



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ESTUDO DO IMPACTO DO HERBICIDA METRIBUZIN SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS MESOFÍLICAS AERÓBICAS DE SOLO
VIRGEM**

ROSSANA GOMES VARELA

Recife – 2005

ROSSANA GOMES VARELA

**ESTUDO DO IMPACTO DO HERBICIDA METRIBUZIN SOBRE O
CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS MESOFÍLICAS AERÓBICAS
DE SOLO VIRGEM**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA
Área de Concentração: Microbiologia Aplicada
Orientador: Prof. Carlos Edison Lopes

Varela, Rossana Gomes

Estudo do impacto do herbicida Metribuzin sobre o crescimento de bactérias mesofílicas aeróbicas de solo virgem / Rossana Gomes Varela. – Recife: O Autor, 2005.

49 folhas: il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Biotecnologia, 2005.

Inclui bibliografia.

1. Herbicidas - Efeitos 2. Herbicidas - Metribuzin 3. Bactérias mesofílicas. I Título.

632.954

CDU (2.ed.)

UFPE

632.954

CDD (22.ed.)

CCB – 2009- 024

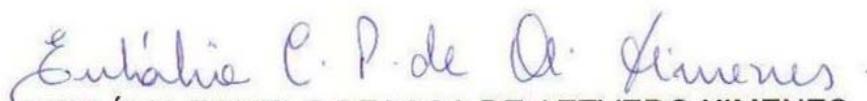
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *ROSSANA GOMES VARELA* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

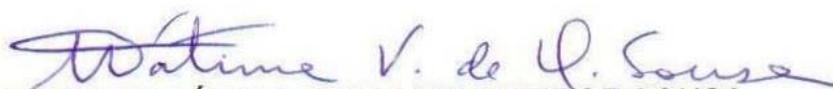
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 31 DE AGOSTO DE 2005 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:



Dra. MARIA DE LOS ANGELES PEREZ FERNANDEZ PALHA
Departamento de Engenharia Química - UFPE



Dra. EULÁLIA CAMELO PESSOA DE AZEVEDO XIMENES
Departamento de Antibióticos - UFPE



Dra. MARIA DE FÁTIMA VIEIRA DE QUEIROZ SOUSA
Departamento de Antibióticos - UFPE

Aos meus pais, Varela e Suely,
Aos meus irmãos, Rodrigo e Rodolfo,
Às minhas Amadas, Tia Chica, Tia Mira e
Vovós Felinta e Luzia,

Ao meu grande amor, Marcelo.
À minha Princesa, Sofia.

Obrigada por vocês existirem na minha vida!

AGRADECIMENTOS

A Deus, por estar sempre ao meu lado nas alegrias e me iluminar nos momentos de aflições.

Aos meus Orientadores, Professor Carlos Edison Lopes, do Laboratório de Processos Fermentativos do Departamento de Antibióticos e a Professora Sônia Souza Melo Cavalcanti de Albuquerque, do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química, a minha gratidão, não só pela orientação, mas pela atenção, incentivo, confiança e amizade.

A todos os Professores do Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pela dedicação e amizade dispensada a mim e meus colegas de mestrado.

A Sueli, Secretária do Curso de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos, pela dedicação e esforço sempre dispensado a nós, alunos do Mestrado.

Aos colegas de Mestrado, que apesar da curta convivência sempre foi muito salutar e agradável. Em especial ao colega Ivanildo, por sempre oferecer palavras de incentivo aos colegas e ser um exemplo de força e perseverança, sempre nos mostrando que dias melhores sempre virão.

Às Professoras Maria de Los Angeles Perez Palha, Maria Alice Gomes Lima e Olga Marques Martins do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Engenharia Química pela gentileza de colaborar comigo nesta dissertação no que diz respeito à realização dos experimentos práticos de laboratório, pelo incentivo, amizade e o carinho dispensados a mim.

Às Técnicas de Laboratório, Maria da Conceição e Márcia por sempre estarem dispostas a colaborarem comigo no que fosse necessário para que o meu trabalho fosse realizado da melhor maneira possível.

A Michele Alves dos Santos, aluna de Iniciação Científica, que colaborou comigo para a realização dos trabalhos práticos.

A todas as novas e boas amigas que fiz durante a minha permanência no Laboratório de Microbiologia: Sara, Suzana, Glória, Charleni, Andreza, Daniela, Cacilda, Julierme e Edivânia.

A Professora Elza Gomes, do Departamento de Micologia, pela grata colaboração desta dissertação.

Ao Professor Hélio Burity, da Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária – IPA, pela atenção e colaboração para comigo e meu trabalho.

A toda minha família e amigos que sempre me incentivaram para a realização e conclusão do Mestrado.

A Marcelo, meu companheiro, que sempre entendeu as minhas ausências e me incentivou para a realização deste Mestrado.

A todos, que direta ou indiretamente, colaboraram comigo para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

A biomassa microbiana do solo é o principal componente dos subsistemas decompositores, que regula a ciclagem de nutrientes, o fluxo de energia, a produtividade das plantas e dos ecossistemas e, portanto, a medição deste compartimento e sua atividade são relevantes para a conservação dos solos. Este trabalho teve como objetivo analisar o comportamento das bactérias mesofílicas aeróbicas e dos fungos filamentosos de solo impactado pelo uso do herbicida Metribuzin. As amostras de solo coletadas foram separadas em dois grupos sendo, um para controle (GC) e outro impactado (GI) para análise. O herbicida Metribuzin foi pulverizado nas concentrações de 40, 80, 160 μ L e 1mL nas amostras de solo do GI para posterior comparação com o GC. As enumerações da população microbiana foram realizadas conforme legislação vigente no momento da coleta do material. As análises seguiram a metodologia preconizada pela *American Public Health Association*. As observações das características microscópicas dos microorganismos foram realizadas utilizando-se observações “*in vivo*” e “*in vitro*” para bactérias e fungos. Os resultados mostraram que no solo impactado pelo metribuzin a quantidade de bactérias Gram positivas aumentaram (92% GI e 82% GC) enquanto as bactérias Gram negativas e os fungos filamentosos diminuíram (18% GC e 8% GI). Nos GC e GI, 72% das bactérias eram móveis e 28% imóveis. O herbicida metribuzin mostrou-se um produto que se utilizado de maneira adequada não oferece riscos à saúde ou ao meio ambiente.

Palavras-chaves: Metribuzin, Herbicida, Solo Virgem.

ABSTRACT

The microbiot biomass of the ground is the main component of the subsystems decompositores, that regulate the cycles of nutrients, the flow of energy, the productivity of the plants and ecosystems and, therefore, the measurement of this compartment and its activity is excellent for the conservation of ground. The work had as objective to analyze the behavior of the aerobics mesofilic bacteria and the filamentous fungi from soil impacted by the use of the herbicide Metribuzin. The collected samples from soil had been separate in two groups being, one for control (CG) and another impactado (IG). The herbicide Metribuzin was sprayed in 40, 80, 160µl e 1ml concentrations in the samples from soil of the IG for posterior comparison with the CG. The counting standard of microorganisms had been carried through in agreement current law at the moment of the collection of the material. The analyses had followed the methodology praised for the American Public Health Association. The comments of the microscopically characteristics had been carried through using comments a alive and *in vitro* for the bacteria and the fungi. Graphs with the UFC/ml you counted versus the period of incubation time had been mounted to analyze and to argue the results of the experiments. Os they had shown that in the ground impacted by metribuzin the amount of positive Gram bacteria they had increased (92% IG and 82% CG) while the negative Gram bacteria and the filamentous fungi had diminished (18% CG and 8% IG). In CG and IG 72% of the bacteria they were mobile and 28% property. The herbicide metribuzin revealed a product that if used in adequate way does not offer risks to the health or the environment.

Index terms: Metribuzin, Herbicide, Virgin Soil.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	5
2.1. Objetivo Específicos.....	5
2. REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	6
3.1. O Solo.....	6
3.2. Microrganismos do Solo.....	9
3.3. Agrotóxicos.....	10
3.4. Pesticidas.....	13
3.5. Herbicidas.....	14
3.6. Metribuzin.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODO.....	22
4.1. MATERIAIS.....	22
4.1.1. Meios de Cultivo.....	22
4.1.2. Herbicida.....	23
4.1.3. Análise Físico-Química do Solo.....	23
4.2. MÉTODOS.....	24
4.2.1. Coleta de Amostras de Solo.....	24
4.2.2. Impactação do solo.....	25
4.2.3. Análise Microbiológica do Solo.....	28
4.2.3.1. Isolamento dos microrganismos.....	28
4.2.3.2. Enumeração dos microrganismos.....	31
4.2.3.3. Isolamento de Bactérias e Fungos.....	32
4.2.3.4. Observações Macroscópicas das Colônias.....	32
4.2.3.5. Observações Microscópicas das Colônias.....	32
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Comportamento das Bactérias e Fungos em Solo Virgem.....	33
5.2. Análises Microscópicas.....	42

6. CONCLUSÕES.....	43
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pulverização de lavouras com pesticidas.....	1
Figura 2. Manipulação inadequada dos agrotóxicos pelo trabalhador rural.....	3
Figura 3. Os diferentes níveis de horizons.....	7
Figura 4. Fórmula estrutural do Metribuzin.....	16
Figura 5. Compostos da degradação do Metribuzin.....	19
Figura 6. Bandejas Controle e Impactada.....	25
Figura 7. Casa incubadora instalada no pátio do DEQ.....	26
Figura 8. Bandejas depositadas no interior da casa incubadora.....	27
Figura 9. Esquema para isolamento e enumeração das bactérias mesofílicas e fungos filamentosos.....	29
Figura 10a. Crescimento das colônias de bactérias em meio PCA.....	31
Figura 10b. Crescimento das colônias de fungos em meio BDA.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Número aproximado de microrganismos por grama de solo seco.....	9
Tabela 2: Consumo de agrotóxicos nas regiões geográficas brasileiras, demonstrando a quantidade de ingrediente ativo e percentual.....	12
Tabela 3: Espécies de plantas daninhas infestantes das lavouras brasileiras combatidas pelo herbicida Metribuzin.....	18
Tabela 4: Quantificação de bactérias e fungos na amostra de solo não impactado, GC (UFC/mL).....	34
Tabela 5: Quantificação de bactérias e fungos na amostra de solo impactado, GI, pelo herbicida metribuzin (UFC/mL).....	36
Tabela 6: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 40µl.....	38
Tabela 7: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 80µl.....	39
Tabela 8: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 160µl.....	39
Tabela 9: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 1000µl.....	40

Tabela 10: Classificação taxonômica dos fungos filamentosos isolados das amostras dos GC e GI.....	42
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultados das contagens dos fungos filamentosos do GC.....	35
Gráfico 2: Resultados das contagens das bactérias mesofílicas do GC.....	35
Gráfico 3: Resultados das contagens dos fungos filamentosos do GI.....	37
Gráfico 4: Resultados das contagens das bactérias mesofílicas do GI.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

BC	Bandeja Controle
BDA	Batata Dextrose Ágar
BI	Bandeja Impactada
DEQ	Departamento de Engenharia Química
GC	Grupo Controle
GI	Grupo Impactado
LD ₅₀	Dose Letal com 50% da dose original
MET	Metribuzin
µl	Microlitro (10 ⁻⁶ litro)
PCA	Plate Count Agar
T ₀	Tempo Zero
T ₂₄	Contagem 24horas após a impactação do solo pelo Metribuzin
T ₄₈	Contagem 48horas após a impactação do solo pelo Metribuzin
T ₇₂	Contagem 72horas após a impactação do solo pelo Metribuzin
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

1. INTRODUÇÃO

A biomassa microbiana do solo é o principal componente dos subsistemas de decompositores, que regula a ciclagem de nutrientes, o fluxo de energia, a produtividade das plantas e dos ecossistemas e, portanto a medição deste compartimento e sua atividade são relevantes para a conservação dos solos (**SPARLIN**, 1992; **WARDLE & GHANI**, 1995; **WARDLE**, 1998; **De-POLLI & GUERRA**, 1999).

