



RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

VINASSE AND TEBUTHIURON APPLICATION TO SUGARCANE SOIL AND ITS EFFECTS ON BACTERIAL COMMUNITY AND ECOTOXICITY AFTER NATURAL ATTENUATION

Mírian Alves de Faria¹, Paulo Renato Matos Lopes^{1,*}, Ederio Dino Bidoia², Luziane Cristina Ferreira¹, Ronaldo da Silva Viana¹, Evandro Pereira Prado¹, Carolina dos Santos Batista Bonini¹, and Rafael Simões Tomaz¹

¹College of Technology and Agricultural Science - São Paulo State University (UNESP), campus of Dracena, Brazil
²Bioscience Institute – São Paulo State University (UNESP), campus of Rio Claro, Brazil

ARTICLE INFO

Article History:

Received 02nd May, 2019
Received in revised form 09th June, 2019
Accepted 26th July, 2019
Published online 28th August, 2019

Key Words:

CFU; Fertigation; Fitotoxicity; Herbicide; Microorganisms.

ABSTRACT

Soil fertility and weed control are fundamental factors for vinasse and herbicide applications in sugarcane crops, however environmental damage can be caused by their continuous and increasing use. Therefore, the present study aimed to analyze the changes in microbial community and ecotoxicological potential of sugarcane soil for different associations of vinasse and tebuthiuron. The experimental design was completely randomized in a factorial scheme 4x2, linked to vinasse volume (V0-0,5-1,0-2,0) and to tebuthiuron recommended dose (H0-1). Thus, different soil samples were analyzed in two periods (initial time and after 51 days of natural attenuation) for the number of bacterial CFU and the phytotoxic effect by ecotoxicity bioassays using lettuce seeds as test organism. Initially, results revealed that vinasse presence increased the number of bacterial colonies in soil, especially when used at higher concentrations. Higher volumes of vinasse also favored plant development at initial time. On the other hand, this benefit was reduced after natural attenuation. Finally, it was found that tebuthiuron dose did not negatively impact the bacterial community or soil ecotoxicity.

Copyright © 2019, Mírian Alves de Faria et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Citation: Mírian Alves de Faria, Paulo Renato Matos Lopes et al. 2019. "Vinasse and tebuthiuron application to sugarcane soil and its effects on bacterial community and ecotoxicity after natural attenuation", *International Journal of Development Research*, 09, (08), 28898-28904.

INTRODUCTION

A expansão da cultura canavieira no Brasil se deu a partir da criação do Programa Nacional do Alcool (Proálcool) na década de 1970 pelo governo brasileiro. O principal intuito desse programa foi a produção do etanol em larga escala, com o objetivo de diminuir a utilização de combustíveis fósseis (IBGE, 2015). Acerca disso, o Brasil se destaca como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, gerando uma contribuição de 25% em produção total (CONAB, 2018). Além disso, o país também recebe destaque pela maior produção mundial de açúcar e etanol (MAPA, 2016). Tendo em vista essa elevada produção, o plantio da cana-de-açúcar é feito comumente em áreas extensas. Para a obtenção de produtividades elevadas nessas áreas, é necessária a utilização de um pacote tecnológico que favoreça a produção e contribua para o manejo de fatores que podem colocar em risco a

produtividade, como as plantas daninhas, controladas por herbicidas (Kuva *et al.*, 2008). Esse método químico é o mais utilizado na cultura, pois, comparado a outras técnicas de controle, apresenta facilidade de acesso e baixo custo (Kuva *et al.*, 2008). Dessa forma, esse insumo acabou se tornando necessário na agricultura moderna, contudo, seu uso indiscriminado resulta em danos ao ambiente como um todo (Morillo; Villaverde, 2017). Especialmente na cultura da cana-de-açúcar, além dos herbicidas, a vinhaça que é um subproduto da indústria sucroalcooleira e é utilizada como fertilizante no campo (Andrade; Diniz, 2007) e pode resultar em impactos ao ambiente. Esse material é considerado um dos agentes poluidores de maior agressividade, visto que apresenta elevada DBO, pH ácido e alto potencial de corrosividade (Lima *et al.*, 2016). Os efeitos adversos causados pela ação de agentes químicos sobre os seres vivos são avaliados por meio dos testes de ecotoxicidade, que avaliam estes prejuízos sobre organismos-teste ou espécies não alvo da substância em análise (Cardoso; Alves, 2013). Na avaliação do potencial tóxico de agrotóxicos, diferentes ensaios podem ser realizados,

*Corresponding author: Paulo Renato Matos Lopes

College of Technology and Agricultural Science - São Paulo State University (UNESP), campus of Dracena, Brazil

empregando organismos bioindicadores, que em função de suas características, são capazes de responder a essa exposição, por meio da detecção de alterações fisiológicas, morfológicas e/ou comportamentais (Magalhães; Ferrão Filho, 2008). Dentre os organismos bioindicadores, destaca-se, a utilização de sementes para a avaliação de solos com potencial de contaminação, sendo essa uma técnica menos onerosa e de custo baixo (Al-Mutairi *et al.*, 2008). Com base nisso, diversos estudos vêm utilizando sementes na avaliação ecotoxicológica do processo de tratamento de ambientes potencialmente contaminados para diferentes compostos: óleos lubrificantes automotivos (Lopes *et al.*, 2010), petróleo e derivados (Cruz *et al.*, 2014), espumas de incêndio (Montagnolli *et al.*, 2017), córregos urbanos contaminados por efluentes de origem domiciliar e industrial (Santos *et al.*, 2017), entre outros. Além disso, no monitoramento ambiental, o uso de sementes representa uma ferramenta de alto potencial, permitindo durante o processo de remediação, uma avaliação da resposta de ações de mitigação adotadas (Al-Mutairi *et al.*, 2008). O trabalho teve como objetivo avaliar a ecotoxicidade e as alterações na comunidade microbiana de solo cultivado com cana-de-açúcar por manejo convencional em análises temporais para diferentes associações de tebutiuron-vinhaça.

