# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

# ANA CLAUDIA DE OLIVEIRA CHAVES

Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a diversidade da comunidade microbiana dos solos

# ANA CLAUDIA DE OLIVEIRA CHAVES

# Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a diversidade da comunidade microbiana dos solos

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Dra. Jussara Borges Regitano

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

# Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Chaves, Ana Claudia de Oliveira

Comportamento ambiental da ametrina e suas influências sobre a diversidade da comunidade microbiana dos solos / Ana Claudia de Oliveira Chaves; orientadora Jussara Borges Regitano. - - Piracicaba, 2007.

83 f.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. 14 Carbono 2. Herbicidas 3. Matéria orgânica do solo
 4. Microbiologia do solo 5. Reação em cadeia por polimerase I. Título

CDU 631.427.2:632.95.028

#### **AGRADECIMENTOS**

À Dra. *Jussara B. Regitano* pelas contribuições, orientações no âmbito científico e, principalmente, pela amizade construída ao longo do tempo.

Ao Dr. Márcio R. Lambais pelo apoio nas pesquisas na área molecular.

Ao Prof. Dr. *Valdemar Luiz Tornisielo* pela oportunidade de realização de grande parte dessa dissertação no Laboratório de Ecotoxicologia.

Ao Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) por colocar a disposição o Laboratório de Microbiologia Molecular.

Aos técnicos Rosângela Aparecida De Gáspari e Carlos Alberto Dorelli pela experiência profissional compartilhada.

Aos *meus colegas de trabalho* do Laboratório de Ecotoxicologia e de Microbiologia Molecular por facilitar meu aprendizado, compartilhando comigo seus conhecimentos e, especialmente, ao Rafael, pelas horas dedicadas ao meu trabalho.

Ao Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos amigos da cidade de Piracicaba pelo apoio, companheirismo e orações.

Aos amigos da cidade de Campinas, que não permitiram que a distância fosse obstáculo ao cultivo da amizade.

Aos meus pais, por terem investido suas vidas e seus sonhos em mim.

Ao meu Deus, sempre presente, abençoador, cuidadoso e amigo. Pelo privilégio de cada amizade adquirida em Piracicaba e por estar sempre ao meu lado, mesmo em momentos difíceis que passei nesses últimos anos. A Ele, toda glória que esse trabalho possa trazer.

"As únicas pessoas que realizam muito são aquelas que querem tanto o conhecimento, que elas o buscam enquanto as condições ainda são desfavoráveis.

Condições favoráveis nunca virão"

#### **RESUMO**

O herbicida ametrina é relativamente persistente no meio ambiente e está entre os cinco mais usados junto à cultura da cana-de-açúcar no Brasil. Técnicas radiométricas e moleculares foram utilizadas neste estudo para avaliar o potencial de sorção/dessorção e a biodegradação da ametrina, além do impacto do tempo de residência deste herbicida sobre a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana, respectivamente. Os solos foram coletados em áreas florestais, sem histórico de aplicação de ametrina, sendo que um deles apresentou textura mais argilosa (NVef) e o outro mais arenosa (RQo). A ametrina apresentou baixo a moderado potencial de sorção (K<sub>d</sub> = 2,2 e 9,9 L kg<sup>-1</sup> nos solos RQo e NVef, respectivamente). Paralelamente, a taxa de biodegradação ( $t_{1/2}$  = 16 e 36 dias nos solos NVef e RQo, respectivamente) e a formação de resíduos ligados de <sup>14</sup>C-ametrina ao solo (59 e 38 % da quantidade aplicada nos solos NVef e RQo, respectivamente) foram muito maiores no solo NVef, mostrando sua maior taxa de dissipação. Houve também a formação de um metabólito de importância ambiental, o qual correspondeu a 19 e 26 % da quantidade aplicada após 70 dias da aplicação nos solos RQo e NVef, respectivamente. O DNA total foi extraído dos solos, com posterior uso da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase associada à Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (PCR-DGGE). A aplicação da ametrina alterou a estrutura da comunidade microbiana em ambos os solos, sendo essa alteração mais evidente no solo NVef, principalmente nos períodos inicias da incubação. Os dados de sequenciamento evidenciaram o predomínio dos seguintes filos: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria e Bacteroidetes. Houve seleção de alguns filos no solo NVef mesmo com apenas 7 dias de incubação da ametrina; entretanto, não houve redução no número de filos no solo RQo. Isto permitiu concluir que a diversidade da população microbiana pode variar com a aplicação do herbicida ametrina, mas isto dependerá principalmente do tipo de solo.

**Palavras-chave:** ametrina; diversidade; DGGE; biodegradabilidade.

#### **ABSTRACT**

The herbicide ametryne is relatively persistent in the environment and is among the five most used in the sugarcane crop in Brazil. Radiometric and molecular techniques were applied in this study to evaluate sorption/desorption and biodegradation of ametryne and the impact caused its residence time on the structure and diversity of the soil microbial community, respectively. The soils were collected from forested areas, with no history of ametryne application. One of them showed a clayey (NVef) and the other one a sandy (RQo) texture. Ametryne presented low to moderate sorption potential ( $K_d = 2.2 \text{ e } 9.9 \text{ L}$  $kg^{-1}$  in the RQo and NVef soils, respectively). In parallel, the biodegradation rate ( $t_{1/2} =$ 16 and 36 days in the NVef and RQo, respectively) and the formation of soil bound residues of <sup>14</sup>C-ametryne in soil (59 and 38 % of applied amount in the NVef and RQo, respectively) were much greater in NVef soil, showing its higher dissipation rate. There was also formation of a metabolite of environmental importance, which corresponded to 19 and 26 % of applied amount in the RQo and NVef soils, respectively. The genomic soil DNA was extracted with further application of the Polymerase Chain Reaction associated to the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) technique. Ametryne application changed the structure of microbial community in both soils, but this change was more pronounced in the NVef soil, mainly in the initial periods of incubation. The sequencing data showed predominance of the following phyla: Proteobacteria, Acidobacteria, Actinobacteria, and Bacteroidetes. There was selection of certain phyla in the NVef, even only with 7 days of ametryne application; however, there was no reduction in the phyla number in the RQo. This led to the conclusion that microbial population diversity may vary with ametryne application, but it will depend on the soil type.

**Keywords**: ametryne, diversity, DGGE, biodegradation.

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 Uso de pesticidas no solo	10
1.2 Ametrina	11
1.3 Importância da diversidade	11
2 SORÇÃO, DESSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DA AMETRI	NA EM DOIS
SOLOS FLORESTAIS COM DIFERENTES ATRIBUTOS FÍSICO-QU	J <b>ÍMICOS</b>
Resumo	14
Abstract	14
2.1 INTRODUÇÃO	16
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
2.2.1 Solos	23
2.2.2 Produto Químico	23
2.2.3 Sorção/Dessorção	25
2.2.4 Biodegradação	27
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
2.3.1 Sorção/dessorção	29
2.3.2 Biodegradação	33
2.4 CONCLUSÕES	40
3. INFLUÊNCIA DA AMETRINA NA ESTRUTURA E DIVE	RSIDADE DA
COMUNIDADE MICROBIANA DE DOIS DIFERENTES SOLOS FLO	ORESTAIS
Resumo	41
Abstract	42

3.1 INTRODUÇÃO	43
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	48
3.2.1 Solos	. 48
3.2.2 Extração do DNA matagenômico	48
3.2.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)	. 50
3.2.4 Bibliotecas de rDNA 16S	. 51
3.2.5 Análises das seqüências de rDNA16S	52
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
3.3.1 PCR-DGGE	. 55
3.3.2 Bibliotecas de rDNA 16S	. 59
3.4 CONCLUSÕES	. 67
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	. 68

# 1. INTRODUÇÃO

#### 1.1 Uso de pesticidas no solo

Desde a "Revolução Verde" da década de 60, a necessidade do aumento de produtividade agrícola requer, além do uso de fertilizantes e de técnicas de manejo, também a maior utilização de pesticidas, que por sua vez, repercute em impactos ao ambiente. Dentro desse contexto, o Brasil hoje ocupa a oitava posição em relação ao consumo mundial de pesticidas (SINDAG, 2004).

Estudos sobre o comportamento de pesticidas, com base em propriedades físicoquímicas do solo e da molécula, como os de sorção e biodegradabilidade, contribuem
com informações importantes sobre a disponibilidade e o tempo de retenção dos
mesmos ao solo. A avaliação desses processos é de extrema importância no diagnóstico
do risco de contaminação ambiental, pois no solo, os pesticidas podem ser transportados
de várias formas, incluindo processos de volatilização, biodegradação, transferência
para organismos não-alvo, absorção pelas plantas, degradação química, ligação ao solo
e lixiviação para águas subterrâneas.

Porém, a chegada da molécula a esses diferentes destinos é de complexa avaliação, uma vez que sofre influência de vários fatores como: condições climáticas, propriedades físico-químicas do pesticida e do solo etc. Entre as propriedades do solo, destaca-se a matéria orgânica, que pode tanto acelerar a degradação do pesticida, por estimular nutricionalmente a microbiota, quanto torná-lo mais persistente ao solo, por adicionar a ele sítios de sorção (REGITANO et al., 2002). Como os herbicidas são tipicamente usados quando a cultura está ausente ou nos primeiros estágios de desenvolvimento, eles alcançam o solo exposto mais freqüentemente que os fungicidas e inseticidas (SEGUERS et al., 2003), sendo, portanto, extremamente relevante o estudo de seus efeitos nesse ambiente.

#### 1.2 Ametrina

Pertencente ao grupo das triazinas, a ametrina foi escolhida para este estudo, pois é um dos cinco herbicidas mais utilizados na cultura da cana-de-açúcar, cultura esta extremamente importante para a região de Piracicaba (SP). Em contato com o solo, fica sujeita primariamente à degradação microbiana, sendo relativamente persistente (DT<sub>50</sub> = 70 a 129 dias). Trata-se de um herbicida ionizável, com caráter básico (pK<sub>a</sub> = 4,1), solubilidade em água = 200 mg L<sup>-1</sup> a 25°C; pressão de vapor = 3,7 x  $10^{-4}$  Pa;  $\log K_{ow}$  = 2,63 e  $K_{oc}$  = 100 a 930 L kg<sup>-1</sup> (ROBERTS et al., 1998).

Apesar do seu uso intensivo na agricultura brasileira, pouco se sabe sobre seus efeitos sobre a diversidade e estrutura das comunidades microbianas do solo. Mais escassos ainda são estudos que utilizam técnicas moleculares para análise do impacto resultante do uso deste herbicida.

#### 1.3 Importância da diversidade

Estudos relacionados à diversidade microbiana do solo auxiliam na identificação de alterações que ocorrem no ambiente (ØVREAS, 2000). A aplicação de herbicidas no solo pode tanto suprimir quanto acarretar a proliferação de microrganismos, alterando a diversidade do ecossistema. Os riscos de desaparecimento e/ou deslocamento de microrganismos dentro de seus nichos devem ser considerados, pois eles sustentam processos básicos como os ciclos biogeoquímicos e as cadeias alimentares.

As alterações na diversidade microbiana além de indicar condições de estresse ambiental, também evidenciam a habilidade do sistema biológico em responder a perturbações. Além disso, microrganismos são recicladores naturais, capazes de converter compostos orgânicos tóxicos em produtos inofensivos, freqüentemente CO<sub>2</sub> e água, por processos de mineralização (JAIN et al., 2005).

A diversidade biológica dos solos pode ser explicada pela riqueza de espécies e suas ligações com processos bioquímicos do solo (KENNEDY; SMITH, 1995), sendo composta de dois elementos: riqueza e abundância. Assim, a mais alta diversidade ocorre em comunidades marcadas pela presença de muitas espécies diferentes (riqueza) em distribuição numérica (abundância) relativamente igual. Portanto, alterações nessa diversidade podem desestabilizar o ecossistema.

A comunidade microbiana dos solos é constituída por representantes dos três domínios: *Bacteria, Archaea* e *Eucaria*, sendo que os procariotos (*Bacteria e Archaea*) representam a maior parte da biota da Terra. Por exemplo, existem aproximadamente  $10^4$  diferentes bactérias por grama de solo. O domínio *Bacteria*, atualmente é composto de 23 filos, determinados com base nas seqüências de rDNA 16S. Métodos de cultivo são insuficientes para acessar toda essa diversidade, pois a maioria desses microrganismos não pode ser cultivada em meios de cultura tradicionalmente utilizados, sendo indicado o uso de métodos moleculares, como os de "*fingerprint*" genético para estimar a diversidade. Esse tipo de estratégia consiste primeiramente na extração de ácidos nucléicos (DNA ou RNA) do solo, seguido de amplificação de genes específicos (PCR), como os que codificam o rDNA 16S, e posterior análise desses produtos amplificados por técnicas como o DGGE, por exemplo (MUYZER, 1999).

Porém, a técnica de DGGE não é suficiente para determinar e identificar diretamente as espécies ou grupos taxonômicos em uma amostra (JOYNT et al., 2006). Além disso, estudos desse tipo fornecem apenas uma noção de alterações na estrutura da comunidade, sendo que para obter informações sobre a identidade dos membros da comunidade, faz-se necessário a excisão do amplicom do gel, com subseqüente seqüenciamento (LAMBAIS et al., 2005).

A avaliação da diversidade e a comparação de comunidades de procariotos são baseadas no grau de similaridade entre as seqüências de rDNA 16S. Com os dados das seqüências em mãos, existem ferramentas de bioinformática e estatística úteis no que se refere a estimar a diversidade e classificar os grupos existentes. As estimativas são feitas em relação ao número de OTUs (Unidades Taxonômicas Operacionais), já que o conceito de espécie ainda é controverso (TORSVIK et al., 2002; ROSSELÓ-MORÁ, 2001). Essas OTUs podem ser bandas detectadas no gel, após DGGE (LIU et al., 1997); ou seqüências de rDNA 16S, sendo que esta última opção representa resultados mais confiáveis (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Existem critérios para definir OTUs e nesse trabalho foi estipulado que seqüências com similaridade > 97 % são consideradas da mesma espécie; > 95 % do mesmo gênero e > 80 % do mesmo filo, com base em Cury (2006).

Assim, o presente estudo inova ao relacionar o comportamento do herbicida amtrina no solo, usando técnicas radiométricas, com as possíveis alterações que o uso desta molécula poderá causar na diversidade da comunidade microbiana, através da técnica de PCR/DGGE, além da Clonagem e Seqüenciamento para avaliação dos microrganismos constituintes da amostra conforme afetados pelos tratamentos (tipo de solo e tempo de residência do herbicida nos solos).

