

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DE SINOP
Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais**

**INTERAÇÃO GLIFOSATO E FÓSFORO SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO NO
ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA PLANTADO COM SOJA TRANSGÊNICA**

ELAINE ARAÚJO PRIMON

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2014

**INTERAÇÃO GLIFOSATO E FÓSFORO SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO NO
ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA PLANTADO COM SOJA TRANSGÊNICA**

ELAINE ARAÚJO PRIMON

2014



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO CURSO DE MESTRADO EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS

DISCENTE:

Aos vinte e oito dias do mês de fevereiro do ano de 2014, às 14 horas, na sala de aula do Laboratório de Solos, do *campus* da UFMT na cidade de Sinop, foi realizada a sessão pública da defesa de dissertação do Curso de Mestrado em Ciências Ambientais da discente Elaine Araújo Primon. A banca foi composta pelos seguintes professores: Profa. orientadora Sayonara Andrade do Couto Moreno Arantes, Pesquisador Anderson Ferreira e Pesquisadora Marina Moura Morales, sob a presidência da primeira. O projeto de pesquisa teve como título "Interação glifosato e fósforo sobre a microbiota de um solo na Amazônia Meridional plantado com soja transgênica". Após explanação do projeto de pesquisa, a discente foi arguida pelos componentes da banca. Terminada a etapa, os membros avaliaram a discente e conferiram a mesma o seguinte resultado N1: 9,0 N2: 9,0 N3: 9,0 sendo o Conceito Final: A proclamado pelo presidente da sessão. Dados por encerrados os trabalhos, lavrou-se a presente Ata, que será assinada pela banca e pela discente. As recomendações da banca seguem em folha anexa.

Sinop, 28 de Fevereiro de 2014.

ASSINATURAS:

Discente: Elaine Primon

Banca: Sayonara Andrade do Couto Moreno Arantes
Marina Moura Morales
[Assinatura]

ELAINE ARAÚJO PRIMON

**INTERAÇÃO GLIFOSATO E FÓSFORO SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO NO
ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA PLANTADO COM SOJA TRANSGÊNICA**

Prof^a. Dr^a SAYONARA A. DO C. M. ARANTES

Prof^a. Dr^a Daniele Cristina Costa Sabino

Dissertação apresentada ao PPGCAM
como parte dos requisitos para
obtenção do título de mestre em
Ciências Ambientais

Sinop, Mato Grosso
Fevereiro, 2014

Ficha Catalográfica

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

A663i Araujo Primon, Elaine.
INTERAÇÃO GLIFOSATO E FÓSFORO SOBRE A MICROBIOTA DO SOLO
NO ECÓTONO CERRADO-AMAZÔNIA PLANTADO COM SOJA
TRANSGÊNICA / Elaine Araujo Primon. -- 2014
62 f. ; 30 cm.

Orientadora: Sayonara Andrade do Couto Moreno Arantes.

Co-orientadora: Daniele Cristina Costa Sabino.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Naturais, Humanas e Sociais, Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Sinop, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Adubação fosfatada. 2. microbiota do solo. 3. sal de isopropilamina. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

Sinópsse:

Estudou-se o efeito da interação glifosato x fósforo x dias após a aplicação sobre a microbiota de um Latossolo Vermelho Amarelo da Amazônia Meridional cultivado com soja transgênica. Aspectos envolvendo a população de fungos e bactérias bem como a atividade microbiana total do solo foram avaliados.

Palavras-chave:

Adubação fosfatada, microbiotado solo, sal de isopropilamina

Dedicatória

À Deus para glorificação do seu Santo nome na minha Vida, por mais uma etapa cumprida. Para sua honra e glória, SENHOR!

Aos meus grandes mentores: papai, **Moacir Araújo** (*in memoriam*) e mamãe **Ruthe Idalina da Silva Araújo**, que me ensinaram o que caminho que deveria seguir, sem nunca me desviar dele.

Ao meu filho **Otávio Miguel**,
minha maior motivação!

dedico.

Epígrafe:

“Por ventura sois todos apóstolos, ou profetas? São todos Mestres? Ou operadores de milagres? Entretanto, procurai com zelo, os melhores dons.”

(1Co12, 29-31)

Agradecimentos

A Deus por ter tido de mim misericórdia e me ajudado chegar até o final desta obra sem perder a graça, superando as dificuldades nos mais diversos campos envolvidos neste processo. “Até aqui me ajudou o Senhor” 1Sam. 7,12.