MATERIAL AND METHODS

Solo: O solo de cultivo convencional de cana-de-açúcar foi coletado em uma propriedade no município de Santa Mercedes-SP, cujas coordenadas geográficas são 21°21'50.2"S e 51°42'33.2"W. A coleta foi realizada de acordo a NBR 14283 (ABNT, 1999) a partir de cinco pontos aleatórios em uma extensão de aproximadamente 100 m². Antes da coleta foram removidos restos de palha de cana e outros detritos, sendo posteriormente coletadas amostras até 15 cm de profundidade com auxílio de uma pá. Em seguida, o solo foi transportado para a FCAT/Unesp – câmpus de Dracena, peneirado em malha de 2,0 mm e acondicionado em caixa plástica.

Herbicida tebutiuron e vinhaça: O herbicida tebutiuron foi adquirido em estabelecimento de produtos agrícolas pelo produto comercial Combine® 500SC - Dow AgroSciences Industrial Ltda. A vinhaça foi fornecida por uma usina sucroalcooleira da região de Dracena-SP. Foram coletados 4,0 L de vinhaça em frascos de vidro estéril, acondicionado a 4 °C até seu uso no experimento.

Delineamento experimental: O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 2x4, ligado à dose recomendada de tebutiuron pelo produto comercial Combine® 500SC para solo de textura arenosa, e ao volume de vinhaça geralmente utilizado na lavoura canavieira na região de Dracena-SP e determinado em função do potássio de acordo com Norma Técnica P4.231 (CETESB, 2015). Assim, foram utilizadas doses zero (H0) e 1,0x (H1) para o herbicida tebutiuron e quatro volumes de vinhaça: zero (V0,0), 0,5x (V0,5), 1,0x (V1,0) e 2,0x (V2,0). A composição das amostras de solo está apresentada na Tabela 1 e foi dividida em quatro grupos em função do volume de vinhaça adicionado (A, B, C e D).

Preparo das amostras de solo: Para cada tratamento, foram preparados 2.500 cm³ de solo adicionado de seus respectivos volumes de tebutiuron e vinhaça, conforme a Tabela 1. O

procedimento foi adaptado a partir da NBR 14.283 (ABNT, 1999).

Tabela 1. Delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x4, associado à dose de tebutiuron e aos volumes de vinhaça

Tratamentos	Vinhaça	Herbicida
A0	V0,0	H0
A1	V0,0	H1
B0	V0,5	H0
B1	V0,5	H1
C0	V1,0	H0
C1	V1,0	H1
D0	V2,0	H0
D1	V2,0	H1

Fonte: Próprio autor - dados de pesquisa, 2019

As amostras de solo dos tratamentos foram preparadas em caixas plásticas retangulares de 3,0 L com tampa. Primeiramente, preparou-se a mistura de cada tratamento em frascos Erlenmeyer com água deionizada, vinhaça e tebutiuron, adicionados nessa ordem, a fim de promover melhor homogeneização. Em seguida, a solução foi homogeneizada manualmente em movimentos circulares por um minuto foi transferida para a caixa plástica e, sobre a mistura, 2,0 dm³ de solo (2.800 g) foi depositado, criando uma camada de cerca de 6 cm dentro da caixa. Esse processo promoveu distribuição da solução de água, vinhaça e herbicida por capilaridade. Após 48 h de repouso em temperatura ambiente, o solo foi revolvido manualmente, a fim de assegurar a total homogeneidade da amostra para cada tratamento. É importante salientar que o volume necessário para que o solo apresentasse de 60 a 70% de sua capacidade de campo foi calculado e corrigido pela adição de água respectiva a cada tratamento (Tabela 1). Por fim, as caixas plásticas foram mantidas fechadas em câmara de germinação tipo BOD a 28 ± 2 °C, durante todo o período do experimento, sendo abertas semanalmente por 60 minutos para renovação da atmosfera no interior do recipiente.

Quantificação da comunidade bacteriana

Foi realizada a quantificação das bactérias presentes nas amostras de solo mediante formação de unidades formadoras de colônias (UFC). A contagem de UFC foi realizada nos tempos inicial (zero – t0) e final (51 dias – t51), diretamente em placa de Petri, de acordo com a microbiologia clássica. Assim, preparou-se uma diluição seriada decimal das amostras de cada tratamento, totalizando 16 ensaios para os oito tratamentos nos dois tempos de análise. A diluição seriada das amostras de solo foi realizada em solução salina estéril (0,9% m/v NaCl). A inoculação das foi realizada pela transferência de 1,0 mL do solubilizado nas diluições 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵ pelo método *Pour Plate*. Para o cultivo de bactérias, foram utilizadas placas de Petri em triplicata contendo meio PCA (*Plate Count Agar*). A incubação foi realizada a 35 ± 2 °C por 48 h. Transcorrido o período, foram contabilizadas as UFC bacterianas presentes nas placas.