2 SORÇÃO, DESSORÇÃO E BIODEGRADAÇÃO DA AMETRINA EM DOIS SOLOS FLORESTAIS COM DIFERENTES ATRIBUTOS FÍSICO-QUIMICOS

#### **RESUMO**

Estudos que avaliam o comportamento de herbicidas em solos são extremamente relevantes para a análise de risco ambiental. Pelo uso de técnicas radiométricas, avaliouse a sorção, a dessorção e a biodegradação do herbicida ametrina em dois solos sob cobertura florestal, com atributos físico-químicos distintos. Este herbicida é relativamente persistente e está entre os cinco mais usados junto à cultura da cana de açúcar na região de Piracicaba. A ametrina apresentou maior sorção no solo argiloso, com maior teor de matéria orgânica (NVef) do que no solo arenoso (RQo) (K<sub>d</sub> = 9,9 versus 2,2 L kg<sup>-1</sup>, respectivamente). Por outro lado, o solo RQo, com menor potencial de sorção, apresentou maior potencial de dessorção do que o NVef (34 versus 11 % das quantidades sorvidas, respectivamente). O ensaio de biodegradação mostrou que taxa de mineralização da ametrina foi mínima em ambos os solos (< 1,6 % da quantidade de <sup>14</sup>C-ametrina aplicada após 70 dias de incubação) e que o solo NVef apresentou maior formação de resíduos ligados ao solo (59 versus 38 % após 70 dias de incubação nos solos NVef e RQo, respectivamente). Isto contribuiu para a mais rápida taxa de dissipação no solo NVef do que no solo RQo ( $t_{1/2} = 16$  e 36 dias, respectivamente). Além disso, um metabólito de importância ambiental significativa formou-se logo aos 7 dias de incubação (provavelmente hidroxiametrina), correspondendo a ainda 19 e 26 % da ametrina aplicada nos solos RQo e NVef, respectivamente, após 70 dias de incubação. Pode-se ainda observar que o potencial de sorção da ametrina praticamente quadruplicou com o tempo de incubação (70 dias).

Palavras-chave: herbicida, triazina, retenção, metabólito, dissipação

SORPTION, DESORPTION, AND BIODEGRADATION OF AMETRYNE IN

TWO **FOREST** SOILS WITH DIFFERENT PHYSICAL-CHEMICAL

**ATTRIBUTES** 

**ABSTRACT** 

Studies that evaluate herbicides behavior in soils are extremely relevant to

evaluate environmental risks. Using radiometric techniques, sorption, desorption and

biodegradation of ametryne were evaluated in two soils under forest cover with

different physical-chemical properties. This herbicide is relatively persistent and is

among the five most used in sugarcane crop at Piracicaba region. Ametryne presented

higher sorption in the clayey soil, with higher organic matter content (NVef) than in the

sandy soil (RQo) ( $K_d = 9.9$  versus 2.2 L kg<sup>-1</sup>, respectively). On the other side, the RQo,

with lower sorption, presented higher desorption potential than the NVef (34 versus 11

% of the sorbed amount, respectively). The biodegradation study showed that ametryne

mineralization rate was very low in the studied soils (< 1.6 % of the applied amount of

<sup>14</sup>C-ametryne after 70 days of incubation) that NVef had higher amounts of soil bound

residues formed (59 versus 38 % of the applied amount after 70 days of incubation). It

contributed to the faster dissipation rate found in the NVef than in the RQo soil ( $t_{1/2}$  =

16 and 36 days, respectively). It was identified one metabolite with environmental

importance soon at 7 days of incubation (probably hydroxyametryne), corresponding to

19 and 26 % of the applied ametryne in the RQo and NVef soils, respectively, after 70

days of incubation. In addition, ametryne sorption potential practically quadruplicated

with incubation time (70 days).

**Key words:** herbicide, triazine, retention, metabolite, dissipation.

# 2.1 INTRODUÇÃO

A eficiência, a persistência e o potencial de contaminação ambiental de alguns pesticidas dependem principalmente da sua retenção ao solo e da sua degradação. Um dos principais problemas advindos do uso de pesticidas na agricultura é a persistência excessiva deste no solo; e ela depende, principalmente, de dois processos básicos: sorção do pesticida à superfície das partículas de solo e sua degradação por processos biológicos (ou biodegradação). A sorção permite avaliar o grau de disponibilidade do produto na solução do solo, enquanto que a degradação permite avaliar o tempo de persistência do mesmo no ambiente, além da formação de metabólitos. Estudos sobre o comportamento dos pesticidas, com base em propriedades físico-químicas do solo e da molécula, contribuem com informações importantes sobre a disponibilidade dos mesmos, tanto para cumprir sua eficácia agronômica como pesticida quanto para diagnosticar o risco de contaminação ambiental.

Esses dois processos se influenciam mutuamente, sendo que a sorção age direta ou indiretamente sobre o transporte e sobre a degradação microbiana do produto (BRICEÑO et al, 2007). Para degradar moléculas sorvidas ao solo, as bactérias devem acessá-la de forma direta e/ou facilitar sua dessorção, através da produção de surfactantes, por exemplo. As reações de sorção e dessorção são influenciadas por características físicas e químicas do solo e do pesticida. As características do solo que mais se destacam nesses processos são: quantidade e tipo de matéria orgânica, textura e composição da fração argila e pH da solução do solo. O conceito de que solos argilosos necessitam de maiores doses de aplicação de pesticidas para alcançar a devida eficiência agronômica, por exemplo, decorre de observações práticas e baseia-se na relação diretamente proporcional entre teor de argila e de matéria orgânica do solo, a qual está

diretamente relacionada ao potencial de sorção do produto. Existem vários trabalhos na literatura que citam a partição hidrofóbica à matriz orgânica do solo como o principal mecanismo de sorção para a maioria das moléculas orgânicas não ionizáveis, como é o caso da maioria dos pesticidas (CHIOU, 1989) Porém, quando se trata de sorção de pesticidas ionizáveis, o valor do pH da solução do solo também assume papel importante no potencial de sorção, uma vez que interações eletrostáticas podem ditar o potencial de sorção neste caso.

A fração orgânica do solo, formada por transformações químicas e microbiológicas de restos orgânicos em diferentes estágios de transformação, é rica em óxidos, o que lhe confere uma grande superfície ativa (500 a 800 m² g⁻¹ de solo) e, portanto, apresenta alto potencial adsorvente (HERMES, 1991). A literatura destaca a importância de considerar não somente a área superfícial, mas também a funcionalidade da superfície da fração orgânica, freqüentemente determinada pela heterogeneidade dos átomos ligados ao carbono (YANG et al., 2004). Por outro lado, existem grupos funcionais do pesticida que também influenciam na sorção, como os hidroxílicos, carboxílicos, cianos, sulfonas, sulfóxidos, aminas, fosfatos etc., que podem contribuir para reações mais específicas com componentes da matéria orgânica, tornando o resíduo não-extraível (BRICEÑO et al., 2007). Assim sendo, a fração orgânica do solo pode tanto dificultar a degradação e/ou dissipação de um pesticida no solo através do aumento no potencial de sorção, quanto favorecer estes processos através do aumento da atividade microbiana do solo. Geralmente, solos com maiores teores de matéria orgânica são mais férteis e apresentam maior biomassa e atividade microbiana.

A energia que dita a intensidade da ligação de uma molécula de pesticida ao solo, também conhecida como entalpia de ligação, pode variar. Assim, os pesticidas podem ser atraídos e sorvidos com diferentes intensidades, dependendo do mecanismo

de ligação envolvido. Esses mecanismos podem ser subdivididos em químicos, físicos e interações hidrofóbicas (LAVORENTI et al., 2003). A intensidade da sorção pode ser quantificada pelo coeficiente de sorção ( $K_d$ ) =  $S/C_e$ , em que S = concentração sorvida e  $C_e$  = concentração na solução do solo, sendo que  $K_d$  permite a comparação entre diferentes tipos de solos. Porém, quando se deseja avaliar a sorção em uma faixa ampla de concentrações para um mesmo solo, é mais adequado o uso de isotermas que relacionem concentração em solução por concentração de produto sorvido (OLIVEIRA JR.; REGITANO, 2007) $^1$ . A equação de Freündlich ( $S = K_f C_e^N$ , em que  $K_f$  = coeficiente de sorção de Freündlich e N = coeficiente exponencial da curva) é normalmente utilizada nesses casos.

Estudos que abordam o comportamento de pesticidas em diferentes tipos de solos são extremamente importantes, pois fornecem informações sobre o potencial de contaminação ambiental da molécula. Avaliar a correlação existente entre a microbiota do solo e o destino de pesticidas no ambiente é fundamental, pois a contribuição dos microrganismos para a fertilidade do solo está fundamentada, principalmente, no processo de ciclagem de nutrientes, responsável pela disponibilização dos mesmos às plantas, garantindo a sustentabilidade do meio ambiente. No solo, os microrganismos podem metabolizar os pesticidas aeróbica ou anaeróbicamente, sendo que a maioria dos ambientes agrícolas são aeróbicos (BRICEÑO et al, 2007). As transformações microbianas destes produtos podem ocorrer basicamente por catabolismo, em que o pesticida serve como fonte de carbono e nutrientes para os microrganismos; e por cometabolismo, em que são necessárias outras fontes de carbono e nutrientes para que a

\_

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup> Oliveira Jr. R. S.; Regitano, J. B. **Química e mineralogia do solo**. In: Dinâmica de pesticidas no solo. 2007.

degradação ocorra (LAVORENTI et al., 2003; BOLLAG; LIU, 1990), já que o pesticida não é usado como fonte de energia para o crescimento do microrganismo, mas sim metabolizado em conjunto com outros substratos (BRICEÑO et al, 2007).

A taxa de dissipação de um pesticida no solo é normalmente subsidiada pelo seu tempo de meia-vida (t<sub>1/2</sub>), que expressa o tempo em que 50 % da sua quantidade aplicada encontra-se dissipada do solo (LAVORENTI et al., 2003). Assim sendo, quanto menor a t<sub>1/2</sub> de um produto, menor será sua persistência no ambiente e, consequentemente, menor o seu efeito residual. O termo dissipação é usado aqui para denotar decréscimo/perda na concentração inicial do produto, sendo essas perdas resultantes de processos de transporte, degradação e/ou da formação de resíduos ligados ao solo (WOOD et al., 2005).

Herbicidas da família das s-triazinas, principalmente a atrazina, têm sido estudados devido a sua utilização e relativa persistência no ambiente. Neste estudo, entrentanto, a ametrina (2-etilamina-4-isopropilamina-6-metiltio-s-2,4,6-triazina) foi selecionada por ser um dos cinco herbicida mais usados na cultura da cana, em pré e pós emergência, e pela importância dessa cultura para a região de Piracicaba. Trata-se de uma cultura que emprega alto nível tecnológico e industrialização na produção de açúcar e álcool. Mapeamento da cana-de-açúcar por satélite mostra que a área total cultivada hoje em São Paulo é de 4,22 milhões de hectares, o que corresponde ao aumento de quase 15% em um ano. Segundo o IBGE (1997 apud MACEDO, 1997), é gasto cerca de 22,6 toneladas de herbicidas com esta cultura anualmente. Miles e Pfeuffer (1997) mostraram que a atrazina, o bromacil, a simazina, a ametrina e o norflurazon foram os pesticidas detectados com maior freqüência em amostras de água de 27 estações no sul da Flórida. No entanto, são raros ou inexistentes trabalhos de

monitoramento ambiental da ametrina em condições brasileiras, sugerindo que seu comportamento mereça ser estudado nessas condições.

A ametrina é um herbicida ionizável, com caráter básico (p $K_a = 4,1$ ); solubilidade em água = 200 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C; pressão de vapor = 3,7 x 10<sup>-4</sup> Pa; Log  $K_{ow} = 2,63$  e  $K_{oc} = 100$  a 930 L kg<sup>-1</sup> (ROBERTS et al., 1998) (Figura 1). Apresenta alta estabilidade em meios neutros, levemente ácidos ou levemente alcalinos. A sorção de pesticidas básicos sofre influência direta do pH da solução do solo. À medida que o pH diminui, ou seja, a atividade de íons  $H^+$  aumenta em solução, as espécies moleculares do pesticida tendem a sua forma protonada (catiônica), aumentando o potencial de sorção devido às forças de interações eletrostáticas, uma vez que a maiorias dos solos apresentam balanço de cargas negativo em superfície (BRICEÑO et al, 2007). A protonação ocorre nos grupos etil e isopropil da ametrina. Yamane e Green (1972) registraram maior sorção da ametrina em solos com baixos valores de pH, enquanto que Yang et al. (2004) mostraram que 98, 50 e 98,8 % da ametrina está na forma protonada nos valores de pH iguais a 2,4; 4,1 e 6,0, respectivamente.

Figura 1. Estrutura molecular da ametrina

No solo, a ametrina está sujeita primariamente à degradação microbiana (FARRÉ et al., 2002), sendo relativamente persistente ( $DT_{50} = 70$  a 129 dias) (ROBERT et al., 1998). No Brasil, pesquisas relatam persistência de até seis meses

(PRATA et al., 2001; RODRIGUES; ALMEIDA, 1995). Os microrganismos têm a capacidade de interagir química e fisicamente com a ametrina, levando-a a alterações estruturais (metabolismo) e/ou a sua completa degradação (mineralização). Segundo Briceño et al. (2007), a causa da persistência de pesticidas no solo é comumente a falta de condições favoráveis à sua degradação microbiana, sendo as mais importantes a disponibilidade de nutrientes, a umidade, a aeração, a temperatura e o pH. Essas condições são muito importantes no caso da ametrina, pois a literatura indica que sua biodegradação ocorra principalmente por cometabolismo (COSTA, 1992; PRATA et al., 2001, PRATA; LAVORENTI, 2002).

Muitas vezes há condições favoráveis a degradação, mas o pesticida não está acessível à microbiota, logo sua dissipação por biodegradação pode ser comprometida. A dissipação da ametrina está profundamente relacionada à quantidade de matéria orgânica, ao tipo e quantidade de argila e ao pH do solo. A adição de materiais orgânicos ao solo, como o lodo de esgoto, pode aumentar a retenção do pesticida devido ao acréscimo de sítios de sorção (BRICEÑO et al., 2007); ou pode ainda ativar a microbiota, por disponibilizar nutrientes, acarretando em aumento da degradação e conseqüente diminuição na persistência da molécula (PRATA; LAVORENTI, 2002). Porém, cada caso deve ser analisado particularmente, considerando o tipo de solo e as características do pesticida. No entanto, o termo matéria orgânica é muito amplo, pois reúne uma extensa variação de características químicas, físicas e biológicas, além de poder ser subdividido em várias frações como: matéria orgânica humificada (composta de ácidos húmicos, ácidos fúlvicos e huminas) e matéria orgânica não-humificada. A maioria dos solos apresenta altos teores de ácidos húmicos, os quais são mais reativos quimicamente com os pesticidas (FAREHORST, 2006, BRICEÑO et al., 2007).

Parte do pesticida aplicado ou de seus resíduos pode permanecer ligada ao solo, não sendo passíveis de extração por métodos que não alterem significativamente a natureza da molécula e da matriz do solo (FUHR, 1987), sendo que essa fração foi denominada de "resíduo ligado" ao solo pela IUPAC (União de Química Pura e Aplicada). A fração de resíduos ligados está associada principalmente à matéria orgânica do solo, influenciando os processos de transporte e persistência do pesticida, bem como sua disponibilidade para a fauna e flora do solo (PRATA; LAVORENTI, 2002; FAREHORST, 2006). Os microrganismos degradam mais rapidamente as frações de pesticida disponíveis na solução do solo e, portanto, a fração de resíduos ligados é mais recalcitrante, persistindo mais no solo devido à sua dificuldade de degradação.

Assim sendo, o presente estudo avaliou os processos de sorção, dessorção e biodegradação da ametrina em dois solos florestais com propriedades físico-químicas distintas, sem histórico de aplicação do herbicida. As possíveis diferenças de comportamento influenciarão a sua taxa de dissipação, o que por sua vez influenciará sua biodisponibilidade no ambiente e sua eficácia agronômica, além das alterações na relação solo-microrganismo-planta de solos tropicais úmidos, bem drenados.