A minha família, e em especial à minha mãe e irmãos que em tudo me apoiaram. A todos os meus professores, a minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Sayonara A.do C. M. Arantes, por compreender minhas dificuldades, por me permitir crescer com meus erros e acertos. A minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Daniele C. C. Sabino pelo comprometimento com a nossa pesquisa e total apoio laboratorial e a Prof^ª. Dr^ª. Daniela T. da S. Campos pela atenção a mim dispensada durante as análises e o processamentos dos dados das atividades realizadas em Cuiabá - MT, e ainda a todos os colaboradores dos laboratórios de microbiologia do solo e de solos da UFMT dos *Campus* de Sinop e Cuiabá. Ao Prof. Dr. Rafael S. Arruda pelo grande apoio em estatística, a Prof^ª. Dr^ª. Solange M. Bonaldo pela coordenação acadêmica e administrativa, admiro sua postura profissional! Ao Prof. Dr. Marlinto Barreto pelo grande espírito de liderança à frente da coordenação do PPGCAM.

A minha querida amiga, doutoranda Karina Penha pelo apoio psicológico, pelas sugestões e pelas releituras deste trabalho, além do companheirismo durante minha trajetória no mestrado.

E ainda a todos os companheiros desta jornada, amigos mestrados das turmas do PPGCAM 2012 e 2013 com os quais convivi durante esses anos. Que as nossas trocas de experiências tenham acrescentado conhecimento à vida de cada um dos senhores (as) assim como acrescentou à minha.

À CAPES pela bolsa a mim concedida nesses anos de trabalho.

Ao laboratório de análises e solos e tecido vegetal Perfil Agroanálise de Sinop-MT e a seus colaboradores na pessoa do Eng.-Agr. Sr. Rogério Berticelli, ao laboratório AgroLab de Primavera do Leste- MT na pessoa da Eng.-Agr.Sr^ª.Tatiane C. Zambiasi, à AgroExtra de Sinop - na pessoa do Eng.-Agr. Sr.Cleyton Camargoe a Fundação Mato Grosso, na pessoa do Eng.-Agr. Sr. José Antônio da Costa pela confiança e pelo apoio na pesquisa bem como na divulgação dos resultados deste trabalho.

A todos que oraram e intercederam por mim junto a Deus para que fosse possível chegar ao término deste trabalho com grande êxito.

Muito Obrigada!

Resumo

O aumento do uso do herbicida glifosato devido às diversas aplicações do mesmo nas lavouras, bem como de adubações fosfatadas, podem modificar a microbiota dos solos. Assim, o objetivo do trabalho foi avaliar a interação do glifosato e do fósforo sobre a microbiota de um solo, sem histórico de uso de glifosato, plantado com soja transgênica (RR) em 4 datas de coletas distintas. Para isso foram realizadas contagens de unidades formadoras de colônias (ufc) de fungos e bactérias e determinado o carbono da biomassa microbiana (CBM), respiração basal (RB), quociente metabólico (qMet) e o quociente microbiano (qMic). O trabalho foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado, em esquema fatorial 4 x 2 x 4 correspondente a 4 concentrações de glifosato (0, 0,9, 45 e 90 kg ha⁻¹ de equivalente ácido de sal de isopropilamina), dois níveis de fósforo (270 e 540 kg ha⁻¹ de P₂O₅) e 4 datas de coleta do solo (0, 1, 10 e 40 dias após a aplicação dos tratamentos), com 4 repetições. Na interação tripla, a maior concentração de glifosato e de fósforo aos 40 dias reduziram significativamente o número de ufc bacteriana e aumentou CBM em 2,3 vezes, porém não se constatou diferença significativa na RB, no qMet ou no qMic para o mesmo tratamento. Houve redução significativa de ufc fúngica nas duplas interações com a maior concentração de glifosato. Nas condições experimentais, a maior concentração de glifosato em interação com nível duplicado de fósforo foi tóxica para bactérias e fungos cultivados, sem, contudo interferir negativamente na atividade microbiana do solo.

Palavras-chave: Microbiota do solo, adubação fosfatada, sal de isopropilamina.