Bioensaios de ecotoxicidade: Bioensaios de fitotoxicidade foram preparados a fim de monitorar o potencial ecotoxicológico de cada tratamento no decorrer do período de atenuação natural. Assim, a fitotoxicidade das amostras de solo nos tratamentos também foi determinada nos tempos inicial (t0) e final (t51). Como organismos-teste, foram empregadas sementes de alface (*Lactuca sativa*), segundo Sobrero e Ronco

(2004). A determinação do efeito fitotóxico de cada tratamento foi realizada em quadruplicata a partir do extrato aquoso (solubilizado) das amostras de solo. O método para a obtenção de extrato aquoso foi realizado de acordo com a NBR 10.006 (ABNT, 2004). Ele consiste na dissolução de 25 g da amostra de solo em 100 mL de água deionizada. Em seguida, a mistura foi agitada em baixa velocidade por 5 minutos, sendo os frascos cobertos com filme de PVC e deixados em repouso a temperatura ambiente durante sete dias. Posteriormente a decantação do material, foi realizada a coleta do sobrenadante denominado como extrato aquoso ou solubilizado de solo. Assim, os testes de ecotoxicidade foram preparados em placas de Petri com papel filtro, contendo 2,0 mL do solubilizado de solo de cada tratamento e 10 sementes do organismo-teste em análise, ou seja, a alfaca. Ensaio de controle positivo (CP) e controle negativo (CN) foram preparados utilizando ZnSO₄ 0,05 M e água deionizada, respectivamente, para testar a sensibilidade das sementes. Em seguida, as placas foram envolvidas com filme de PVC para evitar perda de umidade e incubadas a 20 ± 2 °C por 120 h ao abrigo da luz. Logo, foram determinados: a germinação das sementes, o alongamento da raiz e do hipocótilo (≥ 0,1 mm) e o índice de germinação (GI - *Germination Index*, fator de germinação de sementes e alongamento da raiz, relativos ao ensaio controle negativo - CN). Pela contagem de sementes germinadas, foi calculada a porcentagem de germinação relativa ao CN (%G), dada pela Equação 1 (Labouriau; Agudo, 1987):

$$\%G = \left(\frac{SGa}{SGc} \right) \times 100 \quad \dots\dots\dots[1]$$

em que,

SGa = número total de sementes germinadas na amostra,

SGc = número total de sementes germinadas no CN.

O desenvolvimento relativo da raiz em relação ao CN (%R) foi calculado conforme Equação 2 (Labouriau; Agudo, 1987):

$$\%R = \left(\frac{MRa}{MRc} \right) \times 100 \quad \dots\dots\dots[2]$$

em que,

MRa = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas na amostra,

MRc = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no CN.

O conjunto de medidas da raiz e do hipocótilo permitiu a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal, após 120 h, pela medição de seu comprimento. O índice de germinação (IG), que combina as medidas de germinação de sementes relativa ao CN (%G) e alongamento da raiz relativo ao CN (%R), foi utilizado para avaliar a toxicidade das amostras de solo em alfaca (Equação 3) (Labouriau; Agudo, 1987):

$$IG = \frac{(\%G) \times (\%R)}{100} \quad \dots\dots\dots[3]$$

Forma de análise dos resultados

Os dados experimentais foram analisados efetuando-se a análise de variância, teste de Tukey a 5,0% de probabilidade para a comparação de médias, utilizando o software Microcal Origin 8.0.

RESULTS E DISCUSSION

Caracterização do solo e da vinhaça: Nas Tabelas 2 e 3 estão apresentados os resultados analíticos do solo quanto à sua composição química e parâmetros físicos, respectivamente.

Tabela 2. Análise da composição química do solo

Parâmetro	Valor	Unidade
pH	5,4	-
Matéria orgânica	11	g L ⁻¹
Fósforo	14	mg L ⁻¹
Potássio	1,4	mmolc L ⁻¹
Cálcio	15	mmolc L ⁻¹
Magnésio	10	mmolc L ⁻¹
Bário	0,29	mg L ⁻¹
Cobre	1	mg L ⁻¹
Ferro	13	mg L ⁻¹
Manganês	17,5	mg L ⁻¹
Zinco	0,8	mg L ⁻¹
Hidrogênio + Alumínio	11	mmolc L ⁻¹
Soma de bases	26,4	mmolc L ⁻¹
Capacidade de troca catiônica (CTC)	37,4	mmolc L ⁻¹
Saturação da CTC por bases (V%)	71	%

Fonte: Laboratório de Fertilidade do Solo da Unesp, câmpus de Ilha Solteira, 2019.

Tabela 3. Análise da composição física do solo

Parâmetro	Valor	Unidade
Areia fina	695	g kg ⁻¹
Areia grossa	172	g kg ⁻¹
Areia total	867	g kg ⁻¹
Argila (água) (água)	25	g kg ⁻¹
Argila (c/ disp) (c/ disp)	101	g kg ⁻¹
Silte	32	g kg ⁻¹
Floculação	75	%
Classe de textura	Arenosa	

Fonte: Laboratório de Fertilidade do Solo da Unesp, câmpus de Ilha Solteira, 2019

Os parâmetros relacionados à acidez dos solos e saturação por bases apresentam estreita correlação entre si, conforme a interpretação de índices por Raij *et al.* (1997). A cana de açúcar é uma cultura tolerante à acidez do solo, entretanto é recomendável que para melhores resultados da cultura, essa seja corrigida de forma que V% fique acima de 60% (Raij *et al.*, 1997). O solo em questão apresentou acidez média e V% alta (Tabela 2), indicando que a cultura foi conduzida em condições de boa fertilidade do solo. O teor de fósforo apresentado na Tabela 2 encontrava-se na faixa média próximo ao limite crítico inferior (Raij *et al.*, 1997). O baixo teor de potássio pode estar associado à sua alta demanda no cultivo da cana de açúcar (Caione *et al.*, 2011). Pela Tabela 2, tem-se que os teores de cálcio e magnésio estão dentro da faixa de alta disponibilidade (Raij *et al.*, 1997). Esses resultados evidenciam que a calagem realizada por ocasião do plantio estava adequada para a cultura. Da mesma forma, os teores dos micronutrientes cobre, ferro e manganês apresentaram-se altos, enquanto os teores de boro e zinco estavam dentro da faixa média (Raij *et al.*, 1997). A amostra foi classificada como Argissolo Vermelho Amarelo distrófico (Santos *et al.*, 2018). A determinação de seus parâmetros revelou umidade residual de 0,6 g de água em 100 g de solo, capacidade de campo de 18,0 g de água em 100 g de solo, densidade global de 1,7 g cm⁻³ e densidade aparente 1,4 g cm⁻³ (ABNT, 1999). Quanto à sua textura, a análise física revelou que a amostra consistia em 86,7% de areia, 10% de argila e 3,3% de silte, indicando que o solo é arenoso (Tabela 3).