Os processos de modernização da agricultura, nos anos 60, introduziram o emprego de novas variedades mais produtivas e dependentes de adubos químicos, o uso intensivo de substâncias, bactericidas, fungicidas, acaricidas, parasiticidas, inseticidas, enfim pesticidas e máquinas agrícolas a fim de aumentar os índices de produtividade (figura 1). O emprego destes agentes químicos resultou no aumento da produtividade, mas por outro lado trouxe conseqüências adversas, visto serem estes agentes nocivos ao homem, animais, plantas e ao ambiente em geral (**BAIRD**, 2002).



Figura1: Pulverização de lavouras com pesticidas (www.copercampos.com.br).

Embora os pesticidas possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o risco potencial desses compostos químicos ao ambiente (**SANINO**, 1999).

O uso contínuo de substâncias que atuam como defensivos agrícolas leva à contaminação dos lençóis freáticos, o empobrecimento do solo e danos à saúde humana e animal. A habilidade do solo em autodepurar ligar-se com esses produtos ou retardar-lhes o movimento, ajuda a reduzir esses efeitos nocivos (**MELO & AZEVEDO**, 1997).

Um fator relevante a ser considerado quando da utilização dos herbicidas é a sua degradação, uma vez que a sua persistência prolongada no solo leva à contaminação de outros ambientes, como as águas subterrâneas. A degradação nesses sistemas é influenciada pela concentração e estrutura molecular do pesticida, difusão, sorção, pH, matéria orgânica do meio em que se encontra o pesticida e fatores climáticos como temperatura, umidade, duração e intensidade da luz solar (**KEARNEY**, 1975).

A utilização dos agrotóxicos no meio rural brasileiro tem trazido uma série de conseqüências tanto para o ambiente como para a saúde do trabalhador rural. Em geral, essas conseqüências são condicionadas por fatores intrinsecamente relacionados, tais como o uso inadequado dessas substâncias, a alta toxicidade de certos produtos, a falta de utilização de equipamentos de proteção e a precariedade dos mecanismos de vigilância (figura 2). Esse quadro é agravado pelo baixo nível socioeconômico e cultural da grande maioria dos trabalhadores rurais (**OLIVEIRA-SILVA**, 2001).



Figura 2: Manipulação inadequada dos agrotóxicos pelo trabalhador rural (www.mpmarques.pt).

Este abuso permanente na utilização de produtos químicos pelos humanos pode desencadear doenças crônicas, pois as defesas imunológicas se encontram diminuídas para suportar altas doses de substâncias químicas tóxicas. Doenças como o câncer, a cirrose hepática, a fibrose pulmonar, os distúrbios do sistema nervoso central (paralisia facial, cegueira e/ou depressão) e a impotência sexual, podem ser desencadeadas pela presença dos pesticidas. O perigo é representativo tanto para aqueles que trabalham diretamente com o produto quanto para aqueles que possam vir a consumi-los (**CAVALCANTI**, 2003).

O desaparecimento aparente de um pesticida do solo pode ocorrer devido à incapacidade de detectarem resíduos por procedimentos analíticos convencionais, como a extração (**LICHTENSTEIN**, 1980).

É difícil determinar com precisão quais os impactos reais causados pelos pesticidas sobre a microbiota natural do solo, devido à heterogeneidade, à natureza, dinâmica e os tipos de respostas adaptativas da população

microbiana. O herbicida em grandes concentrações pode ser muitas vezes tão tóxico aos microrganismos do solo a ponto de desequilibrar ou reduzir drasticamente sua população naquele local (**MELO & AZEVEDO**, 1991).

O Metribuzin é um herbicida pré e pós-emergente utilizado em larga escala na agricultura para o controle de ervas daninhas, devido a sua capacidade em inibir a fotossíntese. Este herbicida pertence ao grupo das triazinas, são compostos derivados nitrogenados heterocíclicos (**JACOMNI**, 2002).

A necessidade de reduzir o impacto ambiental tem despertado o interesse científico para a biodegradação de pesticidas e e compostos relacionados. Dentre as classes de pesticidas, os herbicidas tem sido os mais utilizados nas lavouras mundiais. O Brasil dispõem de uma das maiores áreas agricultáveis do mundo sendo um dos primeiros no ranking de vendas de pesticidas, onde os herbicidas correspondem quase à metade do volume total (**ARAUJO**, 2002).

A avaliação dos possíveis prejuízos ambientais causados pela presença de um pesticida no solo depende de estudos em que se estabeleça o destino final deste pesticida e seus efeitos na flora microbiana natural (**RASODEVICH**, 1995).

Assim, o presente trabalho teve como objetivo analisar o comportamento das Bactérias Mesofílicas Aeróbicas e dos Fungos Filamentosos isolados de solo virgem após a impactação com o herbicida Metribuzin em quatro concentrações diferentes.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o comportamento das Bactérias Mesofílicas Aeróbicas e dos Fungos Filamentosos de solo virgem após ser impactado pelo herbicida Metribuzin.

2.2 Objetivos Específicos

- Enumerar a população microbiana no solo virgem e impactado nas concentrações de 40µl, 80µl, 160µl e 1000µl.
- Isolar bactérias mesofílicas aeróbicas e os fungos filamentosos do solo virgem e impactado pelo herbicida Metribuzin.
- Verificar o crescimento das bactérias mesofílicas aeróbicas e os fungos filamentosos neste solo após a aplicação do herbicida Metribuzin.
- Analisar os aspectos macroscópicos das bactérias e fungos filamentosos e microscópicos das culturas puras.
- Quantificar os principais grupos de microrganismos que permanecem no solo impactado após a utilização do herbicida Metribuzin.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. O Solo

O solo é o habitat natural de um grande número de seres vivos. É um sistema complexo composto de cinco principais componentes: água, ar, matéria orgânica e organismos, que interagem entre si, sendo que a variação de um deles pode ocasionar alterações nos demais. Com base em seu tamanho, a biota do solo pode ser dividida em micro, meso e macrorganismos, tanto de fauna e flora. (**SIQUEIRA**, 2004; **ALEXANDER**, 1977).

As comunidades de organismos micro e macroscópicos que habitam o solo realizam atividades imprescindíveis para a manutenção e sobrevivência das comunidades vegetais e animais. A denominação genérica para ação dos organismos vivos do solo, tanto animais quanto vegetais é atividade biológica. Esses organismos têm forte influência na gênese da manutenção da organização dos constituintes do solo, principalmente nos horizontes superficiais (**SIQUEIRA**, 2004).

O solo é caracterizado por uma distinta população microbiana constituída por grupos específicos. Estes exercem entre si efeitos associativos e antagônicos, além de influenciarem de maneira marcante a fertilidade do solo e o desenvolvimento das plantas cultivadas e silvestres. Muitos são cosmopolitas, enquanto outros são de ocorrência limitada (**SIQUEIRA**, 2004).

No solo as principais atividades dos organismos são as de decomposição da matéria orgânica, produção de húmus, fixação de nitrogênio atmosférico, ciclagem de nutrientes e energia, produção de compostos complexos que causam agregação do solo, controles biológicos de pragas e doenças, proporcionando assim, condições ideais para uma biodiversidade extremamente elevada (**SIQUEIRA**, 2004).

Os solos podem ser caracterizados pelos horizons (figura 3), que são as camadas paralelas de várias espessuras e estruturas. As camadas diferem umas das outras, acima ou abaixo, em diversas propriedades, como: o conteúdo orgânico ou mineral, cor, textura, pH, estrutura e porosidade do solo (**HURST**, 1996).

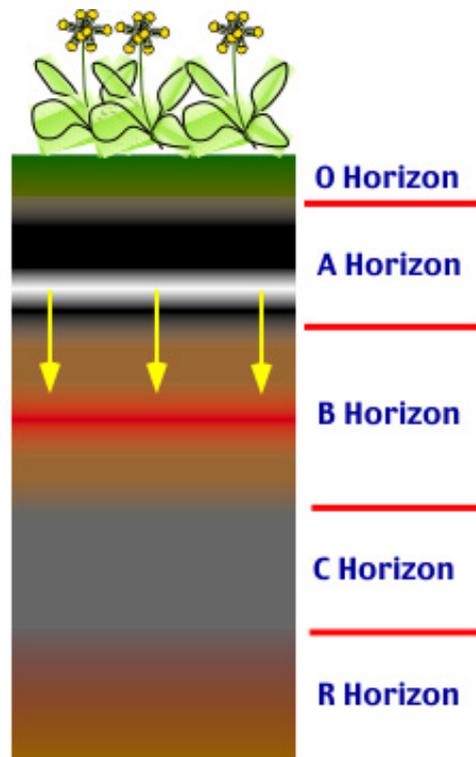


Figura 3: Os diferentes níveis de horizons (www.scielo.br)

Todas estas propriedades podem ser influenciadas pela umidade, pela pressão dos gases e até mesmo pelo conteúdo biológico presente em cada horizon. Esta diferença pode ser observada claramente quando os solos dos horizons são ricos em matéria orgânica ou por blocos de rochas sólidas, baseado nestas características suas atividades biológicas apresentam-se totalmente diferentes (**HURST**, 1996).

A composição quantitativa da população microbiana e sua natureza, dependem bastante da origem e da composição relativa de seus constituintes minerais e orgânicos. Características edáficas e climáticas específicas influem, de maneira marcante sobre a natureza e a abundância da micro flora de um dado solo, em conjunto com condições de umidade, aeração, substratos e fontes de energia, fatores de crescimento, composição e força iônica da solução do solo, pH, composição e pressão atmosférica, potencial redox, temperatura e radiação solar, profundidade e cobertura vegetal e interações entre os organismos (**SIQUEIRA**, 2004).