# 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### **2.2.1 Solos**

Amostras de 02 solos de áreas florestais: NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico (RQo) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico (NVef), ambos sem histórico de aplicação de ametrina, foram selecionados devido às suas diferentes propriedades físico-químicas (Tabela 1). As amostras dos solos foram coletadas na camada 0 - 10 cm, peneiradas (2 mm) e armazenadas a 4°C, no Laboratório de Ecotoxicologia (CENA/USP). O solo arenoso (RQo) foi coletado na área da Fazenda Pinguinha (Bairro Tanquã/Município de Anhembi) e o solo argiloso (NVef) na Mata da Zootecnia (ESALQ/USP), ambos na cidade de Piracicaba. As determinações do teor de água e da capacidade de campo dos solos foram realizadas segundo o protocolo 307 (OECD, 2002). As análises químicas, físicas e biológicas foram realizadas no Departamento de Solos (ESALQ/USP), segundo Camargo et al. (1986).

# 2.2.2 Produto químico

O produto técnico da ametrina (pureza > 95 %) e sua forma radiomarcada (¹⁴C-ametrina, radiomarcada no anel, pureza = 95 % e atividade específica = 38,9 kBq mg⁻¹) foram utilizados no estudo de sorção/dessorção, para atingir as concentrações desejadas. No estudo de biodegradação, apenas a molécula radiomarcada foi utilizada, sendo que incubação paralela foi realizada com o produto técnico para determinação da biomassa microbiana do solo no início e no final do experimento.

Tabela 1. Atributos físicos, químicos e biológicos dos solos.

Solo <sup>(1)</sup>	<b>M.O.</b> <sup>(2)</sup>	pН	Ø <sub>catiônica</sub> (3)	$T^{(4)}$	$\mathbf{V}^{(5)}$	Textura			Biomassa		Classe Textural
		$CaCl_2$				Areia	Silte	Argila	Inicial	Final	
	g dm <sup>-3</sup>		%	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	%		%		mg C g <sup>-1</sup> solo		
RQo	11	4,0	55,7	27,6	28	88	4	8	0,37	0,20	Areia
NVef	42	6,0	1,2	156,4	87	38	6	56	0,54	0,51	Argila

<sup>(1)</sup> RQo = NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico e NVef = NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico (2) M.O. = matéria orgânica (3) Ø<sub>catiônica</sub> = moléculas na forma catiônica (4) T = capacidade de troca catiônica (5) V = saturação em bases

#### 2.2.3 Sorção/dessorção

Os testes de sorção e dessorção baseiam-se em estudos de isotermas. Para tal, alíquotas de 5 mL das soluções de ametrina, nas concentrações correspondentes a 4,4; 15,1; 25,2; 47,2 e 84,6 mg i.a. L<sup>-1</sup> (preparadas em CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup>), foram adicionadas aos tubos de centrífuga (35 mL) contendo amostras de 5 g de solo (seco em estufa), em triplicata. Para todas as soluções, a concentração radiativa foi de aproximadamente 0,17 kBq mL<sup>-1</sup>. Os tubos foram agitados horizontalmente a 140 rpm por 24 h e, posteriormente, centrifugados a 12100 g por 15 min. Alíquotas de 1 mL dos sobrenadantes foram coletadas para determinar as concentrações de ametrina em equilíbrio na solução do solo (C<sub>e</sub>), por espectrometria de cintilação líquida (ECL) (Packard, 1600 TR). Em paralelo, duplicatas dos tubos com apenas 5 mL da solução de ametrina (sem o solo) foram agitadas e centrifugadas para eliminar a sorção do produto às paredes dos frascos.

A concentração de ametrina sorvida (S) às partículas de solo foi calculada pela diferença entre a concentração inicial  $(C_i)$  e a concentração de equilíbrio  $(C_e)$ , conforme a fórmula abaixo:

$$S = (C_i - C_e) \times V / M$$

em que: S = quantidade do pesticida sorvido

C<sub>i</sub> = concentração inicial do pesticida na solução

C<sub>e</sub> = concentração do pesticida na solução em equilíbrio com o solo

V = volume da solução do pesticida

M = massa de solo

Pela equação de Freündlich (GREEN; KARICKHOFF, 1990), o valor do coeficiente de sorção foi determinado:

$$S = K_f \times C_e^N$$

em que:  $K_f$  = coeficiente de sorção de Freündlich

N = coeficiente exponencial da equação

Os valores dos coeficientes de sorção  $(K_d)$  obtidos individualmente para as diferentes concentrações iniciais de ametrina foram calculados de acordo com a equação abaixo, a partir da qual foi calculado o valor médio para as cinco concentrações:

$$K_d = S / C_e$$

Como a sorção da maioria dos pesticidas é diretamente relacionada com o conteúdo de carbono orgânico do solo, o valor de K<sub>oc</sub> (constante de sorção normalizada em relação ao teor de carbono orgânico do solo) também foi calculado para a menor concentração testada do pesticida, correspondente à dose de campo recomendada (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003):

$$K_{oc} = (K_d \times 100) / C_{org}$$

em que:  $K_{oc}$  = constante linear de sorção normalizada em relação ao teor de carbono orgânico do solo

C<sub>org</sub> = carbono orgânico do solo (%)

Para o teste de dessorção, uma alíquota adicional de 1 mL dos sobrenadantes foi descartada, sendo reposta a alíquota de 2 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol L<sup>-1</sup> a cada tubo de centrífuga. Posteriormente, os tubos foram agitados e centrifugados, nas mesmas condições anteriores, e alíquotas de 1 mL foram retiradas dos sobrenadantes para determinar as concentrações de ametrina dessorvidas em solução (C<sub>e</sub><sup>des</sup>), por ECL. Este procedimento foi repetido mais quatro vezes.

O potencial de dessorção da ametrina foi calculado em relação à sua quantidade inicialmente sorvida:

$$D_{\%} = (D / S) \times 100$$

em que:  $D_{\%}$  = porcentagem do pesticida dessorvido

D = concentração do pesticida dessorvido.

#### 2.2.4 Biodegradação

Amostras dos solos peneiradas (2 mm) e armazenadas a 4°C foram utilizadas, as quais foram previamente acondicionadas em sala climatizada pelo período de 10 dias para a adaptação e recuperação da comunidade microbiana. Triplicatas de amostras de 50 g de solo (seco em estufa) foram devidamente acondicionadas em frascos biométricos (300 mL), sendo a solução de <sup>14</sup>C-ametrina aplicada na dose máxima recomendada no campo (3 kg i.a. ha<sup>-1</sup>, o que correspondeu à dose de 4,29 μg i.a. g<sup>-1</sup> de solo, assumindo densidade do solo = 1,2 g cm<sup>-3</sup>) e a umidade ajustada a 75% da capacidade de campo. Os frascos foram mantidos em sala semi-escura e climatizada a 25 ± 3°C durante todo o período de incubação (70 dias).

A quantidade de <sup>14</sup>C-ametrina mineralizada foi aprisionada em 10 mL de solução de NaOH 0,2 mol<sub>c</sub> L<sup>-1</sup>, sendo que alíquotas de 1 mL foram retiradas para a sua determinação, a qual foi realizada semanalmente. Para os outros períodos de incubação pré-estabelecidos (0, 7, 14, 21, 28, 42, 56 e 70 dias), três extrações subseqüentes foram realizadas nas amostras de solo (50 g) para determinar a taxa de dissipação do produto, a fração de resíduos ligados e a influência do tempo de residência na sorção e disponibilidade do produto. A primeira etapa da extração foi realizada pela adição de 100 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.01 mol L<sup>-1</sup> e as duas etapas subseqüentes com a adição de 100 mL

de solução aquosa de metanol (80 %). Para cada extração, os frascos foram agitados por 2 horas a 140 rpm em agitador horizontal e, em seguida, centrifugados nas mesmas condições anteriores, sendo que alíquotas de 1 mL foram retiradas dos sobrenadantes para determinação da concentração de <sup>14</sup>C-resíduos de ametrina por ECL. Os sobrenadantes restantes foram concentrados em rotoevaporador (Heidolph, WB 2000) para identificação da radioatividade por cromatografía de camada delgada (CCD), através da leitura em um Analisador Linear Automático de Placas de CCD (Berthold, Tracemaster 40).

Para determinação da fração de resíduos ligados, as amostras de solo foram secas em estufa (45°C) e maceradas, sendo que sub-amostras de 0,4 g de solo foram oxidadas em Oxidador Biológico (Harvey, OX-500), em triplicata, capturadas em solução de monoetalamina e quantificadas por ECL.

# 2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

# 2.3.1 Sorção

Inicialmente, pode-se observar que as isotermas não apresentaram comportamento linear, ou seja,  $N \neq 1$  e < 0,83 (Tabela 2). Isto significa dizer que quanto maior a concentração de ametrina, menor o seu potencial de sorção aparente (K<sub>d</sub><sup>ap</sup>) e menor a sua porcentagem sorvida (S). Para o solo RQo, por exemplo, o valor de K<sub>d</sub><sup>ap</sup> diminuiu de 2,2 para 1,3 L kg<sup>-1</sup> e o valor de S diminuiu de 69 para 57 % da quantidade aplicada com o aumento da concentração de ametrina de 4,4 para 84,6 mg L-1 (Tabela 2). Acredita-se que com o aumento da concentração do produto ocorra saturação dos sítios de troca do solo, diminuindo o seu potencial de sorção. Ou seja, os sítios de ligação do solo com as moléculas de pesticida são limitados e à medida que a concentração do pesticida na solução do solo aumenta, esses sítios vão sendo progressivamente saturados, reduzindo o potencial de sorção do pesticida (WEBER; MILLER, 1989). CHIOU (1989) observou que este tipo de comportamento exclui a partição hidrofóbica à superfície orgânica do solo como único mecanismo ditando o processo de sorção.

Na prática, o fato de N diferir entre os tratamentos impede o uso de  $K_f$  para comparar os valores dos potenciais de sorção da ametrina, uma vez que eles apresentam dimensões diferentes (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003). Neste trabalho, apesar dos valores dos coeficientes de partição médio ( $K_d^{médio}$ ) terem sido calculados como médias dos valores obtidos nas diferentes concentrações, achou-se mais coerente comparar os valores de  $K_d$  obtidos para a menor concentração adotada ( $K_d^{[menor]}$ ), pois corresponde à dose máxima de ametrina recomendada no campo (3,0 kg i.a. ha<sup>-1</sup>). O potencial de sorção da ametrina variou de moderado a alto (2,2 <  $K_d$  < 9,9), o que

**Tabela 2.** Parâmetros de sorção e dessorção da <sup>14</sup>C-ametrina nos solos estudados

Solos <sup>(1)</sup>	$\mathbf{K_f}^{(2)}$	$N^{(2)}$	r <sup>2</sup>	$\mathbf{K}_{d}$	(3)	K <sub>d</sub> médio	$\mathbf{K_{oc}}^{(4)}$	$\mathbf{S}^{(5)}$		Smédio	Des <sup>(6)</sup>		Desmédio	ΔН	
				[Menor]	[Maior]			[Menor]	[Maior]		[Menor]	[Maior]		[Menor]	[Maior]
g <sup>1-N</sup> kg <sup>-1</sup> L <sup>N</sup> L kg <sup>-1</sup> solo					)	L kg <sup>-1</sup> C <sub>org</sub>		% do aplica	ado	% do sorvido					
RQo	2,21	0,83	0,99	2,2	1,3	$1,6 \pm 0,4$	250	69,0	56,5	$60,3 \pm 5,0$	34,2	46,5	$40,5 \pm 4,6$	1,9	1,6
NVef	6,98	0,67	0,99	9,9	2,5	$4,7 \pm 3,0$	193	90,1	69,9	$78,2 \pm 7,1$	10,7	26,9	$19,8 \pm 6,2$	4,5	2,1

<sup>(6)</sup> Des = quantidade de ametrina dessorvida.

correspondeu à 69 e 90 % da quantidade aplicada de ametrina nos solos RQo e NVef, respectivamente (Tabela 2). Os valores de K<sub>d</sub> aqui obtidos estão condizentes com a literatura. Por exemplos, Yamane e Green (1972) e Furlan (1992) observaram valores de K<sub>d</sub> variando entre 1,8 e 15,0 L kg<sup>-1</sup> em solos com valores de pH-H<sub>2</sub>O entre 4,8 e 6,5. Em solos brasileiros, os valores de K<sub>d</sub> variaram entre 3,2 e 6,5 L kg<sup>-1</sup>, sendo que um solo apresentou valor discrepante de K<sub>d</sub> (85,7 L kg<sup>-1</sup>) (MERCHESE, 2007).

O maior potencial de sorção observado para o solo NVef deve-se aos seus maiores teores de M.O. e argila e à sua maior capacidade de troca catiônica, apesar deste solo apresentar maior valor de pH do que o solo RQo e, portanto, menor fração de moléculas na forma catiônica (1,2 versus 55,7 %) (Tabela 1). De forma geral, solos com menor proporção de moléculas na forma catiônica apresentam menor potencial de sorção, uma vez que a grande maioria dos solos apresenta balanço de cargas negativo na superfície, favorecendo as interações eletrostáticas com moléculas catiônicas. No entanto, a fração coloidal (matéria orgânica e argila) do solo NVef mostrou-se muito mais reativa (maior valor de T), contribuindo de forma significativa com o processo de sorção, tanto pela sua maior área superfícial (YANG et al., 2004) quanto pela maior funcionalidade de sua superfície (SHENG, 2005), superando a influência do valor de pH.

Paralelamente, pode-se observar que o solo RQo apresentou maior potencial de dessorção do que o NVef, sendo que apenas 34 e 11 % das porcentagens sorvidas foram dessorvidas desses solos, respectivamente (Tabela 2). Isto seria esperado devido ao menor potencial de sorção deste solo. Além disso, o RQo apresentou menor histerese ( $\Delta$ H) do que o solo NVef (1,9 versus 4,5, Tabela 2). Histerese reflete a diferença entre as declividades das curvas de sorção e dessorção ( $\Delta$ H =  $N_{sorvido}$ /  $N_{dessorvido}$ ), o que normalmente resulta de interações mais específicas do pesticida com a matriz coloidal

do solo, através da formação de ligações mais resistentes e/ou do aprisionamento físico do pesticida junto às substâncias húmicas e/ou aos minerais de argila, nos agregados de solo. Para ambos os solos, a histerese foi maior na menor concentração utilizada de ametrina (Tabela 2), o que ratifica a influência da sorção no potencial de dessorção da ametrina, uma vez que maior sorção foi constatada na menor concentração do produto. De qualquer forma, para ambos os solos, a quantidade de ametrina dessorvida foi relativamente pequena (< 28 % do aplicado), enfatizando que parte da ametrina fica retida no solo de forma pouco disponível, podendo até formar resíduos ligados ao solo.