Em outros estudos, o herbicida tebuthiuron apresentou baixa sorção, especialmente em solos arenosos, como é o caso do solo amostrado (Lourencetti *et al.*, 2012, Toniêto *et al.*, 2016). Essa informação sugere que o herbicida apresenta alta disponibilidade quando aplicado no solo coletado, o que eleva seu potencial de lixiviação (Pereira-Júnior *et al.*, 2015). Tais informações evidenciam a importância de estudos acerca do comportamento do herbicida tebuthiuron nesse tipo de solo.

Na análise da vinhaça, seus resultados revelaram um pH ácido (4,4), com elevada carga orgânica (matéria orgânica = 9,51 g L⁻¹ e carbono total = 5,28 g L⁻¹) e concentração de nutrientes (em g L⁻¹: potássio 1,42; nitrogênio total 0,56; enxofre 0,30; fósforo 0,28; cálcio 0,21; e magnésio 0,15). Neste sentido, destaca-se a concentração de nitrogênio, fósforo e, principalmente, potássio. Outros parâmetros avaliados foram os resíduos minerais solúvel e insolúvel, apresentando 3,76 e 0,19 g L⁻¹, respectivamente. Resultados semelhantes quanto à acidez e alta quantidade de potássio, também foram reveladas nos estudos recentes de Freitas *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2018).

Quantificação da comunidade bacteriana: Na Figura 1 está demonstrado o número de UFC bacterianas em cada tratamento no tempo inicial (t0) e após 51 dias de atenuação natural (t51).

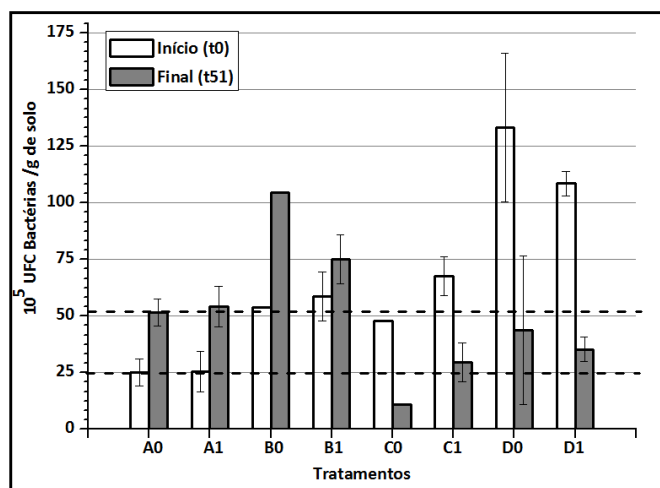


Figura 1. Quantificação da comunidade bacteriana em UFC para as amostras de solo no tempo inicial (t0) e após 51 dias de atenuação natural (t51). Composição (tebuthiuron-vinhaça) – A0 (H0-V0), A1 (H1-V0), B0 (H0-V0,5), B1 (H1-V0,5), C0 (H0-V1), C1 (H1-V1), D0 (H0-V2), e D1 (H1-V2)

Pela Figura 1, nota-se que no tempo inicial, em relação ao solo controle (A0), ocorreu um impacto positivo na comunidade bacteriana de modo geral, nos tratamentos adicionados de vinhaça (B0, B1, C0, C1, D0 e D1), sendo que os tratamentos que receberam a maior quantidade desse composto, ou seja, duas vezes o volume de vinhaça (D0 e D1) apresentaram maior incremento na população bacteriana. Em trabalho realizado por Evangelista *et al.* (2013), ao comparar os atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob sistemas orgânico e convencional de cultivo, observaram que os sistemas de cultivo conservacionistas tem uma tendência a melhora da qualidade do ambiente, favorecendo o desenvolvimento de microrganismos do solo, preservando e acumulando matéria orgânica, e dessa forma incrementando o fornecimento de nutrientes aos microrganismos. De acordo com os autores, a presença da matéria orgânica é então um

fator positivo de incremento para as comunidades microbianas do solo, como observado no presente artigo pela adição da vinhaça. As alterações positivas devido a presença de material orgânico também foram observadas por Sandén *et al.* (2019), cuja pesquisa relatou o tamanho e a diversidade da comunidade bacteriana, bem como diversos táxons discriminantes, foram afetados pela adubação com matéria orgânica. Em contrapartida, observa-se pela Figura 1 que não houve impacto evidente na população bacteriana entre os tratamentos com relação à dose de tebuthiuron quando comparada a presença do herbicida no mesmo tratamento. Este fato sugere que a adição de tebuthiuron não afetou a microbiota do solo no tempo inicial (t0). Resultados diferentes foram relatados por Aguayo *et al.* (2014), que observaram que a composição das comunidades bacterianas em solos de lagos foram afetadas pela presença de herbicidas. Os impactos dos herbicidas sob a comunidade microbiana também foram observados por Niewiadomska *et al.* (2018) que, ao avaliarem a influência de herbicidas pós-emergentes sobre a atividade microbiana do solo sob o plantio de milho, evidenciaram que houve redução significativa na contagem bacteriana total 30 dias após sua aplicação. Por outro lado, o histórico de aplicação de princípios ativos na cultura pode selecionar linhagens microbianas capazes de degradar essas moléculas. Neste sentido, altas concentrações de pesticidas tornam-se tóxicas aos organismos, mas em concentrações menores pode haver um estímulo ao crescimento bacteriano (Sankaralingam *et al.*, 2013). Logo, por se tratar de uma área com histórico de manejo convencional, a presença do tebuthiuron não interferiu negativamente na contagem de colônias bacterianas (Figura 1), o que foi evidenciado pela análise estatística apresentada pela Tabela 4.