Abstract

The increased use of glyphosate due to various applications in the same crops as well as phosphate fertilizer, can modify the soil microbiota. The objective of the study was to evaluate the interaction of glyphosate and phosphate on the microbiota of a soil with no history of glyphosate use, growing GM soy (RR) in 4 different sampling dates. For this purpose colony forming units (CFU) of fungi and bacteria were counted, in addition, microbial biomass carbon (MBC), basal respiration (BR), metabolic quotient (qCO₂), and microbial quotient (qMIC) were determined. The study was conducted in a completely randomized design in a 4 x 2 x 4 factorial scheme, 4 glyphosate concentrations (0, 0.9, 45, and 90 kg ha⁻¹ acid equivalent isopropylamine salt), 2 levels of phosphorus (270 and 540 kg ha⁻¹ P₂O₅), and 4 soil sampling dates (0, 1, 10, and 40 days after treatment application) with 4 replications. In the three-way interaction, at the highest concentration of glyphosate and phosphorus after 40 days, decreased by 7.8% the number of bacterial CFU and increased MBC by 2.3 times, but no significant differences were observed in BR, qCO₂ or qMIC for the same treatment. There was a significant reduction in fungal CFU in two-way interactions at the highest concentration of glyphosate. Under the experimental conditions, the highest concentration of glyphosate in duplicate interacting with phosphorus level was toxic to cultured bacteria and fungi, however, it did not interfere negatively on soil microbial activity.

Key-words: Soils microbes, phosphate fertilizer, isopropilamine salt

SUMÁRIO

RESUMO	x
ABSTRACT	x
INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	03
RESULTADOS	07
Unidades formadoras de colônias de bactérias.....	07
Unidades formadoras de colônias de fungos.....	11
Carbono da biomassa microbiana.....	13
Respiração basal.....	15
Quociente metabólico.....	15
Quociente microbiano.....	18
DISCUSSÃO	21
Unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos.....	21
Carbono da biomassa microbiana total do solo.....	24
Respiração basal.....	26
Quociente metabólico.....	28
Quociente microbiano.....	29
CONCLUSÕES	30
BIBLIOGRAFIA CITADA	32
LISTA DE FIGURAS	37
APÊNDICE A - Protocolo de diluição seriada e Spread-plate.....	38
APÊNDICE B - Protocolo Fumigação-Incubação.....	40
ANEXO A - Anova Respiração Basal	42
ANEXO B - Valores médios do quociente metabólico no desdobramento de dias após a aplicação dentro das concentrações de glifosato.....	42

ANEXO C - Probabilidade associada dos efeitos de concentrações crescentes de glifosato, níveis de fósforo e dias após a aplicação sobre o quociente microbiano do solo submetido a diferentes tratamentos.....42

ANEXO D - Valores médios do quociente microbiano (%) em interação tripla: glifosato x fósforo x dias após aplicação.....43

ANEXO E - Atributos bioquímicos e contagem de ufc bacteriana em função das diferentes concentrações de glifosato em dois níveis de fósforo aos 40 dias após aplicação.....43

ANEXO F - Normas da revista Acta Amazônica na qual este artigo único está configurado. Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/aa/pinstruc.htm>.....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análises químicas e físicas do Latossolo Vermelho Amarelo.....4

Tabela 2 - Anova ufc de bactérias e fungos.....7

Tabela 3 - Valores médios de ufc bacteriana no desdobramento de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação e níveis de fósforo e de níveis de fósforo dentro de dias após aplicação e concentrações de glifosato.....11

Tabela 4 - Valores médios de ufc fúngica na dupla interação entre glifosato e dias após aplicação. Desdobramento de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação e de dias após aplicação dentro de concentrações de glifosato.....12

Tabela 5 - Valores médios de ufc fúngica no desdobramento de níveis de fósforo dentro de concentrações de glifosato e de concentrações de glifosato dentro de cada nível de fósforo..12

Tabela 6 - Anova Carbono da Biomassa Microbiana do solo.....13

Tabela 7 - Valores médios do carbono da biomassa microbiana total do solo ($\mu\text{C g}^{-1}$) no desdobramento de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação e níveis de fósforo.....15

Tabela 8- Valores médios do quociente metabólico ($\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g Cmic}^{-1} \text{dia}^{-1}$) no desdobramento de dias após aplicação dentro de níveis de fósforo.....16

1 INTRODUÇÃO

2 A Amazônia Mato-Grossense, localizada no ecótono Cerrado-Amazônia, tem sido
3 cenário de grandes mudanças no que concerne ao uso da terra. Com expressivo potencial
4 para produção de grãos em larga escala, a região que compreende o município de Sinop-
5 MT destaca-se por ser a última fronteira agrícola da Amazônia Legal, conforme IBGE
6 (2013).