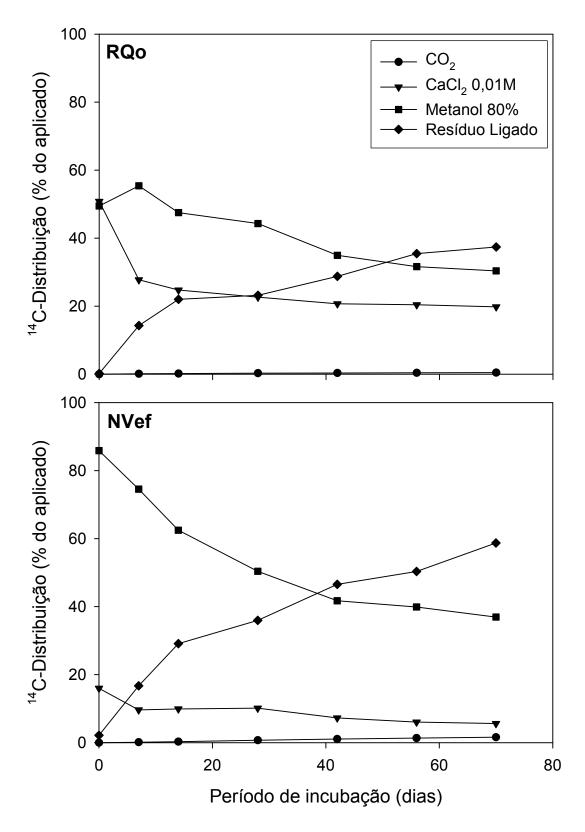
Os processos de sorção e dessorção são fundamentais para entender o comportamento ambiental de pesticidas, uma vez que ambos controlam a sua concentração, ou melhor, a sua disponibilidade na solução no solo. Conforme aqui determinados, o potencial de sorção ditaria a concentração do pesticida na solução do solo logo após a sua aplicação, enquanto que o potencial de dessorção ditaria a sua concentração nos períodos subsequentes, dependendo das condições climáticas, entre outros. Portanto, a ametrina apresenta maior potencial de mobilidade e/ou lixiviação no solo mais arenoso (RQo), com menor potencial de sorção. Na literatura, é normalmente aceito que moléculas com valores de K<sub>d</sub> < 5 L kg<sup>-1</sup>, solubilidade em água > 30 ppm e meia-vida > 21 dias apresentam potencial de mobilidade vertical, podendo chegar até o lençol freático e contaminar fontes de águas subterrâneas (LENG et al., 1995). Infelizmente, o efeito do tempo de residência do produto no ambiente/solo é ignorado nestes tipos de estudo. Normalmente, tem-se que quanto maior o tempo de residência do produto no solo, maior o seu potencial de sorção e, consequentemente, menor o seu potencial de dessorção e de lixiviação (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003; REGITANO et al., 2006).

#### 2.3.2 Biodegradação

A recuperação da radioatividade aplicada variou entre 85 e 104 % durante a execução do experimento, sendo que o valor médio correspondeu a  $96 \pm 6$  %. Isto sugere confiabilidade nos resultados obtidos, uma vez que estes valores estão dentro dos limites aceitáveis (90 a 110 %) segundo a norma da Organisation for Economic Co-Operation and Development (2004).

A ametrina mostrou baixa taxa de mineralização em ambos os solos estudados (< 1,6 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação), sendo que esta taxa foi ainda menor no solo RQo (0,5 %) (Figura 2). Esta menor taxa de mineralização deve-se, provavelmente, à menor biomassa microbiana deste solo (Tabela 1), já que ele apresenta maior concentração de ametrina disponível na solução do solo, ou seja, menor potencial de sorção. Os resultados encontrados neste trabalho estão coerentes com aqueles poucos encontrados na literatura (PRATA et al., 2001; COMPTE, 1997).

Para ambos os solos, a quantidade de resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina extraída com CaCl<sub>2</sub> 0,01mol L<sup>-1</sup> diminuiu com o tempo de incubação, demonstrando que a concentração de ametrina "livre" em solução diminui com o seu tempo de residência no solo. Além disso, também se pode observar que esta quantidade foi bastante maior no solo RQo do que no solo NVef (variou de 51 a 20 % e de 16 a 6 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação, respectivamente) (Figura 2). Isto seria esperado uma vez que o solo RQo apresentou menor sorção e menor histerese, ou seja, menor resistência à dessorção. Já a quantidade de resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina extraída inicialmente com metanol (80 %) foi bastante maior no solo NVef do que no solo RQo (variou de 86 a 37 e de 50 a 30 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação, respectivamente) (Figura 2). Isto ratifica a maior força de ligação da ametrina com o solo NVef, restringindo a sua extração com a solução de CaCl<sub>2</sub> e, por outro lado,



**Figura 2.** Distribuição dos resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina nos solos NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico (RQo) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico (NVef).

possibilitando a sua maior extração com a solução de metanol, principalmente no período inicial após a aplicação do produto. Normalmente, assume-se que a extração com CaCl<sub>2</sub> simula a força de extração da solução do solo, enquanto que a extração com metanol simula a parte da fração sorvida ao solo, na forma reversível (lábil), a qual poderia ser disponibilizada à solução do solo através do processo de dessorção (LAVORENTI; PRATA; REGITANO, 2003). Assim sendo, acredita-se que estas frações participem de forma ativa das reações de equilíbrio, ou seja, dos processos de sorção e dessorção existentes entre a superfície e a solução do solo. Esta resistência à extração com CaCl<sub>2</sub> também evidencia a maior força de ligação da ametrina ao solo NVef, que é um solo argiloso com alto teor de matéria orgânica.

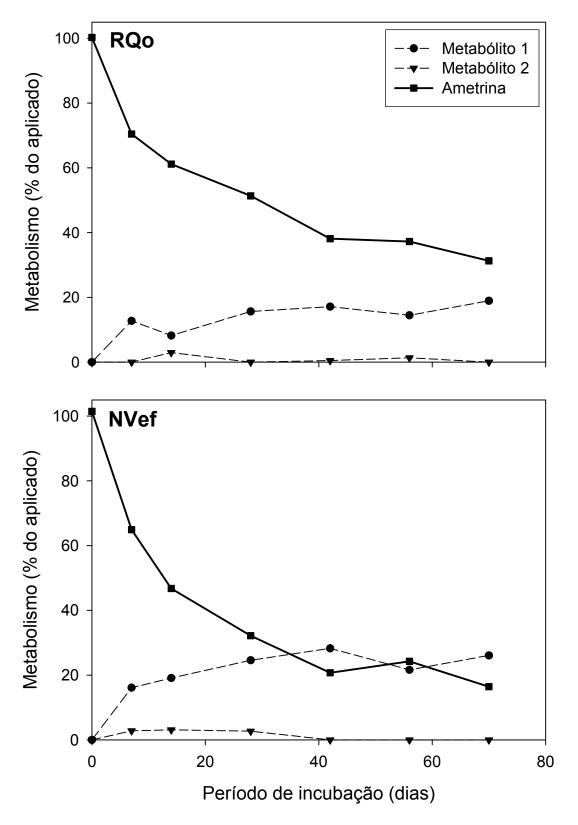
Por outro lado, pode-se observar que a fração de resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina não extraíveis (não disponível), ou seja, de resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina ligados ao solo aumentou com o tempo de residência do produto no solo. Este aumento foi maior no solo NVef do que no solo RQo (de 2 a 59 % e de 0 a 38 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação, respectivamente) (Figura 2), o que pode ser explicado pela maior reatividade da sua fração coloidal e seu maior potencial de sorção. Esses resultados sugerem maior taxa de dissipação da ametrina neste solo, principalmente pela formação de resíduos ligados ao solo.

Na menor concentração, 45 e 80 % da quantidade aplicada de ametrina ficou sorvida aos solos RQo e NVef, respectivamente, após 5 ciclos de dessorção com CaCl<sub>2</sub>. Estas quantidades são relativamente maiores do que a fração de resíduos ligados (38 e 59 % após 70 dias de incubação, respectivamente). Isto mostra que o metanol é capaz de extrair fração maior de resíduos de <sup>14</sup>C-ametrina, tornando questionável a magnitude da fração realmente biodisponível. Para os herbicidas atrazina e simazina, também da classe das *s*-triazinas, observou-se que as extrações seqüenciais com CaCl<sub>2</sub> e metanol

representaram a real biodisponibilidade destes produtos para microrganismos do solo efetivos nos seus respectivos metabolismos (BARRIUSO et al., 2004; REGITANO et al., 2006).

Em ambos os solos, apesar da diferença de magnitude, as curvas de dissipação da ametrina mostraram as mesmas tendências, sendo que a equação cinética de primeira ordem ajustou-se adequadamente aos resultados obtidos (vide valores de  $r^2$ , Figura 3). Isto significa dizer que a concentração de ametrina na solução do solo decai exponencialmente até atingir o platô de equilíbrio e que sua meia-vida ( $t_{1/2}$ ) independe de sua concentração inicial. Pode-se observar que a taxa de dissipação da ametrina foi muito mais rápida no solo NVef do que no solo RQo ( $t_{1/2}=16$  e 36 dias, respectivamente). Paralelamente, esses resultados sugerem que a taxa de dissipação da ametrina em solos brasileiros, com caráter ácido (vide pH, Tabela 1), é bastante maior que em solos de clima temperado ( $t_{1/2}=70$  a 129 dias), diminuindo os riscos de causar danos ambientais nestas condições. No entanto, não se pode ignorar o potencial de lixiviação da ametrina, principalmente no solo RQo, uma vez que  $K_d < 2,0$  L kg<sup>-1</sup> e  $t_{1/2} > 21$ dias.

Esta maior taxa de dissipação no solo NVef deve-se principalmente à maior formação de resíduos ligados neste solo, uma vez que a taxa de metabolização (TM = total dissipado – resíduo ligado) da ametrina foi bastante semelhante em ambos os solos (variou de 0 a 31 % e de 0 a 25 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação nos solos RQo e NVef, respectivamente, com picos de 33 % para ambos os solos após 42 dias de incubação). A fração de resíduos ligados ao solo torna indisponível uma fração cada vez maior do produto aplicado, tanto para exercer sua ação herbicida quanto para sofrer biodegradação. Costa et al. (1997) observou que o processo de formação de resíduos ligados de ametrina aos solos está relacionado principalmente à sua fração



**Figura 3.** Identificação da radioatividade (ametrina + metabólitos) extraída dos solos NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico (RQo) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico (NVef).

orgânica, uma vez que esta tem potencial para formar ligações estáveis com pesticidas e/ou seus metabólitos. Resultados semelhantes foram relatados por Farehorst (2006), Nakagawa e Andréa (2000) e Prata e Lavorenti (2002). Yamane e Green (1972) também registraram maior sorção da ametrina ao solo na presença do que na ausência de carvão vegetal. Esses autores sugeriram a partição hidrofóbica como principal mecanismo de sorção da ametrina aos solos estudados.

Os resultados de cromatografía em camada delgada mostraram a formação de dois metabólitos. Porém, apenas o metabólito 1 (não identificado) apresentou importância ambiental significativa, ou seja, representou mais que 10 % da quantidade aplicada em ambos os solos (OECD, 2002), logo após 7 dias de incubação (Figura 3). Mesmo após 70 dias de incubação, este metabólito ainda correspondia às concentrações de 19 e 26 % da quantidade aplicada nos solos RQo e NVef, respectivamente. Infelizmente, poucos estudos são conclusivos quanto aos metabólitos formados pela degradação da ametrina. Roberts et al. (1998), entretanto, sugere a hidroxiametrina como principal metabólito resultante do metabolismo da ametrina em solos. Nakagawa e Andréa (2000), em solos brasileiros, demonstraram que a atrazina foi degradada principalmente a hidroxiatrazina, observando também as presenças da desetilatrazina e da desisopropilatrazina.

Este trabalho também permitiu estimar o aumento da sorção da ametrina com o seu tempo de residência no solo, assumindo que o valor do coeficiente de sorção aparente  $(K_d^{ap}) = S'/C_e$ , em que S' = concentração sorvida (correspondente à concentração de ametrina extraída com metanol + fração de resíduos ligados ao solo) e  $C_e' = \text{concentração}$  em solução (correspondente à concentração de ametrina extraída com  $CaCl_2$ ), o qual foi estimado para os diferentes períodos de incubação. Inicialmente, pode-se observar que os valores de  $K_d^{ap}$  obtidos para o tempo zero (Tabela 3) foram

bastante semelhantes àqueles obtidos para os valores de K<sub>d</sub><sup>médio</sup> (Tabela 2) no estudo de sorção, o que sugere que os critérios aqui adotados são razoáveis. Os resultados mostraram que já nos primeiros 7 dias de incubação, o potencial de sorção da ametrina aumentou de 1,0 para 2,9 e de 5,3 para 12,4 L kg<sup>-1</sup> nos solos RQo e NVef, respectivamente, atingindo valores de 3,9 e 19,4 L kg<sup>-1</sup> após 70 dias de incubação (Tabela 3). Isto demonstra que, em média, o potencial de sorção de ametrina praticamente quadruplicou com o seu tempo de residência (70 dias) em ambos os solos, tornado-se muito menos disponível, diminuindo seu risco de contaminação ambiental, paralelamente a diminuição do seu efeito residual. Esta diminuição na disponibilidade da ametrina deve-se, principalmente, aos aumentos na sua fração de resíduos ligados e na sua fração dissipada com o aumento de seu tempo de residência no solo.

**Tabela 3.** Influência do tempo de residência no coeficiente de sorção aparente (K<sub>d</sub> <sup>ap'</sup>) da ametrina nos solos estudados.

Período	Solos (1)			
	RQo	NVef		
	K <sub>d</sub> <sup>ap</sup> 'an	netrina <sup>(2)</sup>		
dias	L1	kg-1		
0	1,0	5,3		
7	2,9	12,4		
14	3,8	10,5		
28	3,0	12,9		
42	3,3	25,9		
56	3,9	23,4		
70	3,9	19,4		

<sup>(1)</sup> RQo = NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico NVef = NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico

<sup>(2)</sup>  $K_d^{ap}$  = coeficiente de sorção aparente

## 2.4 CONCLUSÕES

O solo NVef apresentou maior potencial de sorção ao herbicida ametrina do que o solo RQo ( $K_d = 9.9$  versus  $2.2 \text{ L kg}^{-1}$ , respectivamente), provavelmente devido aos maiores teores de matéria orgânica e argila e, conseqüentemente, maior reatividade deste solo.

O solo mais arenoso e com menor potencial de sorção (RQo) apresentou maior potencial de dessorção do que o outro solo (NVef) e, portanto, maior disponibilidade da ametrina na solução do solo (34 versus 11 % das quantidades sorvidas, respectivamente).

A taxa de mineralização da ametrina foi insignificante em ambos os solos estudados (< 1,6 % da quantidade aplicada após 70 dias de incubação).

O solo NVef apresentou maior formação de resíduos de ametrina ligados ao solo do que o solo RQo (59 versus 38 %, respectivamente, após 70 dias de incubação), o que contribuiu para a maior taxa de dissipação da ametrina no primeiro solo ( $t_{1/2} = 16$  e 36 dias, respectivamente), uma vez que a taxa de biodegradação foi bastante semelhante em ambos os solos.

Houve formação de um metabólito de importância ambiental significativa em ambos os solos (> 10% da quantidade aplicada), já logo aos 7 dias de incubação.

O potencial de sorção da ametrina praticamente quadruplicou com o tempo de incubação (70 dias).