Tabela 4. Análise de variância da quantificação da comunidade bacteriana por número de UFC por grama de solo para as amostras de solo no tempo inicial (t0) e após 51 dias de atenuação natural (t51). Composição (tebuthiuron-vinhaça) – A0 (H0-V0), A1 (H1-V0), B0 (H0-V0,5), B1 (H1-V0,5), C0 (H0-V1), C1 (H1-V1), D0 (H0-V2), e D1 (H1-V2)

Tratamentos	10 ⁵ *UFC bactérias / g solo			
	Tempo inicial (t0)		Tempo final (t51)	
A0	25,00 ± 6,00	Aa	51,50 ± 34,65	Aab
A1	25,33 ± 9,02	Aa	54,33 ± 7,09	Aab
B0	54,00 ± 0,00	Aab	104,67 ± 64,45	Ab
B1	58,67 ± 10,79	Aab	75,00 ± 19,80	Aab
C0	48,00 ± 0,00	Aab	11,00 ± 5,29	Aa
C1	67,67 ± 8,50	Ab	29,50 ± 0,71	Aab
D0	133,33 ± 32,88	Ac	43,67 ± 12,42	Bab
D1	108,50 ± 5,50	Ac	35,33 ± 24,58	Bab

*letras minúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na coluna, **letras maiúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na linha. (teste de Tukey a 5,0% de significância)

Fonte: Próprio autor - dados de pesquisa, 2019.

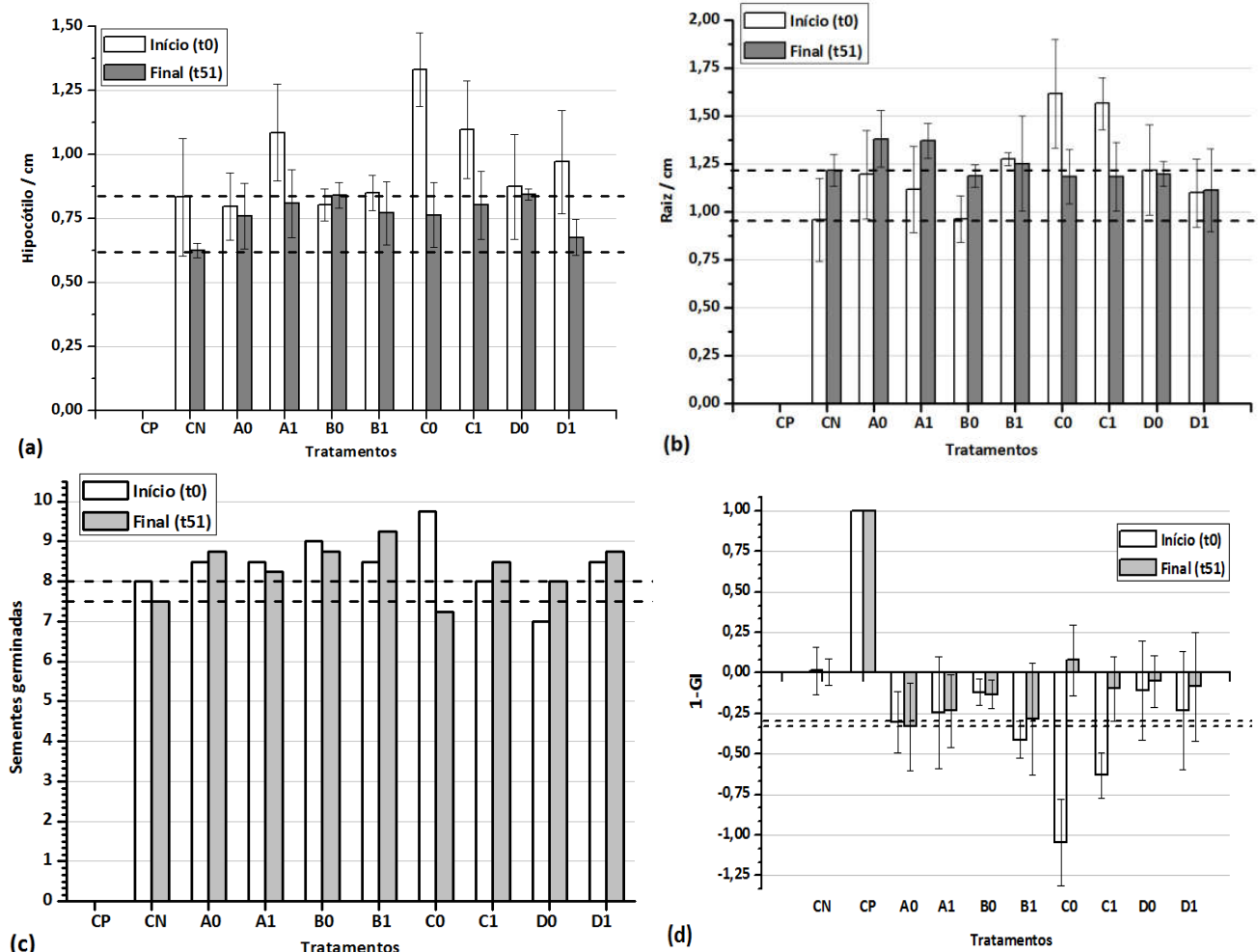
A Tabela 4 também revela o efeito significativo no maior número de UFC naqueles tratamentos com duas vezes a vinhaça (D0 e D1) em relação aos demais no tempo inicial (t0). Quando analisadas após 51 dias, apenas duas amostras de solo apresentaram-se diferentes estatisticamente: B0 e C0. Entretanto, embora a quantidade de UFC bacterianas tenha geralmente reduzido após os 51 dias de atenuação natural, os valores foram superiores em relação ao tratamento sem adição de vinhaça ou tebuthiuron no tempo inicial (A0-t0). Tal resultado sugere que o incremento inicial nos tratamentos que receberam vinhaça deu-se em função da quantidade de matéria orgânica adicionada ao solo através deste resíduo. Após o

tempo de atenuação, o excesso de matéria orgânica foi consumido pelos microrganismos, o que fez com que o número de UFC reduzisse novamente (Evangelista *et al.*, 2013; Sandén *et al.*, 2019). Ainda neste sentido, na comparação dos tratamentos antes e após a atenuação natural, somente D0 e D1 tiveram resultados estatisticamente diferentes, ressaltando que a presença da matéria orgânica oriunda da vinhaça favoreceu inicialmente a microbiota, porém, após ser totalmente metabolizada, houve um menor número de colônias de bactérias em t51.