Esta composição relativa da população microbiana do solo é ainda afetada pelo tratamento deste. Pode-se facilmente comprovar este fato através da comparação da população de um solo virgem, não trabalhado, com a de um idêntico solo que foi cultivado e que recebeu adubos orgânicos, minerais ou algum tipo de agrotóxico. No primeiro, os microrganismos se acham em um estado de equilíbrio, na qual a abundância relativa dos vários grupos de bactérias, actinomicetes, fungos e protozoários dependem das condições naturais do solo. No solo tratado, contudo, tal equilíbrio é frequentemente perturbado, certos organismos multiplicam-se com grande intensidade em proporções muito superiores ao desenvolvimento de todos os grupos (**SIQUEIRA**, 2004; www.consultelme.com.br).

O distúrbio assim produzido no equilíbrio entre as populações microbianas do solo pode ser duradouro, visto que um grupo pode se tornar dominante, verificando-se, mais tarde, o rápido desenvolvimento de outros grupos, ou ele é temporário, isto é, dentro de pouco tempo o equilíbrio é restabelecido nas mesmas bases quantitativas anteriormente prevalecentes, ou numa forma modificada (www.consulteme.com.br).

3.2. Microrganismos do Solo

Os seguintes grandes grupos constituem a população microbiana do solo: as bactérias, os fungos, as algas, os protozoários e os vírus (**BARBOSA**, 1991; **HURST**, 1996).

As bactérias representam o grupo mais numeroso de microrganismos encontrado no solo (tabela 1). As bactérias do solo incluem formas esporuladas e não esporuladas de bacilos, cocos, vibriões e espirilos, variando consideravelmente de tamanho e forma, de respiração aeróbia e anaeróbia e de nutrição autotrófica e heterotrófica. Exemplo de gêneros bacterianos presentes no solo: *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Rhizobium*, *Nocardia*, *Micromonospora* e *Streptomyces* entre outras (**PELCZAR**, 1996; www.consulteme.com.br).

Tabela 1: Número aproximado de microrganismos por grama de solo seco.

Organismos	N° Estimado
Bactérias	3.000.000 a 500.000.000
Actinomicetes	1.000.000 a 20.000.000
Fungos	5.000 a 900.000
Leveduras	1.000 a 100.000
Algas	1.000 a 500.000
Protozoários	1.000 a 500.000
Nematódeos	50 a 200

Fonte: PELCZAR, 1996.

Os fungos, bactérias e minhocas (nematódeos) são aquelas que geralmente apresentam maior biomassa. Em termos de biomassa os organismos do solo podem representar mais de 10 toneladas por hectare quantidade esta, equivalente ou até maior que as produções de certas culturas agrícolas. Os fungos podem ser parasitas ou saprófitos, formam as conhecidas micorrizas e muitas delas produzem substâncias antibióticas (**SIQUEIRA**, 2004).

Os gêneros mais comuns de fungos filamentosos encontrados no solo são: *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus* e *Trichoderma* entre outros (**PELCZAR**, 1996).

Em menor número, esta a população das algas e cujos principais gêneros encontrados são as *Chrysophyta* e *Chlorophyta* mais comumente conhecidas como algas verdes (**BARBOSA**, 1991).

Os protozoários podem ser encontrados aos milhares em solos orgânicos ricos e úmidos. Muitos desses protozoários alimentam-se de bactérias e dos demais materiais orgânicos localizados no solo (**BARBOSA**, 1991).

3.3. Agrotóxicos

O órgão brasileiro responsável pela regulamentação do uso dos agrotóxicos é o Ministério da Agricultura. O decreto nº 4.074 de 04 de Janeiro de 2002, que regulamenta a Lei nº 7.802/1989, os defensivos agrícolas, os agrotóxicos, “são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da fauna e da flora, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento”.

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a segunda grande guerra. Vários serviram de arma química nas guerras da Coreia e do Vietnã, como por exemplo o agente Laranja, desfolhante que dizimou milhares de soldados e civis (www.sindipetro.org.br).

Os países da África, Ásia e América Latina que tinham a agricultura como principal base de sustentação econômica sofreram fortes pressões de órgãos financiadores internacionais para adquirir essas substâncias químicas. A alegação era que os agrotóxicos garantiriam a uma maior produção de alimentos para combater a fome. Com o inofensivo nome de “defensivos agrícolas”, eles eram

incluídos compulsoriamente, junto com adubos e fertilizantes químicos, nos financiamentos agrícolas. No Brasil, sua utilização na agricultura nacional ocorreu em larga escala a partir da década de 70 (www.sindipetro.org.br).

O mercado Mundial de agrotóxicos movimenta atualmente US\$ 30 bilhões. O Brasil é o quinto maior consumidor de pesticidas e movimenta US\$ 2,5 bilhões (UETA, 2003). Infelizmente, pouco se faz para controlar os impactos sobre a saúde dos que produzem e dos que consomem os alimentos impregnados por essas substâncias (www.sindipetro.org.br).

O consumo dos agrotóxicos difere nas diferentes regiões do país, em função da mistura de atividades agrícolas intensas e tradicionais. A tabela 2 apresenta o consumo de pesticidas o ano de 2000, em cada região do Brasil (JACOMINI, 2002).

Tabela 2: Consumo de agrotóxicos nas regiões geográficas brasileiras, demonstrando a quantidade de Ingrediente Ativo (I.A.) e percentual.

Região	Quantidade I.A.(t*)	Participação (%)
Norte	1.943	1,4
Nordeste	8.354	5,9
Centro-Oeste	37.352	26,6
Sudeste	47.533	33,8
Sul	45.291	32,2
Brasil	140.473	

Fonte: SINDAG – Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola, 2002 *apud* JACOMINI, 2002.

t* = tonelada

Vários estudos realizados com trabalhadores demonstraram que há relação entre a exposição prolongada à agrotóxicos e doenças, principalmente do sistema nervoso (central e periférico). Além disso, também ocorrem episódios de intoxicação aguda, colocando em risco a vida dos trabalhadores rurais (www.sindipetro.org.br). Calcula-se que somente cerca de 0,1% atinge o alvo específico enquanto os restantes 99,9% da aplicação tem potencial para mover em diferentes compartimentos ambientais tais como o solo e águas residuais e subterrâneas (**UETA**, 2003).

O uso indiscriminado de agroquímicos levou à contaminação dos solos a índices acima de 5000 ppm de atrazina, 3900 ppm de diuron, 3000 ppm de clorpirifos e 1900 ppm de parthion, segundo foram descritos na literatura (**WINTERLIN**, 1989).

Estudos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agrotóxicos e seus produtos de degradação em solos e águas superficiais e subterrâneas. Os relatos iniciaram-se nos anos 70 e desde então com o aprimoramento das técnicas analíticas com maior acuidade e sensibilidade, mostraram, por exemplo, que em 1988, mais da metade dos estudos americanos possuíam águas subterrâneas contaminadas (**PARSONS & WITT**, 1989).

3.4. Pesticidas

Os pesticidas são defensivos agrícolas com ação tóxica, que tem como ingrediente ativo os componentes químicos formulados para controlar ou erradicar, de maneira específica, as doenças e pragas de plantas e animais e os vetores transmissores de doenças ao homem (**MELO & AZEVEDO**, 1991).

Embora os pesticidas possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o risco potencial desses compostos químicos ao ambiente (**SANINO et al**, 1999).

Na atividade agrícola, a utilização de pesticidas visa sempre o incremento da produção, embora possa também gerar alterações negativas, tais como o surgimento de novas pragas e a contaminação do ambiente (**DELLAMATRICE**, 2002).

O pesticida pode atuar de duas formas sobre a microbiota do solo: de um lado ele pode influenciar os microrganismos responsáveis pela degradação e por outro lado pode atuar como substrato para o seu crescimento (**ARAÚJO**, 2002).

A degradação de pesticidas no solo pode ser realizada por via química ou biológica, ou a combinação das duas, entretanto, a degradação microbiana é a mais importante (**FOMSGAARD**, 1997).

Os pesticidas organofosforados são largamente utilizados no Brasil, seja na lavoura ou no combate a endemias, como o controle da dengue, febre amarela e doença de Chagas. Casos de intoxicação aguda por pesticidas exigem cuidados imediatos, até hospitalar, pois coloca em risco a vida (www.sindipetro.com.br).

3.5. Herbicidas

De alguns anos para cá, principalmente após a chamada “Revolução Verde”, moléculas organo-sintéticas têm sido largamente utilizadas na agricultura para o

controle de plantas daninhas. Essas moléculas receberam o nome de herbicidas (**PRATA**, 2000).

Dentre os pesticidas, os herbicidas são os produtos mais comercializados no mundo inteiro, em face da necessidade de controle de ervas indesejáveis na agricultura. De acordo com a época de aplicação, os herbicidas podem ser classificados em produtos para pré-plantio, herbicidas pré-emergentes e pós-emergentes. Os herbicidas usados antes de estabelecer o plantio visam o controle total (não seletivo) de ervas daninhas. Geralmente irão controlar também fungos e nematóides. Além dos herbicidas não seletivos, enquadram-se neste grupo os fumigantes de solo (brometo de metila) (www.sportsmagazine.com.br).

Herbicidas pré-emergentes devem ser aplicados no gramado já plantado e antes da germinação das ervas daninhas. A maioria dos pré-emergentes age como inibidor da mitose, impedindo a divisão celular (www.sportsmagazine.com.br).

Os herbicidas pós-emergentes são aplicados diretamente nas ervas daninhas já germinadas e promovem pouco, ou quase nulo, efeito residual no solo. Geralmente são necessárias aplicações repetidas para conseguir eficiência, o que pode causar danos à grama (fitotoxidez). São eficientes para controlar gramíneas perenes e folhas largas que escapam ao controle de pré-emergentes. Neste sentido, o herbicida Metribuzin é muito promissor, devido sua utilização como herbicida pré e pós-emergente (www.sportsmagazine.com.br).

A absorção de herbicidas por plantas pode ter como consequência sua transferência para outras culturas posteriores e transferência nas cadeias alimentares (**NAKAGAWA**, 2000).

O consumo de herbicidas no Brasil foi de cerca 174 mil toneladas de produtos formulados (comerciais) em 2000. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo representa mais de 81 mil toneladas. O uso desses produtos difere nas várias regiões do país, onde se misturam atividades agrícolas intensivas e tradicionais (**SPADOTTO**, 2002).

3.6. Metribuzin

As triazinas são um grupo de herbicidas químicos similares, registrados em 1955, como a atrazina, simazina, propazina, cianazina, ametrina e metribuzin, sendo empregado na agricultura para o controle de ervas daninhas, devido a sua capacidade em inibir a fotossíntese (**JACOMINI**, 2002).

Quanto ao aspecto químico, as triazinas são derivados nitrogenados heterocíclicos (estrutura de anel com átomos de diferentes tipos). No caso do metribuzin, o anel é composto por átomos de nitrogênio e carbono (**JACOMINI**, 2002).

