBZ) [(2RS, 3RS) - 1- (4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol], um composto muito utilizado em culturas de manga, cujo modo de ação é a inibição da síntese de giberelina (JACKSON et al., 1996). Esse composto é importante na cultura da manga para o controle do crescimento, redução da poda e facilita uma melhor manipulação do cultivo para expansão da produção (SILVA et al., 2003a; PEDROSA et al., 2008).

Jackson et al. (1996) reportaram que o paclobutrazol (PBZ) permanece no solo por vários anos, e que isso pode afetar o crescimento e desenvolvimento de colheitas subsequentes, principalmente pela redução do vigor vegetativo. Por ser estruturalmente similar aos triazóis o PBZ atua como fungicida, apresentando efeitos na microbiota do filoplano da mangueira (JACOBS; BERG, 2000). No solo, os fungicidas têm potencial de erradicar ou influenciar, em número e função, uma grande diversidade de micro-organismos deste ambiente. O maior ou menor efeito desses compostos na microbiota dependerá, porém, do tipo da molécula que está sendo utilizada. Determinados fungicidas exercem um maior efeito danoso sobre os micro-organismos não-alvos do solo (VIEIRA et al., 2004).

A biorremediação torna-se uma ferramenta atraente devido a seus custos e benefícios, constituindo-se como excelente alternativa para eliminar ou minimizar os efeitos dos

poluentes usando micro-organismos com potencialidades para biodegradação, sendo capazes de transformar os contaminantes em substâncias menos tóxicas ou mineralizando-os (CERQUEIRA et al., 2012; SATHISHKUMAR et al., 2008).

O bioestímulo e o bioaumento constituem-se como estratégias de biorremediação que utilizam micro-organismos e cuja aplicação isolada ou combinada poderá conduzir a uma rápida e completa degradação de poluentes. O bioestímulo tem por objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos micro-organismos degradadores da comunidade nativa de uma determinada região contaminada, através da adição de receptores de elétrons, nutrientes ou doadores de elétrons. O bioaumento consiste na adição de micro-organismos, pertencentes ou não à comunidade nativa, crescidos em laboratório e com capacidade para degradar o contaminante a remover (UETA et al., 2002).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do bioestímulo e do bioaumento sobre a biodegradação de paclobutrazol em solos não saturados com histórico de aplicação de paclobutrazol.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do bioestímulo e do bioaumentamento sobre a biodegradação de paclobutrazol em solos de duas regiões do semiárido nordestino.

### 2.2 Objetivos específicos

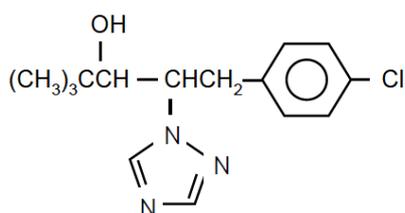
- Realizar a caracterização dos solos;
- Investigar a influência de uma fonte de carbono adicional;
- Avaliar a influência da adição do inóculo de uma cultura mista de linhagens de *Pseudomonas* spp.;
- Verificar a influência da adição de um meio mineral.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 PACLOBUTRAZOL

Os reguladores de crescimento vegetal são agroquímicos usados na agricultura e horticultura para o controle vegetativo e aumento do rendimento reprodutivo de plantas (VAZ 2006). O uso dessas substâncias adquiriu grande importância, pois possibilita modificar os processos que estimulam o florescimento e a subsequente produção de frutos em períodos de baixa oferta dos produtos nos mercados interno e externo (GROSSI, 2009).

Entre estas substâncias reguladoras do crescimento está o PBZ [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol] (Figura 3.1), cujo modo de ação é a inibição da síntese da giberelina. O composto ativo alcança os meristemas subapicais da planta inibindo a oxidação do caurenó para ácido caurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico. O resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo (SILVA et al., 2003a).



**Figura 3.1** – Estrutura química do paclobutrazol

Na Região Nordeste do Brasil, o uso de inibidores de crescimento como o paclobutrazol, tornou-se prática importante para a produção comercial de manga (FONSECA et al., 2004). De acordo com o IBGE 2012, no Brasil, a área plantada com manga na região do Vale do São Francisco (Figura 3.2) ultrapassou os 38.000 hectares em 2011, sendo aproximadamente 70 % desse total produzidos no Estado da Bahia. A produtividade média é aproximadamente 20 toneladas por hectare, sendo superior à média nacional de 16 toneladas. O Submédio do Vale do São Francisco responde por aproximadamente 80% do total exportado pelo País (BRASIL, 2012).



**Figura 3.2** - Plantação de mangueira do Vale do São Francisco (Fonte do autor)

Nas condições semiáridas do nordeste brasileiro, o efeito do PBZ para regular o crescimento vegetativo da mangueira tem sido estudado desde 1996, com adequação das doses, formas e épocas de aplicação, visando à possibilidade de escalonamento da produção da mangueira. Os trabalhos de pesquisa conduzidos com PBZ no Vale de São Francisco foram implantados em pomares da cv. Tommy Atkins e o produto comercial registrado para a cultura, em 2000, foi o Cultar, com 25 % de ingrediente ativo (MOUCO, 2008). Na região Sudeste, em Jaboticabal-SP (SANTOS et al., 2004) e Viçosa-MG (SIQUEIRA et al., 2004), foram realizados estudos com Citrus e em Palma-MG com morangueiro. Alguns estudos foram desenvolvidos utilizando o paclobutrazol numa ampla diversidade de culturas vegetais, tendo destaque à cultura de mangas na Índia (SHARMA; AWASTHI, 2005; SINGH; BHATTACHERJEE, 2005).

O paclobutrazol pode ser aplicado nas folhas ou diretamente no solo sendo absorvidos através das raízes, tecidos dos ramos e folhagem (TONGUMPAI et al., 1991; BURONDKAR; GUNJATE, 1993). Estudos mostram que a dosagem utilizada de PBZ varia de acordo com várias características da planta como: o tipo de cultivar, o porte e o estado nutricional. Delgado et al., (1986) verificou que a resposta referente ao aumento de produção de laranja ‘Valência’, está diretamente relacionada à quantidade aplicada de 2,5 e 10 gramas por planta. Iwahori e Tominaga (1986) utilizaram 1 g/L de paclobutrazol, em pulverização foliar, enquanto Mata et al., (1998) empregaram 0,8 g/L em tangerina ‘Ponkan’. Bausher e Yelenosky (1986), em experimento realizados em casa de vegetação com mudas de limão ‘Rugoso’, constataram efeitos visíveis no crescimento e desenvolvimento das plantas a partir

da concentração de 10 mg por litro de ingrediente ativo em pulverização foliar e da aplicação de 20 mg de paclobutrazol no substrato, em recipientes com capacidade de 2,5 L.

Vários estudos relataram alterações significativas nas plantas após a aplicação do paclobutrazol, por exemplo, alterações na área foliar, aumento nos teores de clorofila, maior espessura das folhas, maior crescimento radicular foram verificados por Fletcher et al. (2000). Redução no número de brotações e no comprimento dos ramos, encurtamento dos entrenós dos citros foram verificadas nos estudos de Snowball et al. (1994); Delgado et al. (1995); Okuda et al. (1996) e Mata et al. (1998).

Greenberg et al. (1993) com estudo de tangelo ‘Minneola’ tratado com paclobutrazol verificou que houve redução significativa no tamanho dos frutos, resultando em menor produtividade do cultivar. Mehouchi et al. (1996) a partir da pulverização com paclobutrazol em mudas de citrange ‘Carrizo’ observou reduções de 21 % na altura das plantas e 19 % a massa seca da parte aérea, quando comparados à testemunha. A redução na massa seca, bem como a produção de entrenós mais curtos, raízes curtas e finas, bem como diminuição nos teores de nutrientes minerais nas folhas de diversos porta-enxertos, também foram constatadas por Yelenoski et al. (1995). Lidon et al. (2001) verificou menor crescimento das plantas, formação de entrenós mais curtos e folhas menores, e alteração na densidade estomática e na transpiração após a aplicação de paclobutrazol em dois porta-enxertos de citros (*Citrus macrophylla* e *Citrus aurantium*).

O paclobutrazol é geralmente aplicado anualmente no solo, na zona das raízes, ou no dossel arbóreo, porém a aplicação no solo tem apresentado melhor eficiência (SINGH, 2000). Apesar da vantagem associada à produtividade, esse regulador de crescimento permanece ativo no solo por muitos anos, podendo afetar severamente o crescimento e o desenvolvimento dos cultivos subsequentes pela redução do vigor vegetativo (ATTYIA et al., 1983; HAMPTON, 1988). A Figura 3.3 apresenta um exemplo da redução do vigor vegetativo nas mangueiras tratadas com excesso de paclobutrazol. As duas plantas, apontadas com a seta, possuem a mesma idade das outras mangueiras mostradas na Figura 3.3, no entanto, os seus tamanhos são bem menores que os das outras.



**Figura 3.3** - Aspecto da redução do vigor vegetativo (VAZ, 2011)

Estudos têm demonstrado que a meia-vida do PBZ varia com o tipo de solo e as condições climáticas. Na Índia, Sharma e Awasthi (2005) verificaram que mangueiras tratadas com paclobutrazol por três anos consecutivos, nas concentrações de 5 a 10 g de ingrediente ativo por árvore, não apresentaram resíduos de PBZ nos frutos maduros, porém, foi verificado um aumento progressivo das concentrações de PBZ no solo, indicando caráter acumulativo. O mesmo acúmulo no solo foi observado por Singh e Bhattacharjee (2005).

Mcarthur e Eaton (1987) na cultura do morango observaram que os resíduos de paclobutrazol permaneciam ativos no solo por, pelo menos, onze meses após a última aplicação do produto. Segundo Costa et al. (2008) o PBZ pode ser lixiviado em solos arenosos com baixo teor de matéria orgânica e não é fotodegradado após exposição à luz do sol por 10 dias. De acordo com Silva et al. (2003c) o paclobutrazol é degradado aerobicamente no solo por um tempo de meia-vida em torno de 1-7 meses, dependendo do tipo de solo, e não se espera que sofra hidrólise quando depositado no meio ambiente.

### 3.2 INDICADORES DA QUALIDADE DO SOLO

Diversas ações antrópicas levam ao solo substâncias que podem melhorar suas propriedades físicas, químicas e biológicas (impacto positivo) ou causar poluição e contaminação (impacto negativo), como metais pesados e produtos orgânicos tóxicos de

difícil degradação (MELO et al., 2010). Para avaliar o nível de qualidade de um solo, tem-se buscado índices ou indicadores de qualidade que possam refletir alterações em função das atividades antrópicas.

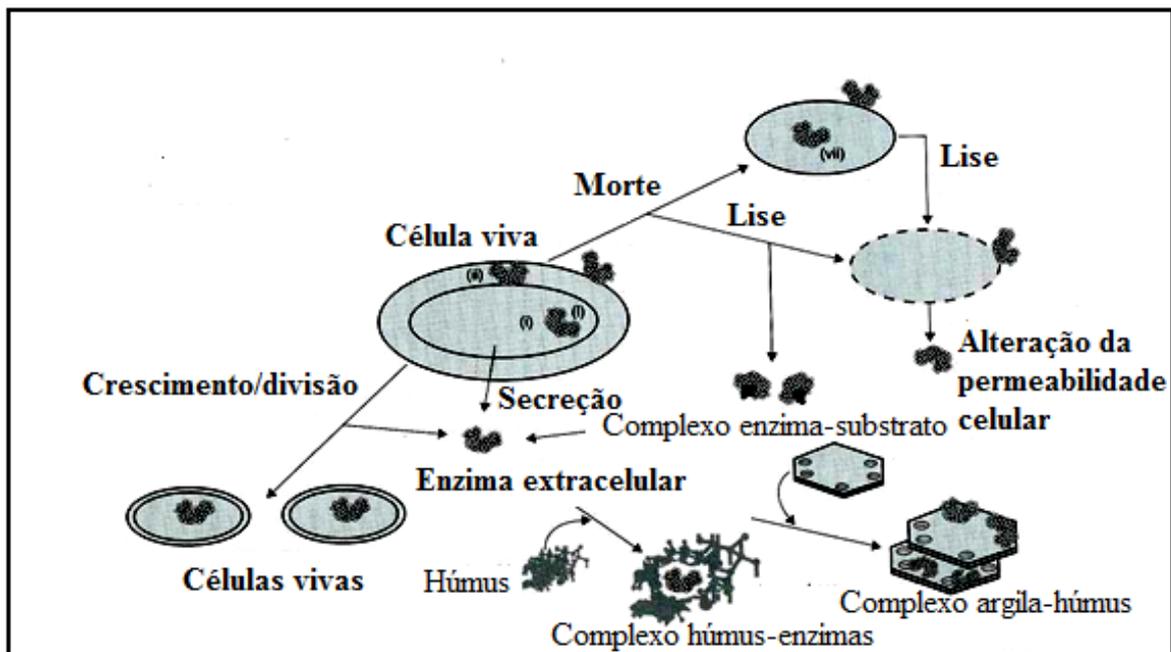
O solo é um sistema vivo, dinâmico e um recurso não renovável, cuja condição influencia a produção de alimentos, a eficiência ambiental e o balanço global (DICK et al., 1996). Segundo Doran e Parkin (1994) a qualidade do solo é definida como a capacidade do mesmo de funcionar dentro de um ecossistema de maneira a sustentar a produtividade biológica, manter a qualidade ambiental e promover a saúde vegetal e animal.

De acordo com Vezzani (2001) a maioria das avaliações da qualidade dos solos trata apenas de propriedades químicas, como conteúdo total de carbono orgânico e suas frações, conteúdo de nitrogênio, ou então atributos físicos, como agregação. Para Dexter (2004) parâmetros relacionados à dinâmica da água no solo também são usados para as avaliações da qualidade dos solos. Para ambos os autores citados anteriormente o conteúdo de carbono orgânico no solo é importante para avaliar a qualidade destes, mas poucas avaliações de qualidade do solo baseiam-se em análises microbiológicas do solo, embora a microbiota seja fundamental na ciclagem dos nutrientes neste ambiente (KENNEDY; PAPENDICK, 1995).

A seleção de indicadores que possibilitem a quantificação da qualidade do solo é de fundamental importância. Para o correto funcionamento do solo, um número imenso de propriedades físicas, químicas e biológicas está envolvido. Segundo Kennedy e Papendick (1995) as avaliações dos atributos biológicos tais como: a atividade das enzimas do solo e a diversidade e biomassa microbiana, se ajustam à maioria dos critérios para a seleção de indicadores de qualidade do solo. Isso se deve, principalmente, a sua capacidade de responder rapidamente a mudanças derivadas de alterações de manejo, e o fato de que a atividade microbiana do solo reflete a influência conjunta de todos os fatores que regulam a degradação da matéria orgânica e transformações dos nutrientes (SILVEIRA, 2007).

As análises de atividades enzimáticas do solo podem ser utilizadas de forma prática em inúmeras situações envolvendo o ambiente solo-planta, incluindo aspectos relativos à fertilidade, remediação de solos contaminados e avaliações de impacto de manejos e da qualidade dos solos agrícolas (DICK; TABATABAI, 1992). As enzimas estão presentes em baixas concentrações no solo, a quantificação destas é feita de maneira indireta, através da medida da sua atividade, e não pela sua quantidade. Geralmente, a atividade é medida através da quebra de um substrato específico para que cada enzima a ser avaliada, em condições padronizadas de pH e temperatura (TABATABAI, 1994).

As enzimas que fazem parte do conteúdo celular podem ser liberadas de diferentes formas para o solo. As células vivas podem secretar e liberar as enzimas para o solo durante o crescimento ou divisão celular. Outra via de liberação das enzimas intracelulares acontece após a morte da célula, devido à lise ou a alterações na permeabilidade celular. Quando uma proteína enzimática é liberada para o solo, ela pode ser imediatamente metabolizada pelos micro-organismos ou se associar física ou quimicamente aos colóides ali presentes, o que a torna mais estável e inacessível a inibidores e extratores. As enzimas extracelulares se complexam ao húmus por meio de ligações iônicas, covalentes ou de hidrogênio, sendo que a maior parte da atividade das enzimas extracelulares do solo se estabiliza na forma de complexos húmicos-proteicos (MELO, 1988). A Figura 3.4 ilustra a origem e os diferentes destinos das enzimas nos solos.