Bioensaios de ecotoxicidade

Os resultados dos testes de fitotoxicidade do extrato aquoso das amostras nos tempos inicial (t0) e final (t51) estão representados abaixo de acordo com a germinação de sementes e o desenvolvimento das plântulas de alface (*Lactuca sativa*). Na Figura 2 estão demonstrados: (a) o alongamento do hipocótilo e (b) da raiz; (c) a germinação de sementes, e (d) o efeito fitotóxico das amostras de solo.

Figura 2a. Na Figura 2b, é possível observar que, para o controle negativo (CN) e para os tratamentos A0, A1 e B0, ocorreu um aumento no alongamento da raiz na comparação de tempo inicial (t0) e final (tf). Para os tratamentos B1, C0 e C1, houve uma diminuição no desenvolvimento da raiz, e em D0 e D1 não houve diferença pronunciada no tamanho da raiz para as plântulas de *L. sativa*. Pela Figura 2d, é possível evidenciar o efeito fitotóxico das amostras de solo pelo cálculo do índice de germinação. Nota-se que os resultados estão expressos em “1-GI”, ou seja, valores acima de zero indicam prejuízos à germinação e ao desenvolvimento do organismo-teste, enquanto valores negativos representam benefícios a *L. sativa* nos bioensaios, visto que CN é o ensaio referência com valor zero. Neste sentido, os resultados revelaram que a maioria dos ensaios promoveram benefícios na germinação e no desenvolvimento da alface, mesmo o ensaio controle sem a adição de vinhaça e tebutiuron (A0). Para o tempo inicial, seu resultado foi -0,30 e após 51 dias de atenuação natural de -0,33, não representando diferença significativa entre as análises (Tabela 5).



Fonte: Próprio autor - dados de pesquisa, 2019.

Figura 2. (a) Alongamento do hipocótilo e (b) da raiz de plântulas, (c) germinação de sementes, e (d) valores de 1-GI (Índice de germinação) nos bioensaios de ecotoxicidade com *Lactuca sativa* para as amostras de solo no tempo inicial (t0) e após 51 dias de atenuação natural (t51). Composição (tebutiuron-vinhaça) – A0 (H0-V0), A1 (H1-V0), B0 (H0-V0,5), B1 (H1-V0,5), C0 (H0-V1), C1 (H1-V1), D0 (H0-V2), e D1 (H1-V2)

Os controles negativo (CN) e positivo (CP) revelaram a viabilidade das sementes de alface utilizadas, pois foram sensíveis à germinação com água e a não germinação com o agente inibidor (Figura 2c). Quanto ao hipocótilo, observou-se uma redução em seu tamanho após o período de atenuação natural para todos os tratamentos, como pode ser observado na

Na Tabela 5 está representada a análise estatística dos dados a partir análise de variância das médias dos valores de 1-GI dos tratamentos, além dos controles negativo (CN) e positivo (CP), pelo teste de Tukey a 5,0% de probabilidade. Em relação aos tratamentos sem vinhaça (A0 e A1), observou-se que A1 (com herbicida) não diferiu significativamente de A0 (sem

herbicida), sugerindo que a dose utilizada de herbicida não prejudica o desenvolvimento do organismo-teste. O mesmo ocorreu para os tratamentos com metade do volume de vinhaça (B0 e B1) assim como quando utilizado uma vez (C0 e C1) e duas vezes o volume desse resíduo orgânico (D0 e D1), sugerindo mais uma vez que a adição do herbicida tebutiuron não altera significativamente a toxicidade do meio.

Tabela 5. Análise de variância dos valores de 1-GI para *Lactuca sativa* nos bioensaios de ecotoxicidade com *Lactuca sativa* para as amostras de solo no tempo inicial (t0) e após 51 dias de atenuação natural (t51). Composição (tebutiuron-vinhaça) – A0 (H0-V0), A1 (H1-V0), B0 (H0-V0,5), B1 (H1-V0,5), C0 (H0-V1), C1 (H1-V1), D0 (H0-V2), e D1 (H1-V2)

Tratamentos	1-GI			
	Tempo inicial (t0)		Tempo final (t51)	
CN	0,01 ± 0,17	Ac	0,01 ± 0,08	Aa
CP	1,00 ± 0,00	Ad	1,00 ± 0,00	Ab
A0	-0,30 ± 0,20	Abc	-0,33 ± 0,27	Aa
A1	-0,25 ± 0,36	Abc	-0,24 ± 0,22	Aa
B0	-0,12 ± 0,25	Abc	-0,13 ± 0,25	Aa
B1	-0,41 ± 0,12	Abc	-0,28 ± 0,34	Aa
C0	-1,04 ± 0,28	Aa	0,08 ± 0,22	Ba
C1	-0,63 ± 0,15	Aab	-0,10 ± 0,20	Aa
D0	-0,11 ± 0,46	Abc	-0,05 ± 0,16	Aa
D1	-0,23 ± 0,15	Abc	-0,08 ± 0,34	Aa

*letras minúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na coluna, **letras maiúsculas representam diferença significativa das médias entre os tratamentos na linha. (teste de Tukey a 5,0% de significância)

Fonte: Próprio autor - dados de pesquisa, 2019.