Metribuzin é o nome comum para o 4-amino-6(1,1-dimetiletil)-3(metiltio-1,2,4-triazina-5(4H)ona, cuja fórmula química é $C_8H_{14}N_4OS$ (Figura 4). Apresenta-se sólido cristalino branco, com cheiro característico e disponível na forma de suspensão líquida ou granular para se diluído em água. É um herbicida seletivo que faz parte do grupo químico das triazinonas que age inibindo o mecanismo do transporte de elétrons na fotossíntese das plantas. Outras características químicas e físicas podem ser citadas (**EISHLER**, 1989):

- Peso Molecular: 214,29
- Massa específica: 1,28g/cm³
- Solubilidade em água (20°C): 1,2g/L
- Pressão de vapor (20°C): 0,058 mPa
- Log Kow (coeficiente de partição octanol-água): 1,7 à 25°C
- Ponto de fusão: 125 – 126,5°C
- Solubilidade em solventes orgânicos: solúvel em solventes aromáticos e organosclorados, formamida, ciclohexano, metanol, benzeno, etanol e o xileno.
- Nomes comerciais: Lexone, Sencor, Sencondal e Sencorex.

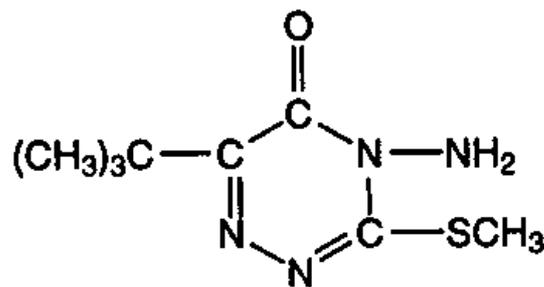


Figura 4: Fórmula estrutural do Metribuzin

Este herbicida é usado para o controle pré e pós-emergencial de ervas daninhas do tipo rasteiro. Está disponível no mercado de produtos agrícolas como suspensão líquida ou granular para ser diluída em água. Este herbicida é normalmente absorvido pelas raízes e pelas folhas. Devido à sua solubilidade em água o metribuzin é aplicado sobre os campos de cultura na forma de spray. No Brasil, é aplicado principalmente nas culturas de soja e cana-de-açúcar (**BERG**, 1986; **MEISTER**, 1992).

O herbicida metribuzin não atua sobre as sementes das plantas daninhas, mostrando sua ação somente quando se inicia o processo fotossintético. Como as espécies de plantas daninhas são diversas e numerosas, variam as sensibilidades ao produto, o modo de translocação na planta e sua conversão em substâncias inativas. Apresenta-se como um produto sistêmico e se movimenta na planta no sentido ascendente ou acropetal (www.bayer.com).

O metribuzin não é considerado um herbicida de alta toxicidade, segundo a *Environmental Protection Agency (EPA – USA)*, sendo que os valores de DL₅₀ encontrados para os ratos variam de 50 a 5000mg/Kg, nas formulações atualmente comercializadas (**TEMLEN**, 1994).

A meia-vida do metribuzin varia de acordo com o tipo de solo e das condições climáticas. No solo, a meia-vida varia de 30 a 120 dias, e na água é de, aproximadamente, 07 dias. O metribuzin é moderadamente persistente no solo. As perdas devido à volatilização ou fotodegradação não são significativas (<http://extoxnet.orst>).

Quando o produto é aplicado nos campos pode controlar as mais diversas espécies de plantas daninhas tão comuns em lavouras brasileiras. Algumas delas estão na tabela 3 (www.bayer.com).

Tabela 3: Espécies de plantas daninhas infestantes das lavouras brasileiras combatidas pelo herbicida Metribuzin.

PLANTAS DANINHAS	
Picão-preto	Nabo ou nabiça
Caruru	Quebra-pedra
Beldroega	Joá-de-capote
Serralha	Mostarda
Capim pé-de-galinha	Apaga-fogo
Cipó de veado	Mentruz
Guanxuma	Capim braquiária
Gorga	Capim colchão
Capim carrapicho	Maria-mole

A maioria dos compostos orgânicos, tais como os agroquímicos, não se perpetuam no ambiente, pois podem ser biodegradados pela ação de organismos vivos presentes na natureza, que atacam a estrutura molecular destes compostos orgânicos. Todavia, dependendo da natureza qualitativa e quantitativa do composto empregado e das características gerais do solo, ocorre o acúmulo a índices considerados tóxicos (KORPRADITSKUL, 1993).

A persistência de um herbicida no solo depende dos processos de dissipação, ou seja, dos processos de transferência, como: a evaporação, a lixiviação, escoamento superficial, absorção por plantas, e também, da taxa de degradação do pesticida. Os processos de degradação podem ser de natureza física, química e

biológica, e podem resultar na mineralização total do pesticida ou na sua conversão em metabólitos. Entre estes processos, o de maior importância tem sido atribuída à degradação biológica, que está principalmente relacionada com os microrganismos presentes no solo (**GRAHAM-BRYCE**, 1981).

A degradação microbiológica é a principal via de remoção do metribuzin do solo. O herbicida Metribuzin (Figura 5) degrada-se no solo produzindo como principal produto o DADK - desaminodiceto metribuzin, seguido do diceto metribuzin, DK, e desamino metribuzin, DA (**LOCKE**, 1994).

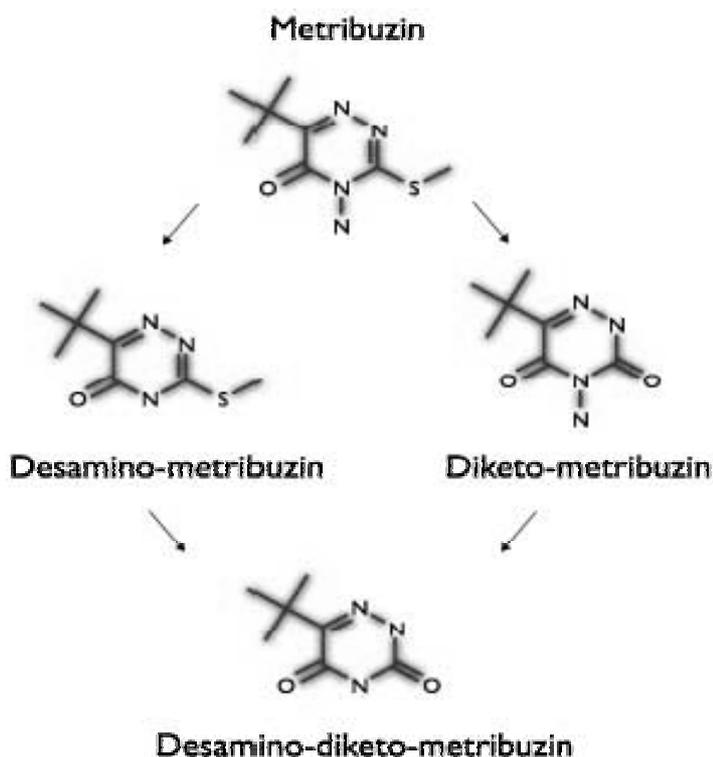


Figura 5: Compostos da degradação do Metribuzin

O processo de degradação microbiológica pode ser dificultado em função de diversas características químicas da molécula, como as ligações de cloro e outros

halogênios, anéis aromáticos altamente condensados ou quaternários de átomos de carbono (**MONTEIRO**, 1998).

Segundo Musumeci (1992), os motivos que podem levar a uma menor mineralização das moléculas são: a) a inibição da síntese de enzimas de microrganismos capazes de atuar na sua degradação; b) uma impossibilidade do composto penetrar na célula microbiana, pela falta de enzimas adequadas; c) insolubilidade do composto e, portanto, uma ausência de disponibilidade ao ataque dos microrganismos; d) o fenômeno da sorção e finalmente e) uma toxicidade excessiva da molécula e seus metabólitos.

Segundo Golovleva et al. (1990), as *Pseudomonas* são bactérias eficientes na degradação de herbicidas e pesticidas. Porém, as capacidades de degradar estes compostos tóxicos dependem do tempo de contato com os compostos químicos, das condições ambientais em que elas se encontram e da sua versatilidade fisiológica.

Tecnologias avançadas tais como o uso de sistemas biológicos de tratamento, para reduzir ou destruir resíduos perigosos, são vistas como opção para a tecnologia de descontaminação. A biorremediação é um dos campos mais promissores no que diz respeito ao emprego de microrganismos para a remediação de locais contaminados por produtos agroquímicos como os pesticidas.

A biorremediação tem como principal objetivo a exploração da diversidade genética e versatilidade metabólica microbiana para a conversão de contaminantes em produtos menos tóxicos que de alguma forma serão integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. A literatura atual apresenta diversos casos de

degradação total ou parcial de pesticidas por populações microbianas naturais presentes no solo.

Porém, se faz necessário conhecer os possíveis impactos que os pesticidas podem causar sobre a microbiota natural do solo quando se verifica a impactação por agroquímicos no solo pela primeira vez, como é o caso descrito aqui utilizando o herbicida Metribuzin.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. MATERIAIS

4.1.1. Meios de Cultivo

Para o isolamento das bactérias mesofílicas aeróbicas e dos fungos filamentosos foram utilizados os seguintes meios de cultura:

- Meio para enumeração “*Plate Count Agar*” (PCA – Biobrás);
- Meio Batata Dextrose Ágar (BDA - DIFCO);
- Meio Ágar Nutritivo (AN);

A composição dos meios encontra-se descrita abaixo. Os mesmos foram esterilizados em autoclave a temperatura de 121° C e pressão de 1 atm por 15 minutos.

Meio de Contagem *Plate Count Agar* (PCA)

Água destilada	1Litro
Meio Sintético PCA	24g

Meio Batata Dextrose Ágar (BDA)

Água destilada	1Litro
Meio Sintético BDA	36g

O pH do meio foi acidificado através da adição de ácido láctico para o valor de 5,0 no momento de uso.

Meio Ágar Nutritivo (AN)

Água destilada	1Litro
Extrato de carne	3g
Peptona	5g
Ágar	16g

4.1.2. Herbicida

O herbicida utilizado foi o Sencor[®] 480 da BAYER, em suspensão concentrada comercialmente conhecido por Metribuzin.

4.1.3. Análise Físico-Química do Solo

Uma amostra de 4kg de solo foi retirada da área verde que circunda o Departamento de Antibióticos e foi enviada ao IPA – Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco, que procedeu a análise físico-químico do solo. A amostra apresentou a seguinte composição: Solo do tipo Franco Arenoso (FA), composto por 46% de Areia grossa, 27% de Areia fina, 21% de Silte e 6% de Argila, pH 5,25, 48mg/dm³ de matéria orgânica e 2,4% de umidade residual. Ainda foram determinados pela análise a presença de outros componentes minerais como: Cálcio, Magnésio, Sódio, Potássio, Alumínio e Hidrogênio.

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Coleta de Amostras de Solo

A metodologia utilizada foi descrita pela EMBRAPA, 1997. Na área de vegetação nativa, antes da coleta das amostras foi removida manualmente a serrapilheira (galhos, folhas, raízes entre outros) presente na superfície do solo.