# 3 INFLUÊNCIA DA AMETRINA NA ESTRUTURA E DIVERSIDADE DA COMUNIDADE MICROBIANA DE DOIS SOLOS CONTRASTANTES

#### **RESUMO**

Técnicas moleculares têm sido usadas para análises de alterações na estrutura e diversidade de comunidades microbianas resultantes do impacto de poluentes. No presente trabalho, técnicas de PCR-DGGE para análise do impacto causado pelo herbicida ametrina sobre a estrutura da comunidade microbiana e técnicas de sequenciamento de bibliotecas de clones para análise de grupos específicos impactados foram utilizadas em dois solos florestais, sendo um de textura argilosa (NVef) e outro de textura arenosa (RQo). O DNA total do solo foi extraído e um fragmento do gene rDNA16S analisado por essas técnicas. Os resultados mostraram que as comunidades microbianas de ambos os solos foram muito diferentes e que houve alteração visível na estrutura da comunidade microbiana do solo NVef após 7 dias de incubação com a ametrina, o que não foi observado para o solo RQo. Os filos predominantes nas amostras foram: Proteobacteria (variando de 28,8 a 49,3 % após 0 e 7 dias de incubação com a ametrina, respectivamente); Acidobacteria (de 6,5 a 33,8 %); Actinobacteria (10,4 a 16,4 %), e Bacteroidetes (de 0 a 3,2 %). No solo NVef, alguns filos foram selecionados após 7 dias de incubação do herbicida, enquanto que no solo RQo não houve redução no número de filos durante o mesmo período. Além disso, houve redução no número de UTOs após 7 dias de incubação em ambos os solos. Esses resultados permitiram concluir que a estrutura e a diversidade da comunidade microbiana dos solos estudados variaram com o tipo de solo e com o tempo de residência na ametrina no solo

Palavras-chave: herbicida, DGGE, sequenciamento, rDNA 16S, bactéria.

INFLUENCE OF AMETRYNE IN THE STRUCTURE AND DIVERSITY OF

MICROBIAL COMMUNITIES OF TWO CONTRATING SOILS

**ABSTRACT** 

Molecular techniques have been used for analyzing changes in the structure and

diversity of microbial communities as a result of pollutant impact. In this study, PCR-

DGGE techniques to evaluate the impact of ametryne herbicide on the structure of the

microbial community and library sequencing techniques to evaluate specific groups

impacted were used in two soils under forest cover, one with clayey (NVef) and the

other with sandy texture (RQo). The total soil DNA was extracted and a fragment of the

gene rDNA16S was analyzed by these techniques. The results showed that soil

microbial communities were very distinct in both soils and that happened earlier visible

change in the structure of the microbial community of the NVef soil (with 7 days of

ametryne incubation), and it did not happened to the RQo soil. The predominant phyla

in the samples were: Proteobacteria (varied from 28.8 to 49.3 % after 0 and 7 days of

ametryne incubation); Acidobacteria (from 6.5 to 33.8 %); Actinobacteria (10.4 to 16.4

%), and *Bacteroidetes* (from 0 to 3.2 %). In the NVef, certain phyla were selected soon

after 7 days of incubation in the presence of ametryne, whereas in the RQo there was no

reduction in the phyla number during the same period. Moreover, there was reduction in

the OTUs numbers after 7 days of incubation in both soils. These results allowed

concluding that the structure and diversity of the studied soils varied with soil type and

ametryne residence time in the soil.

Keywords: Herbicide, DGGE, sequencing, rDNA 16S, bacteria.

# 3.1 INTRODUÇÃO

O impacto resultante do uso de herbicidas no ambiente tem sido alvo de intensas pesquisas. A maioria delas aborda a molécula e sua ação físico-química, investigando processos de transporte do produto no ambiente (BRICEÑO et al., 2007; WEBER; MILLER, 1989). Outras ainda enfocam a comunidade microbiana como agente de degradação do herbicida (COSTA, 1992; PRATA et al., 2001; PRATA; LAVORENTI, 2002). Porém, poucas pesquisas avaliam o impacto destas moléculas sobre a diversidade e funcionalidade da comunidade microbiana do solo e seus impactos na sustentabilidade do ecossistema. Torsvik et al. (1996) estima que a diversidade em solos florestais esteja em torno de 12.000 a 18.000 espécies.

De maneira geral, técnicas baseadas no cultivo de microrganismos não são suficientes para acessar a diversidade microbiana do solo, já que menos de 10 % das bactérias existentes neste ambiente podem ser isoladas ou cultivadas, sendo necessárias estimativas da diversidade (TORSVIK et al., 1989). As técnicas moleculares, mesmo tendo algumas limitações, trouxeram grande avanço aos estudos de diversidade microbiana. Porém, só ganharam importância em meados da década de 80, com estudos usando o rDNA 16S para avaliação de grupos de procariotos (ZILLI et al., 2003). Os métodos que investigam parte da seqüência do rDNA, notadamente o gene que codifica o rDNA 16S, baseiam-se na amplificação do fragmento de interesse por PCR com iniciadores específicos, em que as seqüências amplificadas são separadas por migração eletroforética diferencial num gel de agarose ou poliacrilamida, dependendo do tamanho (ARDRA, t-RFLP, RISA e RAPD) ou da seqüência (DGGE e TGGE), fornecendo um perfil de bandas ("fingerprint") que representa a estrutura genética da comunidade (RANJARD et al., 1999).

A utilização do gene que codifica o rDNA 16S, alvo dos iniciadores, foi selecionado para o estudo de diversidade porque funciona como marcador genético devido à sua presença em todos os organismos procariotos, por possuir regiões hiper variáveis úteis para classificação taxonômica, por não estar sujeito a transferência horizontal e por ter seqüências disponíveis em bancos de dados públicos (KIRK et al., 2004; SESSITSCH et al., 2001).

A técnica de Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE) foi desenvolvida por Muyzer, Waal e Uitterlinder (1993) para análise de mutações e, desde então, tem sido freqüentemente usada para análise de comunidades microbianas. Apesar de comunidades microbianas complexas serem de difícil análise por DGGE porque geram um grande número de bandas (ØVREÅS et al., 1998), essa técnica geralmente é escolhida quando os microrganismos estão sobre pressão seletiva. Pesquisas que analisam a comunidade microbiana do solo por DGGE em áreas contaminadas, como por exemplos: hidrocarbonetos poliaromáticos (NAKATSU et al., 2000), herbicidas (SEGHERS et al., 2003; EL FANTROUSSI et al., 1999; ENGELEN et al., 1998) ou fungicidas (THIRUP et al., 2001), ganharam destaque na última década.

A DGGE baseia-se na eletroforese de fragmentos de rDNA 16S amplificados por PCR, em gel de poliacrilamida contendo gradiente linear de desnaturantes. Nos géis de poliacrilamida, fragmentos de DNA do mesmo tamanho, mas com diferentes seqüências de nucleotídeos (conteúdo de G+C) e, portanto, com diferentes desnaturações podem ser separados (EL FANTROUSSI et al., 1999). Esta técnica pressupõe que espécies diferentes carregam consigo proporções diferentes de nucleotídeos (variando de 24 a 76 % de G+C) (TIEDJE et al., 1999) e, portanto, oferece um indicativo da diversidade da comunidade microbiana (RÖSCH et al., 2005), podendo revelar alterações na sua estrutura.

A técnica de seqüenciamento pode ser útil para complementar dados de impacto sobre a diversidade, como os obtidos por DGGE, pois permite a identificação de grupos específicos afetados pelo tratamento. As seqüências lidas no seqüenciador geram grande quantidade de dados que devem ser analisados por algorítmos específicos (LAMBAIS et al., 2005). Análises subseqüentes podem ser realizadas, tais como: comparação com banco de dados público como GenBank do National Center for Biotechnology Information (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) e o Ribosomal DataBase Project (http://www.rdp.cme.msu.edu/index.jsp); inferência quanto à classificação taxonômica através do RDPquery (http://simo.marsci.uga.edu/public\_db/rdp\_query.htm) e a comparação entre as bibliotecas com seqüências de rDNA 16S através do programa S-LIBSHUFF (http://www.arches.uga.edu/%7Ewitman/libshuff.html) (SINGLETON et al., 2001) determinando a diferença estatística entre as comunidades.

A complexidade genética de comunidades de bactérias diminui cerca de 60 % em solos contaminados (em relação aos não poluídos), e até cerca de 90 % em solos altamente contaminados (KOZDRÓJ; ELSAS, 2001). A maioria dos trabalhos que estuda o impacto de pesticidas sobre a diversidade microbiana, tem como principal variável a concentração do produto aplicada (CHINALIA; KILLHAM, 2006; ROS et al., 2006), outros ainda variam a molécula testando diferentes pesticidas e até combinações deles (EL FANTROUSSI et al., 1999; PAMPULHA; OLIVEIRA; 2006). Por exemplo, Atlas et al. (1991) encontrou redução na diversidade genética de comunidades de bactérias em solos expostos ao herbicida 2,4,5-T. O que observou-se de comum em todos esses trabalhos é que a presença de pesticidas alterou a comunidade microbiana existente no solo, seja estimulando seu crescimento por adicionar nutrientes, seja inibindo grupos específicos, devido à sua toxicidade.

Kapur e Jain (2004) destacam a importância dos microrganismos nos ciclos bioquímicos, nas cadeias alimentares e na degradação de poluentes. Johnsen (2001) ressalta importantes implicações da diversidade microbiana na qualidade do ambiente:

a) a diminuição na diversidade geralmente resulta em diminuição na habilidade de alguns sistemas biológicos em responder às perturbações; e b) a diversidade bacteriana reflete o estado e a história das perturbações ocorridas no microambiente, indicando o seu grau de estresse. Assim sendo, é essencial avaliar o efeito de qualquer tipo de xenobiótico sobre a diversidade microbiana do solo.

A diversidade microbiana pode ser expressa de várias formas: como inventário de grupos taxonômicos, como um número simples (índices de diversidade), como árvores filogenéticas ou como número de grupos funcionais (JOHNSEN; 2001). Como o conceito de espécie microbiana ainda é controverso (AMANN, 2001), normalmente a diversidade e a estrutura da comunidade microbiana são analisadas em função da ocorrência de Unidades Taxonômicas Operacionais (UTOs). O número de UTOs e de seqüências de cada UTOs podem ser computados e utilizados para cálculo dos índices de diversidade, para estimativa da riqueza de espécies, bem como para estimar a cobertura de amostragem (CURY, 2006). Nos índices usados, ou as espécies abundantes têm maior peso (índice de Simpson) ou considera-se que todas as espécies foram amostradas, relacionando número de espécies e sua equitabilidade (índice de Shannon) (PINTO-COELHO, 2000).

Métodos não-paramétricos foram desenvolvidos para estimar a diversidade a partir de pequenas amostras da comunidade considerando as espécies raras, presentes uma ou duas vezes por amostra, sendo que eles não dependem de conhecimentos prévios sobre a distribuição de freqüência quanto à ocorrência dos microrganismos (KEMP; ALLER, 2004). O método não-paramétrico de Chao1 (CHAO, 1987) utiliza o

número de UTOs com um e dois representantes na amostra para estimar a diversidade total. Chao e Lee (1992) propuseram um algoritmo chamado ACE ("Abundance-based Coverage Estimator"), no qual as UTOs são separadas em grupos raros e abundantes, e somente os grupos raros são utilizados para estimar a diversidade não conhecida.

Neste trabalho, o efeito do herbicida ametrina sobre a estrutura das comunidades de bactérias foi investigado por PCR-DGGE em diferentes períodos de incubação (0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 dias após a aplicação do herbicida), Adicionalmente, os grupos bacterianos mais afetados pelo tratamento foram determinados pelo seqüenciamento de clones de fragmentos do gene que codifica o rDNA 16S nas amostras de dois solos florestais com atributos distintos, 0 e 7 dias após a aplicação do herbicida. O herbicida ametrina foi selecionado devido à sua ampla utilização junto à cultura da cana-de-açúcar no Brasil, sendo que pouco se sabe sobre o seu impacto na estrutura da comunidade microbiana do solo. Devido a seu uso intensivo, persistência e potencial tóxico, a ametrina pode causar efeitos deletérios irreversíveis no ambiente.

## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

#### **3.2.1 Solos**

Foram coletadas amostras de dois solos de áreas florestais, sendo NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico (RQo) e NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico (NVef), ambos sem histórico de aplicação da ametrina, retiradas da camada 0-10cm, peneiradas (2 mm) e após os devidos períodos de incubação (0, 7, 14, 21, 28, 42, 56, 70 dias) com a dose de campo recomendada de ametrina (3 Kg i.a. ha<sup>-1</sup>), foram armazenados a -80°C em tubos de polipropileno para posteriores análises moleculares, que consistiram na extração do DNA metagenômico, Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante e Seqüenciamento. O solo NVef foi coletado na Mata da Zootecnia (ESALQ/USP) e o solo RQo, na área da Fazenda Pinguinha (Bairro Tanquã/Município de Anhembi), ambos na cidade de Piracicaba. As análises químicas, físicas e mineralógicas foram realizadas no Departamento de Ciências do Solo (ESALQ/USP), segundo Camargo et al. (1986) (Tabela 1).

#### 3.2.2 Extração do DNA metagenômico

O DNA metagenômico foi extraído utilizando o "Fast DNA kit" (Qbiogene, Irvine, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. A integridade do DNA foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8%, depois de corado com "Sybr Green" (GE Healthcane, São Paulo, Brasil). A concentração do DNA foi determinada por densitometria, utilizando o "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão e o programa "Fragment Analyses" (GE Healthcane, São Paulo, Brasil).

Tabela 1. Atributos físicos, químicos e biológicos dos solos.

Solo <sup>(1)</sup>	<b>M.O.</b> <sup>(2)</sup>	pН	Ø <sub>catiônica</sub> (3)	$\mathbf{T}^{(4)}$	$\mathbf{V}^{(5)}$		Textura		Biomassa		Classe Textural
		$CaCl_2$				Areia	Silte	Argila	Inicial	Final	
	g dm <sup>-3</sup>		%	mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>	%		%		mg C g	g <sup>-1</sup> solo	
RQo	11	4,0	55,7	27,6	28	88	4	8	0,37	0,20	Areia
NVef	42	6,0	1,2	156,4	87	38	6	56	0,54	0,51	Argila

<sup>(1)</sup> RQo = NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico e NVef = NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico (2) M.O. = matéria orgânica (3) Ø<sub>catiônica</sub> = moléculas na forma catiônica (4) T = capacidade de troca catiônica (5) V = saturação em bases

#### 3.2.3 Eletroforese em Gel com Gradiente Desnaturante (DGGE)

A região V3 do gene do rDNA 16S foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA338fGC (5' GCC CGC CGC GCG CGG GCG GGG CGG GGG CAC GGA CTC CTA CGG GAG GCA GCA G 3') e UN518r (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREAS et al., 1997). A amplificação do DNA 16S foi realizada com 1X Tag Platinum DNA polymerase buffer contendo 0.2 mM dNTPs, 3 mM MgCl2, 1 U Taq Platinum DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 5 pmol dos primers e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação do PCR foram: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. A concentração dos produtos de PCR (amplicons) foi determinada por densitometria, após eletroforese em gel de agarose 0,5X TBE-0.8% e coloração com "Sybr Green" (Amersham Biociences, São Paulo, Brasil), utilizando "Low DNA Mass Ladder" (Invitrogen, São Paulo, Brasil) como padrão. A aquisição da imagem dos géis foi feita com o densitômetro laser "FluorImager" (Amersham Biosciences, São Paulo, Brasil) e o programa "Fragment Analyses" (Amersham 8 Biosciences, São Paulo, Brasil). Quantidades iguais de amplicons (300 ng) foram analisadas através de eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE) 8% (m/v) de acrilamida:bisacrilamida (37,5:1, m:m) contendo um gradiente de 15 a 55% de formamida e uréia (DUHAMEL et al., 2002). A eletroforese foi feita à 200V e 60°C, utilizando um sistema "DCode" (BioRad, Hercules, CA, USA), em tampão 1X TAE. O DNA foi corado com "Vistra Green" (GE, São Paulo, Brasil) e os géis analisados por densitometria, utilizando um densitômetro laser "FluorImager" e o programa "Diversity Database" (BioRad, Hercules, CA, USA). Os perfis de bandas após DGGE foram analisados por agrupamento hierárquico utilizando-se o programa Systat 11.0, com base em dados binários, pelo método de concordância simples ("simple matching"), com o algoritmo de Ward e distância euclidiana como unidade de medida.