7 Ocorre que a utilização de modelos pré-existentes, tal como sucessão de culturas,
8 não podem subsistir em tal região, haja vista a necessidade de se conhecer as
9 especificidades produtivas de cada paisagem para que a produção seja otimizada de forma
10 sustentável.

11 Assim, lançando mão da multidisciplinaridade das Ciências Ambientais, a
12 utilização de ferramentas geradas a partir de inovações científicas, tais como o uso de
13 organismos geneticamente modificados (OGM), bem como o emprego de tecnologias
14 sistemáticas de manejo de produção, tal como a integração lavoura-pecuária-floresta,
15 podem se tornar econômica e ambientalmente viáveis, uma vez que o conhecimento, o uso
16 e a conservação da biodiversidade são os aspectos centrais de tal ciência.

17 Sinop está inserida numa região cuja estimativa de participação na produção estadual
18 de soja é de 36,60% para safra 2014/15. A produção estadual para safra 2013/14 está
19 estimada em 25,6 milhões de t. em uma área 8.269.025 ha. Dessa, estima-se que 77% seja
20 destinada ao cultivo de soja geneticamente modificados (OGM) (APROSOJA, 2013).

21 Tal contexto prevê contínuas e novas entradas de glifosato no ambiente, e estudos
22 que possam prever a sua dinâmica no solo frente aos demais insumos, principalmente aos
23 fosfatos inorgânicos, tornam-se de grande relevância para obtenção de produções
24 ambiental e economicamente sustentáveis.

25 O glifosato quando aplicado sobre as plantas de soja, 90% de sua molécula pode
26 chegar de forma ativa ao solo (Prata, 2002) e estar disponível para transformações bióticas
27 e abióticas ou ainda ser transportada para outros compartimentos do ambiente (Arantes,
28 2007), comprometendo assim tanto a eficiência do herbicida quanto a segurança ambiental
29 dos ecossistemas e produções subsequentes.

30 Por se tratar de um herbicida organofosforado, anfótero, de alta solubilidade e de
31 comportamento zwitterionico, em condição ideal de pH para produção de soja, pKa 5,5,
32 50% da sua molécula deverá possuir 3 dissociações no grupo metilfosfônico (Amarante
33 Júnior e Santos, 2002). Tal fato propicia competição entre essa molécula e o fósforo
34 inorgânico proveniente de adubos fosfatado convencionais pelos sítios de sorção dos
35 coloides do solo (Prata et al., 2003).

36 O glifosato e o fósforo convencional possuem uma forte interação nos solos, uma
37 vez que a extensão das forças de ligação do glifosato é proporcional à capacidade do solo
38 em adsorver fosfato inorgânico (Prata et al., 2003). No entanto, estudos revelaram que os
39 óxidos de ferro e alumínio, preferencialmente, adsorvem íons fosfato à molécula do
40 glifosato, possivelmente pelo maior volume e pela sua menor afinidade com os sítios de
41 sorção (Gimsing e Borggaard, 2001).

42 Portanto, acredita-se que a condição duplicada de fósforo no solo, utilizado neste
43 experimento tenderá a deixar maior concentração da molécula do glifosato na solução do
44 solo e assim, acessível ao ataque microbiano, uma vez que a principal via de degradação
45 do glifosato no solo é mediada pelos microrganismos do solo (Forloni et al., 1998; Moreira
46 e Siqueira, 2006; Arunakumara et al., 2013).

47 A medição e o monitoramento de atributos biológicos do solo que permitam inferir
48 sobre a sua qualidade podem ser ferramentas aliadas dos produtores quanto ao seu manejo,
49 pois os microrganismos respondem rapidamente às alterações antrópicas no ecossistema

50 solo, sendo assim capazes de predizerem o estado ecológico do solo (Tótola e Chaer,
51 2002).

52 Não obstante, e embora vista com ressalvas, a contagem de microrganismos no solo
53 é de grande importância para que se possa inferir também sobre a sua fertilidade,
54 fornecendo subsídios para programas de conservação de áreas florestadas e ainda
55 recuperação de áreas degradadas.

56 Diante desses aspectos, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a interação do
57 herbicida glifosato e do fósforo sobre os microrganismos de um Latossolo Vermelho
58 Amarelo da Amazônia Meridional, sem histórico de uso de glifosato e plantado com soja
59 transgênica em diferentes datas de análise.