As amostras de solo foram coletadas nas áreas verdes que se localiza em frente ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

As coletas foram aleatórias em pontos diferentes localizados dentro de uma mesma área, perfazendo um total de 04 amostras de solo nas profundidades de 0 – 20cm, realizadas por meio de abertura de trincheiras de até 30cm de profundidade, retirando-se, com auxílio de uma espátula, fatias de solo as quais foram acondicionadas em sacos plásticos para serem levadas ao laboratório.

A partir de amostras coletadas um novo processo de limpeza foi realizado no laboratório, sendo este mais refinado. As amostras coletadas foram peneiradas em uma malha de 0,22mm, homogeneizadas e as amostras de terra foram distribuídas, em partes iguais de 6Kg em cada bandeja. As bandejas foram rotuladas de **Bandeja Controle (BC)** e **Bandeja Impactada (BI)** (figura 6). As bandejas permaneceram a temperatura ambiente, expostas ao ar, pelo período de duas horas, para que um equilíbrio na umidade fosse alcançado (EMBRAPA, 1997).



Figura 6: Bandejas Controle e Impactada

4.2.2. Impactação do Solo

O fabricante do Metribuzin indica nas suas instruções de uso uma dose de emprego de 3,0 a 4,0 litros por hectare de terra. Baseado nas especificações do fabricante realizou-se o cálculo para determinar a dose de aplicação proporcional ao tamanho das bandejas de plástico utilizadas nos experimentos.

Para a realização desta etapa foi necessário fazer um ajuste na dose que seria aplicada às bandejas com as amostras de solo, pois é clara a diferença entre as áreas de aplicação das doses.

Assim, as concentrações determinadas para a realização do trabalho foram **40, 80, 160 e 1000 μ l**. Estas concentrações foram escolhidas com base nas especificações do fabricante levando em consideração o tamanho das bandejas.

A aplicação do herbicida Metribuzin foi realizada exclusivamente na bandeja impactada da seguinte forma:

O herbicida foi diluído em 100ml de água destilada esterilizada. A água esterilizada evitaria a presença de outros microrganismos que não fossem aqueles nativos da amostra coletada;

Em seguida, a mistura foi colocada em um pulverizador manual para ser distribuída de forma uniforme por toda a amostra de solo a ser impactada;

Ao término do processo de pulverização, o solo foi totalmente revolvido para uma homogeneização do herbicida com o solo.

As bandejas, Controle e Impactada, foram acondicionadas em uma casa incubadora, semelhante às casas de vegetação, construída para atender as necessidades de tamanho e espaço para o depósito e repouso das amostras (figuras 7 e 8) e foi instalada ao ar livre no Departamento de Engenharia Química (DEQ).



Figura 7: Casa Incubadora instalada no pátio do DEQ



Figura 8: Bandejas depositadas no interior da casa incubadora

Durante todo o período em que aconteceram os experimentos a temperatura a que estas amostras de solo foram submetidas também foi monitorada. Foi instalado um termômetro no interior da casa incubadora. Foram levadas em consideração observações sobre as variações sazonais do ano, por exemplo, os períodos de seca (verão) e chuvas (inverno).

4.2.3. Análise Microbiológica do Solo

4.2.3.1 Isolamento dos microrganismos

O isolamento e a enumeração das bactérias mesofílicas e dos fungos filamentosos das amostras de solo obedeceram a seguinte metodologia (Figura 9) (ICMSF, 2000):

- A) Retirou-se 10g de amostra de solo de cada uma das Bandejas Controle (BC) e Impactada (BI). Esta amostra foi adicionada a um frasco de Erlenmeyer com capacidade de 250mL, contendo 90ml de solução salina a 0,85%, o qual foi submetido à agitação de 200rpm por um período de 30 minutos;
- B) Após agitação, foram realizadas diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} ;
- C) Alíquotas de 1mL foram transportadas em duplicatas para placas de Petri estéreis e em seguida foram adicionados 20mL de meio PCA para enumeração de bactérias e meio BDA acidificado pelo ácido láctico (**ROQUE & MELO**, 2000) para contagem de fungos filamentosos;
- D) As placas foram incubadas 34°C por 48 horas, para observação do crescimento das bactérias, e por 5 dias para o crescimento dos fungos filamentosos;
- E) Após o período de incubação, foram realizadas as enumerações das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) e isolados os diferentes grupos microbianos, semeando-os em meio ágar nutritivo e BDA para bactérias e fungos respectivamente.

O trabalho apresenta quatro concentrações do herbicida Metribuzin, logo foram realizados quatro experimentos diferentes, ou seja, um experimento para cada concentração. Cada experimento teve a duração de quatro semanas.

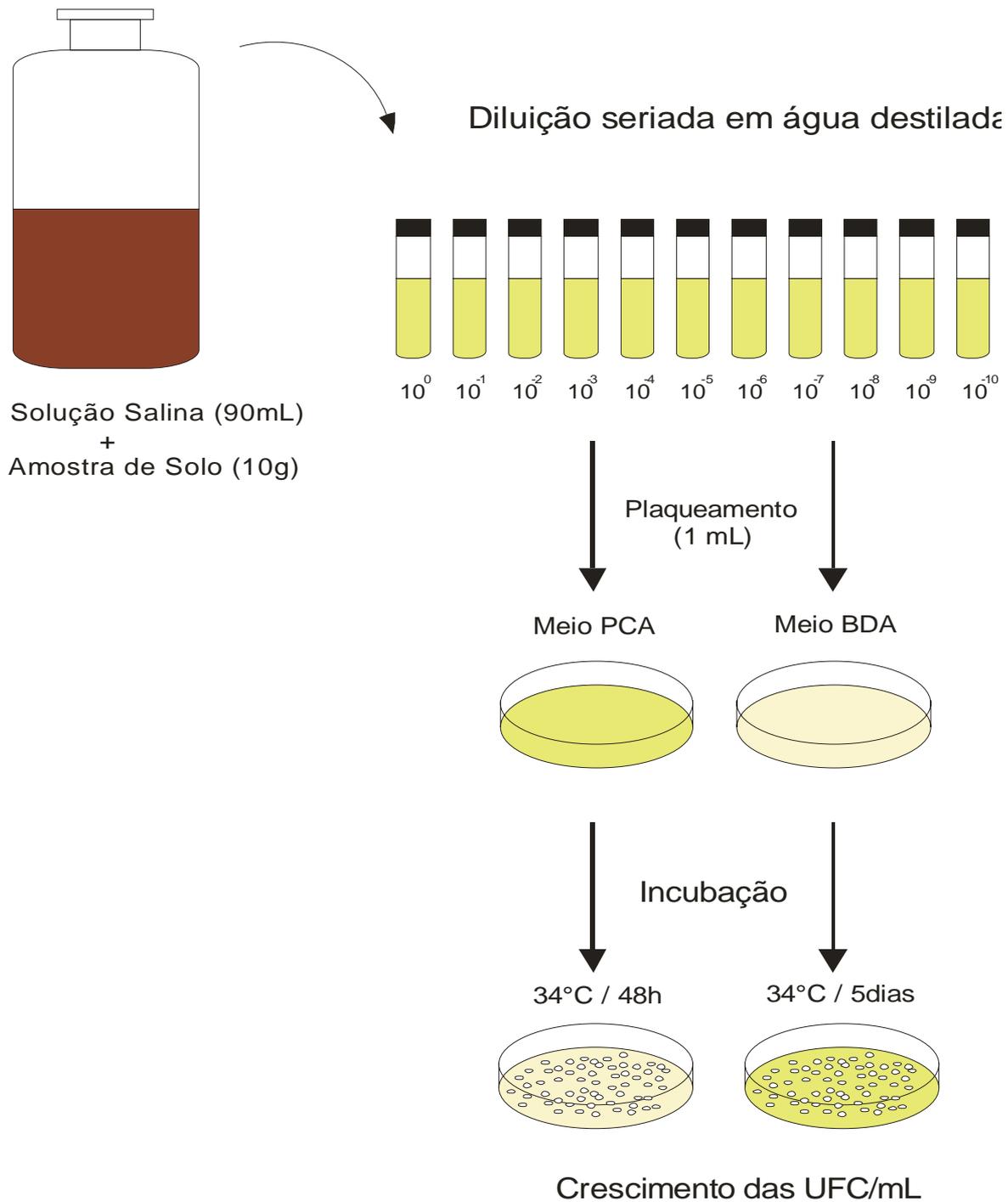


Figura 9: Esquema para o isolamento e enumeração das bactérias mesófilicas e fungos filamentosos.

Uma contagem da população microbiana no momento da coleta das amostras de solo foi realizada antes da impactação do solo pelo Metribuzin, esta contagem foi denominada Tempo Zero (T_0). O período de incubação para determinar as UFC foi o mesmo descrito anteriormente (item D). O objetivo desta contagem inicial ou zero foi o de observar a população microbiana existente na amostra no momento da coleta, ou seja, antes da impactação.

Os processos de inoculação do herbicida, incubação das amostras de solo impactadas e enumeração das populações microbianas aconteceram para as BC e BI em todas as etapas que estão descritas abaixo para fins comparativos do trabalho. As enumerações seguiram a seguinte metodologia:

A) Inicialmente, a enumeração das UFC das bactérias e fungos das BC e BI **24** horas após a impactação da amostra de solo e foi denominada T_{24} ;

B) O mesmo procedimento de contagem das UFC descrito no item anterior foi realizado nas BC e BI **48** e **72** horas após a impactação da amostra de solo denominados T_{48} e T_{72} ;

C) Contagem das UFC das bactérias e fungos das BC e BI após a 1ª semana, ou T_{1s} de permanência do herbicida na amostra de solo;

D) O procedimento descrito no item anterior foi repetido nas três semanas seguintes para que as contagens das UFC dos experimentos da **2ª**, **3ª** e **4ª** semanas ou T_{2s} , T_{3s} , T_{4s} fossem realizadas.



Figura 10a: Crescimento das colônias de bactérias em meio PCA.



Figura 10b: Crescimento das colônias de fungos em meio BDA

A reumidificação das amostras de solo foi realizada quando era observada a diminuição da umidade das amostras de solo nas BC e BI. Esta etapa foi realizada manualmente com água destilada esterilizada e revolvimento da terra das bandejas. A diminuição da umidade no ambiente externo pode acarretar o aumento da concentração de solutos intracelulares e, com o solo muito seco pode provocar o rompimento e morte das células microbianas (KIEFT, 1987).

4.2.3.2 Enumeração dos Microrganismos

Após os períodos determinados para a incubação das placas, 48 horas para as bactérias e 5 dias para os fungos (figuras 10a e 10b), foram realizadas as enumerações das colônias de bactérias e de fungos através do uso do contador eletrônico de colônias (ICMSF, 2000).

Seguindo o critério para contagem das colônias utilizado por Moreira (2002), foram consideradas para contagens das UFC as placas que apresentassem contagens entre 30 e 300 colônias bacterianas e 10 a 100 colônias de fungos.