A técnica do DGGE apresenta algumas restrições, pois nem sempre cada banda no gel representa uma espécie microbiana. Muitas bactérias possuem mais de uma cópia do rDNA 16S, as quais podem mostrar diferentes mobilidades no gel (com gradiente desnaturante), resultando em múltiplas bandas da mesma espécie microbiana (BOON et al., 2000). Outra restrição da técnica de DGGE é a amplificação preferencial de grupos mais abundantes durante o PCR (VETRIANI et al., 1999). Devido a essas limitações, pode-se afirmar que o número de espécies presentes no solo é muito maior do que aquelas avaliadas através dos amplicons do rDNA 16S no DGGE. Porém, essa técnica é considerada adequada quando se tem como objetivo comparar duas ou mais amostras (MUYZER et al., 1993). O número e a ocorrência de bandas podem ser usados para comparação das diferentes amostras, através do agrupamento hierárquico (BOON et al., 2000).

#### 3.2.4 Bibliotecas de rDNA16S

A região V1-V3 do rDNA 16S de microrganismos do domínio *Bacteria* foi amplificada por PCR utilizando-se o DNA metagenômico extraído e os iniciadores BA63F (5'GGA TCC CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC 3') (MARCHESI et al., 1998) e UN518R (5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3') (ØVREAS et al., 1997), de acordo com Lambais et al. (2005). A amplificação foi efetuada com 1X tampão Taq DNA polimerase contendo 0,2 mM dNTPs, 3 mM MgCl2, 1 U Taq DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil); 5 pmol dos iniciadores e 10 ng do DNA metagenômico. As condições de amplificação foram 5 min a 95°C; 30 ciclos 1 min a 95°C, 1 min a 55°C e 1 min a 72°C, e extensão final por 10 min a 72°C. Os amplicons foram purificados

usando GFX PCR DNA e "Gel Band Purification kit" (GE, São Paulo, Brasil) e ligados no vetor "pGEM-T Easy Vector" (Promega, Madison, WI, USA) a 4°.C "overnight", de acordo com as instruções do fabricante. O produto de ligação foi transformado em células competentes de Escherichia coli DH5a por choque térmico e as células transformadas foram plaqueadas em ágar LB, contendo ampicilina (50 mg mL<sup>-1</sup>), X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-galactosídeo 20 mg mL<sup>-1</sup>). Colônias contendo o plasmídeo recombinante foram selecionadas e cultivadas em meio líquido LB contendo 50 mg mL<sup>-1</sup> de ampicilina a 37°.C "overnight". Os plasmídeos foram extraídos através de lise alcalina. As soluções de ácidos nucléicos foram incubadas com 15µg de RNase por 20 min a 37°.C. O DNA foi precipitado com equivalente volume de isopropanol no gelo por 5 min na geladeira e centrifugado a 4000 g por 40 min a 4°.C. O pélete de DNA foi lavado com etanol gelado 70%, seco e solubilizado em água destilada. A concentração do DNA foi determinada espectrofotometricamente a 260 nm. O següenciamento foi executado utilizando-se 200-500 ng do DNA plasmidial, 10 pmol dos iniciadores T7 ou SP6, 2 µL de "DYEmanic ET Terminator" (GE, São Paulo, Brasil), 2 µL de "sequencing buffer" (200 mM Tris-HCl pH 9,0 e 5 mM MgCl2.6H2O) e água ultrapura para um volume final de 10 µL, em 25 ciclos de 20 s. a 95°.C, 15 s. a 50°C e 1 min. a 60°C. Os produtos de PCR foram precipitados com etanol, lavados e solubilizados em formamida desionizada. O següenciamento foi realizado em sequenciador automático ABI 3100, de acordo com as instruções do fabricante (Applied Biosystems, São Paulo, Brasil).

#### 3.2.5 Análises das següências de rDNA16S

As sequências de nucleotídeos foram processadas com o programa PHRED (EWING; GREEN, 1998) para a remoção de bases com baixa qualidade e sequências do

vetor. Foram consideradas somente seqüências com qualidade > 20, representando menos de um erro a cada 100 bases lidas.

Para a afiliação filogenética das seqüências, utilizou-se o programa RDPquery (http://simo.marsci.uga.edu/public\_db/rdp\_query.htm) que compara as seqüências do gene rDNA 16S com seqüências depositadas no Ribosomal Database Project (RDP: ttp://rdp.cme.msu.edu/index.jsp) e, baseado na distância evolutiva calculada entre as seqüências que serão classificadas e aquelas de maior similaridade no banco de dados, define possível classificação em diferentes níveis taxonômicos.

Para a definição de unidades taxonômicas operacionais (UTOs) foi utilizado o programa DOTUR (SCHLOSS; HANDELSMAN, 2005). Para tanto, utilizou-se uma matriz de distância evolutiva calculada usando-se o programa DNADIST (algoritmo de Jukes-Cantor) do pacote PHYLIP 3.63 (FELSENSTEIN: http://evolution.genetics. washington.edu/phylip.html), a partir do alinhamento feito usando-se o programa ClustalX 1.83 (GARRITY et al., 2005), com definições de parâmetros padrão, exceto "gap-opening penalty" (10.0) e "gap-extension penalty" (0.1).

Os números de UTOs e de seqüências de cada UTO, considerando a distância evolutiva de 0,01 e 0,03 para definição de OTUs, foram computados e utilizados no programa SPADE para o cálculo dos índices de diversidade de Shannon e recíproco de Simpson, para a estimativa de riqueza de espécies pelos métodos não-paramétricos ACE e Chao1 (CHAO; CHEN: http://chao.stat.nthu.edu.tw), além da estimativa da cobertura de amostragem (SINGLETON et al., 2001).

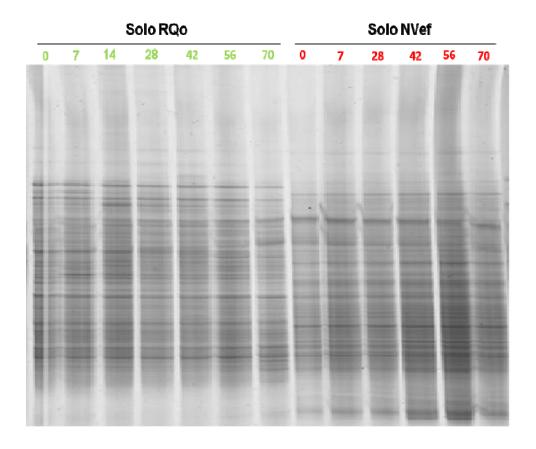
As comunidades bacterianas de rDNA 16S foram comparadas utilizando o programa S-LIBSHUFF (htp://www.arches.uga.edu/whitman/libshuff.html) (SINGLETON et al., 2001), o qual determina o nível de probabilidade de duas

bibliotecas do gene rDNA16S serem estatisticamente diferentes entre si com base em curvas de coberturas homólogas e heterólogas.

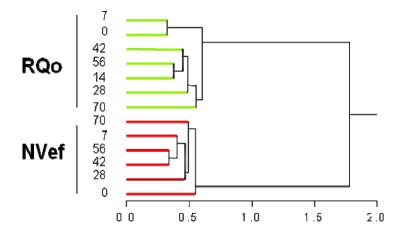
### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 PCR-DGGE

Pela metodologia baseada na amplificação por PCR de um fragmento de rDNA 16S, obteve-se o agrupamento hierárquico dos amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* a partir do gel de DGGE (Figuras 1 e 2), no qual constatou-se que as comunidades microbianas existentes nos solos RQo e NVef apresentam padrões de bandeamento nitidamente distintos (Figura 1), e que a comunidade microbiana se altera durante o período de incubação com a ametrina (Figura 2).



**Figura 1.** Amplicons da região V3 do rDNA 16S de *Bacteria*, após separação por DGGE. Números indicam período de incubação (em dias) na presença do herbicida ametrina.



**Figura 2.** Agrupamento hierárquico com base na separação de amplicons de rDNA 16S de *Bacteria* por DGGE. Números à frente dos ramos indicam o período de incubação (em dias) na presença do herbicida ametrina.

Esses resultados sugerem que o tipo de solo foi o fator que mais influenciou a diversidade microbiana do solo, até mais do que a presença do herbicida. Para o mesmo solo, padrões de bandeamento semelhantes foram obtidos para os diferentes períodos de incubação da ametrina (Figura 1). O solo NVef, de textura argilosa, possui condições mais favoráveis ao crescimento de microrganismos, pois apresenta maior valor de pH, maior teor de matéria orgânica e maior saturação em bases (Tabela 1) e, portanto, maior fertilidade. O solo RQo é bastante arenoso, apresentando condições desfavoráveis à maioria dos microrganismos, principalmente devido à sua elevada acidez, baixo teor matéria orgânica e baixa fertilidade (Tabela 1). Isto pode ser ratificado pela maior biomassa microbiana encontrada no solo NVef do que no solo RQo, até o final do experimento (Tabela 1). Albadejo e Diaz (1990) citam que a atrazina, um herbicida também da classe das s-triazinas, foi menos acessível aos organismos degradadores em solos nutricionalmente pobres, tendendo a persistir mais tempo no solo.

Na presença da ametrina, a estrutura da comunidade microbiana do solo NVef sofreu alteração visível com apenas 7 dias de incubação, enquanto que isso só aconteceu

após 14 dias de incubação no solo RQo (Figura 1). Apesar da maior biomassa existente no solo NVef, a sua comunidade microbiana deve passar por um processo de seleção mais rápido diante do estresse causado pela presença da ametrina. No entanto, resultados anteriores não permitem concluir que esta seleção estaria relacionada aos microrganismos degradadores, uma vez que a velocidade e a rota de biodegradação da ametrina foi semelhante em ambos os solos. Isto sugere que a eficiência e/ou tamanho da comunidade degradadora do solo NVef seja semelhante à do solo RQo, apesar da maior biomassa microbiana da sua comunidade.

A pronta resposta da comunidade microbiana à presença da ametrina no solo NVef, apesar da menor disponibilidade do herbicida neste solo do que no solo RQo (K<sub>d</sub> = 9,9 versus 2,2 L kg<sup>-1</sup>), pode ser explicada pela sua maior biomassa, pela presença de espécies mais sensíveis a fatores estressantes devido à sua maior fertilidade, ou ainda pela seleção natural de algumas espécies dominantes, uma vez que este solo apresenta atributos mais favoráveis ao desenvolvimento dos microrganismos selecionando espécies mais robustas. Macnaughton et al. (1999) observaram que comunidades complexas foram dominadas por apenas algumas espécies após o contato com alguns hidrocarbonetos. Outras pesquisas também relataram mudanças significativas na estrutura da comunidade bacteriana quando diferentes pesticidas foram adicionados ao solo: o dinoderb (ENGELEN et al., 1998); dinuron, dinuron + linuron e cloronuron (EL FANTROUSSI et al., 1999), atrazina (ROS et al., 2006; SEGHERS et al., 2005) e azimsulfuron (VALLE et al., 2006). Esses trabalhos mostraram que o perfil obtido no DGGE concede informações sobre o potencial genético da comunidade quando em situação de contaminação, mas as alterações além de dependerem do tipo de solo e do tempo de exposição, também dependeram da natureza da molécula.

Em ambos os solos, as alterações nas estruturas das comunidades microbianas não cessaram mesmo 42 dias após a aplicação da ametrina (Figura 2). No entanto, esperar-se-ia que essas alterações cessassem caso a presença do herbicida fosse o único fator estressante afetando a dinâmica dessa população, uma vez que resultados anteriores mostraram que a maioria de suas reações metabólicas e de equilíbrio (sorção/dessorção) já havia atingido relativa estabilidade após 30 dias de incubação. Por exemplo, os valores dos coeficientes de sorção da ametrina já haviam sido triplicado com apenas 7 dias de incubação (aumentaram de 1,0 para 2,9 e de 5,3 para 12,4 L kg<sup>-1</sup> nos solos RQo e NVef, respectivamente), sendo que a maioria de suas moléculas já havia dissipado 42 dias após a sua aplicação (t<sub>1/2</sub> = 16 e 36 dias nos solos NVef e RQo, respectivamente).

Os atributos físico-químicos do solo não garantem o estabelecimento de microrganismos degradadores. Porém, trabalhos relatam maior taxa de degradação em solos com valores de pH próximos à neutralidade (7,0). Microrganismos degradadores do fungicida carbendazim e do herbicida 2,4-D cresceram na faixa de pH ~ 6,0, sendo que houve inibição de alguns grupos degradadores na faixa de pH ~ 4,0 (PATTANASUPONG et al., 2004). Este mesmo autor, usando a técnica de DGGE, percebeu queda na diversidade em valores de pH ~ 4,0, sugerindo inibição microbiana. Por outro lado, Ralebitso et al. (2002) mostrou que o pH ~ 4,0 correspondeu ao ótimo para a degradação da atrazina, porém as mesmas bandas foram observadas no gel de acrilamida com a elevação do pH, mostrando que não houve alteração da comunidade. Shi e Bending (2007), estudando comunidades de *Sphingomonas* associadas à biodegradação do herbicida isoproturon, relataram que o tempo de meia-vida variou de 6,1 a 6,7 e de 8,4 a 25,7 dias nos solos cujos valores de pH variavam de 7,1 a 7,4 e de 5,6 a 6,1, respectivamente.

Outro parâmetro de avaliação relevante é o teor de matéria orgânica do solo. Como a dinâmica do carbono no solo é mediada pelas comunidades microbianas, obviamente existe uma relação positiva e direta entre o teor de matéria orgânica e a atividade e diversidade dos microrganismos no solo. Øvreas e Torsvik (1998) verificaram que a diversidade de bactérias em solos orgânicos é maior do que em solos arenosos, sob atividade agrícola. Stenberg (1999) acrescenta que solos com alto conteúdo de biomassa microbiana conseguem não somente estocar, mas também ciclar mais nutrientes no sistema.

#### 3.3.2 Bibliotecas de rDNA 16S

No presente trabalho, as ferramentas de bioinformática foram úteis na comprovação dos dados gerados a partir do DGGE. O programa S-LIBSHUFF mostrou que as bibliotecas para os tratamentos RQo (t0) (0 dias de incubação com a ametrina) e RQo (t7) (7 dias de incubação com a ametrina) quando comparadas com aquelas para os tratamentos NVef (t0) e NVef (t7) foram estatisticamente diferentes entre si ( $p \le 0,01$ ) (Tabela 2). Portanto, pode-se dizer que as estruturas das comunidades existentes nos solos RQo e NVef foram realmente diferentes. Porém, não houve diferenças estatísticas entre as bibliotecas do solo NVef, quando comparadas entre si, ao longo do tempo ( $p \le 0,01$ ) (Tabela 2).