60

61 **2- MATERIAL E MÉTODOS**

62 O solo utilizado no experimento foi coletado em uma mata de transição entre os
63 biomas Cerrado-Amazônia nas proximidades da Universidade Federal de Mato Grosso
64 (UFMT), na cidade de Sinop-MT, nas seguintes coordenadas geográficas: 11°48'036''
65 latitude sul e 55°28'314'' longitude oeste. O clima predominante na região segundo
66 Köppen é Tropical chuvoso (Aw), com média pluviométrica anual de 2000 mm (Vianello,
67 1991). A predominância de chuvas se dá entre os meses de setembro e março e a de seca
68 entre os meses de junho a setembro. A temperatura máxima e mínima anual é de 33°C e
69 27°C, respectivamente, com altitude de 384 m (Pinto júnior et al., 2009). O experimento
70 foi conduzido em casa de vegetação, nas dependências da UFMT *Campus* de Sinop - MT.

71 O solo utilizado no experimento foi coletado na profundidade de 0 a 15 cm e
72 classificado como Latossolo Vermelho Amarelo, conforme o Sistema Brasileiro de
73 Classificação de Solos (EMBRAPA 2006). Do volume total, foi retirada uma amostra

74 composta para análises físicas (textura e densidade do solo), conforme Manual de Métodos
 75 de Análises de Solo (EMBRAPA, 1997) e químicas (macro e micronutrientes) descritas no
 76 Manual de Análises Químicas de Solos, Plantas e Fertilizantes (EMBRAPA, 2009). Os
 77 resultados são apresentados na Tabela 1.

78 **Tabela 1 - Análises químicas e físicas do Latossolo Vermelho Amarelo**

79	pH	pH	P	S	K	Ca	Mg	Al	H+Al	C	M.O
80	(CaCl ₂)	(H ₂ O)	---mg dm ⁻³ ---	-----cmol _(c) dm ⁻³ -----						(%)	g dm ⁻³
81	4,86	5,22	1,35	1,08	0,09	1,55	0,67	0,10	4,50	2,31	39,97
82	<hr/>										
83	Zn	Cu	Fe	Mn	B	Areia	Silte	Argila	Ds		
84	-----mg dm ⁻³ -----					-----g dm ⁻³ -----			g cm ⁻³		
85	0,37	0,29	80,4	1,63	0,14	374	146	480	1,2		

86 Ds- densidade do solo

87

88 O delineamento experimental foi inteiramente casualizado (DIC), em esquema
 89 fatorial 4 x 2 x 4 correspondente a quatro concentrações do glifosato (0; 0,9; 45 e 90 kg
 90 ha⁻¹ equivalente ácido do sal de isopropilamina), dois níveis de fósforo, o recomendado e
 91 o duplicado (270 e 540 kg ha⁻¹ de P₂O₅); e 4 datas de coleta (0, 1, 10 e 40 dias após a
 92 aplicação do herbicida e do fósforo). A data de coleta 0 foi realizada após 4 horas da
 93 aplicação. Constituído por 4 repetições, o experimento totalizou 128 unidades amostrais,
 94 sendo amostrados 32 vasos para cada data de coleta. As concentrações crescentes de
 95 glifosato testadas correspondem a 0, 1, 50 e 100 vezes a dose do produto comercial
 96 Roundup Original[®] por hectare, sendo a dose recomendada equivalente a 2,5 L ha⁻¹ do
 97 produto comercial.

98 Antes do início do experimento o solo foi corrigido com calcário Filler (PRNT
 99 99%), a fim de elevar a sua saturação de bases para 60%. Após três meses da calagem, 3,5
 100 kg do solo corrigido foi transferido para os vasos e adubado com fosfato monoamônico
 101 (MAP 41% P₂O₅), nas doses de 0,50g (recomendada) e 1,00 g (duplicada) e com cloreto de
 102 potássio (60% K₂O) na dose de 0,45 g. Em seguida foram aplicadas, com o auxílio de um
 103 borrifador, as diferentes concentrações de glifosato diretamente ao solo de cada vaso e

104 homogeneizados. O produto comercial utilizado foi Roundup original[®], o qual contem 360
105 g L⁻¹ equivalente ácido de sal de isopropilamina.