4.2.3.3 Isolamento de Bactérias e Fungos

Os isolamentos de bactérias mesofílicas aeróbias foram realizados em tubos contendo meio de cultura AN para obtenção de culturas puras. A partir desses tubos foram realizadas colorações de Gram e Ziehl-Nielsen para observações microscópicas.

As colônias de fungos foram isoladas em meio de cultura BDA acidificado e enviadas para o Departamento de Micologia da Universidade Federal de Pernambuco para identificação.

4.2.3.4. Observações Macroscópicas das Colônias Bacterianas e Fungicas

Foram realizadas observações macroscópicas das colônias quanto à suas características de tamanho, forma, cor de verso e reverso, presença ou ausência de brilho e pigmentação solúvel.

4.2.3.5. Observações Microscópicas das Colônias Bacterianas Isoladas

Para a realização das observações *“in vitro”* das culturas puras foram utilizadas colorações diferenciais de Gram, para classificar as bactérias Gram Positivas e

Gram Negativas. Uma coloração especial foi utilizada para a visualização e identificação de bactérias esporuladas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Comportamento das Bactérias e Fungos em solo Virgem e Impactado

A persistência do herbicida no solo é resultado de processos de transformação (degradação da molécula, formação de metabólitos) e remoção (volatilização, escoamento superficial), enquanto sua intensidade é fortemente influenciada por condições ambientais como temperatura, umidade, atividade microbiana e pela tecnologia de aplicação (método usado, dose aplicada, formulação) (**PERNIN-GARNIER**, 1995).

Os microrganismos do solo têm sua população e atividades alteradas pela presença de herbicidas, que poderão ser utilizados pelos microrganismos devido ao aumento da fonte de carbono e outros nutrientes o que favorece o crescimento microbiano (**ARAÚJO**, 2002).

Os resultados para enumeração de contagens de bactérias e fungos filamentosos do Grupo Controle (GC) estão na tabela 4. A tabela mostra que o solo sem impactação pelo herbicida, em todos os períodos do experimento, apresenta uma diminuição gradual da população de bactérias e fungos que poderia ser devido a diversos fatores como, por exemplo, a falta de nutrientes do solo, temperatura, entre outros.

Tabela 4 – Quantificação de bactérias e fungos na amostra de solo não impactado, GC (UFC/mL)

Microrganismos do GC	T₀	T₂₄	T₄₈	T₇₂	2ª S	3ª S	4ª S
Fungos							
Exp.1	300	435	365	310	285	170	60
Exp.2	370	360	310	340	210	260	240
Exp.3	830	980	735	410	535	355	202
Exp.4	450	365	315	245	192	85	61
Bactérias							
Exp.1	20200	21600	16800	9700	12000	7350	2730
Exp.2	22300	20000	18500	17500	17700	19000	19600
Exp.3	16250	25100	16600	14500	23900	16500	12600
Exp.4	35000	48200	37500	28850	21500	21800	17450

A visualização dos resultados da tabela 4 estão melhor visualizados nos Gráficos 1 e 2. Analisando estes resultados pode-se observar que o Experimento 3 apresenta uma quantidade de fungos maior que os demais experimentos.

Segundo Anderson, 1984 a atividade microbiana, geralmente, é maior quando é acrescentado material vegetal ao solo do que quando se adicionam apenas nutrientes.

Tal fato foi evidenciado no momento da coleta do solo para o experimento 3, pois este encontrava-se úmido e recoberto por folhagens o que poderia ter influenciado a quantidade de microrganismos na amostra. O mesmo observa-se no Experimento 3 para a população de bactérias.

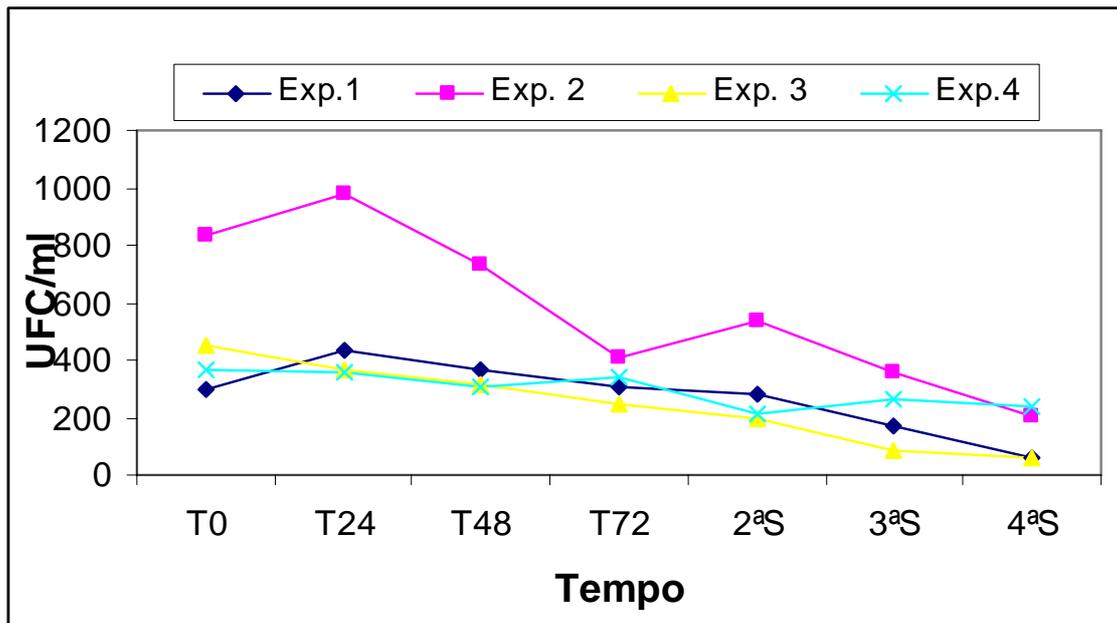


Gráfico 1: Resultados das contagens dos fungos filamentosos do GC

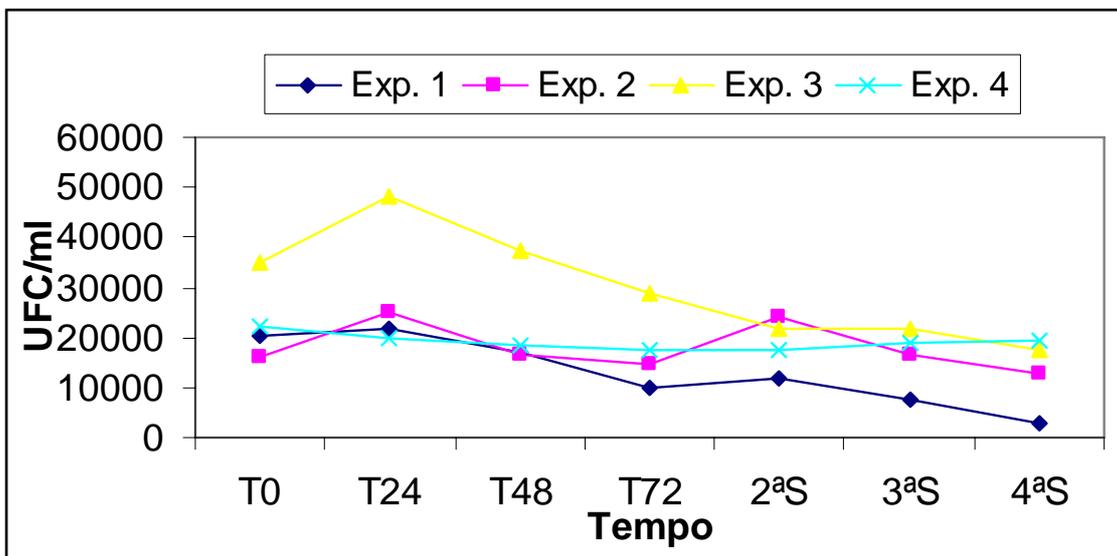


Gráfico 2: Resultados das contagens das bactérias mesófilas do GC

A tabela 5 apresenta os resultados das contagens das bactérias e fungos de solo impactado pelo metribuzin, o Grupo Impactado (GI). De maneira geral, em todos os experimentos verifica-se um aumento na quantificação das bactérias mesofílicas aeróbias. Os fungos filamentosos apresentaram um quadro inverso àquele apresentado pelas bactérias, apresentando uma diminuição desse grupo de microrganismos após o uso do herbicida.

Tabela 5 – Quantificação de bactérias e fungos na amostra de solo impactado, GI, pelo herbicida metribuzin (UFC/ml)

Microrganismos	T_{24h}	T_{48h}	T_{72h}	2^a S	3^a S	4^a S
do GI						
Fungos						
Exp.1 - 40µl	130	235	140	130	110	35
Exp.2 - 80µl	120	160	140	170	120	80
Exp.3 - 160µl	335	370	300	325	181	94
Exp.4 - 1000µl	685	465	355	270	195	173
Bactérias						
Exp.1 - 40µl	10100	18000	20050	22200	11800	1540
Exp.2 - 80µl	10700	14500	16800	23200	25200	13900
Exp.3 - 160µl	9100	21100	22300	24600	21800	16780
Exp.4 - 1000µl	64000	76000	64500	58750	45580	42600

A visualização da tabela 5 estão melhores visualizados nos Gráficos 3 e 4. Os resultados demonstram um aumento da população dos fungos e das bactérias, à medida que a concentração do herbicida metribuzin é modificada. Indicando que, possivelmente de alguma forma que estes microrganismos utilizam algum dos componentes do herbicida em seu metabolismo.