**Figura 3.4** - Origem e os diferentes destinos das enzimas nos solos (Fonte: KANDELER, 2007)

A biomassa microbiana do solo é definida como a parte da matéria orgânica do solo (usualmente entre 1 % e 5 %), constituída por micro-organismos vivos menores que  $5\text{-}10\ \mu\text{m}^3$  (VIEIRA, 2007). Segundo Moreira e Siqueira (2006), esta biomassa é representada por fungos, bactérias, actinomicetos, leveduras e representantes da microfauna como os protozoários. A biomassa microbiana representa de 2 % a 5 % do N total do solo (SMITH; PAUL, 1990) e é a principal fonte de enzimas do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os valores obtidos de biomassa microbiana variam muito com o tipo de solo, vegetação e clima,

e sua quantidade está relacionada com a quantidade e qualidade de carbono que o solo recebe (SILVEIRA, 2007).

Para Smith e Paul (1990) a biomassa microbiana é um importante reservatório de nutrientes no solo que se recicla rapidamente, tornando-os disponíveis para as plantas. Ela é composta por elementos essenciais ao desenvolvimento desses seres vivos, regulando o fornecimento e a disponibilidade, por exemplo, de N, P e K no solo. Em determinadas situações, como em regiões de clima tropical, a biomassa assume um papel muito importante como fonte de nutrientes facilmente disponíveis para os micro-organismos do solo (FEIGL et al., 1995), ao contrário dos valores encontrados em solos de clima temperado, que ficam ao redor de 2 %.

Medidas da biomassa microbiana do solo fornecem indicações mais rápidas sobre as mudanças em longo prazo no conteúdo de matéria orgânica do solo, antes que tais mudanças possam ser detectadas por técnicas convencionais (POWSON et al., 1987). Embora a medida de biomassa microbiana seja citada como indicador sensível a poluição do solo por agroquímicos (DUAH-YENTUMI; JOHNSON, 1986; HARDEN et al., 1993), esse método nem sempre tem sido o parâmetro mais adequado para avaliar o efeito tóxico daqueles produtos na microbiota do solo. Isto é observado em experimentos de incubação com herbicidas em condições controladas (VIEIRA, 1999; HANEY et al., 2000) e de campo (OLSON; LINDWALL, 1991), com fungicidas inibidores ou não da síntese de ergosterol (HART; BROOKES, 1996; VIEIRA et al., 2000).

A biomassa microbiana, por representar a parte viva do solo, é influenciada pela disponibilidade de carbono e nutrientes, umidade, aeração e pH do solo, e ainda pelos tipos de argilas e minerais do solo. Mas apesar de ser uma medida da população viva do solo é pouco informativa quando apresentada isoladamente (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

### 3.3 ASPECTOS GERAIS SOBRE OS COMPOSTOS AGROQUÍMICOS E IMPACTO AMBIENTAL

Compostos agroquímicos são xenobióticos utilizados na agricultura para diversos fins, dentre eles o controle fitossanitário, o aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos. Muitos desses compostos têm seu efeito nocivo ao meio ambiente, devendo ser

recomendado ou aplicado de maneira criteriosa a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (ARAÚJO, 2002).

O grande dilema referente à aplicação dessa classe de compostos é que o ideal seria que fossem altamente seletivos para espécies-alvo, ou seja, apresentassem toxicidade para organismo-alvo em níveis de exposição muito inferior àqueles capazes de causar efeitos adversos para o homem e para outras espécies não alvo. Infelizmente, a almejada toxicidade diferencial entre espécies “alvo” e “não alvo” é ainda insatisfatória para a maioria dos ingredientes ativos disponíveis. Daí, estes compostos estão entre as substâncias químicas mais estudadas em todo o mundo, sendo objeto de diversos estudos toxicológicos e ecotoxicológicos (SISINNO; FILHO 2013).

Uma vez introduzidos no ambiente, um composto agroquímico pode se comportar de diferente forma naquele meio (solo, ar, água), isto é, pode interagir com outros constituintes desse meio, ser transportado a certas distâncias, transferido para outros compartimentos ambientais, degradado, transformado ou imobilizado (SISINNO; FILHO 2013).

Percebe-se a degradação do meio ambiente por agroquímicos, principalmente pela contaminação direta dos lençóis freáticos e da atmosfera, ou pelas suas consequências indiretas sobre o homem e os outros organismos vivos, via a cadeia alimentar. No entanto, a maioria dos poluentes transita pelos solos e é exatamente neste meio que vai se condicionar a manifestação de seu caráter poluidor de águas subterrâneas (BARRIUSO et al., 1996). O solo intervém como um filtro bio-físico-químico (HILLEL, 1998) relativamente eficaz entre a superfície do solo, onde os produtos são aplicados, e o lençol freático, permitindo a eliminação do poluente por processos como a biodegradação ou biotransformação, ou ainda retardando seu efeito pela sorção sobre as partículas sólidas que constituem o solo.

Alcançando o solo, o composto agroquímico pode sofrer volatilização, outra parcela do composto pode escoar na superfície do solo e contaminar corpos d'água superficiais, em alguns casos, ser lixiviada e, conseqüentemente, contaminar os aquíferos. Durante o transporte dependendo inclusive da característica química da molécula e das propriedades do solo, o composto agroquímico pode ficar retido no solo, retardando ou até mesmo impedindo o seu movimento ao longo do perfil. Na solução do solo, o composto pode ficar sujeito à degradação química e/ou microbiológica, gerando produtos, algumas vezes até mais tóxicos que a molécula original e, em alguns casos, chegar até a mineralização. Devido à presença prolongada de muitas moléculas no solo, a retenção desempenha um papel preponderante no comportamento dos agroquímicos, bem como na segurança do ambiente (RIBEIRO et al., 2007).

O impacto de agroquímicos sobre a microbiota do solo é difícil de ser avaliado, considerando-se a dinâmica da população microbiana, sua alta heterogeneidade e sua capacidade adaptativa às condições adversas. Entretanto, em experimentos de avaliação de campo, Silva et al. (2003b), verificaram por meio da técnica de contagem em placa, o efeito do paclobutrazol nas diferentes comunidades microbianas de solos sob cultivo comercial de manga. Os resultados obtidos demonstraram o efeito tóxico do paclobutrazol nos microorganismos do solo, sendo que o número de colônias bacterianas, fúngicas e de actinomicetos cultiváveis, apresentaram um decréscimo médio de 58 %, 28 % e 28 %, respectivamente. Jacobs e Berg (2000) verificaram o efeito inibidor do paclobutrazol sobre diversos fungos patogênicos da madeira, como: *Armillaria*, *Botryosphaeria*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Ophiostoma*, *Sirococcus*, *Sphaeropsis* e *Verticilium*. Este efeito inibidor, segundo Jackson et al. (1996) é em consequência da estrutura química do PBZ que apresenta grande similaridade estrutural com os fungicidas do grupo dos triazóis, que são usados no controle de um amplo espectro de fitopatógenos.

Silva et al. (2003b) analisaram o efeito do paclobutrazol sobre a atividade enzimática da desidrogenase em solos com textura franco arenosa de Petrolina/PE e Lins/SP. Foram adicionadas aos solos diferentes concentrações de PBZ. O solo de Petrolina foi suplementado com 80 e 160 µg/g e o solo de Lins com 0,8 e 16 µg/g. Utilizando diferentes tempos de incubação (3, 7, 10, 15 e 27 dias), os autores verificaram que para o solo da região de Petrolina/PE, a concentração de PBZ e o tempo de incubação apresentaram efeito significativo sobre a atividade da desidrogenase. Os autores observaram que no terceiro dia de incubação houve um decréscimo na atividade da desidrogenase de 23 e 44 %, respectivamente, na menor e maior dose do produto. No décimo, décimo quinto e vigésimo sétimo dias os decréscimos foram, respectivamente, de 38, 12 e 63 %. Ao contrário, o solo de Lins/SP não foi observado efeito do paclobutrazol sobre a atividade da desidrogenase. Segundo os autores, tal fato pode estar relacionado às diferentes concentrações do composto orgânico, utilizada nos diferentes solos.

Gianfreda e Sannino (2001) avaliaram a influência de quatro pesticidas (glifosato, paraquat, atrazina e carbaril) sobre a atividade enzimática (invertase, fosfatase e urease) em vinte e dois solos com diferentes propriedades físico-químicas. Os resultados mostraram que os pesticidas afetam as atividades enzimáticas dos solos, por exemplo, as adições de glifosato e paraquat ativaram as atividades da invertase e da urease. Entretanto, um efeito inibidor sobre a atividade da fosfatase foi observado na presença do glifosato. A atividade de invertase foi inibida na presença de atrazina, mas ao contrário aumentou a atividade da urease.

Gianfreda e Bollag (1996) consideram que esses efeitos dos agroquímicos sobre as atividades enzimáticas do solo parecem depender de vários fatores, como, por exemplo, a natureza e a dose do agroquímico, tipo de enzima e solo e tipo de experimento (campo ou laboratório). Esses efeitos podem ser resultado da interação direta entre os agroquímicos e a enzima, ou de interações indiretas resultantes das modificações no número de microorganismos, que levam a alterações nos níveis de enzimas intra e extracelulares (SILVA et al., 2004).

Os efeitos de agroquímicos na biomassa microbiana podem ser verificados quando são aplicados em doses dez vezes maiores do que as recomendadas (VIEIRA, 2004). Isto ocorreu, por exemplo, para os herbicidas rimsulfuron e imazetapir (PERUCCI et al., 2000). O efeito do rimsulfuron na biomassa microbiana ocorreu até 30 dias após a incubação do produto no solo, apesar da meia vida desse agroquímico ser de aproximadamente três dias (VISCHETTI et al., 1997). Tais resultados levaram a possibilidade de efeitos em longo prazo dos xenobióticos na biomassa microbiana, mesmo após a maioria das moléculas originais terem praticamente desaparecido (PERUCCI et al., 2000).

Silva et al. (2003b) também verificaram o efeito deletério do paclobutrazol na comunidade fúngica do solo analisando o conteúdo de ergosterol do solo. Os resultados mostraram que após 15 dias da suplementação com 8 µg/g e 16 µg/g houve diminuição no conteúdo de ergosterol do solo para ambas as doses, indicando o efeito deletério do composto. Este efeito foi transitório no caso da menor dose, enquanto que na maior dose ele permaneceu mesmo após 21 dias da suplementação. Portanto, segundo os autores, esta dose extremamente elevada e prejudicial, demonstra que cuidados devem ser tomados com aplicações repetidas do produto e também a longo prazo.

### 3.4 O PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO E AS TECNOLOGIAS

Biorremediação é um processo no qual se utilizam agentes biológicos para remover poluentes tóxicos do ambiente terrestre e aquático (PELCZAR et al., 1996). Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção (GAYLARDE et al., 2005).

As tecnologias de biorremediação vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas para remediação de locais contaminados com agroquímicos. Essas técnicas têm como pré-requisito básico o aumento da eficiência da remoção natural feita pelos micro-organismos. Os processos utilizados podem ser classificados como: *in situ*, quando o tratamento é efetuado no próprio local contaminado, e *ex situ*, quando o procedimento é efetuado fora do local impactado.

Para entender a eficácia dessas tecnologias, tanto *ex situ* como *in situ*, é necessário o conhecimento sobre a cinética da biodegradação (SILVA et al., 2004c). Estudos em laboratório para determinar as taxas de biodegradação podem ser usados como testes de varredura para determinar a rapidez e extensão da biorremediação, fornecendo, assim, um desenho criterioso na obtenção de uma biorremediação ótima. No entanto, nem todos os ensaios de laboratório sobre biodegradabilidade podem ser usados para simular os complexos processos de biorremediação em condições naturais de campo. Os parâmetros mais importantes a serem avaliados antes da implementação de um projeto nessa área são determinar se o composto é biodegradável e conhecer o mecanismo mais efetivo e a taxa de biodegradação. Essa biodegradação, por sua vez, é influenciada por uma série de fatores químicos, físicos e biológicos, alguns dos quais podem ser desfavoráveis e devem ser evitados em estudos de laboratório (SILVA et al., 2004c).

Dentre as diversas tecnologias de biorremediação destacam-se o bioestímulo e o bioaumento. O bioestímulo tem por objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos micro-organismos degradadores da comunidade nativa de uma determinada região contaminada, através da adição de receptores de elétrons, nutrientes ou doadores de elétrons. O bioaumento consiste na introdução de micro-organismos degradadores podendo ser estes micro-organismos geneticamente modificados, nativos ou não nativos (GAYLARDE et al., 2005). Também vem sendo observada atualmente a junção do acréscimo de nutrientes (bioestímulo) e da comunidade microbiana específica (bioaumento), o que reduz significativamente o tempo necessário de remediação de solos (BENTO et al., 2005).

Em revisão da literatura sobre as estratégias de biorremediação (bioestímulo e bioaumento), Tyagi et al. (2011) descreveram que um programa de biorremediação de sucesso geralmente requer a aplicação de estratégias personalizadas para as condições ambientais específicas do local contaminado. Devido à complexidade destas estratégias, cuja eficiência envolve vários fatores, muitos problemas de difícil equacionamento podem surgir no decorrer do processo (GAYLARDE et al., 2005).

Goldstein et al. (1985) e VanVenn et al. (1997) relataram em seus estudos sobre bioaumento a perda da viabilidade microbiana durante a inoculação e relacionaram este fenômeno devido ao estresse em decorrência das mudanças drásticas nas condições ambientais. Goldstein et al. (1985) e Liu et al. (2009) observaram morte dos micro-organismos após a inoculação e relacionaram tal observação com a exaustão dos nutrientes e/ou com a toxicidade causadas pelos contaminantes. Thompson et al. (2005) e El Fantroussi e Agathos (2005) verificaram que a competição por nutrientes pelos micro-organismos autoctones é um fator importante que influencia na eficiência do bioaumento. Bouchez et al. (2000) verificaram que o bioaumento pode ser acompanhado pelo desaparecimento da população de bactérias inoculadas e super crescimento da população de protozoários e relacionaram tal evento à predação realizada pelos protozoários. Dibble e Bartha (1979), Atlas (1981), Leahy e Colwell (1990), Gentry et al. (2004) relataram que as tensões que dificultam o crescimento microbiano podem incluir flutuações extremas de temperatura, teor de água, pH, esgotamento de nutrientes, bem como os níveis de poluentes potencialmente tóxicos no solo contaminado.

### 3.5 BIODEGRADAÇÃO DE AGROQUÍMICOS EM SOLOS

Na maioria dos casos, os agroquímicos são substâncias orgânicas xenobióticas aplicadas internacionalmente nos ecossistemas terrestres, e se usados de acordo com a recomendação, espera-se que causem mínimos efeitos no ambiente. Após sua ação, esses agroquímicos deixam resíduos, considerados indesejáveis no ambiente (FAY; SILVA, 2004). Os micro-organismos do solo estão geralmente envolvidos nas alterações iniciais dos agroquímicos, inativando-os, e provavelmente estão também envolvidos na degradação de seus resíduos. A resposta à adição de agroquímicos no solo está na dependência de suas capacidades enzimáticas para reagir à molécula xenobiótica (FAY; SILVA, 2004).

A degradação microbiológica dos agroquímicos (agrotóxicos) foi definida por Audus (1960) como um processo pelo qual os micro-organismos se adaptam ao agrotóxico e produzem enzimas capazes de degradá-los durante a fase lag, seguida por um período de enriquecimento, quando os micro-organismos adaptados multiplicam-se utilizando o substrato como fonte de carbono.

A capacidade adaptativa de degradar novos compostos sintéticos é uma das questões mais intrigantes sobre a biodegradação. Os organismos mais aptos a sobreviverem em um dado ambiente têm uma vantagem seletiva, um princípio conhecido como seleção natural, proposto por Charles Darwin. Respostas adaptativas têm sido observadas em culturas puras em ambientes aquáticos, em solos e em aquíferos (SILVA; MELO 2004). Com relação a esse fenômeno, têm-se dois tipos de situação: a) adaptação de enzimas catabólicas existentes (incluindo processos associados como mecanismos de regulação e transporte) para a degradação de novos compostos; e b) a aquisição de novas vias metabólicas (ALEXANDER, 1997).

Quando o agroquímico é utilizado no solo pela primeira vez, observa-se um período de adaptação antes que a degradação ocorra a uma taxa significativa. Nas aplicações subsequentes do mesmo composto, resulta uma degradação rápida e imediata com pequena ou nenhuma fase lag. A taxa de biodegradação em solos enriquecidos está relacionada à concentração do agroquímico e à expansão do conjunto enzimático associado ao crescimento microbiano (SILVA; MELO 2004).

Os micro-organismos exibem duas estratégias para assimilação de substratos: metabolismo e cometabolismo (SILVA; MELO 2004). O metabolismo pode resultar na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para CO<sub>2</sub>, água, íons inorgânicos e energia, que é utilizada na biossíntese dos constituintes celulares. Em contrapartida, muitos micro-organismos são capazes de transformar parcialmente os compostos químicos em produtos sem produção de energia para o seu crescimento; este processo é denominado de cometabolismo e é um fenômeno celular típico. Pesquisas sobre estas transformações cometabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos à atividade de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais (SILVA; MELO 2004).