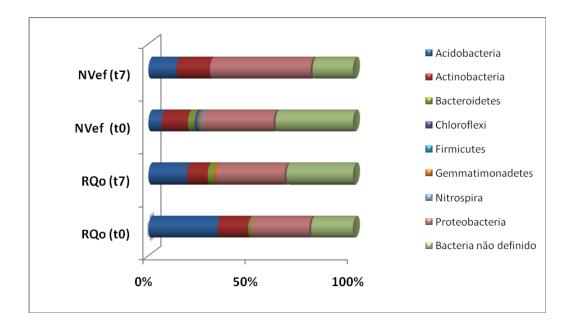
O número de filos prevalecente no solo NVef reduziu de oito para três, após 7 dias de incubação na presença da ametrina, sendo eles: *Acidobacteria*, *Actinobacteria* e *Proteobacteria*, passando de 6,5 a 13,7, de 12,9 a 16,4 e de 34,4 a 49,3 % das seqüências analisadas nos períodos de 0 e 7 dias, respectivamente (Figura 3). O mesmo não foi observado para o solo RQo, pois as porcentagens de representantes dos filos

**Tabela 2.** Valores de *p* calculados nas comparações múltiplas entre as bibliotecas de rDNA 16S das comunidades de *Bacteria* usando o S-LIBSHUFF.

	$\mathbf{Y}^{(1)}$						
$\mathbf{X}^{(1)}$	RQo (t0)	RQo (t7)	NVef (t0)	NVef (t7)			
RQo (t0)	-	0,0000	0,0000	0,0000			
RQo (t7)	0,0000	-	0,0000	0,0000			
NVef (t0)	0,0000	0,0000	-	0,0165			
NVef (t7)	0,0000	0,0000	0,7172	-			

<sup>(1)</sup> RQo (t0) e RQo (t7) = NEOSSOLO QUARTZARÊNICO Órtico típico com 0 e 7 dias de incubação com ametrina; NVef (t0) e NVef (t7) = NITOSSOLO VERMELHO Eutroférrico típico com 0 e 7 dias de incubação com ametrina. X = homólogo na coluna; Y= heterólogo na linha. Valores mínimos para diferenças significativas: 0.008 e 0,0043 para 1 % e 5 % de probabilidade, respectivamente.

Actinobacteria e Proteobacteria permaneceram praticamente inalteradas, sendo que passaram de 15 a 10,1 e de 28,8 a 33,3 % durante os mesmos períodos de incubação. Para este solo, apareceram representantes de outro filo, o Gemmatimonadetes (inexistente no período inicial de incubação), só que em quantidades bastante baixas (1,5 % do total das seqüências) (Figura 3). Isto permitiu inferir que os microrganismos foram mais rapidamente selecionados no solo NVef e que houve estímulo à multiplicação de grupos específicos no solo RQo após 7 dias de incubação com a ametrina. Provavelmente, esse estímulo decorreu do incremento nutricional trazido pela presença do herbicida no solo RQo, nutricionalmente mais pobre (Tabela 1). Alguns autores citam que a presença do herbicida no solo estimula a sua comunidade microbiana devido ao seu uso como fonte de nutrientes (principalmente C e N) (DAS et al., 2003; ROS et al. 2006); porém, outros observaram redução na diversidade pela sua toxicidade aos microrganismos do solo (ARAUJO et al., 2003; EL-FANTROUSSI et al., 1999). Chinalia et al. (2006), usando a técnica de DGGE, mostrou que a diversidade microbiana do solo diminuiu com o aumento da concentração de 2,4-D.

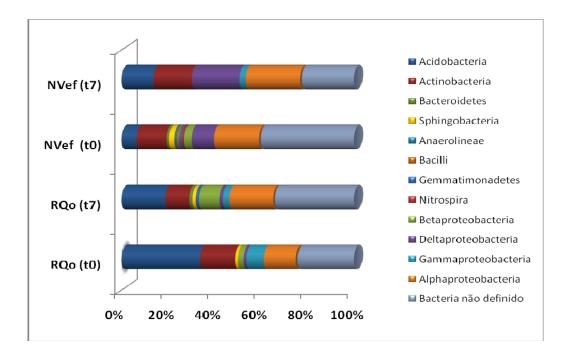


**Figura 3.** Ocorrência relativa de sequências de rDNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDP query dos diferentes **filos** existentes nos solos RQo e NVef, após 0 e 7 dias de incubação com a ametrina.

Os filos predominantes em ambos os solos foram: *Actinobacteria*, *Proteobacteria* e *Acidobacteria*, independentemente do período de incubação (Figura 3). No solo RQo, os filos *Gemmatimonadetes* e *Bacteroidetes* foram estimulados com o tempo de incubação da ametrina (passando de 0 a 1,5 % e de 1,3 a 2,9 % do total das seqüências, respectivamente). Já no solo NVef, esses mesmos filos desapareceram em igual período de incubação, o que ratifica a influência do tipo de solo sobre a sua diversidade microbiana na presença do herbicida, ressaltando a complexidade da dinâmica da interação entre esses fatores.

Para entender o funcionamento das comunidades microbianas e sua relação com processos bioquímicos do ambiente é necessário conhecer as características específicas de cada táxon. O filo *Actinobacteria* é reconhecido por apresentar microrganismos com alta diversidade fisiológica, sendo encontrados principalmente em solos (GARRITY; HOLT, 2001). Seus representantes são gram-positivos, geralmente termófilos e com alto

conteúdo de G+C (GAO; GUPTA, 2005; CAVALIER-SMITH, 2002), além de possuírem papel importante na decomposição e formação do húmus (GOODFALLOW; WILLIAMS, 1983). A classe *Actinobacteria*, pertencente a esse filo, foi encontrada em ambos os solos de forma significativa, porém em maior quantidade no solo NVef (Figura 4), chegando a 16,4 % dos clones das seqüências de rDNA 16S analisadas no período de 7 dias de incubação na presença da ametrina. Isto seria esperado uma vez que este solo apresentou maior teor de matéria orgânica e maior biomassa, sendo que a biomassa microbiana exerce papel fundamental na decomposição da matéria orgânica e nas transformações envolvendo os nutrientes minerais (CURY, 2002).



**Figura 4**. Ocorrência relativa de seqüências de rDNA 16S de *Bacteria*, classificadas com o RDP query das diferentes **classes** existentes nos solos RQo e NVef, após 0 e 7 dias de incubação com a ametrina.

O filo *Proteobacteria* inclui microrganismos de morfologia e metabolismo diversificados (MARGULIS; SCHWARTZ, 1998), autotróficos e heterotróficos, aeróbios e anaeróbios. Esse filo predomina em ambientes que possuem ampla variedade

de condições ambientais para o estabelecimento de populações de procariotos, como é o caso de solos florestais. Este filo subdivide-se em 5 classes: *Alphaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gammaproteobacteria.* No solo RQo, apenas as classes *Betaproteobacteria* (t0 = 2,5 e t7 = 8,7 % do total das seqüências), *Gammaproteobacteria* (t0 = 7,5 e t7 = 2,9 %), *Alphaproteobacteria* (t0 = 13,8 e t7 = 18,8 %) e *Deltaproteobacteria* (t0 = 1,3 e t7 = 1,5 %) foram identificadas. Todas tiveram o crescimento estimulado pelo período de incubação com a ametrina, exceto a *Gammaproteobacteria*. No solo NVef, as classes *Alphaproteobacteria* (t0 = 19,4 e t7 = 23.3 %) *e Delthaproteobacteria* (t0 = 9,7 e t7 = 20,6 %) foram mais representativas dentro desse filo, sendo que a classe *Betaproteobacteria* desapareceu após 7 dias de incubação (t0 = 3,2 e t7 = 0 %) e a classe *Gammaproteobacteria* apareceu durante o mesmo período (t0 = 0 e t7 = 2,7 %).

O filo *Acidobacteria* é composto de bactérias ácido-tolerantes (pH<sub>ótimo</sub> 5.5 – 6.5). Este grupo tem sido freqüentemente detectado em solos, chegando a representar de 30 a 50 % das seqüências de uma biblioteca (QUAISER et al., 2003). Sua presença freqüente em solos de floresta justifica-se pela influência favorável da presença de ácidos húmicos e fúlvicos sobre seu metabolismo. Pereira et al. (2006) observaram que 43,3 % das bactérias presentes no solo florestal pertenciam ao filo *Acidobacteria*, atribuindo isso possivelmente ao pH mais ácido desses solos do que dos solos cultivados. Resultados semelhantes foram encontrados neste trabalho, sendo que este filo apresentou maior representatividade no solo mais ácido (RQo). A classe *Acidobacteria*, pertencente a esse filo, foi encontrada em quantidade significativa no solo RQo, chegando a representar 33,8 % das seqüências obtidas no período de 0 dias de exposição ao herbicida. No solo NVef, representou 13,7 % do total das seqüências após 7 dias de exposição ao herbicida. Para esta classe, a presença do herbicida gerou impacto adverso nos solos; ou

seja, houve diminuição de sua ocorrência no solo RQo e aumento no solo NVef com o tempo de exposição ao herbicida.

O filo *Bacteroidetes* tem sido encontrado em solos de florestas nativas (SILVEIRA, 2006) e em solos cultivados (PEREIRA et al., 2006), sendo que este autor observou que a diversidade de *Bacteroidetes* em solos cultivados e em solos florestais permaneceu a mesma. Microrganismos pertencentes a este filo tem sido descritos em solos áridos dos EUA (KUSKE et al., 1997) e em solos de pastagens (BORNEMAN; TRIPLET, 1997; BORNEMAN et al., 1996, DUNBAR et al., 1999). No solo NVef, esse filo desapareceu no período de 7 dias de incubação na presença do herbicida.

Na literatura existem vários índices matemáticos que auxiliam na interpretação da diversidade da comunidade microbiana do solo. Assim sendo, as estimativas da riqueza, os índices de diversidade, as estimativas do número de UTOs e da cobertura de amostragem, considerando-se a distância evolutiva de 0,03 para a definição de UTOs, estão apresentados na Tabela 3. Para ambos os solos, a riqueza de UTOs é maior inicialmente (t0) do que após 7 dias de incubação com a ametrina (t7). Isto foi mais evidente no solo NVef, cuja comunidade foi mais rapidamente impactada, conforme já havia sido observado pelos resultados da DGGE. O mesmo acontece com a maioria dos índices que estimam riqueza e diversidade.

Os índices de Chao 1 e ACE avaliam a riqueza de espécies; isto é, o número de espécies diferentes presentes na amostra. A riqueza de espécies foi maior no solo NVef, sendo que esta riqueza diminuiu em ambos os solos com o tempo de residência da ametrina no solo (t7). No entanto, após análise dos intervalos de confiança, pode-se dizer que na maioria dos casos não houve diferenças estatisticamente significativas entre os índices para o mesmo solo, em diferentes períodos de incubação (Tabela 3).

Tabela 3. Estimativa de riqueza de UTOs, índice de diversidade e cobertura de amostragem calculados a partir de bibliotecas de rDNA 16S de Bacteria dos solos RQo e NVef, nos períodos de 0 e 7 dias (t0 e t7) de incubação com o herbicia ametrina.

Amostras	<b>N.S.</b> <sup>(1)</sup>	OTUs <sup>(2)</sup>	Estimativa	ı de riqueza	Índice de di	ECA <sup>(5)</sup>	
			ACE	Chao1	Shannon <sup>(3)</sup>	<b>1/D</b> <sup>(4)</sup>	-
(D=0,03) <sup>(6)</sup>							
RQo (t0)	81	53	131,4 (83,8; 252,7)	117,8 (79,7; 210,1)	3,824 (3,701; 3,948)	38,8 (31,7; 49,9)	0,556
RQo (t7)	70	48	89,9 (66,0; 145,4)	99,2 (68,5; 176,1)	3,768 (3,659; 3,877)	38,9 (32,5; 48,5)	0,543
NVef (t0)	94	79	306,0 (188,6; 549,0)	328,4 (192,6; 626,7)	4,305 (4,227; 4,384)	68,0 (56,6; 84,9)	0,287
NVef(t7)	74	56	244,3 (138,1; 487,9)	424,2 (171,2; 1232,8)	3,889 (3,759; 4,019)	41,0 (32,6; 54,6)	0,365

<sup>(1)</sup> N.S = número de seqüências.

Valores entre parênteses representam intervalo de confiança de 95%.

<sup>(2)</sup> OTUs = Unidades taxonômicas operacionais determinadas pelo DOTUR.

<sup>(3)</sup> Estimador de máxima semelhança.

<sup>(4)</sup> Recíproca do índice de Simpsom (estimador de máxima semelhança).

<sup>(5)</sup> ECA = Estimativa de cobertura de amostragem. (6) D = Distância evolutiva considerada: 0,03.

O índice da Recíproca de Simpson (1/D) reflete dominância de espécies, indicando a probabilidade de dois indivíduos escolhidos ao acaso na comunidade pertencerem à mesma espécie. Assim, quanto maior o seu valor, maior a dominância da espécie e, portanto, menor a diversidade. Assim, no solo NVef houve dominância de espécies em relação ao solo RQo (Tabela 3). Por outro lado, o índice de Shannon avalia o grau da incerteza em prever a que espécie pertencerá um indivíduo escolhido ao acaso. Assim, quanto menor seu valor, menor será a diversidade. De acordo com este índice, ocorreu diminuição na diversidade de ambos os solos após 7 dias de incubação, na presença da ametrina.

Infelizmente, apenas uma fração da diversidade existente é analisada, sendo que as estimativas dos índices de riqueza e diversidade tornam-se aproximações muitas vezes grosseiras. Isto fica bastante evidente quando observamos a grande amplitude dos intervalos de confiança das estimativas (Tabela 3). Mesmo com essas ressalvas, os resultados deste trabalho mostram que a diversidade da comunidade microbiana dos solos estudados varia em função do tipo de solo e do tempo de residência do herbicida ametrina; e que estudos desse tipo contribuem para o esclarecimento da dinâmica de populações de bactérias em diferentes condições de solo.

# 3.4 CONCLUSÕES

Com apenas 7 dias de incubação na presença da ametrina, grupos definidos de microrganismos foram selecionados no solo argiloso, mais fértil e com maior biomassa (NVef).

A alteração na estrutura da comunidade microbiana do solo NVef foi mais rápida do que no solo RQo.

Para ambos os solos, a riqueza de UTOs foi maior no momento inicial da aplicação da ametrina (t0) do que 7 dias após a incubação com o produto, sendo este fato mais proeminente no solo NVef.

A diversidade dos solos estudados variou em função do tipo de solo e do tempo de residência da ametrina no solo; ou seja, a presença do herbicida ametrina alterou a estrutura da comunidade de *Bacteria*.

# 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBADEJO, J.; DIAZ, E. Degradación y regeneración del suelo em el mediterrâneo español: experiências em el proyeto Lucdeme. In: ALBADEJO, J.; STOCKING, M. A.; DIAZ, E. (Ed.). Soil degradation and rehabilitation in Mediterranean environmental conditions. Murcia: CSCI, 1990.

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

ATLAS, R. M. et al. Response of microbial populations to environmental disturbance. **Microbial Ecology**, New York, v. 22, p. 249-256, 1991.

BARRIUSO, E.; KOSKINEN, W. C.; SADOWSKY, M. J. Solvent extraction characterization of bioavailability of atrazine residues in soils. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 6552-6556, 2004.