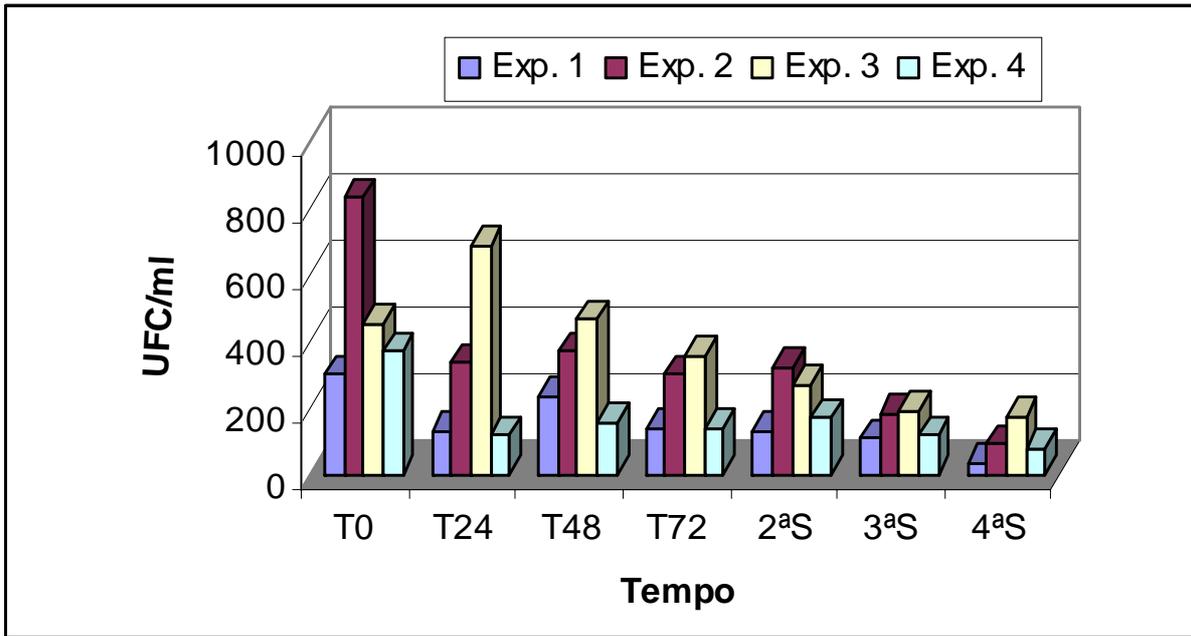


Gráfico 3: Resultados das contagens dos fungos filamentosos do GI

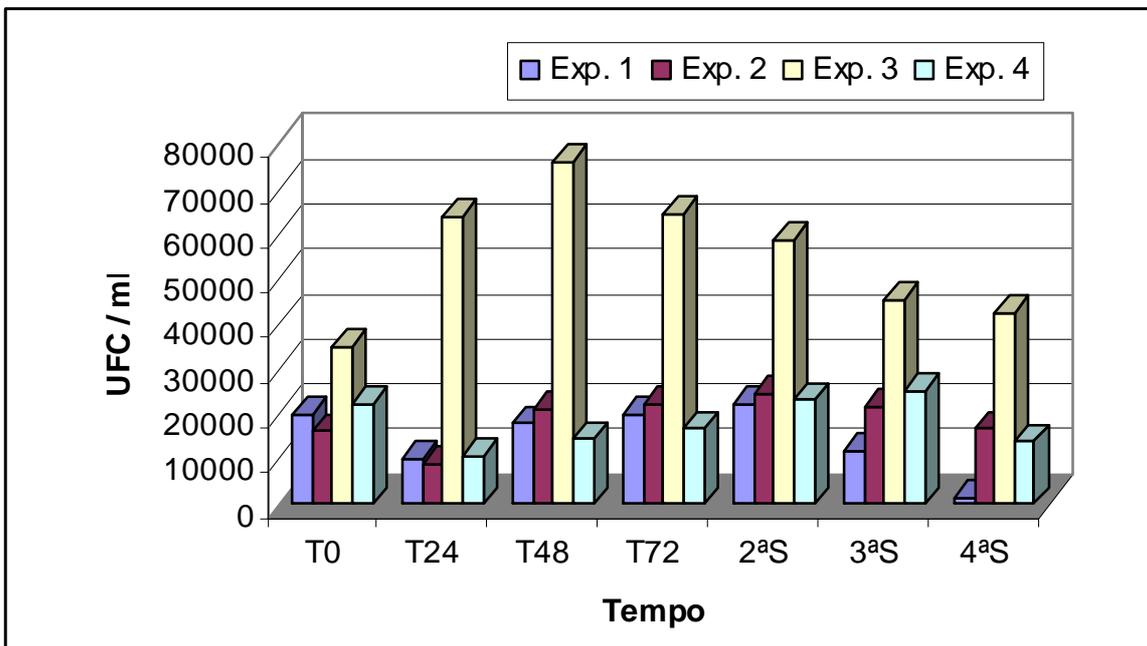


Gráfico 4: Resultados das contagens das bactérias mesofílicas do GI

Os dados receberam um tratamento estatístico onde os mesmos foram avaliados pelo teste *t* para observações dependentes, estabelecendo o nível de significância de 5%, utilizando-se o programa “*Statistics for Windows*”, versão 6.0, no qual foi aplicada a função logarítmica neperiano (*ln*) aos dados para obter uma variância constante e uma distribuição normal.

Analisando as tabelas 6, 7 e 8 observa-se que há uma variação significativa na contagem de células para as 24 horas iniciais, mostrando claramente uma situação de adaptação pelas espécies presentes no meio. Quanto às demais amostra (48, 72, 2ªS, 3ªS e 4ªS) verifica-se um comportamento variável, no entanto, há espécies que sobreviveram enquanto outras morreram, no meio impactado houve crescimento superior ao número de bactérias, porém não em quantidade de espécies, indicando que as sobreviventes adaptaram-se às condições adversas.

Tabela 6: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 40µl.

Tempo	Amostras de solo não impactado	Amostras de solo impactado
24 horas	10,0 ±1,0 ^a	9,2 ±1,1 ^b
48 horas	9,7 ±1,0 ^a	9,8 ±1,2 ^a
72 horas	9,2 ±1,0 ^b	9,9 ±1,2 ^a
2ª Semana	9,4 ±1,0 ^b	10,1 ±1,1 ^a
3ª Semana	8,9 ±1,8 ^a	9,4 ±1,2 ^a
4ª Semana	7,9 ±1,3 ^a	7,3 ±1,2 ^b

Medidas na horizontal seguida de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%.

Tabela 7: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 80µl.

Tempo	Amostras de solo não impactado	Amostras de solo impactado
24 horas	10,2 ± 1,2 ^a	9,3 ± 1,3 ^b
48 horas	9,8 ± 1,2 ^a	9,1 ± 1,3 ^b
72 horas	9,6 ± 1,0 ^a	9,7 ± 1,2 ^a
2 ^a Semana	9,8 ± 1,2 ^a	9,9 ± 1,3 ^a
3 ^a Semana	9,6 ± 1,3 ^a	10,1 ± 1,2 ^a
4 ^a Semana	9,4 ± 1,4 ^a	9,9 ± 1,2 ^a

Medidas na horizontal seguida de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%.

Tabela 8: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/mL) na concentração de 160µl.

Tempo	Amostras de solo não impactado	Amostras de solo impactado
24 horas	10,1 ± 1,2 ^a	9,1 ± 1,3 ^b
48 horas	9,7 ± 1,2 ^a	9,9 ± 1,3 ^a
72 horas	9,6 ± 1,0 ^b	10,0 ± 1,2 ^a
2 ^a Semana	10,1 ± 1,3 ^a	10,1 ± 1,3 ^a
3 ^a Semana	9,6 ± 1,4 ^a	10,0 ± 1,2 ^a
4 ^a Semana	9,4 ± 1,4 ^a	9,7 ± 1,2 ^a

Medidas na horizontal seguida de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%.

Tabela 9: Quantificação de bactérias em amostras de solo não impactado e impactado pelo herbicida metribuzin (UFC/ml) na concentração de 1000µl.

Tempo	Amostras de solo não impactado	Amostras de solo impactado
24 horas	10,8 ±1,0 ^a	11,1 ±1,1 ^a
48 horas	10,5 ±1,0 ^a	11,2 ±1,2 ^a
72 horas	10,3 ±1,0 ^a	11,1±1,2 ^a
2 ^a Semana	10,0 ±1,0 ^b	11,0 ±1,1 ^a
3 ^a Semana	10,0±1,8 ^a	10,7 ±1,2 ^a
4 ^a Semana	9,8 ±1,3 ^b	10,6 ±1,2 ^a

Medidas na horizontal seguida de letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5%.

A atividade microbiana reconhecida por alguns autores como um dos fatores mais importantes na eliminação de produtos químicos no meio ambiente. A função dos microrganismos na transformação de xenobióticos vem, há tempo, sendo demonstrada em trabalhos de laboratório, comparando-se as proporções de degradação entre amostras de solos ativas e esterilizadas (**LICHTENSTEIN & SCHULTZ**, 1964).

Segundo Bollag & Liu, 1990 e Rao *et al.*, 1993 uma vez exposta às comunidades microbianas do solo, as moléculas de outros herbicidas estariam sujeitas a cinco possibilidades de transformação ou inativação:

- a) Biodegradação em que a molécula poderia servir como substrato de crescimento e energia;

- b) Cometabolismo, em que o herbicida é transformado por reações metabólicas, mas não serviria como fonte de energia aos microorganismos;
- c) Polimerização ou conjugação, em que a molécula, ou seu intermediário, seria conjugado com outros compostos presentes naturalmente no solo;
- d) Acumulação, em que a molécula seria incorporada e acumulada dentro do organismo;
- e) Efeitos secundários da atividade microbiana, em que o herbicida é transformado, por causa de mudanças no pH, reações de redox e produtos reativos, entre outros, proporcionado pelos microorganismos.

Alguns microrganismos têm demonstrado habilidade de biodegradar parcial ou totalmente a molécula, levando a formação de NH_3 e CO_2 . Diversos autores têm apresentado em seus trabalhos, fungos (*Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer*) e bactérias (do gênero: *Rhodococcus*, *Nocardia*, *Bacillus* e *Pseudomonas*) que trabalhando em consórcio podem degradar parcialmente a molécula de atrazina (**BEHKI & KHAN**, 1986; **BEHKI**, 1993; **LEVANON**, 1993; **RASODEVICH**, 1995).

Como uma perspectiva futura, resta o estudo do tipo de degradação (acima citadas) a qual o Metribuzin é exposto. Estudos realizados por outros autores indicam qual o tipo de degradação estão sujeitos determinados grupos de herbicidas como, por exemplo:

- a) Degradação da ametrina (Costa, 1992);
- b) Biodegradação da atrazina (Ueta *et al.*, 2003);
- c) Degradação do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-d) (Campos *et al.*, 2004)

5.2. Análises Microscópicas

As observações das características microscópicas das linhagens de bactérias dos GC e GI foram realizadas utilizando observações “*in vivo*” e “*in vitro*”.

Os resultados revelaram que cerca de 82% das bactérias, isoladas do solo controle eram do tipo Gram positivas e 18% eram Gram negativas, enquanto que no solo impactado 92% eram bactérias Gram positivas e 8% eram Gram negativas.

Quanto a motilidade das bactérias isoladas nas amostras de solo dos GC e GI, cerca de 72% foram móveis e 28% imóveis.

A tabela 10 apresenta alguns dos fungos filamentosos que foram isolados, em meio BDA, de **ambos** os grupos, ou seja, tanto do GC e GI, os quais foram enviados ao Departamento de Micologia da UFPE para a classificação taxonômica.

Tabela 10: Classificação taxonômica dos fungos filamentosos isolados das amostras dos GC e GI

Classificação Taxonômica	
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Mucor hiemolis</i> variação <i>luteus</i>
<i>Aspergillus niveus</i>	<i>Penicilium restrictum</i>
<i>Aspergillus tamaritii</i>	<i>Penicillium corylophilum</i>
<i>Eupenicillium</i> sp	<i>Penicillium expansum</i>
<i>Fusarium</i>	<i>Penicillium globrum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Penicillium pinophilum</i>
<i>Fusarium oxysporum</i> variação <i>redolens</i>	<i>Penicillium purpurogenum</i>
<i>Fusarium solani</i>	Phoma sp
	<i>Gliocladium</i> sp

6. CONCLUSÕES

Diante a apresentação e análise dos resultados, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- Os resultados demonstraram que a microbiota do solo, quando impactado pelo herbicida metribuzin, aumentou a quantidade de bactérias Gram positivas mesofílicas aeróbicas da amostra de solo;
- A quantidade de fungos filamentosos e bactérias Gram negativas diminuíram em relação ao outro grupo controle de estudo, indicando uma possível ação inibidora deste herbicida para este grupo de microrganismos;
- A análise estatística comprovou que houve o crescimento de bactérias aeróbias na presença do herbicida metribuzin, indicando uma possível assimilação deste composto;
- Os resultados demonstraram que o Metribuzin não causou danos consideráveis à população de bactérias mesofílicas do solo analisado;
- Outros estudos ainda são necessários para analisar outros possíveis mecanismos de ação do metribuzin sobre os microrganismos existentes na natureza.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. 2 ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 467 p.