Analisando os tratamentos que não receberam tebutiuron (A0, B0, C0 e D0), observa-se que C0 (H0-V1) diferiu significativamente dos demais, sendo que a adição de 1,0x vinhaça ao solo representou o maior favorecimento para o organismo-teste no tempo inicial. Porém, os resultados no tempo final (t51) demonstraram que não houve diferença significativa nos valores de 1-GI na comparação entre os oito tratamentos (Tabela 5). Ao comparar os oito tratamentos, somente C0 apresentou diferença significativa entre o tempo inicial e final, sugerindo que uma dose de vinhaça na ausência do herbicida tebutiuron (H0-V1) inicialmente favoreceu o desenvolvimento do organismo-teste, mas ao final da atenuação natural, foi a única amostra de solo que ocasionou prejuízo em relação ao controle negativo. Nos tratamentos B1, C1, D0 e D1, houve uma queda no desenvolvimento das plantas entre t0 e t51, embora não significativa (Figura 2d, Tabela 5). Este fato pode estar relacionado a uma maior presença de nutrientes no início em função da adição da vinhaça, cuja concentração foi reduzindo no decorrer do tempo, tornando o desenvolvimento das plântulas menor. Diferentemente dos resultados apresentados (Figura 2 e Tabela 5), Macena et al. (2017) revelaram a inibição na germinação das sementes de *L. sativa* quando expostas à atrazina, confirmando o potencial ecotoxicológico desse herbicida e a eficácia na utilização desse organismo-teste. Da mesma forma, Martins e Pereira (2018) também observaram efeito tóxico dos herbicidas picloram e 2,4-D com a utilização de sementes de alfaca como agente bioindicador. Neste sentido, estudos sobre degradação de compostos orgânicos não deve apenas direcionar para a redução da sua concentração, pois eles podem não ser totalmente mineralizados ou ser transformados em outras moléculas ainda mais tóxicas. Portanto, estudos mais detalhados e com acompanhamento em longo prazo são necessários na compreensão de seus processos de contaminação, biodegradação e ecotoxicidade (Giacomazzi; Cochet, 2004).

Utilizando sementes de pepino em bioensaios com pesticidas, Faria et al. (2018) e Silva-Júnior et al. (2018) confirmaram a viabilidade e eficácia dos testes de ecotoxicidade avaliados pelo desenvolvimento vegetal. No entanto, o presente estudo não revelou efeito fitotóxico nas amostras de solo contendo uma dose de tebutiuron. Logo, acredita-se que o sistema de manejo convencional no preparo do solo e também o histórico de aplicação do herbicida na área amostral podem ter contribuído para uma maior fertilidade e também para um maior potencial de atenuação natural da molécula de tebutiuron, respectivamente. Logo, sugerem-se novos estudos utilizando outros organismos-teste não-alvo na avaliação ecotoxicológica e também na avaliação de diferentes concentrações de tebutiuron, modelos de cultura, estratégias de manejo agrônomo e tipos de solo.

Conclusion

Inicialmente, a presença vinhaça no solo aumentou o número de bactérias, principalmente quando utilizada em concentrações maiores. Entretanto, houve uma queda na quantidade de colônias bacterianas observada nos tratamentos com maior quantidade deste composto após 51 dias. A adição de vinhaça nos volumes de 150 m³ ha⁻¹ e 300 m³ ha⁻¹ favoreceu o desenvolvimento de sementes de alfaca no tempo inicial de análise. Por outro, após o período de atenuação natural, o benefício no desenvolvimento das plântulas foi menor. A dose de tebutiuron indicada pelo produto comercial não impactou negativamente a comunidade microbiana e nem o desenvolvimento das sementes de alfaca nos bioensaios de ecotoxicidade.

Acknowledgements

Os autores agradecem a PROPE/Unesp e ao Grupo de Ação em Impactos Ambientais - GAIA da FCAT/Unesp, câmpus de Dracena.

REFERENCES

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 1999. NBR 14283: Resíduos em solos - Determinação da biodegradação pelo método respirométrico. Rio de Janeiro: ABNT, pp 1-8.
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas 2004. NBR 10006: Procedimento para obtenção de extrato solubilizado de resíduos sólidos. Rio de Janeiro: ABNT, pp 1-7.
- Aguayo P, González C, Barra R, Becerra J, Martínez M. 2014. Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3):1101-1110.
- Al-Mutairi N, Bufarsan A, Al-Rukaibi F 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere*, 74(1):142-148.
- Andrade JMFD, Diniz KM 2007. Impactos ambientais da agroindústria da cana-de-açúcar: subsídios para a gestão. 2007. 131 f. Monografia (Especialização em Gerenciamento Ambiental) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- Caione G, Silva AF, Reis LL, Dalchiavon FC, Teixeira MTR, Santos PA 2011. Doses de potássio em cobertura na primeira soca da cultura da cana-de-açúcar cultivada no norte matogrossense. *Bioscience Journal*, 27(4):572-580.