A biodegradação de compostos complexos requer freqüentemente o uso de um consócio microbiano. Culturas puras podem metabolizar somente uma faixa limitada de substratos, assim, a formação de populações mistas com ampla capacidade enzimática é necessária (ALEXANDER, 1997). As vantagens de uma cultura mista podem ser atribuídas a efeitos de sinergismo entre os membros da associação. O mecanismo é complexo, sendo possível que uma espécie remova os metabólitos tóxicos de outras espécies precedentes. Isto também possibilita a degradação de compostos que a primeira degradou apenas parcialmente, por uma segunda espécie (GHAZALI et al., 2004). Porém, se os organismos envolvidos na

cultura mista não fazem parte de uma mesma associação adaptativa, a cultura pode não ser estável, havendo assim a predominância de um ou mais organismos (CALDWELL et al., 1997).

### 3.5.1 Fatores que influenciam a biodegradação

Diversos fatores podem influenciar na biodegradação de xenobióticos, tais como a densidade do inóculo, a biodisponibilidade do poluente e as condições do solo (umidade, temperatura, pH e matéria orgânica) (KARPOUZAS; WALKER, 2000; SINGH et al., 2003). A presença de fontes adicionais de carbono pode aumentar ou diminuir a biodegradação de xenobióticos (SINGH et al., 2003; SCHMIDT et al., 1987).

Geralmente, a utilização simultânea de diferentes fontes de carbono favorece o crescimento microbiano numa situação de limitação de carbono (BAKER, 1994). LaPat- Polasko et al. (1984) encontraram que a degradação de cloreto de metileno por uma linhagem de *Pseudomonas* sp. foi mais rápida quando o acetato estava presente do que quando foi utilizado apenas cloreto de metileno como a única fonte de carbono. Schmidt et al. (1987) verificaram que a presença de glicose como substrato secundário aumentou a taxa de degradação de p-nitrofenol por *Pseudomonas*. Além disso, eles verificaram que nem todos os substratos adicionados estimularam a degradação de p-nitrofenol, como a adição de fenol que inibiu a degradação. A presença de uma fonte de carbono que reprime a expressão de certos genes e óperon (repressor catabólico) pode resultar numa baixa ou nenhuma taxa de biodegradação, havendo apenas o consumo da fonte de carbono preferencial (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002).

Vaz (2006) obteve três isolados, por enriquecimento, de bactéria de solos com histórico de aplicação de paclobutrazol (PBZ) pertencentes a regiões com plantio de manga do Vale do São Francisco. Essas foram classificadas como *Pseudomonas* spp. capazes de degradar PBZ. A biodegradação de PBZ em meio líquido mineral contendo apenas PBZ como fonte de carbono foi de 47 % em 20 dias de cultivo. Este mesmo autor também apresentou ótimos resultados de biodegradação quando foi utilizado o glicerol como fonte de carbono adicional na biodegradação de PBZ, alcançando 75 % em 10 dias. Vaz et al. (2012) estudaram a biodegradação de PBZ em dois solos, sob condição de saturação, da mesma região e alcançaram valores máximos de 43 % em 14 dias, quando foi utilizado apenas PBZ como

única fonte de carbono, e 70% em 28 dias, quando o glicerol foi utilizado como fonte adicional de carbono. Vaz et al. (2012b) aplicaram diferentes modelos matemáticos que descrevem a biodegradação de PBZ e obtiveram, na maioria dos casos, uma dupla cinética de primeira ordem. O tempo de meia-vida do PBZ também foi calculado baseado nesse modelo e este foi de aproximadamente 17,94 dias quando este foi utilizado como única fonte de carbono e de 15,40 dias quando foi utilizado juntamente com o glicerol, como fonte de carbono adicional em experimentos com solos saturados.

A presença de matéria orgânica pode indicar a presença de elementos alternativos que aumentam a taxa de biodegradação (IAH, 1998). A adição de materiais orgânicos aumenta a atividade microbiana e, conseqüentemente, acelera a degradação de muitos agrotóxicos. A matéria orgânica frequentemente domina a adsorção de agrotóxicos no solo, uma vez que as substâncias húmicas são predominantemente polímeros amorfos que podem existir como partículas tridimensionais ou como um envoltório de partículas minerais. Muitos xenobióticos com características lipofílicas difundem para dentro dessas substâncias, podendo ser a inserção de um mecanismo de proteção contra fatores químicos físicos e enzimáticos de degradação. Como consequência, o xenobiótico pode adquirir maior persistência (SILVA; FAY, 2004).

A umidade tem efeito direto e profundo na proliferação dos micro-organismos e suas atividades, uma vez que compete pelos sítios de adsorção com o agrotóxico, determinando a quantidade de agrotóxico disponível ao ataque microbiano (SILVA; FAY, 2004). O baixo conteúdo de umidade afeta a degradação dos agrotóxicos mediante redução da biomassa microbiana e de sua atividade e por reduzir o agrotóxico na solução do solo (MOORMAN, 1982). Para Alexander (1977), a umidade auxilia nas trocas gasosas, dissolve e transporta os diferentes nutrientes. Para Werf (1996) por esses motivos, a meia-vida dos agrotóxicos tende a ser mais longa em solos secos.

A medida do pH é um critério importante como indicativo das reações microbianas do solo. Bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo disso para degradar compostos xenobióticos (SPINELLI, 2006). Os valores de pH para um determinado microambiente devem estar relacionados ao tamanho dos organismos e à multiplicidade de enzimas, as quais são, em sua maioria pH dependentes e estão relacionados aos componentes celulares, como, por exemplo, as membranas (SILVA; FAY, 2004). Os compostos orgânicos fracamente ácidos apresentam-se tanto na forma de ânions como na forma de moléculas não dissociadas. Herbicidas fracamente básicos, como as triazinas, podem apresentar-se na forma neutra ou protonada, dependendo do pH do solo. Além dos efeitos diretos na molécula

orgânica, o pH pode ter influência na persistência, devido ao seu efeito na atividade microbiana e nos processos de adsorção/dessorção (SILVA; FAY, 1997). A biodisponibilidade de um composto xenobiótico é de extrema importância, por que frequentemente responde pela persistência de compostos que são biodegradáveis e que deveriam ser rapidamente decompostos. O pH tem relação direta com a biodisponibilidade de um composto agroquímico no solo, pois influencia na sorção destes e desta forma interfere na persistência do xenobiótico neste ambiente. A indisponibilidade de uma molécula xenobiótica pode ser resultado de sua sorção a sólidos no ambiente ou a sua oclusão nas partículas do solo, sedimentos ou aquíferos e como consequência os xenobióticos podem adquirir maior persistência (SILVA et al., 2004).

A temperatura no solo afeta muitos processos que contribuem para a dissipação dos xenobióticos, como a atividade microbiana, a volatilização e os processos de transporte. Dentro da faixa de temperatura, normalmente encontrada nos solos agricultáveis (0 a 35°C) a degradação geralmente aumenta com a temperatura e umidade (SILVA; FAY, 2004).

### 3.6 PLANEJAMENTO FATORIAL NA BIODEGRADAÇÃO DE XENOBIÓTICOS

No contexto da pesquisa científica existe a busca contínua da melhor maneira de obter o máximo de informações possíveis com o mínimo de experimentos, esta maneira, no geral, reduz os custos dos estudos. Uma das formas de planejar experimentos é a aplicação de ferramentas estatísticas, como o planejamento fatorial (BARROS-NETO, SCARMINIO; BURNS, 2007).

O planejamento fatorial pode ser aplicado quando há diferentes fatores que interagem entre si e podem interferir na resposta investigada. Esses fatores na linguagem estatística são chamados de variáveis independentes. Os valores atribuídos aos fatores são denominados níveis (FERREIRA, 2010). Em termos práticos, um planejamento fatorial deve ser feito em 2 ou 3 níveis, pois o uso de mais níveis aumentaria o número de experimentos, inviabilizando a sua aplicação (CALADO; MONTGOMERY, 2003).

Segundo Button (2001), o planejamento fatorial é indicado para fase inicial do procedimento experimental quando há necessidade de se definir os fatores mais importantes e estudar os efeitos sobre a variável resposta escolhida.

Como observado no item 3.5.1 diferentes fatores afetam a biodegradação de xenobióticos, diversos trabalhos em que houve aplicação do planejamento fatorial para identificar os fatores e níveis que afetam biodegradação já foram realizados e na maioria dos trabalhos apresentam resultados interessantes. Ferreira (2010) realizando estudo sobre a biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina aditivada com diferentes teores de etanol, fez a aplicação de um planejamento fatorial  $2^3$  cujos fatores foram a condição de umidade, o percentual de etanol adicionado à gasolina e a concentração de fósforo e verificou que a concentração de fósforo e a condição de umidade foram as variáveis significativas para a remoção de hidrocarbonetos totais do petróleo do solo. Zu et al. (2012) aplicaram um planejamento fatorial  $2^3$  para investigar a biodegradação e desbromação do 2,4,6-tribromofenol, e para isso usou como fatores a concentração de 2,4,6 – tribromofenol, o valor de pH e o volume de inóculo (*Bacillus* sp.). Este planejamento fatorial foi realizado com o ponto central. Os autores verificaram que a concentração do 2,4,6-tribromofenol em seu nível inferior e o volume do inóculo em seu nível superior possibilitou os maiores valores para as duas respostas investigadas. Wen-Ta Su et al. (2011) investigaram a composição de um meio de cultura para favorecer o processo de biodegradação de óleo de motor por *Pseudomonas aeruginosa* e para isso aplicaram um planejamento fatorial fracionário  $2^{6-1}$ . Os fatores foram: as concentrações dos componentes do meio de cultura. Estes autores verificaram que as concentrações do óleo motor e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  no meio de cultivo favoreceram a biodegradação do óleo por *Pseudomonas aeruginosa*. Chen et al. (2009) aplicaram um planejamento fatorial fracionário  $2^{6-1}$  para melhorar a biodegradação de efluentes por consórcios microbianos. As concentrações iniciais de células das seis diferentes linhagens de micro-organismos (*Agrobacterium* sp., *Bacillus* sp., *Enterobacter*) foram os fatores mais significativos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 SOLOS

Os solos utilizados foram coletados (Figura 4.1) de duas regiões com plantio de manga (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins), regiões A e B, com histórico de aplicação de paclobutrazol, ambas pertencentes à EMBRAPA Semiárido, localizadas no Vale do São Francisco no Nordeste do Brasil.

As coletas foram realizadas na região da rizosfera, numa profundidade de 0-20 cm. A caracterização dos solos foi realizada e esta apresentada no item 5.1.



**Figura 4.1** - Coleta das amostras de solo ao redor de uma mangueira (Fonte do autor)

O clima da região é muito quente e semiárido, as temperaturas médias anuais variam entre 23 °C e 27 °C, com desvio médio mensal menor que 5 °C e variações diárias entre 5 °C e 10 °C. A umidade relativa média de 50 % e o período de insolação atinge valores de 2.800h.ano (CUNHA et al., 2010). Com precipitação pluviométrica anual de 535,8 ( $\pm$  180,3) mm concentrada em uma estação chuvosa entre os meses de janeiro e abril (AZEVEDO et al., 2003).

## 4.2 MEIOS DE CULTURA

Para preservação, manutenção e reativação das culturas, foi utilizado o meio Ágar Triptona Soja (TSA) fabricado pela MERK composto por (em g/L): peptona de caseína (15), peptona de farinha de soja (5), NaCl (5), ágar (15). Na preparação do inóculo foi utilizado o meio caldo nutriente composto por extrato de carne (1 g/L), extrato de levedura (2 g/L), peptona (5 g/L) e NaCl (5 g/L). O meio mineral utilizado nos ensaios de biodegradação de paclobutrazol (Ridgway et al., 1990) composto de (em µg/g):  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (544),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (568),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (20),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (1.2),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.0156),  $\text{ZnCl}_2$  (0.0084),  $\text{CaCl}_2$  (4),  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,616),  $\text{COCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.0164),  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.01),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (400).

## 4.3 MICRO-ORGANISMOS

Os micro-organismos utilizados foram isolados previamente por enriquecimento em pesquisas anteriores (VAZ, 2006). São micro-organismos com capacidade de degradação do paclobutrazol, isolados de solo da região do Vale do São Francisco. As três linhagens de bactérias Gram negativas utilizadas foram identificadas por Vaz (2006) como *Pseudomonas*. Estas linhagens foram denominadas de MS09, MS23 e MS26, onde M significa o local de onde foram isoladas, isto é, da região de Mandacaru e S significa que foram isoladas de solo sem histórico de aplicação.

## 4.4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.4.1 Ensaio de biodegradação

Para avaliar o efeito do bioestímulo (adição de glicerol e/ou meio mineral), do bioaumento e do solo utilizado sobre a biodegradação de paclobutrazol foi aplicado um planejamento fatorial  $2^4$ , cujos fatores e níveis são apresentados na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1-** Fatores e níveis do planejamento fatorial

Fatores	Níveis	
	-	+
$X_1$ Glicerol ( $\mu\text{g/g}$ )	0	2.400
$X_2$ Meio mineral	0	Com *
$X_3$ Inóculo (UFC/g)	0	$10^8$
$X_4$ Solo	A	B

\* Composição descrita no item 4.2.

Os ensaios foram realizados conforme as condições apresentada na Tabela 4.2. Os ensaios 1 e 9 foram considerados como ensaios controle, isto é, com adição apenas de água para manter a umidade. O bioestímulo com adição apenas de glicerol foi realizado nos ensaios 2 e 10. Nos ensaios 3 e 11 o bioestímulo foi realizado apenas com a adição do meio mineral. Nos ensaios 4 e 12 tanto o glicerol, quanto o meio mineral foram utilizados na realização do bioestímulo. Nos ensaios 5 e 13 apenas o bioaumentação foi realizado. Nos ensaios 6, 7, 8, 14, 15 e 16 tanto o bioestímulo quanto o bioaumentação foram realizados.

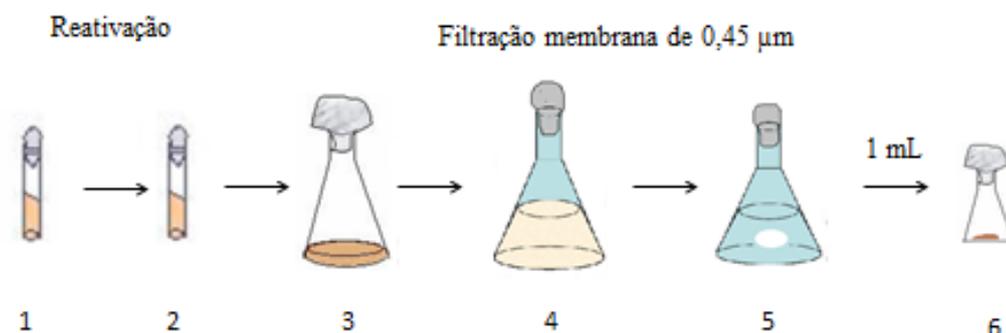
Todos os ensaios foram realizados com solos que apresentavam histórico de aplicação de paclobutrazol. Os experimentos foram em batelada, em condições não saturadas, não estéreis, em temperatura ambiente e sem agitação durante o período de 40 dias. Cada ensaio foi realizado em triplicata, em erlenmayer de 125 mL contendo 2,5 g de solo e 1 mL da solução contendo: glicerol e/ou meio mineral, meio mineral e/ou inóculo, inóculo e/ou glicerol. Aos ensaios onde não foram realizados nem o bioestímulo nem o bioaumentação 1 mL de água destilada estéril foi adicionado aos solos. Em todos os ensaios um pequeno volume de água destilada estéril foi adicionado periodicamente para manter a umidade inicial. Amostras foram retiradas no tempo 0 e 40 dias para a quantificação de PBZ, do crescimento, do pH e da atividade enzimática.