ANDERSON, J. P. E. Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 13, n.5, p. 483 – 489, 1984.

ARAÚJO, A. S. F. Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo. Piracicaba, 2002. Tese de mestrado.

BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2. ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. p. 315-401. 622p.

BARBOSA, H. R. *et al.* **Microbiologia Básica**. 2 ed. São Paulo: Ed. Atheneu, 1991. 224p.

BERG, G. L.. Farm Chemicals Handbook. Willoughby, Ohio: Meister Publishing dealkylation and dehalogenation of atrazine and methabolites. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 34, p. 746 – 749, 1986.

BEHKI, R. M.; KHAN, S.V. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.34, p. 746 – 749, 1986.

BEHKI, R. M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rodococcus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 39, p. 1955 – 1959, 1993.

BOLLAG, J. M. ; LIU, S. Y. Biological transformation process of pesticides. In: CHENG, H. (ed.) Pesticides in the soil environment; processes, impacts and modeling. Madison: **Soil Science society of American**, 190. p. 169 – 211.

CAMPOS, S. X.; SANCHES, S. M., FALONE, S. Z., VIEIRA, E. M. influência da taxa de dose na degradação do herbicida ácido diclorofenóxiacético (2,4-D) por meio da radiação gama do cobalto – 60. **Ver. Eclética Química**. Vol. 29, n.1, 2004.

CAVALCANTI, C. A. **Jornal GOVINDA**: “Os Agrotóxicos na Alimentação”. Ano 2, n. 23, Recife - PE, 2003. p. 6 – 7. 11 p.

COSTA, M. A. Biodegradação de 14C-ametrina em areia quartzosa com adição de cana e solo rizosférico. Piracicaba, 1992, 107 p. **Dissertação de mestrado** – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

DELLAMATRICE, P.M. Degradação do Herbicida 14C Diuron por *Acinetobacter baumannii* e pela *Acinetobacter* species. **Chemosphere**, v.46, p. 797-807, 2002.

DE-POLLI, H.; GUERRA, J. G. M. C, N e P na biomassa microbiana do solo. In: SANTOS, G. A.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos da matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Gênese, 1999. p. 389- 411.

EISHELER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates: a snoptic review. **Contam. Hazard Review**, v. 18, p. 1 – 55, 1989.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA – EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação do Solo. Manual de Análises de solo. 2. ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

FOMSGAARD, I. S. Modelling the mineralization kinetics for low concentrations of pesticides in surface and subsurface soil. **Ecological Modelling**. v. 102, p. 175 – 208, 1997.

GOLOVLEVA, L.; AHARONSON, R.; GREENHALG, N.; SETHUNATHAN, N.; VONK, W. The rol and limitations of microorganism in the conversion of xenobióticos. **Puer and Applied Chemistry**, v.32, p. 3354-3359, 1990.

GRAHAM-BRYCE, I.G. The behaviour of pesticides in soil. In: GREENLAND, D.J.; HAYES, M.H.B. (Ed.). **The chemistry of soil processes**. New York : J. Wiley, 1981. p.621-670.

HURST, C. J. **Manual of Environmental of Microbiology**. American Society of Microbiology, 1996, 894 p.

ICMSF – (International Commision of Microbiological Specifition for Foods, of The Internation Union of Microbiological Sicieties) **Microorganismos de los alimentos**, 1, Su Significados y metodos de enumeracion, 2. ed. Espanha: Editorial Acribia S.A., 2000. 439p.

JACOMINI, A. E. **Bioacumulação do herbicida atrazina pelas espécies de bivalves limnicos *Anodontites trapesialis* (Lamarck, 1819) e *Corbicula fluminea* (Muller, 1774)**, 2002.

KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. Herbicides – Chemistry, degradation, and mode of action. New York, Marcel Dekker v.1, p. 130 – 137, 1975.

KIEFT, T. L.; SOROKER, E.; FIRESTONE, M. K. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 19, n. 2, p. 119-126, 1987.

KORPRADITSKUL, R.; KATAYAMA, A.; KUWATSUKA, S. Degradation of atrazine by soil bacteria in stationary phase. **Journal of Pesticide Science**, v. 18, p. 293 – 298, 1993.

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachor, melathion and carbofuran in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 25, p. 1097 – 1105, 1993.

LICHTENSTEIN, E.P. Bound residues in soils and transfer of soil residues in crops. **Residue Reviews**, New York, v.76, p. 147-153, 1980.

LICHTENSTEIN, E.P., SCHULTZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soils, with especial emphases on parathion. **Journal of Economic Entomology**, v.57, p. 618-627, 1964.

LOCKE, M.A.; HARPER, S.S.; GASTON, L.A. Metribuzin mobility and degradation in undisturbed soil columns. **Soil Biology Biochemistry**, v. 157, n.5, May 1994.

MEISTER, R.T. (Ed.). 1992. **Farm Chemicals Handbook'92**. Meister Publishing Company, Willoughby, OH.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. São Paulo: Embrapa – CNPMA, 1991, 440p.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, Ed. Embrapa – CNPMA, 1997. Cap. 4, p. 107 - 124.

MONTEIRO, R.T.R. Degradação de pesticidas. In: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. (Ed.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. p. 107-124.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Lavras – MG: Editora UFLA, 2002. 626 p.

MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. Campinas: **Sociedade Brasileira de Ciências do Solo**, 1992. p.341-360.

NAKAGAWA, L. M.; ANDRÉA, M. M. Liberação de resíduos não extraíveis ou ligados ao herbicida atrazina em solo e sua absorção por plantas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, p. 1517 – 1522, ago, 2000.

OLIVEIRA-SILVA, J.J.; ALVES, S.R.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.N.; MATOS, R.C.O.C.; MOREIRA, J.C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revistas de Saúde Pública**, v.35(2), p. 130-135, 2001.

PARSONS, B. & WITT, J. M. (1989) – **Pesticides in groundwater in the USA. A report of a 1988 survey of US States**. Em 8406; Oregon State University Extension Service.

PELCZAR JUNIOR., J. M.; et al. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. 2 ed. São Paulo: Makron Books, 1996. 524 p.

PERNIN-GARNIER, C.; SCHIAVON, M.; PORTAL, J. M. et al. Degradation de pisoproturon et disponibilité des résidus dans les sol. **Weed Research**, v. 35, n.2, p. 257 – 263, 1995.

PRATA, F. **Comportamento de Herbicidas no solo: influência da matéria orgânica**. 2000.

RAO, P. S. C.; BELLIN, C. A.; BELLIN, C. A.; BRUSSEAU, M. L. Coupling biodegradation of organic chemicals to sorption and transport in soli aquifers: paradigms and paradoxes. In: LINN, D. M.; CARSKI, T. H.; BRUSSEAU, M. L. *et al.* (Ed.) **Sorption and degradation of pesticides and organics chemicals in soil**. Madison: Wisconsin, 1993, p. 1 – 26.

RASODEVICH, M.; TRAINA, S.J.; HAO, Y.L.; TUOVINEN, O.H. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied Environmental Microbiology**, Washington, v.61, n.1, p.297-302, 1995.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento de e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. **Scientia Agrícola**, v.57, n. 4, p. 723-728, out./dez. 2000.

SANINO, F.; FILAZZOLA, M. T.; VIOLANTE, A. *et al.* Fate of herbicides influenced by biotic and abiotic interactions. **Chemosphere**, v. 39, n.2, p. 336 – 341, 1999.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. – **Biologia e Bioquímica do Solo**. Universidade Federal de Lavras, [2004?]. disponível na World Wide Web: <http://www.ambientebrasil.com.br/composer.php3?base=./agropecuario/index.html&conteudo=./agropecuario/artigos/organismos.html>> Acesso em 27 de Janeiro de 2005.

SPADOTTO, C.A. Uso de herbicidas no Brasil. **Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciências das Plantas Daninhas**. 2002. [on line] Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> Acessado em 25/10/2004.

SPARLING, P. G. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a sensitive indicator of changes in soil organic matter. **Australian Journal of Soil Research**, Collingwood, v. 30, p. 95-207, 1992.

TEMLEN, C. The Pesticide Manual, 1994.

UETA, J.; PEREIRA, N. L .; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Ano II, n. 11, p. 10 – 13, nov/dez, 1999.

UETA, J.; PEREIRA, N. L .; SHUHAMA, I. K. **Ver. Biotec., Ciênc. Desenv.** Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação, 2003, 29 ed. 10p.

US EPA. 1998 (Aug.). Metribuzin: Health Advisory. Office of Drinking Water, US EPA, Washington, DC.

WARDLE, D. A. Controls of temporal variability of the soil microbial biomass: a global-scale synthesis. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 30, n. 13, p. 1627-1637, 1998.

WARDLE, D. A.; GHANI, A. A critique of the microbial metabolic quotient (qCO₂) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v. 27, n. 12, p. 1601-1610, 1995.

WINTERLIN *et al.* **Arch Environmental Contamination and Toxicology**, v. 18, p. 734 – 747, 1989.

Sites consultados na internet:

AMBIENTE BRASIL

Em: www.ambientebrasil.com.br Acesso em 18 de Julho de 2005.

BAYER S.A.

Em: www.bayer.com Acesso: 26 de julho de 2005.

CONSULTE-ME.

Em: www.consulteme.com.br/1z/biologia/compsolo.htm Acesso: 27 de Janeiro de 2005.

EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E BIOTECNOLOGIA: Disponível em: www.cenargen.embrapa.br. Acesso em 30 de Agosto de 2004

EXTOXNET

Em: [//extoxnet.orst.edu](http://extoxnet.orst.edu) Acesso em 22 de Julho de 2005.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA DO BRASIL. Disponível em: www.agricultura.gov.br . Acesso em 01 de Setembro de 2004.

SINDIPETRO

Em: www.sindipetro.org.br Acesso em 16 de Julho de 2005.

SINDICATO NACIONAL DOS DISTRIBUIDORES DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS – SINDAG. Disponível em: www.sindag.com.br. Acesso em 30 de Outubro de 2004.

SPORTS MAGAZINE

Em: www.sportsmagazine.com.br Acesso em 22 de julho de 2005.

<http://www.geus.dk/./publications/aarsberetning00/aab00-02.htm>