- Cardoso EJBN, Alves PRL 2012. Soil ecotoxicology. In: Ghousia B (ed) Ecotoxicology. IntechOpen, 27-50.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo 2015. Norma Técnica P4.231: Vinhaça - Critérios e procedimentos para aplicação no solo agrícola. 3a edição, São Paulo: CETESB, pp. 1-15.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento 2018. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar. Safra 2018/19- Terceiro levantamento, 5(3):1-71.
- Cruz JM, Tamada IS, Lopes PRM, Montagnolli RN, Bidoia ED. 2014. Biodegradation and phytotoxicity of biodiesel, diesel, and petroleum in soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 225(5):1962.
- Evangelista CR, Partelli FL, Brito Ferreira EP, Pires FR. 2013. Atributos microbiológicos do solo na cultura da cana-de-açúcar sob manejo orgânico e convencional. *Semina: Ciências Agrárias*, 34(4):1549-1562.
- Faria AT, Souza MF, Jesus Passos ABR, Silva AA, Silva DV, Zanuncio JC, Rocha PRR. 2018. Tebuthiuron leaching in three Brazilian soils as affected by soil pH. *Environmental Earth Sciences*, 77(5):214.
- Freitas L, Oliveira IA, Silva LS, Frare JCV, Filla VA, Gomes RP 2017. Indicadores da qualidade química e física do solo sob diferentes sistemas de manejo. *Revista Unimar Ciências*, 26(1-2):8-25.
- Giacomazzi S, Cochet N. 2004. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*, 56(11):1021-1032.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2015. Levantamento sistemático da produção agrícola - Pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, 29(5):1-76.
- Kuva MA, Ferraudo AS, Pitelli RA, Alves PLCA, Salgado TP 2008. Padrões de infestação de comunidades de plantas daninhas no agroecossistema de cana-crua. *Planta Daninha*, 26(3):549-557.
- Labouriau LG, Agudo M. 1987. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. temperature effects. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 59: 37-56.
- Lima, FA, Santos-Júnior AC, Martins LC, Sarrouh B, Lofrano RCZ 2016. Revisão sobre a toxicidade e impactos ambientais relacionados à vinhaça, efluente da indústria sucroalcooleira. *Cadernos UniFOA*, 11(32):27-34.
- Lopes PRM, Montagnolli RN, Domingues RF, Bidoia ED 2010. Toxicity and biodegradation in sandy soil contaminated by lubricant oils. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 84(4):454-458.
- Lourencetti C, De Marchi MR, Ribeiro ML. 2012. Influence of sugar cane vinasse on the sorption and degradation of herbicides in soil under controlled conditions. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*, 47(10):949-958.
- Macena DA, Agostini EAT, Costa TT, Agostini RT 2018. Teste de fitotoxicidade do composto atrazina: bioensaio utilizando como organismo teste a *Lactuca sativa*. *Colloquium Vitae*, 9:7-13.
- Magalhães DDP, Ferrão Filho ADS 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecologia brasiliensis*, 12(3):355-581.
- MARTINS H, PEREIRA FDC 2018. Avaliação dos efeitos tóxicos do agroquímico Tordon® sobre os organismos teste *Lactuca sativa* e *Allium cepa*. *Visão Acadêmica*, 19(2):55-68.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento 2016. Plano Nacional de Agroenergia 2015-2016. 2a ed. revisada, Brasília: MAPA, pp 1-110.
- Montagnolli RN, Lopes PRM, Cruz JM, Claro EMT, Quiterio GM, Bidoia ED 2017. The effects of fluoride based fire-fighting foams on soil microbiota activity and plant growth during natural attenuation of perfluorinated compounds. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 50:119-127.
- Morillo E, Villaverde J 2017. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. *Science of the Total Environment*, 586:576-597.
- Niewiadomska A, Sulewska H, Wolna-Maruwka A, Waraczewska Z, Budka A, Ratajczak K 2018. An assessment of the influence of selected herbicides on the microbial parameters of soil in maize (*Zea mays*) cultivation. *Applied Ecology and Environmental Research*, 16(4):4735-4752.
- Pereira-Junior EV, Giori FG, Nascimento AL, Tornisielo VL, Regitano JB 2015. Effects of soil attributes and straw accumulation on the sorption of hexazinone and tebuthiuron in tropical soils cultivated with sugarcane. *Journal of Environmental Science and Health - Part B*, 50(4):238-246.
- Raj BV, Cantarella H, Quaggio JA, Furlani AMC 1997. Recomendações de adubação e calagem para o Estado de São Paulo. 2a Ed., Campinas: Instituto Agrônomo/Fundação IAC, pp 1-285.
- Sandén T, Zavattaro L, Spiegel H, Grignani C, Sandén H, Baumgarten A, Tirola M, Mikkonen A 2019. Out of sight: Profiling soil characteristics, nutrients and bacterial communities affected by organic amendments down to one meter in a long-term maize experiment. *Applied Soil Ecology*, 134:54-63.
- Sankaralingam S, Nithyanand P, Karuthapandiyan ST, Palavesam A, Ramasubburayan R, Immanuel G 2013. Identification and growth characterization of a novel 2, 4-D (dichlorophenoxyacetic acid) degrading bacterium *Maribacter* sp. Amsu isolated from aquaculture effluent. *Applied Ecology and Environmental Research*, 11(1):137-151.
- Santos AR, Sales ML, Campolino ML 2017. Sementes de *Lactuca sativa* (alface) como bioindicador da toxicidade da água dos córregos urbanos JK e Interlagos, região sudeste de Sete Lagoas - Minas Gerais. *Revista Brasileira de Ciências da Vida*, 5(1):1-14.
- Santos HG, Jacomine PKT, Anjos LHC, Oliveira VA, Lumberras JF, Coelho MR, Almeida JA, Araújo Filho JC, Oliveira JB, Cunha TJF 2018. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. 5 ed. rev. ampl., Brasília, 531 p.
- Silva-Júnior ACD, Gonçalves CG, Queiroz JRG, Martins D 2018. Evaluation of leaching potential of tebuthiuron using bioindicator plants. *Arquivos do Instituto Biológico*, 85:1-9.
- Silva MRM, Oliveira FA, Cavalcante LF, Luna Souto AG, Dias JA, Bezerra FTC 2018. Salinidade e composição catiônica do lixiviado de um solo salino-sódico tratado com vinhaça. *Revista Brasileira de Agricultura Irrigada - RBAI*, 12(5):2834-2844.
- Sobrero MC, Ronco A. 2004. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.). In: Morales GC (ed). Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas: standerización, intercalibración, resultados y aplicaciones. Mexico: IMTA, pp 71-79.
- Toniêto TAP, Pierri L, Tornisielo VL, Regitano JB. 2016. Fate of tebuthiuron and hexazinone in green-cane harvesting system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(20):3960-3966.