**Tabela 4.2** – Condições experimentais dos ensaios do planejamento fatorial

Ensaio	X <sub>1</sub> Glicerol	X <sub>2</sub> Meio mineral	X <sub>3</sub> Inóculo	X <sub>4</sub> Solo
1	-	-	-	-
2	+	-	-	-
3	-	+	-	-
4	+	+	-	-
5	-	-	+	-
6	+	-	+	-
7	-	+	+	-
8	+	+	+	-
9	-	-	-	+
10	+	-	-	+
11	-	+	-	+
12	+	+	-	+
13	-	-	+	+
14	+	-	+	+
15	-	+	+	+
16	+	+	+	+

#### 4.4.2 Preparo do inóculo para o bioaumentação

A Figura 4.2 esquematiza o preparo do inóculo. Nos ensaios com bioaumentação, o inóculo foi preparado a partir das linhagens de *Pseudomonas* spp. apresentadas no item 4.3. Estas linhagens foram inoculadas em meio TSA descrito no item 4.2 e incubadas a 30 °C para reativação. Após 24 h, foi realizado o repique de cada linhagem em seu respectivo frasco de 250 mL contendo 50 mL de caldo nutriente descrito no item 4.2. Após um período de cinco horas de incubação, a 30 °C e 250 rpm, quando todos os inóculos apresentaram em média absorbância de 0,63 a 420 nm, todo o volume da suspensão microbiana foi transferido a um frasco estéril de 500 mL, e logo em seguida, foi realizada filtração em membrana de 0,45 µm. As células foram ressuspensas em 150 mL de água destilada estéril para os ensaios 5 e 13. Para o bioestímulo a ressuspensão das células foi em solução estéril contendo glicerol para os ensaios 6 e 14, em solução estéril contendo apenas meio mineral para os ensaios 7 e 15. Para os ensaios 8 e 16 a ressuspensão das células foi em solução estéril contendo glicerol e meio mineral. Um volume de 1 mL da suspensão microbiana foi retirado e adicionado a 2,5 g de solo para os ensaios em que foram realizados bioaumentação.



1. Linhagens *Pseudomonas* spp. preservadas em TSA na geladeira; 2. Linhagens reativadas em TSA, 30°C por 24 horas; 3. Linhagens inoculadas no caldo nutriente e incubadas a 30°C, 250 rpm, 5 horas; 4. Junção das três linhagens; 5. Células ressuspensas em 150 mL; 6. Bioaumentação

**Figura 4.2** - Esquema de preparação do inóculo utilizado nos ensaios com bioaumentação

## 4.5 MÉTODOS ANALÍTICOS

### 4.5.1 Umidade

A umidade foi determinada segundo Araújo et al. (2010). Uma massa de 10 g de solo foi pesada em erlenmeyer de 125 mL previamente tarado. O solo foi levado para secar em estufa à temperatura de 105°C por 24 horas. A umidade foi calculada de acordo com a Equação 4.1.

$$Umidade(\%) = \frac{MSU - MSS}{MSS} \times 100 \quad (4.1)$$

Em que  $MSU$  = Massa do solo úmido (g);  $MSS$  = Massa do solo seco (g);  $100$  = fator de transformação em porcentagem.

#### 4.5.2 Granulometria dos solos

A granulometria foi determinada segundo Ruiz (2005) realizada em três etapas: aplicação de pré-tratamentos para remoção de agentes cimentantes e floculantes, dispersão da amostra de solo e quantificação das frações texturais. A análise granulométrica foi realizada no laboratório de química de solos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

#### 4.5.3 Capacidade de campo

A capacidade de campo foi determinadas segundo Araújo et al. (2010). Amostras de 20 g de solo com umidade natural, em triplicata, foram colocadas sobre papel de filtro qualitativo e acondicionado em funil e montado sobre um frasco coletor previamente pesado. Foram adicionados, 100 g de água deionizada pesada em balança analítica e deixou-se por uma noite. O conjunto foi coberto com filme plástico para evitar a evaporação. Decorrido o período o frasco coletor foi pesado novamente. O controle (sem solo), em triplicata, foi realizado da mesma forma. A equação 4.11 foi utilizada para calcular o valor da capacidade de campo.

$$CC (\%) = \frac{[(100 - MAP) + MIAS]}{MSS} \cdot 100 \quad (4.2)$$

Em que  $CC$  = capacidade de campo (%);  $MAP$  = Massa da água percolada (g);  $MIAS$  = massa inicial de água no solo (g);  $MSS$  = massa do solo seco (g);  $100$  = fator para transformação em porcentagem.

#### 4.5.4 Quantificação do pH em água

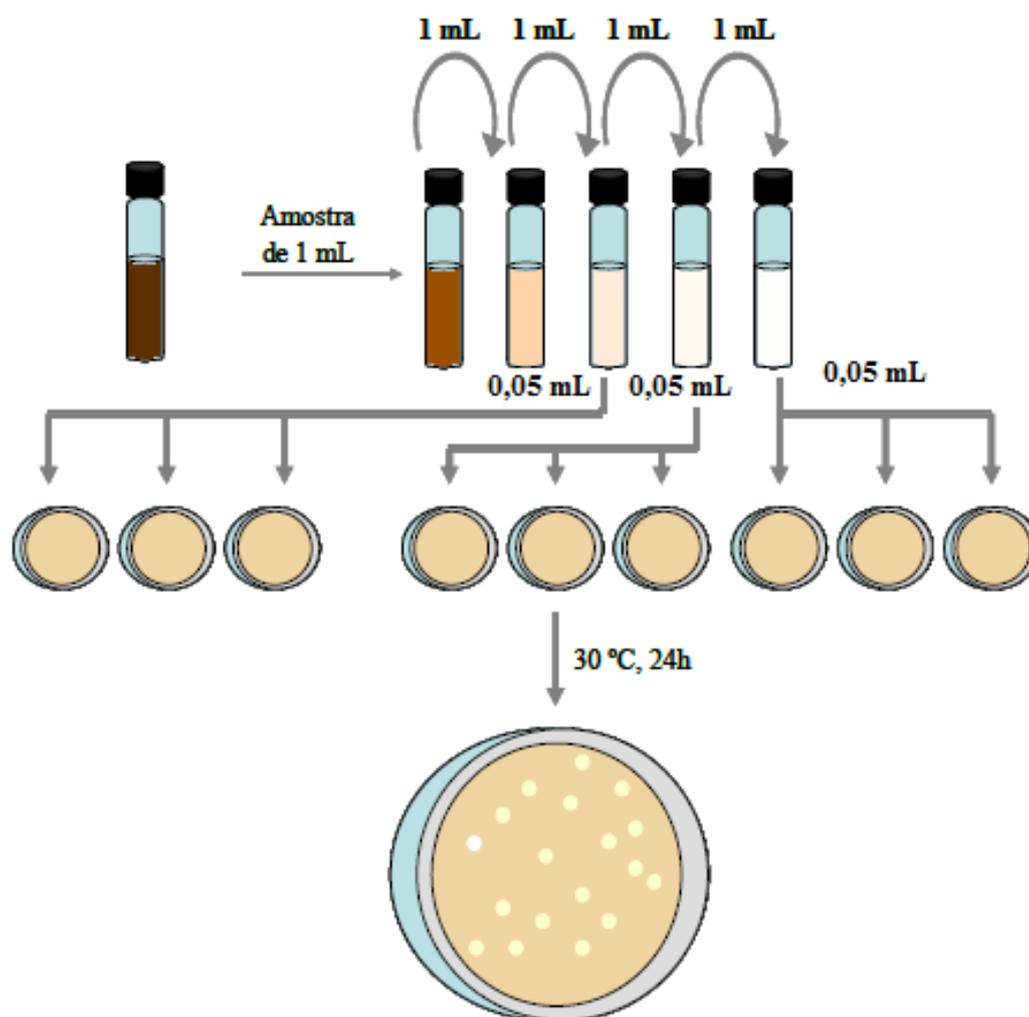
O pH dos experimentos foi medido nos tempos 0 e 40 dias em todos os ensaios para verificar a variação desse e a possível influência sobre o crescimento das bactérias na biodegradação do PBZ. O  $\text{pH}_{(\text{H}_2\text{O})}$  foi determinado usando a relação solo:solução de 1:2,5 (AMARAL et al., 2013). Uma massa de 2 g de solo foi pesado em béquer previamente tarado, em seguida, 5 mL de água destilada foi adicionado ao solo, após leve agitação e repouso por 15 minutos foi medido o pH da solução.

#### 4.5.5 Quantificação do crescimento microbiano

O crescimento microbiano foi quantificado pela técnica de contagem de células viáveis em placas (Figura 4.4). Um grama de solo foi adicionado a nove mL de água destilada estéril. Realizada a homogeneização inicial a partir desta amostra foram realizadas diluições sucessivas em tubos de ensaio contendo o mesmo volume de água destilada estéril da primeira diluição. Em seguida 0,05 mL de cada diluição foi inoculado em placas de Petri (em triplicata) contendo o meio de cultura TSA (Tabela 4.2). Após secagem no interior de uma câmara de fluxo laminar, as placas foram incubadas por 24-48 horas em estufa a 30 °C para o crescimento e em seguida contagem das colônias. Foram consideradas para a contagem as placas que apresentaram valores de no mínimo 30 colônias a no máximo 300 colônias. O resultado foi expresso em UFC (unidade formadora de colônia) / mL (MADIGAN, et al., 2010), segundo a Equação 4.3

$$C = \frac{n}{V} \cdot d \quad (4.3)$$

Em que C = Unidade formadora de colônias por mililitro (UFC/mL), n = número médio de colônias (UFC), V = volume da suspensão (mL) e d = diluição.



**Figura 4.3** - Esquema da técnica de contagem de células viáveis em placas (VAZ, 2011)

A equação 4.4 foi utilizada para converter o valor de UFC/mL para UFC/g de solo.

$$C^* = \frac{n}{V} \cdot d^* \quad (4.4)$$

Em que  $C^*$  = Unidade formadora de colônias por grama de solo (UFC/g),  $n$  = número médio de colônias (UFC),  $v$  = volume da suspensão (mL) e  $d^*$  = diluição

considerando a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) como a amostra inicial.

#### 4.5.6 Quantificação do paclobutrazol

O paclobutrazol, padrão analítico, foi obtido a partir da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e o metanol (grau cromatográfico), da Mallinckrodt Baker (Phillipsburg, NJ, EUA). Exatamente 2,5 g de solo seco foram pesados e misturados com 20 mL de metanol. As condições de extração foram: 30 °C, 200 rpm em um incubador rotativo da New Brunswick Scientific Company, SC 25 (Figura 4.5), durante dois ciclos de 30 minutos cada.



**Figura 4.4** - Incubador rotativo utilizado a extração de PBZ dos solos (Fonte do autor)

Após a extração e filtração em papel qualitativo (Figura 4.6), cinco mL de água ultrapura foram adicionados ao extrato metanólico.



**Figura 4.5** - Filtração durante a preparação de amostras para quantificação do PBZ (Fonte do autor)

O metanol foi evaporado a 40 °C utilizando um evaporador rotativo (Fisatom, Brasil), apresentado na Figura 4.7, para a obtenção de PBZ em solução aquosa.



**Figura 4.6** –Evaporação durante a preparação de amostras para quantificação do PBZ (Fonte do autor)

Após a evaporação da amostra foi realizada a extração em fase sólida (Figura 4.8) em cartucho C-18 da Agilent (500 mg/3mL), previamente condicionado com 5 mL de metanol

(grau cromatográfico). Após lavagem do cartucho com cinco mL de água ultrapura, o analito foi eluído em 3 mL de metanol e injetado em cromatógrafo líquido.



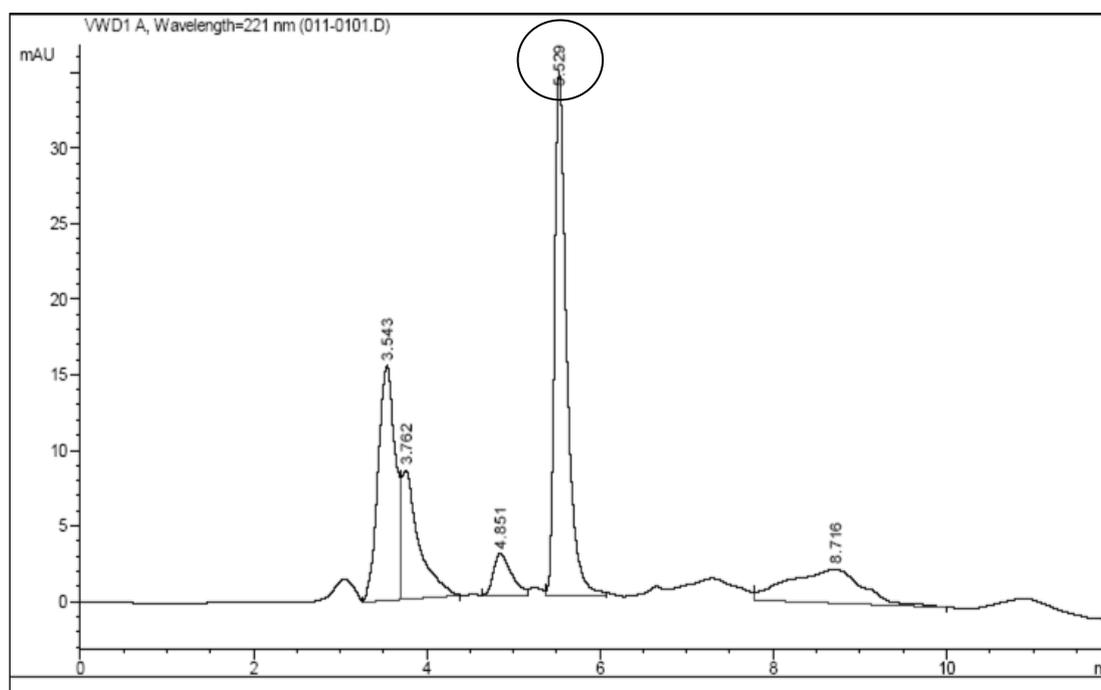
**Figura 4.7** - Extração em fase sólida do PBZ (Fonte do autor)

O sistema cromatográfico utilizado foi o da Agilent (HP 1100, Waldbronn, Alemanha), equipado com um detector UV/VIS, injetor automático, desgaseificador, bomba quaternária, e compartimento de colunas termostaticado (Figura 4.9). As condições cromatográficas foram baseados nas condições utilizadas por VAZ et al. (2007). Uma eluição isocrática foi obtida pela mistura de água (20 %) e Metanol (80 %). O fluxo foi ajustado para 0,4 mL/min numa coluna C18 (150mmx4,6mm - Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A detecção foi a 221 nm e a temperatura da coluna, 30 °C.



**Figura 4.8** - Cromatógrafo líquido utilizado na quantificação de PBZ (Fonte do autor)

Uma curva de calibração de paclobutrazol foi construída utilizando concentrações que variaram de 0,05 a 10 mg/L. Em média o tempo de retenção foi de 5,4 minutos obtendo áreas que variaram de 1,38 a 250. A Figura 4.10 apresenta o cromatograma de uma amostra padrão com o pico do PBZ em torno de cinco minutos.



**Figura 4.9** - Cromatograma de uma amostra padrão da Sigma com o pico do PBZ em torno de 5 minutos

A percentagem de biodegradação de paclobutrazol foi expressa pela equação 4.5

$$\% \text{ Biodegradação de PBZ} = A/A_i.100 \quad (4.5)$$

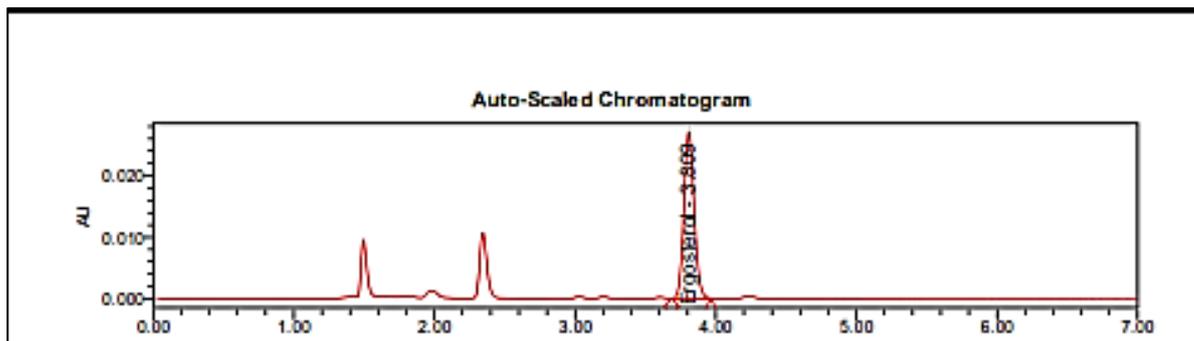
Na qual,  $A$  é a área de PBZ encontrada e  $A_i$  é a área inicial de PBZ.

O resíduo de PBZ expresso em  $\mu\text{g/g}$  de solo foi considerado como a diferença entre a quantidade de PBZ quantificada no tempo inicial (0 dias) e a quantificada no tempo final (40 dias) de cada ensaio.

#### 4.5.7 Quantificação de ergosterol

A quantificação de ergosterol foi conforme as metodologias propostas por Chiocchio e Matkovic (2011) e Eash et al. (1996). Em tubos de centrífuga contendo 5 g de solo foram adicionados 15 mL de metanol, 5 mL de solução de hidróxido de potássio (40 g/L de KOH a 95% em etanol), homogeneizados em mixer por poucos segundos, e sonificados por 1 min.