BOLLAG, J. M.; LIU, S. Y. Biological transformation process of pesticides. In: CHENG, H. H. (Ed.). **Pesticides in the soil environment**: process, impacts and modeling. Madison: SSSA, 1990. p. 169-211.

BOON, N. et al. Comparation of the special homogeneity of physico-chemical parameters and bacterial 16S RNA genes in sediment samples from dumping site for

drugging sludge. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 53, p. 742-747, 2000.

BORNEMAN, J. et al. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 62, p. 1935-1943, 1997.

BORNEMAN, J.; TRIPLET, E. W. Molecular Microbial diversity in soils from eastern Amazonia: evidence from unusual microorganisms and microbial populations shifts associated with deforestation. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, n. 7, p. 2647-2653, 1997.

BRICEÑO, G.; PALMA, G.; DURAN, N. Influence of organic amendment on the biodegradation and movement of pesticides. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology,** Boca Raton, v. 37, p. 233-271, 2007.

CAMARGO, O. A. et al. **Métodos de análise química, mineralógica e física de solos do Instituto Agronômico de Campinas.** Campinas: IAC, 1986. 94 p. (Boletim Técnico, 106).

CAVALIER-SMITH, T. The neomuran origin of archeobacteria, the negibacterial root of the universal tree and bacterial megaclassification. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 52, p. 7-76, 2002.

COMPTE, V. X. Avaliação de metodologias de coleta de CO<sub>2</sub> em estudos de biodegradação de agroquímicos em solos. 1997. 55 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 1997.

COSTA, M. A. Biodegradação de <sup>14</sup>C-ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana-de-açúcar e solo rizosférico. 1992. 170 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1992.

COSTA, M. A.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V. L. Influência da adição de palha de cana-de-açúcar na degradação de <sup>14</sup>C-ametrina em solo areia quartzosa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, n. 3, p. 117-122, 1977.

CURY, J. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. 2002. 84 f. Dissertação (Mestrado) – Agronomia. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

CURY, J. C. **Diversidade de** *Bacteria* e *Archaea* em solos de mangue e marisma.

2006. 148p. Tese de doutorado – Microbiologia Agrícola. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 2006.

CHAO, A. Estimating the population size for capture recapture data with unequal catchability. **Biometrics**, Arlington, v. 43, p. 783-791, 1987.

CHAO, A.; LEE, S. M. Estimating the number of classes via sample coverage.

Journal of the American Statistical Association, Alexandria, v. 87, p. 210-217, 1992.

CHINALIA, F. A.; KILLHAM, K. S. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biodegradation in river sediments of Northeast-Scotland and its effect on the microbial communities (PLFA and DGGE). **Chemosphere**, Oxford, v. 64, p. 1675-1683, 2006.

CHIOU, C. T. Theoretical consideration of the partition uptake of nonionic organic compounds by soil organic matter. In: SAWHNEY, B. L.; BROWN, K. Reactions and movement of organic chemicals in soils. Madison: SSSA, 1989. p. 1-31.

DAS, A. C.; DEBNATH, A.; MUKHERJEE, D. Effect of the herbicides oxadiazon and oxyfluorfen on phosphate solubilizing microorganisms and their persistence in Rice fields. **Chemosphere**, Oxford, v. 53, p. 217-221, 2003.

DUHAMEL, M. S. D. et al. Comparison of anaerobic dechlorinating enrichment cultures maintained on tetrachloroethene, trichloroethene, cis-dichloroethene and vinyl chloride. **Water Research**, New York, v. 36, p. 4193-4202, 2002.

DUNBAR, J. et al. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation 16S rRNA Gene Cloning. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 1662-1669, 1999.

EL FANTROUSSI, S. et al. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA Gene Fingerprints and community-level physiological profiles. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 982-988, 1999.

ENGELEN, B. et al. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprint in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 2814-2821, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using Phred II error probabilities. **Genome Research,** Woodbury, v. 8, p. 186-194, 1998.

FARENHORST, A. Importance of soil organic matter fractions in soil-landscape and regional assessments of pesticide sorption and leaching in soil. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 70, p. 1005-101, 2006.

FARRÉ, M. et al. Analysis and toxicity of methomyl and ametryn after biodegradation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, p. 704-709, 2002.

FUHR, F. Non-extractable pesticides residues in soil. In: GREENHALG, R.; ROBERTS, T. R. **Pesticide science and biotechnology**. Oxford: Blackwell Science, 1987. p. 381-389.

FURLAN, G. R. Efeito da queimada na adsorção, dessorção e mobilidade dos herbicidas 2,4-D, ametrina e trifluralina em dois solos da região Amazônica.

1992. 53 f. Dissertação (Mestrado) — Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 1992.

GAO, B.; GUPTA, R. S. Conserved indels in protein sequences that are characteristic of the phylum *Actinobacteria*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 55, p. 2401-2412, 2005.

GARRITY, G. M.; BELL, J. A.; LILBURN, T. G. **Taxonomic outline of the Prokariotes. Bergey's manual of systematic bacteriology**. 2. ed. Relase 5.0. New York: Springer, 2004. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline.

GOODFALLOW, M.; WILLIAMS, S. T. Ecology of actinomycetes. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 37, p. 189-216, 1983.

GREEN, R. E.; KARICKHOFF, S. W. Sorption estimates for modeling. In: CHENG, H. H. **Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling.** Madison: SSSA, 1990. p.79-102.

HERMES, L. C. Adsorção e mobilidade dos herbicidas 2,4 – D e ametrina em solos do estado de São Paulo. 1991. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 1991.

JAIN, R. K. et al. Microbial diversity: application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. **Current Science**, New Delhi, v. 89, 1, 2005.

JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biology and Fertility of Soils**, Berlin, v. 33, p. 443-453. 2001.

JOYNT, J. et al. Microbial community analysis of soils contaminated with Lead, Chromium and Petroleum hydrocarbons. **Microbial ecology**, New York, v.51, p.209-219, 2006.

KAPUR, M.; JAIN, R. K. Microbial diversity: exploring the unexplored. **WFCC Newsletter**, Mishima, n. 39, p. 12-16, 2004.

KEMP, P. F.; ALLER, J. Y. Bacterial diversity in aquatic and other environments: what 16S rDNA libraries can tell us. **FEMS Microbiology Ecology**, Oxford, v. 47, p. 161-177, 2004.

KENNEDY, A. C.; SMITH, K. L. Soil microbial diversity and the sustainability of agricultural soils. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 170, n.1, p.75-86, 1995.

KIRK, J. L. et al. Methods of studying soil microbial diversity. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 58, p. 169-188, 2004.

KOZDRÓJ, J.; van ELSAS, J. D. Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches.

Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 43, p. 197-212, 2001.

KUSKE, C. R.; BARNS, S. M.; BUSCH, J. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of arid southwestern United States that are present in many Geographic regions. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3614-3621, 1997.

LAMBAIS, M. R et al. Diversidade microbiana nos solos: Definindo novos paradigmas. In: VIDAL-TORRADO, P.; ALLEONI, L. R. F.; COOPER, M.; SILVA, A. P.; CARDOSO, E. J. (Ed.) **Tópicos em ciências do solo.** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciências do Solo, 2005, v. 4, p.43-84.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos – Fundamentos. In: CURI, N. et al. (Ed.). **Tópicos em ciências do solo**. Viçosa: SBSC, 2003. v. 3, p. 335-400.

LENG, M. L.; LEOVEY, E. M. K.; ZUBKOFF, P. L. (Ed.) **Agrochemical environmental fate**: state of the art. Boca Raton: CRC Press, 1995. 410 p.

LIU, W. T. et al. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. **Applied and Environmental Microbiology.** Michigan, v. 63, 11, p. 4516-4522, 1997.

MARCHESI, J. R. et al. Design of evolution of useful bacterium- specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 795-799, 1998.

MARGULIS, L.; SCHWARTZ, K.V. **Five kingdoms**: an illustrated guide to the phyla of life on earth. 3. ed. New York: WH Freeman, 1998. 520 p.

MERCHESI, L. Sorção e lixiviação do herbicida ametrina em solos canavieiros tratados com lodo de esgoto. 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Mestre em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade Estadual de São Paulo, Piracicaba, 2007.

MUYZER, G. DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, Netherlands, v. 2, p. 317-322. 1999.

NAKAGAWA, L. E.; ANDRÉA, M. M. Degradação e formação de resíduos nãoextraíveis ou ligados do herbicida atrazina em solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, n. 8, p. 1509-1515, 2000.

NAKATSU, C. H.; TORSVIK, V.; OVREAS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA polymerase chain reaction products. **Soil Science Society of America Journal**, Madison, v. 64, p. 1382-1388, 2000.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Aerobic and anaerobic transformations in soil.** Paris: OECD, 2002. 17 p. (Guideline for Testing of Chemicals, 307).

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Leaching in soil columns.** Paris: OECD, 2004. 15 p. (Guideline for Testing of Chemicals, 312).

ØVREÅS, L. et al. Distribution of bacterioplakton in meromictic lake saelevannet as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR- amplified gene fragments coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 63, p. 3367-3373, 1997.

ØVREÅS, L. et al. Microbial community changes in a perturbed agricultural soil investigated by molecular and physiological approaches. **Applied end Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 64, p. 2739-2742, 1998.

ØVREÅS, L. Population and community level approaches for analyzing microbial diversity in natural environments. **Ecology Letters**, London, v. 3, p.236-251, 2000. ØVREÅS, L.; TORSVIK V. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. **Microbial ecology**, v. 36, p. 303-315, 1998.

PAMPULHA, M. A.; OLIVEIRA, A. Impact of an herbicide combination of Bromoxynil and Prosulfuron on soil microorganisms. **Current Microbiology**, New York, v. 53, p. 238-243, 2006.

PATTANASUPONG, A. et al. Degradation of Carbendazim and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid by immobilized consortium on Loofa sponge. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 98, p. 28-33, 2004.

PEREIRA, M. R. et al. Molecular characterization of bacterial populations of different soils. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 37, p. 439-447, 2006.

PINTO-COELHO, R. M. **Fundamentos em ecologia**. Porto Alegre: ARTMED, 2000. 252 p.

PRATA, F. et al. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 36, p. 975-981, 2001.

PRATA, F.; LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria orgânica. **Revista de Biociências**, Taubaté, v. 6, n. 2, p. 17-22, 2002.

QUAISER, A. et al. *Actinobacteria* form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from the environmental genomics. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 50, p. 563-567, 2003.

RALEBITSO, T. K. et al. Insights into bacterial associations catabolizing atrazine by culture-dependent and molecular approaches. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 19, p. 59-67, 2002.

RANJARD, L.; POLY, F.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment. **Research in Microbiology**, Paris, v. 151, p. 167-177, 1999.

REGITANO J. B. et al. Sorção e dessorção do fungicida cloratalonil em solos com diferentes teores de matéria orgânica. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 26, n. 1, p.267-274, 2002.

REGITANO, J. B.; KOSKINEN, W. C.; SADOWSKY, M. J. Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Piracicaba, v. 54, n. 4, p. 1373-1379, 2006.

ROBERTS T. R. et al. **Metabolic pathways of agrochemicals.** Part 1: Herbicides and plant growth regulators. London: The Royal Society of Chemistry, 1998. 849p.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 4. ed. Londrina: IAPAR, 1995. 676 p.

ROS, M. et al. Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 34, p. 93-102, 2006.

RÖSCH, C.; EILMUS, S.; BOTHE, H. Approaches to assess the biodiversity of bacteria in natural habitats. **Biochemical Society Transaction**, Essex, v. 34, p. 169-173, 2006.

ROSSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 25, p. 39-67, 2001.

SCHLOSS, P. D.; HANDELSMAN, J. Introducing to DOTUR, a computer program for defining operational taxonomic units and estimating species richness. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 71, p. 1501-1506, 2005.

SEGUERS, D. et al. Effect of a long-term herbicide application on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 46, p. 139-146, 2003.

SEGUERS, D.; SICILIANO, S. D.; TOP, E. M. Combined effect of fertilizer and herbicide applications on the abundance, community structure and performance of the soil methanotrophic community. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 37, p. 187-193, 2005.

SESSITSCH, A. et al. Microbial populations structures in soil particles size fractions of a long-term fertilizer field experiment. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4215-4224, 2001.

SHI, S.; BENDING, G. D. Changes to the structure of *Sphingomonas* spp. Communities associated with biodegradation of the herbicide isoproturon in soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 269, p. 110-116, 2007.

SHENG, G.; YANG, G.; HUANG, M.; YANG, K. Influence of pH on pesticide sorption by soil containing wheat residue-derived char. **Environment Pollution**, Shangai, v. 134, p. 457-463, 2005.

SILVEIRA, L. E. et al. Bacterial diversity of soil under eucalyptus assessed by 16S DNA sequencing analysis. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 1507-1516, 2006.

SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA. Informações do setor. Disponível em: http://www.sindag.com.br/new/upload/inforsector/consumomundial.xls. Acesso em: 15 set. 2007.

SINGLETON, D. R. et al. Quantitative comparisons of 16S rRNA gene sequence libraries from environmental samples. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 67, p. 4374-4376, 2001.

STENBERG, B. Monitoring soil quality of arable land: microbiological indicators. **Acta Agriculturae Scandinavica. B**, London, v. 49, p. 1-24, 1999.

THIRUP, L. et al. Effects of fenpropimorph on bacteria and fungi during decomposition of barley roots. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 33, p. 1517-1524, 2001.

TIEDJE, J. M. et al. Opening the black box of soil microbial diversity. **Applied Soil Ecology**, Amsterdam, v. 13, p. 109-122, 1999.

TORSVIK, V.; GOKSOYR, J.; DAAE, F. L. High diversity in DNA of soil Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 56, p. 782-787, 1989.

TORSVIK, V.; ØVREÅS, L. THINGSTAD, T. F. Prokaryotic Diversity – Magnitude, Dynamics, and Controlling Factors. **Science**, Bergen, v. 296, p.1064-1066. 2002.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R., GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal Industrial Microbiology**, Amsterdam, v. 17, p. 170-178, 1996.

VALLE, A. et al. The microbial degradation of azimsulfuron and its effects on the soil bacterial community. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, p. 443-452, 2006.

VETRIANI, C. et al. Population structure and phylogenetic characterization of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. **Applied and Environment Microbiology**, Baltimore, v. 65, p. 4375-4384, 1999.

WEBER, J. B.; MILLER, C. T. Organic chemical movement over and through soil. In: SAWHNEY, B. L.; BROWN, K. **Reactions and movement of organic chemicals in soils**. Madison: ASA; CSSA; SESA, 1989. p. 305-334. (Special Publication, 22).

WOOD, B. P.; GUMBS, F.; HEANDLY, J. V. Dissipation of atrazine and two N-dealkylated metabolites in soils of sugarcane plantations under field conditions in Barbados. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, New York, v. 36, p. 783-794, 2005.

YAMANE, V. K.; GREEN, R. E. Adsorption of ametryne and atrazine on an oxisol, montmorillonite and charcoal in relation to pH and solubility effects. **Soil Science of America Proceedings,** Madison, v. 36, p. 58-64, 1972.

YANG, Y. et al. pH-dependence of pesticide adsorption by wheat-residue-derived black carbon. **Langmuir**, Washington, v. 20, p. 6736-6741, 2004.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. Cadernos de Ciências & Tecnologia, Brasília, v. 20, p.391-411, 2003.