A mistura de extração foi transferida para banho-maria a  $80-83^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos, homogeneizada em mixer, retornando para mais 15 minutos em banho-maria. Os tubos foram resfriados em água corrente. A mistura de extração foi filtrada em papel Whatman nº1, lavada com 5 mL de água e 10 mL de metanol. O filtrado foi transferido para funil de separação de 125 mL e extraído com hexano por três vezes ( $3 \times 10\text{mL}$ ). Os extratos foram combinados e concentrados até aproximadamente 2-3 mL com evaporador rotatório a vácuo à temperatura de  $42-43^{\circ}\text{C}$ , transferidos para tubos graduados de 10 mL, elevados ao volume de aproximadamente 6 mL e então levados à secura utilizando-se corrente de  $\text{N}_2$ . As amostras foram ressuspensas em 4 mL de metanol, homogeneizadas e filtradas em membranas ( $0,45 \mu\text{m}$ ). As amostras extraídas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, nas seguintes condições: 282 nm, coluna C18, temperatura ambiente, fase móvel metanol e vazão de  $0,8 \text{ mL/min}$ .



**Figura 4.10** - Cromatograma de uma amostra padrão com o pico do ergosterol

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS SOLOS

Os valores médios ( $\pm$  desvio padrão) das análises granulométricas dos solos estão apresentados na Tabela 5.1. As análises revelaram que na região de rizosfera com profundidade de 0-20 cm, onde foram coletadas as amostras, os solos possuem classe textural arenosa. Segundo Fageria e Stone (2006), esta classe de solos inclui todos os solos cujo teor total de areia é de 70 % ou mais, dividido novamente nas classes areia (maior que 90 %) e areia-franca (menor que 90 %) e são frequentemente referidos como solos de textura grosseira.

**Tabela 5.1** – Granulometria dos solos

<b>Solos</b>	<b>A T (%)</b>	<b>A G (%)</b>	<b>A F (%)</b>	<b>Silte (%)</b>	<b>Arg. (%)</b>	<b>Classe Textural</b>
A	85,73 ( $\pm$ 0,44)	50,25 ( $\pm$ 1,74)	35,48 ( $\pm$ 1,29)	6,43 ( $\pm$ 1,04)	7,73 ( $\pm$ 1,36)	Arenosa- Areia franca
B	76,81 ( $\pm$ 2,97)	50,18 ( $\pm$ 2,12)	26,63 ( $\pm$ 0,86)	12,84 ( $\pm$ 1,34)	10,32 ( $\pm$ 1,64)	Arenosa- Areia franca

AT=Areia total; AG=Areia grossa; AF=Areia fina; Arg.=Argila.

A Tabela 5.2 apresenta os resultados dos valores médios ( $\pm$  desvio-padrão) das análises de umidade natural e experimental, da capacidade de campo, de pH, da quantidade de unidade formadora de colônia por grama de solo (UFC/g), da quantidade de PBZ, invertase e ergosterol dos solos das regiões A e B.

**Tabela 5.2** – Características químicas, físicas e biológicas dos solos

Variáveis	Solo A	Solo B
Umidade natural (%)	0,06 ( $\pm$ 0,00)	0,13 ( $\pm$ 0,02)
Umidade experimental (%)	4,97 ( $\pm$ 0,39)	5,03 ( $\pm$ 0,02)
Capacidade de campo (%)	27,84 ( $\pm$ 1,0)	65,10 ( $\pm$ 2,84)
pH <sub>(H<sub>2</sub>O)</sub>	7,23 ( $\pm$ 0,14)	7,65 ( $\pm$ 0,05)
UFC/g	3,66x10 <sup>5</sup> ( $\pm$ 2,83x10 <sup>3</sup> )	4,40x10 <sup>5</sup> ( $\pm$ 3,11x10 <sup>4</sup> )
PBZ ( $\mu$ g/g)	4,22( $\pm$ 0,24)	3,8 ( $\pm$ 0,11)
Invertase (U)	1,06 ( $\pm$ 0,05)	1,43 ( $\pm$ 0,05)
Ergosterol ( $\mu$ g/g)	0,05 ( $\pm$ 0,00)	0,04 ( $\pm$ 0,00)

Segundo Ribeiro et al. (2009) os solos da classe textural arenosa são solos com baixa disponibilidade de água e altas taxas de infiltração, estas características podem justificar os baixos valores de umidade natural verificados em ambos os solos. Estes valores foram significativamente diferentes entre ambos os solos ( $F = 61,39$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

A capacidade de campo do solo da região B foi 134 % maior do que a capacidade de campo do solo da região A, provavelmente os maiores teores de silte e argila verificados no solo da região B (Tabela 5.1) contribuíram para a maior capacidade de campo do solo desta região.

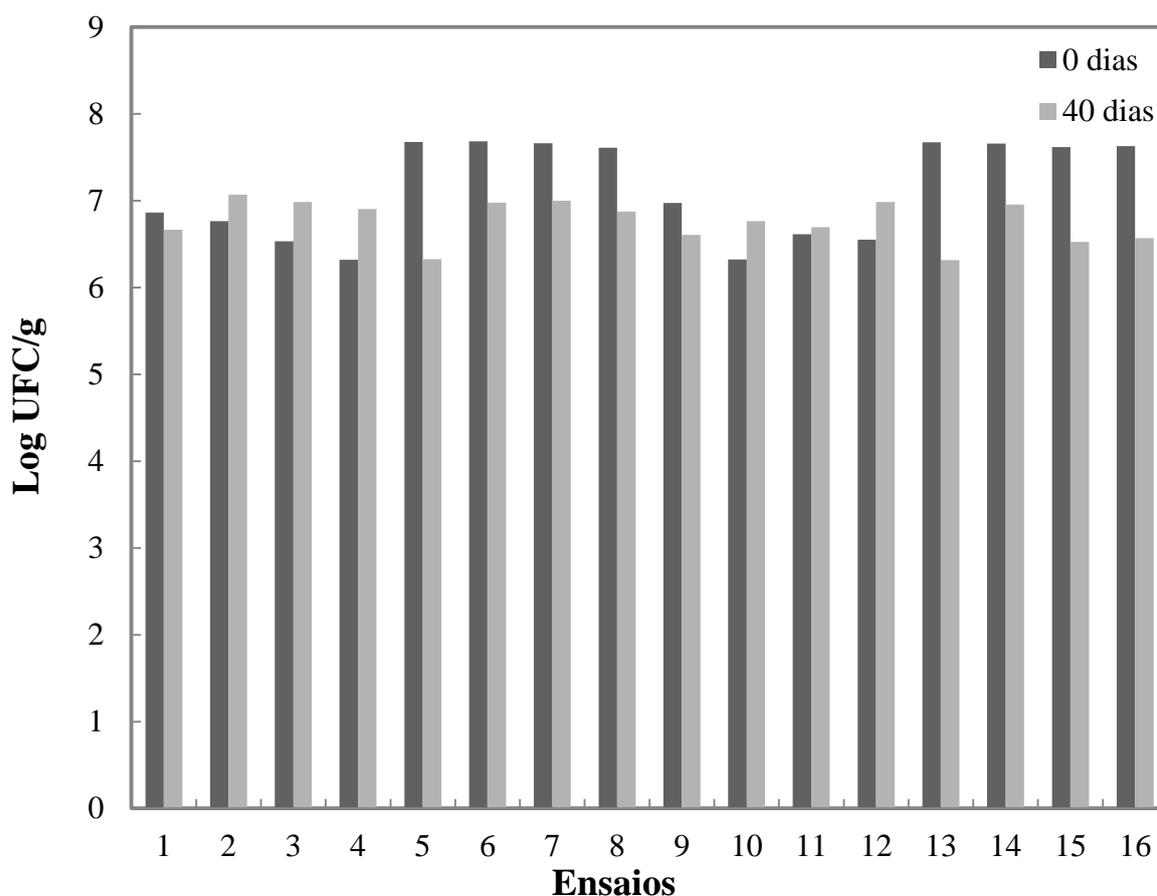
De acordo com Alvarez et al. (1999) quanto ao valor do pH em água, os solos das regiões A e B apresentaram alcalinidade fraca (7,1 – 7,8). O pH do solo da região B foi 5,8% maior que o pH da região A entretanto, estes valores não foram significativamente diferentes ( $F = 16,09$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

A quantidade de UFC/g no solo da região B foi 20 % maior do que no solo da região A, os valores observados de UFC/g foram significativamente diferentes entre ambos os solos ( $F = 22,16$ ;  $\alpha = 0,05$ ), nota-se também que a atividade de invertase no solo da região B foi 35 % maior do que no solo da região A e estes valores também foram significativamente diferentes ( $F = 179,72$ ;  $\alpha = 0,05$ ). Segundo Estermann e McLaren (1961) a origem de invertase nos solos está atribuída principalmente às raízes do que à microbiota da rizosfera.

A quantidade de PBZ no solo da região A foi 5,3 % maior do que no solo da região B. As quantidades de PBZ observadas não foram significativamente diferentes ( $F = 0,15$ ;  $\alpha = 0,05$ ). A quantidade de ergosterol no solo da região A foi 25 % maior do que a quantificada no solo da região B. As quantidades do conteúdo ergosterol foram significativamente diferentes ( $F = 28$ ;  $\alpha = 0,05$ ).

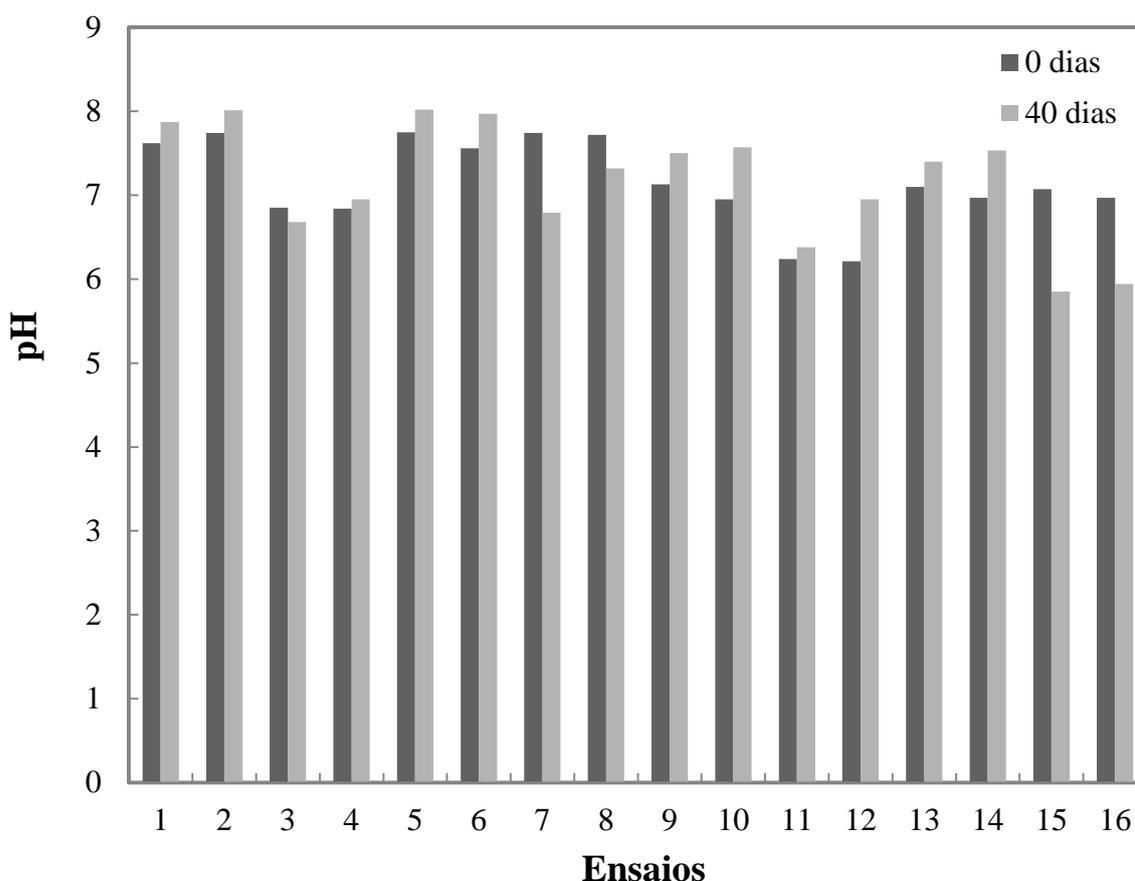
## 5.2 EFEITO DO GLICEROL, MEIO MINERAL, INÓCULO E DOIS SOLOS SOBRE O CRESCIMENTO MICROBIANO, O pH E A BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL

A Figura 5.1 mostra o crescimento (Log UFC/g) da microbiota dos solos obtido em todos os ensaios do planejamento fatorial  $2^4$ . Comparando os resultados no tempo 0 e 40 dias nota-se que no ensaios 1 e 9 houve redução do crescimento. Provavelmente, isso ocorreu devido ao esgotamento de nutrientes dos solos, uma vez que apenas água destilada estéril foi adicionada (ensaios controle). Da mesma forma, nos ensaios 5, 6, 7, 8, 13, 14, 15 e 16 houve redução da microbiota dos solos. A competição microbiana do solo também pode ter contribuído para reduzir o crescimento dos micro-organismos (THOMPSON et al., 2005). Nos ensaios com adição de glicerol e/ou meio mineral (2, 3, 4, 10, 11 e 12) houve aumento no crescimento, independente do solo utilizado. Geralmente, a utilização simultânea de diferentes fontes de carbono favorece o crescimento microbiano em situações de limitações de carbono (BAKER, 1994).



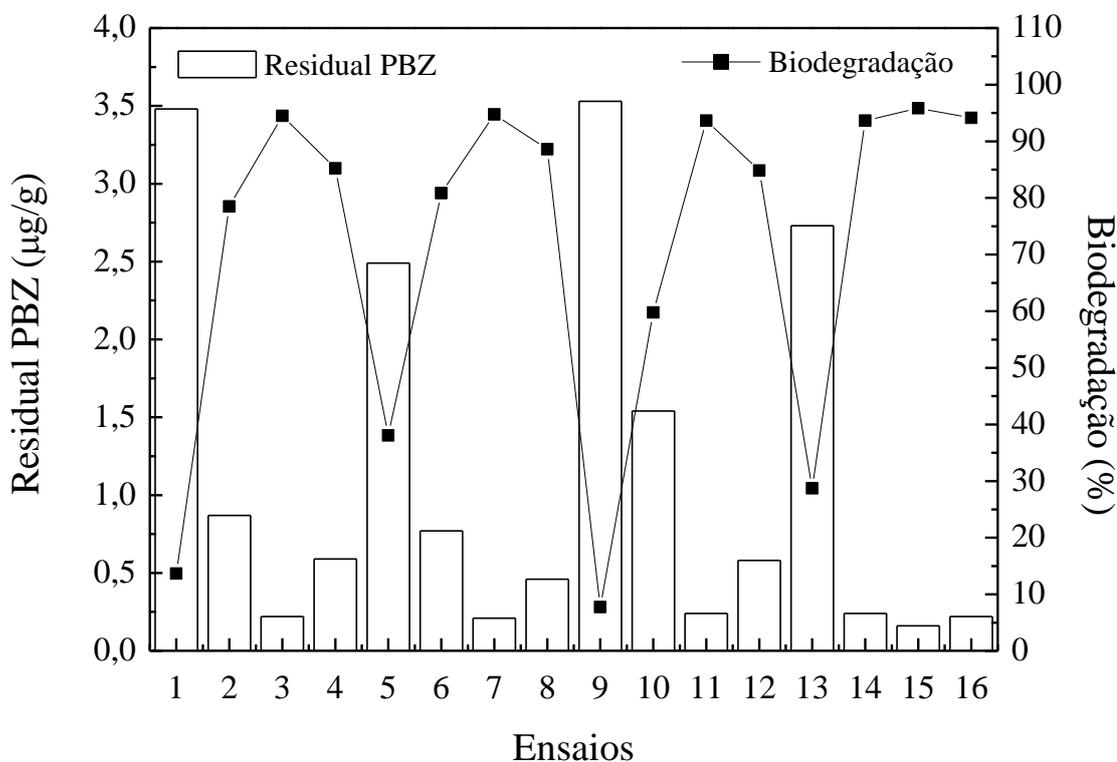
**Figura 5.1** - Crescimento da microbiota dos solos obtido em todos os ensaios do planejamento fatorial

A Figura 5.2 mostra a variação de pH observada nos tempos 0 e 40 dias em ambos os solos. Os valores de pH variaram entre 6 a 8. Nos ensaios 3, 7, 8, 15 e 16 houve redução do pH. As condições experimentais dos ensaios foram semelhantes em 7 e 15, bem como em 8 e 16. No primeiro caso, foram adicionados aos solos meio mineral e inóculo. Por outro lado, no segundo caso, foram adicionados glicerol, meio mineral e inóculo. Embora tenha ocorrido uma diminuição do pH em ambos os solos nas condições mencionadas, a maior queda ocorreu quando o solo B foi utilizado. Em todos os outros ensaios foi observado aumento do pH.



**Figura 5.2** - Variação de pH dos solos obtido em todos os ensaios do planejamento fatorial

A Figura 5.3 mostra a biodegradação de paclobutrazol nas condições do planejamento fatorial. Os menores valores foram obtidos nos ensaios 1 (14 %) e 9 (8 %). Em tais ensaios não foi adicionado glicerol, meio mineral ou inóculo. A biodegradação foi possível devido à ação da microbiota natural presente nos solos. Esta capacidade da microbiota em degradar o paclobutrazol deve-se ao histórico de aplicação de PBZ que ambos os solos apresentavam. Depois de repetidas aplicações de alguns agroquímicos, os micro-organismos do solo podem degradar estes compostos, pois se tornam adaptados para usar o agroquímico como uma fonte de carbono para produção de energia e para o crescimento. Embora existam alguns outros fatores que afetam a persistência de agroquímicos no solo, tais como temperatura, pH do solo, hidrólise química e teor de água, os micro-organismos do solo parecem desempenhar um papel importante na degradação destes compostos (ABDELRAHMAN, 2010).



**Figura 5.3** - Biodegradação de paclobutrazol nas condições do planejamento fatorial

Valores de biodegradação de 79 % e 60 % foram observados quando apenas o glicerol foi adicionado aos solos, isto ocorreu nos ensaios 2 e 10, respectivamente. Entretanto, a biodegradação alcançou valores em torno de 94 % (ensaios 3 e 11) quando apenas o meio mineral foi adicionado. Por outro lado, com a adição de glicerol e meio mineral simultaneamente a biodegradação foi de cerca de 85 %. Nos ensaios 5 e 13, a biodegradação foi 38 % e 29 %, respectivamente. Nestes ensaios, apenas o inóculo foi adicionado. Nos ensaios em que o bioestímulo e o bioaumento foram realizados simultaneamente (ensaios 6, 7, 8, 14, 15 e 16) foram obtidas altos valores de biodegradação. Os valores variaram entre 81 % e 96 %.

Vaz et al. (2012) estudaram a biodegradação de PBZ em dois solos sob condições saturadas. O valor máximo de 43 % de biodegradação em 14 dias foi observado, quando foi utilizado apenas PBZ como única fonte de carbono. Por outro lado, o valor máximo de 70 % de biodegradação em 28 dias foi verificado, quando o glicerol foi usado como uma fonte de carbono adicional.

A combinação do bioestímulo e do bioaumento pode ser uma estratégia promissora, pois a adição de receptores de elétrons pode favorecer o potencial degradador tanto de microrganismos nativos quanto dos não-nativos (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005). Silva et al. (2004) desenvolveram uma estratégia conjunta utilizando bioaumento e bioestímulo para remediação de solos contaminados com uma alta concentração de atrazina. O bioaumento foi realizado utilizando *Pseudomonas sp.* ADP resultando em uma remoção limitada da atrazina dos solos. Entretanto, realizando o bioaumento juntamente com o bioestímulo com a adição de citrato e succinato, foi verificado o aumento na sobrevivência das células bacteriana e maior mineralização do herbicida.

Os resultados observados para o crescimento, biodegradação e pH seguiram o mesmo comportamento em ambos os solos. Nos ensaios controle (1 e 9) e nos ensaios 5 e 13 (ensaios apenas com bioaumento), o crescimento diminuiu, a biodegradação foi baixa e o pH aumentou. O maior valor de pH observado nestes ensaios foi igual a 8 verificado no ensaio 5. Por outro lado, nos ensaios 2, 3, 4, 10, 11 e 12 o crescimento aumentou, a biodegradação foi alta e o pH aumentou, com exceção do ensaio 3. O maior valor de pH também foi cerca de 8 nestes ensaios. Redução do crescimento e aumento da biodegradação foi observado nos ensaios 6, 7, 8, 14, 15 e 16. Do mesmo modo, o aumento do pH ocorreu nos ensaios 6 e 14, entretanto houve redução do pH nos ensaios 7, 8, 15 e 16. Estes últimos ensaios (15 e 16) apresentaram o valor de pH mais baixo sendo os valores 5,85 e 5,94, respectivamente. A medição do pH é um fator importante como indicador das reações microbiana do solo. As bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo deste valor para degradar compostos xenobióticos (SPINELLI, 2006).

**Tabela 5.3** – Crescimento, variação de pH e biodegradação nos ensaios do planejamento fatorial

<b>Ensaio</b>	<b>Crescimento (<math>\Delta</math> Log UFC/g)</b>	<b><math>\Delta</math> pH</b>	<b>Biodegradação (%)</b>
1	-0.20	0.25	13.66
2	0.31	0.27	78.51
3	0.45	-0.17	94.48
4	0.59	0.11	85.23
5	-1.35	0.27	38.06
6	-0.70	0.41	80.86
7	-0.66	-0.95	94.74
8	-0.74	-0.40	88.59
9	-0.37	0.37	7.75
10	0.44	0.62	59.79
11	0.08	0.14	93.65
12	0.43	0.74	84.85
13	-1.36	0.3	28.74
14	-0.70	0.56	93.65
15	-1.09	-1.22	95.85
16	-1.06	-1.03	94.13

### 5.3 ANÁLISE DO PLANEJAMENTO FATORIAL

Glicerol ( $X_1$ ), meio mineral ( $X_2$ ) e inóculo ( $X_3$ ) foram os fatores significativos sobre a biodegradação (Tabela 5.4). A adição de glicerol, meio mineral e inóculo aumentaram a biodegradação independente do solo, pois o fator solo ( $X_4$ ) não foi significativo sobre a biodegradação. Entretanto, os maiores valores de biodegradação (94 % a 96 % ocorreram nos ensaios 11, 14, 15 e 16) estes foram observados no solo da região B. Nestes ensaios o bioestímulo foi realizado com a adição de glicerol e/ou meio mineral. Dentre os fatores principais que apresentaram efeito significativo, o maior efeito foi apresentado pela adição do meio mineral seguido da adição de glicerol e de inóculo.

Em relação aos efeitos de interação entre os fatores apenas dois fatores de interação apresentaram efeitos significativos sobre a biodegradação:  $X_1X_2$  e  $X_2X_3$ . Como se pode observar, ambos os fatores são relacionados com a adição do meio mineral. Estes efeitos de interação foram ambos negativos, o que indica que a adição de glicerol ou do inóculo junto com o meio mineral, não favoreceram a biodegradação de PBZ, sendo a adição de glicerol

junto com o meio mineral mais significativa (- 31,31) do que a adição do meio mineral junto com o inóculo (- 8,31). Os coeficientes do modelo empírico, os valores do teste T e os valores de p para os fatores principais e de interação são apresentados na Tabela 5.4.

**Tabela 5.4** - Efeitos principais e de interação e coeficientes do modelo empírico sobre a biodegradação nos ensaios do planejamento fatorial

Contante	Efeito	Coefficiente	Teste t	p
Média	70,78	70,78	44,27	0,000000
$X_1$	24,84	12,42	7,76	0,000566
$X_2$	41,31	20,65	12,92	0,000050
$X_3$	12,09	6,04	3,78	0,012896
$X_4$	-1,97	-0,98	-0,61	0,565598
$X_1 X_2$	-31,31	-15,66	-9,79	0,000189
$X_1 X_3$	0,12	0,06	0,04	0,970500
$X_1 X_4$	1,77	0,89	0,55	0,603097
$X_2 X_3$	-8,31	-4,16	-2,60	0,048326
$X_2 X_4$	3,32	1,66	1,04	0,346045
$X_3 X_4$	4,50	2,25	1,41	0,218832

A Tabela 5.5 apresenta a análise de variância (ANOVA) do modelo empírico. A ANOVA avalia a significância dos efeitos principais e de interação sobre a biodegradação. Os resultados mostraram um coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 98,58 %, o que indica a precisão do modelo empírico para explicar os dados experimentais. Os valores do teste F foram calculados como a razão entre as médias quadráticas. O alto valor de F e o baixo valor de p dos efeitos principais indicam que alguns fatores principais ( $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$ ) contribuíram mais significativamente para a biodegradação do que os efeitos de interação.

**Tabela 5.5** - Análise de variância do modelo empírico

<b>Fonte de variação</b>	<b>Soma quadrática</b>	<b>Número de graus de liberdade</b>	<b>Média quadrática</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Regressão	14075,80	5	2815,16	137,63	0,0124
Resíduo	204,55	10	20,45		
Total	14280,35				
% de variação explicada	0,9858				

Através da aplicação de análise de regressão múltipla dos dados experimentais, um modelo polinomial de segunda ordem apresentado na Equação 5.1 com unidade codificada explica o papel de cada fator e suas interações.

$$Y = 70,78 + 12,42X_1 + 20,65X_2 + 6,04X_3 - 0,94X_4 - 15,66X_1X_2 + 0,06X_1X_3 + 0,84X_1X_4 - 4,16X_1X_3 + 1,66X_2X_4 + 2,25X_3X_4 \quad \text{Eq. (5.1)}$$

Onde Y é a biodegradação (%) e Xi é fator de nível na unidade codificada (1 ou -1), i = 1 -4 por quatro factores. Depois de negligenciar os termos insignificantes com base no nível de 5% de significância, o modelo empírico torna-se:

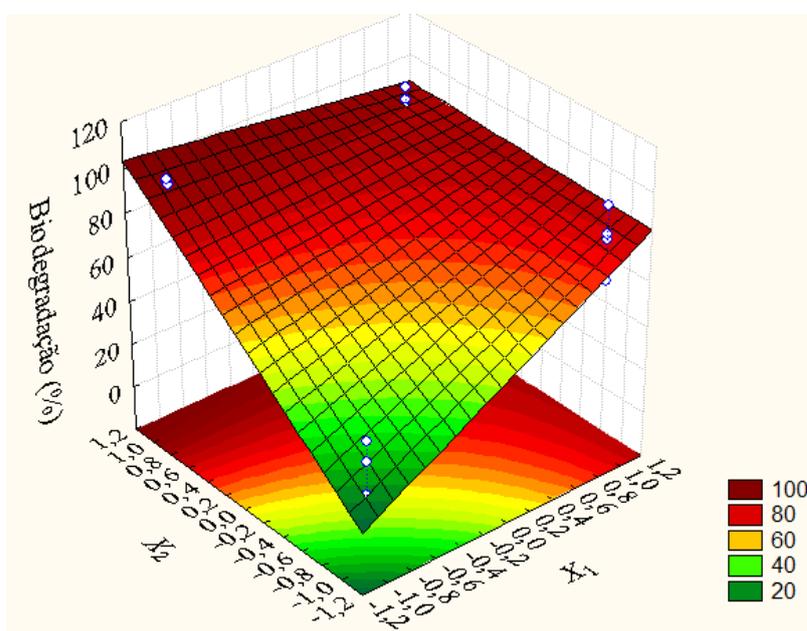
$$Y = 70,78 + 12,42X_1 + 20,65X_2 + 6,04X_3 - 15,66X_1X_2 - 4,16X_2X_3 \quad \text{Eq. (5.2)}$$

A equação 5.2 mostra que o glicerol ( $X_1$ ), meio mineral ( $X_2$ ) e inóculo ( $X_3$ ) foram os factores responsáveis pela maior parte da degradação observada. Há apenas dois termos de interação significativos ( $X_1X_2$  e  $X_2X_3$ ). Isto indica efeito sinérgico adicional destes factores.

O bioestímulo acelera a biodegradação como a adição de um ou mais nutrientes limitantes da velocidade da população microbiana que habita (Nikoloupolou e Kalogerakes, 2009).

Para entender melhor a relação entre a biodegradação de PBZ e os fatores principais significativos  $X_1$  (glicerol),  $X_2$  (meio mineral) e  $X_3$  (inóculo), as superfícies de resposta também foram analisadas e estão apresentadas nas Figuras 5.4, 5.5 e 5.6. Na análise das figuras a seguir considera-se que melhor resposta para a biodegradação encontra-se na região vermelha mais escura da superfície. Os valores negativos (- 0,2 a -1,2) nos eixos dos fatores  $X_1$ ,  $X_2$  e  $X_3$  indicam sem adição destes, enquanto que os valores positivos (0,2 a 1,2) nos eixos dos fatores indicam com adição.

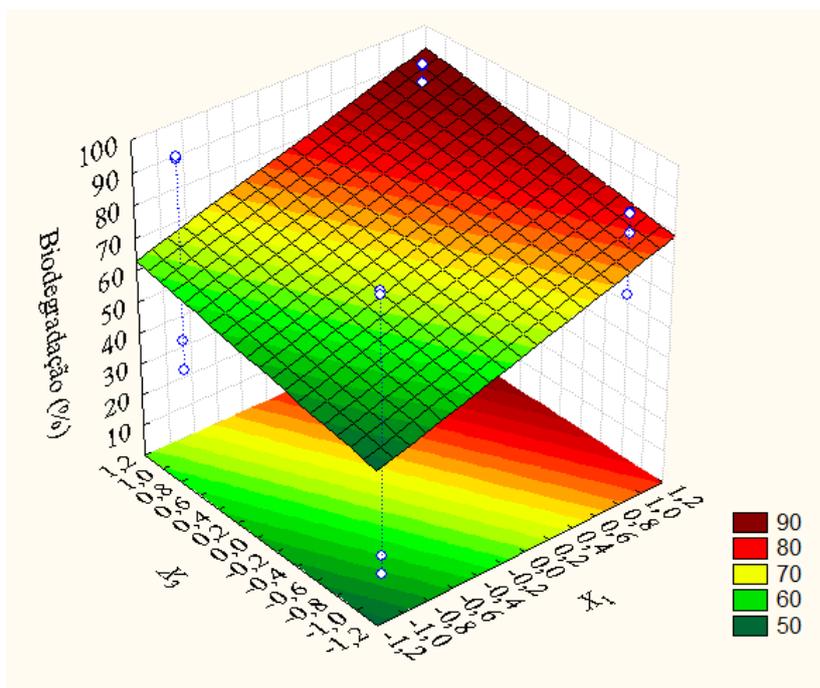
A Figura 5.4 apresenta a superfície de resposta para  $X_1$  (glicerol) e  $X_2$  (meio mineral) sobre a biodegradação. Nota-se que sem adição de glicerol e meio mineral a biodegradação atingiu valores menores que 60 % (região verde). Com a adição de glicerol, mas sem meio mineral pode-se observar até 80 % de biodegradação (região vermelha mais clara), entretanto, com a adição apenas de meio mineral a biodegradação foi quase 100 % (região vermelha escura). Percentual de biodegradação parecido com o observado apenas com a adição de meio mineral pode ser observado quando o glicerol e o meio mineral foram adicionados juntos.



**Figura 5.4** - Superfície de resposta para  $X_1$  (glicerol) e  $X_2$  (meio mineral) sobre a biodegradação do PBZ

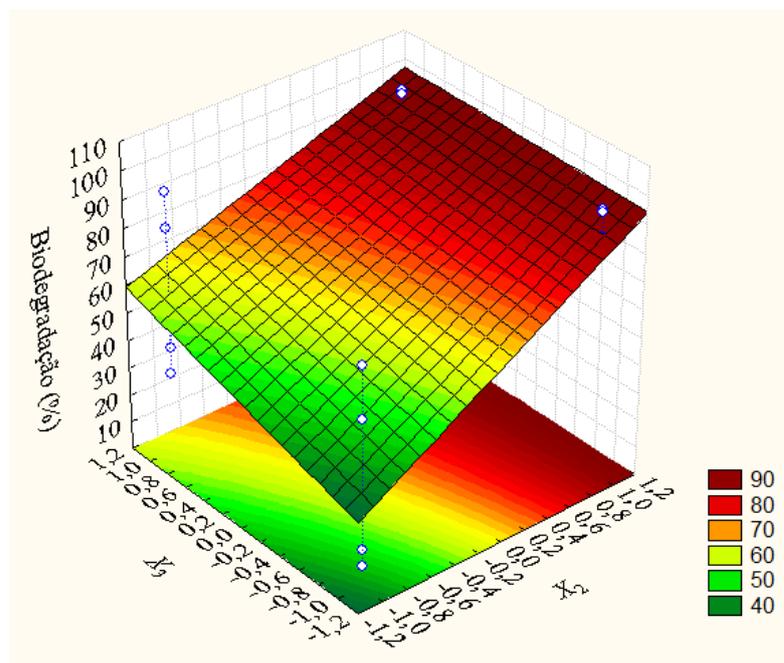
Observa-se na Figura 5.5 a superfície de resposta para  $X_1$  (glicerol) e  $X_3$  (inóculo) sobre a biodegradação. Verifica-se que sem a adição de glicerol e inóculo a biodegradação foi menor que 70 % (região verde). Com glicerol, mas sem inóculo a pode-se observar até 80 %

de biodegradação (região vermelha mais clara). Sem glicerol, mas com inóculo a biodegradação foi até 60 % (região verde claro). Com glicerol e inóculo a biodegradação foi de 90 % (região vermelha escura).



**Figura 5.5** - Superfície de resposta para  $X_1$  (glicerol) e  $X_3$  (inóculo) sobre a biodegradação do PBZ

A Figura 5.6 apresenta a superfície de resposta para  $X_2$  (meio mineral) e  $X_3$  (inóculo) sobre a biodegradação. Pode-se observar que sem meio mineral e sem inóculo a biodegradação foi menor que 60 % (região verde). Com inóculo e sem meio mineral a biodegradação foi menor que 70 % (região verde). Entretanto, com adição de meio mineral e sem inóculo a biodegradação foi até 90 % (vermelho escuro), este valor percentual também foi observado quando meio mineral e inóculo foram adicionados juntos.



**Figura 5.6** - Superfície de resposta para  $X_2$  (meio mineral) e  $X_3$  (inóculo) sobre a biodegradação do PBZ

A estratégia de bioestímulo (adição do meio mineral) foi mais eficiente do que a de bioaumento (adição do inóculo composto pelas três linhagens de *Pseudomonas* spp). Os valores mais baixos de biodegradação quando realizado o bioaumento em comparação ao bioestímulo deve-se provavelmente à perda de viabilidade dos micro-organismos causada pelas variações drásticas no ambiente (vanVEEN et al., 1997). Além disso, depois de repetidas aplicações de alguns pesticidas, os micro-organismos do solo tornam-se adaptados ao uso destes compostos como fonte de carbono e de energia. Eventualmente, a microbiota adaptada ao composto xenobiótico apresenta maior capacidade de remediação quando comparado a microbiota sem histórico de exposição ao xenobiótico e, portanto, o bioestímulo pode ser suficiente nestes casos (LEAHY; COLWELL 1990). Isso também deve ter favorecido a semelhante biodegradação em ambos os solos, uma vez que ambos são de regiões de contínua aplicação de PBZ.

Na literatura existe uma discussão sobre qual é a estratégia (bioestímulo ou bioaumento) mais eficiente para remediar solos contaminados por xenobióticos. Aparentemente diversas circunstâncias como o tipo de molécula xenobiótica, o histórico de exposição dos micro-organismos nativos ao composto xenobiótico e características físico-

químicas dos solos influenciam de forma significativa na escolha da técnica a ser aplicada (TYAGI et al., 2011).

Hamdi et al. (2007) consideraram que a seletividade de micro-organismos capazes de degradar um composto xenobiótico define a eficácia do processo de biorremediação em vez de adicionar nutrientes ao local contaminado. Bento et al., (2005), compararam a biorremediação de óleo diesel por atenuação natural, bioestímulo e bioaumento. Eles concluíram que a melhor abordagem para biorremediação de óleo diesel foi o bioaumento realizado pela inoculação de micro-organismos pré-selecionados a partir do local contaminado. Segundo estes autores aparentemente, os micro-organismos nativos (pré-selecionados para bioaumento) são mais propensos a sobreviver e se propagar quando reintroduzidos no local contaminado, em comparação com micro-organismos não nativos (BENTO et al., 2005; THOMPSON et al., 2005). Entretanto, existem estudos laboratoriais e de campo que demonstram que a inoculação de uma cultura proveniente do próprio local contaminado não afetam a taxa de remoção de hidrocarbonetos, sendo o bioestímulo a estratégia mais eficaz para remoção deste xenobiótico (THOMASSIN-LACROIX et al., 2002).

O bioestímulo pode fornecer nutrientes e condições adequadas para os micro-organismos nativos e não nativos do solo. Desta forma, esta estratégia torna-se uma abordagem viável nos casos em que a população microbiana já se encontra adaptada devido à exposição ao xenobiótico nos locais contaminados. Entretanto, flutuações extremas do pH dos solos após adicionar nutrientes, podem interferir na biorremediação deste ambiente após aplicar esta estratégia (GENTRY et al., 2004). Devido às limitações associadas com bioaumento e bioestímulo quando aplicados individualmente, estas técnicas estão surgindo como complementares. Hamdi et al. (2007) utilizando as duas estratégias para remover hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HAP) de solos obtiveram maiores taxas de dissipação deste composto, quando realizou as duas estratégias simultaneamente.

## 6 CONCLUSÕES

Por se tratar de solos pertencentes à mesma classe textural, apesar dos maiores valores de silte e de argila no solo da região B, os solos não foram significativos para biodegradação, uma vez que ambos apresentavam histórico de aplicação do paclobutrazol.

A adição de glicerol e/ou meio mineral causaram os maiores aumentos na variação do crescimento da microbiota de ambos os solos.

O crescimento da microbiota de ambos os solos favoreceu a biodegradação de paclobutrazol.

A melhor estratégia de biorremediação encontrada neste trabalho foi o bioestímulo (pela adição do meio mineral) esta estratégia pode ser aplicada em ambos os solos.

A adição de glicerol e/ou meio mineral causaram os maiores aumentos na variação do crescimento da microbiota de ambos os solos.

O crescimento da microbiota de ambos os solos favoreceu a biodegradação de paclobutrazol.

A melhor estratégia de biorremediação encontrada neste trabalho foi o bioestímulo pela adição do meio mineral.

Estudos futuros *in situ* poderão ser realizados utilizando a estratégia de bioestímulo.

## 7 REFERÊNCIAS

ABDELRAHMAN, H: **Biodegradation of some pesticides by soil microorganisms**. 2004. 112 f. Dissertação (Mestrado em microbiologia agrícola) Faculdade de agricultura, Universidade de Zagazig, Moshtohor, 2010.

ALEXANDER, M. **Introduction to soil Microbiology**. New York: J. Wiley, 1977. 467p.

ALEXANDER, M. Microbial communities and interactions: a prelude. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: ASM Press, 1997. p. 5-13.

ALVAREZ V. V.H.; NOVAES, R. F.; BARROS, N. F.; CANTARUTTI, R. B.; LOPES, A.S. Interpretação dos resultados das análises de solos. In: RIBEIRO, A.C.; GUIMARAES, P.T.G.; ALVAREZ V., V.H. **Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5º Aproximação**. Viçosa: Editora Universidade Federal de Viçosa.1999. p. 25-32.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/9d1f4d0047457c378916dd3fbc4c6735/Consulta+P%C3%BAblica+n%C2%BA+5%2C+de+29+de+fevereiro+de+2008..pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em 21 de set. 2013.

ARANGO, H. G. **Bioestatística teórica e computacional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. 438p.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 72 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, v.52, p.799-804, 2003.

ARAÚJO, A. S. F.; SANTOS, V. B.; MELO, W. J.; BROOKES. P. C. Determinação da biomassa microbiana do solo. In: FIGUEIREDO, M, V, B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. 1º Edição, Brasília: Embrapa, 2010, p.584- 587.

ATLAS, R.M. Bioremediation of petroleum pollutants. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v.35, p.317–327, 1995.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum-hydrocarbons and environmental perspective. *Microbial Reviews*. v.45, p.180-209. 1981.

ATTIYA, H. J.; FIELD, R. J.; HILL, G. D. Effects of PP333 and TIBA growth regulators on development and yield components of spring sown field beans (*Vicia faba* L.). *Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand*, v.13, p.81-87, 1983.

AUDUS, L. J. Microbial breakdown of herbicides in soil. In: WOODFORD, E. K.; SAGAR, G. R. **Herbicides and the soil**. Oxford: Blackwell, 1960. p.1-19.

BAKER, K. H. Bioremediation of surface and subsurface soils. In: BAKER, K. H.; HERSON, D. S. **Bioremediation**. New York: McGraw-Hill, 1994. p.203-249.

BARROS-NETO, B.; SCARMINIO, I.S.; BURNS, R.E. 2007. **Como fazer experimentos**. Campinas: Editora Unicamp, Campinas, 480p.

BARRET, J. E.; BARTUSKA, C. A. PP333 effects on stem elongation dependente on site of application. *HortScience*. v.17, p.737-738, 1982.

BARRIUSO, E., CALVET, R., SCHIVANO, M.; G. SOULAS. Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. *Etudes et Gestion des Sols*. v. 3, p. 279-296, 1996.

BAUSHER, M.G.; YELENOSKY, G. Sensitivity of potted citrus plants to top sprays and soil applications of paclobutrazol. *HortScience*. v.21, p.141- 143, 1986.

BENTO, F. M. et al. Comparative biorremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*. Oxon, v.96, n.9, p.1049-1055, 2005.

BRASIL. Presidência da República. Lei nº7.802, de 11 de julho de 1989. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/leis/17802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm)>. Acesso em: 15 jan. 2014.

BRASIL. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Alice web: dados das exportações brasileiras por período. Disponível em: <<http://aliceweb2.mdic.gov.br/>>. Acesso em: 02 ago. 2013.

BOUCHEZ, T et al. Ecological study of a bioaugmentation failure. *Environmental Microbiology*. v.2 n.2, p.179-190, 2000.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS Microbiology Letters*. v. 209, p.141-148, 2002.

BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*. Oxford, v.14, p.423-427, 1982.

BUTTON, S. T. Metodologia para planejamento experimental e análise de resultados. Disponível em: <<http://www.fem.unicamp.br/~sergio1/pos-graduacao/IM317/im317.htm>> Acessado em agosto de 2013.

CALADO, V.; MONTGOMERY, D. **Planejamento de experimentos usando o Statistica**. Rio de Janeiro: e-papers, 2003, 257p.

CALDWELL, D. E.; WOLFAARDT, G. M.; KORBER, D. R.; LAWRENCE, J. R. Cultivation of Microbial Consortia and Communities. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, Washington: Ed. ASM Press, 1997. p.5-13.

CHEN, Y.; LIN, C. J.; JONES, G.; FU, S.; ZHAN, H. Enhancing biodegradation of wastewater by microbial Consortia with fractional factorial design. *Journal of Hazardous Materials*. v.171, p. 948-953. 2009.

CHEAR, U.B.; KIRKWOOD, R.C.; LUM, K.Y. Degradation of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. *Journal Agric. Food Chem*. v. 46, p. 1217- 1223, 1998.

CHIOCCHIO, V.M.; MATKOVIC, L. Determination of ergosterol in cellular fungi by HPLC. A modified technique. *The Journal Argentine Chemical Society*, n. 98, p. 10-15, 2011.

COSTA, M. A.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Mobilidade do paclobutrazol em um solo franco-arenoso cultivado com manga no nordeste brasileiro. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 32, n. 5, p. 2177-2182, 2008.

DAVIS, T. D.; STEFFENS, G. L.; SANKHALA, N. Triazole plant growth regulators. *Horticultural Reviews*. v.10, p.63-105, 1988.

DELGADO, R. R.; CASAMAYOR, J. L.; RODRIGUEZ, R.; CRUZ, R. F. R. Paclobutrazol effects on oranges under tropical conditions. *Acta Hort.*, v.179, p.537-543, 1986.

DELGADO, R. R.; RODRIGUEZ, R.; CASAMAYOR, R. Empleo de paclobutrazol em plantas de lima persa sobre naranjo trifoliado 'Rubdoux' a altas densidades. **Agrícola Vergel**. p.121-125, 1995.

DEXTER, A. R. Soil physical quality Part I. Theory, effects of soil texture, density, and organic matter, and effects on root growth. *Geoderma*. Amsterdam, v.120, p.201-214, 2014.

DIBBLE, J. T.; BARTHA, R. Effect of environmental parameters on the biodegradation of oil sludge. *Applied and Environmental Microbiology*. n.3, p.729-739, 1979.

DICK R. P.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING, F. B. **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.95-127.

DICK, R. P.; BREACKWELL, D. P.; TURCO, R. F. Soil enzyme activities and biodiversity measurements as integrative microbiological indicators. In: DORAN, J. W.; JONES, A. J. **Methods for assessing soil quality**. Madison: SSSA, 1996. p.247-271.

DICK, W. A.; TABATABAI, M. A. Significance and potential uses of soil enzymes. In: METTING, F. B. **Soil Microbial Ecology**. New York: Marcel Dekker, 1992. p.95-127.

DORAN, J. W.; PARKIN, T. B. Defining and assessing soil quality. In: DORAN, J. W. et al. **Defining soil quality for a sustainable environment**. Madison: SSSA, 1994. p.3-21.

DUAH-YENTUMI, S.; JOHNSON, D. B. Changes in soil microflora in response to repeated applications of some pesticide. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v.18, n.6, p.629-635, 1986.

EASH, N. S.; STAHL, P. D.; PARKIN, T. B.; KARLEN, D. L. A simplified method for extraction of ergosterol from soil. **Soil Science of Society of American Journal**, v. 60, p. 468-471, 1996.

EL FANTROUSSI S.; AGATHOS S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation. *Current Opinion in Microbiology* n.8 p. 268-275, 2005.

ESTERMAN, E.F.; McLAREN, A.D. Contribution of rhizoplane organism to the total capacity of plants to utilize organic nutrients. *Pl. Soil, Hague*. v.15. p. 243-260,1961.

FAGERIA, K. N; STONE, L. F. Qualidade do solo e meio ambiente. Disponível em: <[http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/25088/1/doc\\_197.pdf](http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAF/25088/1/doc_197.pdf)> Acesso em 07 fev. 2013.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. v. 11, p. 1-16, 2001.

FLETCHER, A., GILLEY, A.; SANKHLA, N.; DAVIES, T. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. *Horticultural Reviews*. v. 24, p. 55-138, 2000.

FEIGL, B. J.; SPARLING, G. P.; ROSSI, D. J. Soil microbial in Amazonian soils: evaluation of methods and estimates of pool sizes. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v.27, n.11, p.1467-1472, 1995.

FERREIRA, D. G. **Biorremediação de solo argiloso contaminado com gasolina aditivada com diferentes teores de etanol**. 2010. 177f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2010.

FONSECA, N.; NETO, M. T. C.; LEDO, C. A. S. Paclobutrazol e estresse hídrico no florescimento e produção da mangueira (*Mangifera indica*) 'Tommy Atkins'. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 27, n. 1, p. 21-24, 2005.

GALDÁMEZ, E.V.C. **Aplicação das técnicas de planejamento e análise de experimentos na melhoria da qualidade de um processo de fabricação de produtos plásticos**. 2002. 133 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.

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

GAYLARDE, C. C.; GAYLARDE P. M. A comparative study of the major microbial biomass of biofilms on exteriors of buildings in Europe and Latin America. *International Biodeterioration & Biodegradation*. v.55, n.2, p.131-139, 2005.

GENTRY, T. J.; RENSING, C.; PEPPER, I. L. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. v.34, n.5, p.447–494, 2004.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *International biodeterioration & biodegradation*. v. 54, n.1, p. 61-67, 2004.

GIANFREDA, L.; BOLLAG, G. M. Influence of natural and anthropogenic in soil. In: STOTSKY, G., BOLLAG, J. M. *Soil biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1996. p.123-193.

GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; ORTEGA, N. NANNIPIERI, P. Activity of free and immobilized urease in soil: effects of pesticides. *Soil Biology & Biochemistry*. v.26, n.6, p. 777-784, 1994.

GIANFREDA, L.; SANNINO, F.; VIOLANTE, A. Pesticide effects on the activity of free, immobilized and soil invertase. *Soil Biology & Biochemistry*. v.27 n.9, p. 1201-1208, 1995.

GOLDSTEIN, J. F.; MALLORY, L. M.; ALEXANDER, M. Reasons for possible failure of inoculation to enhance biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology*. v.50 n.4, p. 977–983, 1985.

GREENBERG, J.; GOLDSCHMIDT, E.E.; GOREN, R. Potential and limitations of the use of paclobutrazol in citrus orchards in Israel. *Acta Horticulturae*. v.329, p.58-61, 1993.

GROSSI, P. **Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para análises ambientais via GC-MS**. 2009. 148 f. Tese (Doutorado em ciências – Química Analítica) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

HAMPTON J. G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. *New Zealand Journal of Experimental Agriculture*. v. 16, n.2, p. 167-172, 1988.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*. Lawrence, v.48, p.89-93, 2000.

HARDEN, T.; JOERGENSEN, R. G.; MEYER, B.; WOLTERS, V. Mineralization and formation of soil microbial biomass in a soil treated with simazine and dinoterb. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v.25, p.273-1276, 1993.

HART, M. R.; BROOKES, P. C. Soil microbial biomass and mineralization of soil organic matter after 19 years of cumulative field applications of pesticides. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v.12, p.1641-1649, 1996.

HARVEY, R. W. In situ and laboratory methods to study subsurface microbial transport. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Washington: Ed. ASM Press, 1997. p.5-13.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I. & JEDIDI, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford v.39, p. 1926 – 1935. 2007

HILLEL, D. **Environmental Soil Physics**. New York: Academic Press, 1998. 771 p.  
KENNEDY, A. C.; PAPENDICK, R.I. Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*. Ankeny, v.50, n.3, p.243-248, 1995.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA. **Banco de dados agregados**: Sistema IBGE de recuperação automática: SIDRA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em: 18 nov. 2012.

IJAH, U. J. J.; Studies on capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*. v.18, n.5, p.293-299, 1998.

IWAHORI, S.; TOMINAGA, S. Increase in first-flush flowering of ‘Meiwa’ kunquat, *Fortunella crassifolia* Swingle, trees by paclobutrazol. *Scientia Horticulturae*. v.28, n.4, p.347-353, 1986.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A.; HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant – paclobutrazol (PP333). *Soil Biology & Biochemistry*. v. 28, n. 9, p.1265-1267, 1996.

JACOBS, K. A.; BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. *Pest Management Science*. v. 56, n.5, p.407-412, 2000.

JACQUES, J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, v. 37, n.4, p.1192-1201, 2007.

KANAZAWA, J. Measurement of the bioconcentration factors of pesticides by freshwater fish and their correlation with physicochemical properties or acute toxicities. *Pesticide Science*. v. 12, n.4, p. 417-424, 1981.

KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E. A. **Soil Microbiology, ecology and biochemistry**. 3° Ed., Academic Press, 2007, p. 53-77.

KARPOUZAS, D. G.; WALKER, A. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epI to degrade ethoprophos in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. v. 32, n. 11, p. 1753-1762, 2000.

LAPAT-POLASKO, L. T.; MCCARTY, P. L.; ZEHNDER, A. J. B. Secondary substrate utilization of methylene chloride by an isolated strain *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 47, n. 4, p. 825-830, 1984.

LEAHY, J. G; COLWELL, R. R. Microbial-degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.54, n.3, p.305–315, 1990.

LIDÓN, A.G.; BERNAL, I.M.; MARTÍNEZ, A.C.; FERNÁNDEZ, F.J.B. & CASTILLO, I.P. *Invest. Agr. Prod. Prot. Veg.*, vol. 16, p. 59-69, 2001.

LIU Y.J.; ZHANG A.N; WANG X.C. Biodegradation of phenol by using free and immobilized cells of *Acinetobacter* sp XA05 and *Sphingomonas* sp FG03. *Biochemical Engineering Journal*. v. 44, n.2, p.187-192, 2009.

MATAA, M.; TOMINAGA, S.; KOSAKI, I. Relative effects of growth retardant (Paclobutrazol) and water-stress on tree growth and photosynthesis in Ponkan (*Citrus reticulata* Blanco). *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*. v.67, n.1 p.28-34, 1998.

MCARTHUR, D. A. J.; EATON, G. W. Effect of fertilizer, paclobutrazol and chlormequat on strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. v. 112, n. 2, p. 241-246, 1987.

MEHOUACHI, J.; TADEO, F.R.; ZARAGOZA, S.; PRIMO MILLO, E.; TALON, M. Effects of gibberellic acid and paclobutrazol on growth and carbohydrate accumulation in shoots and roots of citrus rootstock seedlings. *Journal of Horticultural Science*. v.71, p.747-754, 1996.

MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S. Biodegradação acelerada de agrotóxicos. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e ambiente**, Brasília: Embrapa, 2004, p. 201-212.

MELO, W. J.; MELO, G. M. P.; ARAÚJO, A. S. F. MELO, V. P. Avaliação da atividade enzimática em amostras de solo. In: FIGUEIREDO, M. V. B.; BURITY, H. A.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, C. E. R. S.; STAMFORD, N. P. **Biotecnologia aplicada à agricultura**. Brasília: Embrapa, 2010, p.153-186.

MENDONÇA, V.; NETO, S. E. A.; HAFLE, O. M.; MENEZES, J. B.; RAMOS, J. D. Florescimento e frutificação de mangueira com uso de paclobutrazol, ethephon e nitrato de cálcio. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 23, n. 2, p. 265-269, 2001.

MILFONT, M. L.; ANTONINO, A. C. D.; MARTINS, J. M. F.; NETTO, A. M.; GOUVEIA, E. R.; CORREA, M. M. Transporte do Paclobutrazol em colunas de solo. *Revista Brasileira de Ciências do Solo*. v. 32, n.5, p. 2165-2175, 2008.

MOORMAN, T. B. Pesticide degradation of pesticide in the environment by microorganisms and sunlight. In: MATSUMURA, F.; KRISHNA MURTI, C. R. **Biodegradation of pesticides**. New York: Plenum, 1982. p. 67-87.

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

MOUCO, M. A. C. **Manejo da floração de mangueiras no Semi-Árido do nordeste brasileiro com inibidores da síntese de Giberelinas**. 2008. 120 f. Tese (Doutor em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomicas da UNESP, Botucatu, 2008.

MOUCO, M. A. C.; ALBUQUERQUE, J. A. S. Efeito do paclobutrazol em duas épocas de produção da mangueira. *Bragantina*. v. 64, n. 2, p. 219-225, 2005.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 4<sup>o</sup> Edição, Porto Alegre: Bookman; 2010, 413 p.

NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, H.R. Dermal in vitro penetration of methiocarb, paclobutrazol, and pirimicarb: effect of nonylphenoethoxylate and protective gloves. *Environmental Health Perspectives*. v. 109, n. 2, p.129-132, 2001.

OKUDA, H.; KIHARA, T. & IWAGAKI, I. Effects of paclobutrazol application to soil at the beginning of maturation on sprouting, shoot growth, flowering and carbohydrate contents in

roots and leaves of Satsuma mandarine. *Journal of Horticultural Science*. v.71, p.785-789, 1996.

OLSON, B. M.; LINDWALL, C. W. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effects of 2,4-D and glyphosate. *Soil Biology & Biochemistry*. Oxford, v.23, n.11, p.1071-1075, 1991.

PEDROSA, D.; RIBEIRO, L. C. S.; ROSA, M. A.; FERRACINI, V. L.; QUEIROZ, S. C. N. Determinação de Paclobutrazol em Manga por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Disponível em: <<http://iac.impulsahost.com.br/areadoinstituto/pibic/anais/2008/Artigos/RE0802008.pdf>> Acesso em: 09 de setembro de 2012.

PERRUCCI, P.; DUMONTET, S.; BUFO, S. A.; MAZZATURA, A.; CASUCCI, C. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. *Biology and Fertility of Soils*. Berlin, v. 32, p.17-23, 2000.

PELCZAR JR, M.J; CHAN, E.C.S.; KRIEG, N.R. Microbiologia de alimentos. In: **Microbiologia Conceitos e Aplicações**. 2 ed., 1996. p.372-387.

POWSON, D. S.; BROOKES, P. C.; CHRISTENSES, B. T. Measurement of soil microbial biomass provides an early indication of change in total soil organic matter due to straw incorporation. *Soil Biology and Biochemistry*. Oxford, v.19, p. 159-164, 1987.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. *Química Nova*. v. 30, n. 3, p.688-694, 2007.

KANDELER, E. Physiological and biochemical methods for studying soil biota and their function. In: PAUL, E. A. **Soil Microbiology, ecology and biochemistry**. 3º Ed., Academic Press, 2007, p. 53-77.

RIBEIRO, M. R.; BARROS, M. F. C.; FREIRE, M. B. G. Química dos solos salinos e sódicos. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. **Química e mineralogia do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, v.2, p.449-484, 2009.

RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P.; CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 56, n. 11, p. 3565-3575, 1990.

RODRIGUEZ-KABANA, R.; CURL, E. A. Nontarget effects of pesticides on soilborne pathogens and disease. *Annual Review of Phytopathology*. v. 18, n.3, p. 311-332, 1980.

ROGERS, S.O.; YAN, Z.H.; SHINOHARA, M.; LOBUGLIO, K.F. WANG, C.J. Messenger RNA intron in the nuclear 18S ribosomal RNA gene of deuteromycetes. *Current Genetics*. n.23,v.4, p.338-342,1993.

SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*. v. 45, n.4, p.417-425, 2001.

SANTOS, C. H.; KLAR, A. E.; FILHO, H. G.; RODRIGUES, J. D.; PIERRE, F. C. Indução do florescimento e crescimento de tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) em função da irrigação e da aplicação de paclobutrazol. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 26, n. 1, p.08-12, 2004.

SCHMIDT, S. K.; SCOW, K. M.; ALEXANDER, M. Kinetics of parantrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: Effects of second substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 53, p.2617-2623, 1987.

SHARMA, D.; AWASTHI, M. D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit in soil. *Chemosphere*. v. 60, n.2, p.164-169, 2005.

SHIMIT, J. L.; PAUL, E. A. The Significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. *Soil Biochemistry*. New York, 1990. p.357-296.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Persistência e Biomagnificação de Moléculas Xenobióticas. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*, Jaguariúna: Embrapa, 1997, p. 67-105.

SILVA, C.M.M. S; VIEIRA, R, F. Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Microbiologia Ambiental*. 2º Edição, Jaguariúna: Embrapa, 2008, p. 18-41.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; CASTRO, V. L. Xenobióticos e seus Impactos Ambientais. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. *Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol*, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003b. p. 15-35.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; CASTRO, V. L. Xenobióticos e seus Impactos Ambientais. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. *Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol*, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003b. p. 15-35.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; JONSSON, C. M. Paclobutrazol – Regulador de crescimento vegetal. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol**, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003a. p. 09-14.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação de paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, 2003c. p. 1223-1227.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; MELO, I. S. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxico e Ambiente**. 1º Edição, Brasília: Embrapa, 2004a. p.144-163.

SILVA, C.M.M. S; MELO, I. S. Biodegradação acelerada de agrotóxicos. In: SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. **Agrotóxico e Ambiente**. 1º Edição, Brasília: Embrapa, 2004b. p.193-212.

SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. **Agrotóxico e Ambiente: Persistência de moléculas xenobióticas**. 1º Edição, Brasília: Embrapa, 2004. p.221-250.

SILVEIRA A. O. **Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul**. 2007, 94f. Dissertação (Mestrado em ciências do Solo), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W.; WRIGHT, D. J. Effects of soil pH on the biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 69, n.9, p. 5198-5206, 2003.

SINGH, V. K.; BHATTACHERJEE, A. K. Genotypic response of mango yield to persistence of paclobutrazol in soil. *Scientia Horticulturae*. v. 101, n. 1, p. 53-59, 2005.

SINGH, Z. Effect of (2RS, 3RS) paclobutrazol on tree vigour, flowering, fruit set and yield in mango. *Acta Horticulturae*. v. 525, p.459-462, 2000.

SIQUEIRA, D. P.; BARCENA, J. L. G.; ESPOSTI, M. D. D. Florescimento de tangerineiras satsuma ‘Owari’ tratadas com paclobutrazol, anelamento do caule e baixa temperatura. *Revista Brasileira de Fruticultura*. v. 26, n. 3, p. 406-409, 2004.

SISINNO, C. L. S.; FILHO, E. C. O. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2013. 198p.

SNOWBALL, A.M.; WARRINGTON, I.J.; HALLIGAN, E.A. & MULLINS, M.G. Phase-change in citrus- the effects of main stem node number, branch habit and paclobutrazol application on flowering in citrus seedlings. *Journal of Horticultural Science*. v.69, p.149-160, 1994.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. **In:** RAND, G. R.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. New York: Hemisphere Publishing Corporation, 1985. p. 495-525.

SU, W. T.; WU, B. S.; CHEN, W. J.; Characterization and biodegradation of motor oil by indigenous *Pseudomonas aeruginosa* and optimizing medium constituents. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. Philadelphia v.42, p.689-695. 2011.

TABATABAI, M. A. Soil enzymes. **In:** WEAVER, R. W.; SCOTT, A.; BOTTOMELEY, P. J. **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994. p.778-835.

THOMPSON I.P.; VAN DER GAST C.J.; CIRIC, L.; SINGER, A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*. v.7 n.7, p.909-915, 2005.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento Microbiano. **Microbiologia**. 6<sup>a</sup> ed. Porto Alegre: Artmed. 1998. p.154-180.

THOMASSIN-LACROIX, E. J. M.; ERIKSSON, M.; REIMER, K.J.; MOHN, W. W. Biostimulation and bioaugmentation for on-site treatment of weathered diesel fuel in Artic soil. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* v.59, p. 551-556. 2002.

TYAGI, M.; MANUELA, M. R.F.; CARVALHO, C.C.C.R. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Springer*. v. 22, n. 2, p. 231-241, 2010.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. *Biotechnologia*. Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

VANVEEN J.A.; VANOVERBEEK L.S.; VANELSAS J.D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. v.61, n.2, p.121–135, 1997.

VAZ, F. L. **Avaliação sobre a biodegradação de paclobutrazol utilizando culturas mistas de bactérias**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

VAZ, F. L. **Biodegradação de Paclobutrazol em dois tipos de Solos cultivados com manga no Vale do São Francisco**. 2011. 90f. (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

VAZ, F. L.; NETTO, A. M.; ANTONINO, A. C. D.; AFONSO, A. C. M.; MARTINS, J. M. F.; GOUVEIA, E. R. Modelagem da cinética de biodegradação de paclobutrazol em dois solos do semiárido do nordeste brasileiro. *Química Nova*. v. 35, n. 1, p. 77-81, 2012.

VAZ, F. L.; NETTO, A. M.; ANTONINO, A. C. D.; GOUVEIA, E. R.; MARTINS, J. M. F.; Biodegradação de paclobutrazol por *Pseudomonas* spp. em sistemas de solo saturados. *Química Nova*. v. 35, n. 6, p. 1090-1096, 2012.

VERGIEVA, T. Single day treatment - a feasible tool in revealing not dependent on maternal toxicity teratogenic potential. *Advanced Experimental Medical Biology*. v. 444, p. 191-199, 1998.

VEZZANI, F. M. **Qualidade do solo na produção agrícola**. 2001, 184f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós Graduação em Ciências do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

VIEIRA, F. R. Efeito de agrotóxicos em organismos não-alvo do solo. In: SILVA C. M.M. S; FAY, E. F. **Agrotóxicos e meio ambiente**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p.259-288.

VIEIRA, R, F. Efeito de agrotóxicos em organismos não-alvo do solo. In: SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. **Agrotóxico e Ambiente**. Brasília: Embrapa, 2004. p.262-271.

VIEIRA, R. F. Parâmetros microbiológicos indicadores do efeito do diuron sobre a microflora do solo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.34, n.5, p.897-902, 1999.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C M. M. S.; MAIA, A. H. N.; FAY, E. F; COLELHO, K. C. An appraisal of live methods for the measurement of fungal population in soil treated with chlorothalonil. *Pest Management Science*. Exeter, v.56, p;431-440, 2000.

VISCHETTI, C.; PERUCCI P.; SCARPONI, L. Rimsulfuron in soil: effect of persistence on growth and activity of microbial biomass at varying environmental conditions. *Biogeochemistry*. Dordrecht, v.39, p. 165-176, 1997.

VIVANCO, J. M.; FLORES, H. E. **Control of root formation by plant growth regulators.** In: BASRA, A. S. **Plant growth regulators in agriculture and horticulture: their role and commercial uses.** London: Haworth Press, 2000. p. 1-25.

VU, J.C.; YELENOSKI, G. Growth and photosynthesis of sweet orange plants treated with paclobutrazol. *Journal of Plant Growth Regulation*. v.11, n.2, p.85-89, 1992.

WERF, H. M. G. van der. Assessing the impact os pesticide on the environment. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. Amsterdam, v.60, p.81-86, 1996.

WHITE, R. E.; KOOKANA, R. S. Measuring nutrient and pesticide movement in soil: benefits for catchment management. Australian. *Journal os Experimental Agriculture*. Collingwood.v.38, p.725-743, 1998.

YELENOSKI, G.; VU, J.C.V. & WUTSCHER, H.K. Influence of paclobutrazol in the soil on growth, nutrient elements in the leaves, and flood/freeze tolerance of citrus rootstock seedlings. *J. Plant Growth Regul.* v.14, n.3, p.129- 134, 1995.

ZU, L.; LI, G.; AN, J.; LI, J.; AN, T. Kinetic optimization of biodegradation and debromination of 2,4,6-tribromophenol using response surface methodology. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v.76, p. 18-23. 2012.