106 Após a adubação do solo e aplicação do glifosato foram semeadas em cada vaso, 5
107 sementes da cultivar de soja transgênica TMG 132 RR, com germinação de 98%,
108 inoculadas com estirpe de *Bradyrhizobium* spp, segundo a recomendação do fabricante.

109 Os vasos foram mantidos em casa de vegetação até o término do experimento sob
110 irrigação por microaspersão controlada automaticamente, com lâmina d'água diária
111 programada para 5 mm ha⁻¹.

112 Para as análises microbiológicas as coletas de solo foram realizadas aos 0
113 (aproximadamente 4 horas após a aplicação dos tratamentos ao solo) 1, 10 e 40 dias após a
114 aplicação de glifosato, do fósforo e do plantio da soja, sendo amostrados 32 vasos para
115 cada data. Todo o solo de cada vaso, após a retirada da raiz da planta, foi homogeneizado
116 sobre saco plástico descartável, e deste uma subamostra de 500 g foi colocada em um saco
117 plástico identificado e armazenada em geladeira a 4 °C.

118 **Contagens de Unidades Formadoras de Colônias (ufc)**

119 Foram realizadas quantificações de unidades formadoras de colônias (ufc) de
120 fungos e bactérias para as 128 amostras de solos armazenadas. O método utilizado foi
121 diluição seriada e plaqueamento do tipo *spread-plate* em meio de cultura seletivo
122 (Wollum, 1982). Os meios utilizados para o crescimento de bactérias e fungos foram Ágar
123 Nutriente do fabricante HIMEDIA[®] e Batata Dextrose Ágar (BDA) do fabricante
124 ACUMEDIA[®], respectivamente.

125 A extração dos microrganismos foi realizada pela diluição sucessiva de 1,00 g de
126 solo, em 9,0 ml de solução salina de NaCl a 0,85%, até diluição 10⁻⁶. Placas de 9,0 cm de
127 diâmetro foram inoculadas em triplicatas com 100 µL de cada diluição e incubadas a 28 ± 2
128 °C durante 24 h para bactérias e 48 h para fungos. Para bactérias utilizaram-se as placas

129 que apresentavam entre 30 e 300 colônias e para fungos entre 10 e 100 colônias (Moreira e
130 Siqueira, 2006). Para converter ufc em ufc mL⁻¹, multiplicou-se o valor de cada contagem
131 pelo fator de diluição e multiplicou-se por 10.

132

133 **Quantificação do carbono da biomassa microbiana total do solo (CBM), taxa de**
134 **respiração basal (RB), quociente metabólico (qMet) e quociente microbiano (qMic)**
135 **do solo**

136 O carbono da biomassa microbiana do solo foi determinado pelo método
137 fumigação-incubação adaptado de Jenkinson e Powlson (1976b). A umidade do solo foi
138 corrigida para 60% da capacidade de campo e em seguida, amostras de 100 g em
139 quadruplicata foram acondicionadas em béqueres de 50 mL. Essas amostras foram
140 subdivididas em duas replicatas de 23 g + 2 g e outra de 25 g, sendo 23 g fumigadas e 25g
141 não fumigadas. Os 2 g foram utilizados para reinoculação posterior a fumigação, a qual
142 teve duração de 7 dias. Para definir o melhor período de incubação do solo utilizado neste
143 trabalho, após a reinoculação, foi realizado um ajuste metodológico através de titulações
144 sucessivas aos 5, 7 e 10 dias da liberação de C-CO₂.

145 Após a titulação do NaOH, calculou-se a quantidade de C-CO₂ liberada das
146 amostras fumigadas e não fumigadas, conforme Alef e Nannipieri (1995).

147 O carbono da biomassa microbiana e a taxa de respiração basal do solo foram
148 calculados conforme Jenkinson (1988).

149 O quociente metabólico, qMet ou qCO₂, foi calculado de acordo com Anderson e
150 Domsch (1993) enquanto que, o quociente microbiano, qMic, calculou-se a partir da
151 metodologia determinada por Sparling (1992).

152

153

154 **Análise estatística**

155 Os resultados obtidos foram submetidos a análise de variância (ANOVA) e quando
 156 significativos ($p < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5%. O software
 157 usado foi o SISVAR 5.1. Para normalização, os dados de contagens de ufc foram
 158 transformados em log.

159

160 **RESULTADOS**

161 **Unidade Formadora de Colônia (ufc) de Bactérias**

162

163 **Tabela 2. Probabilidade associada dos efeitos de concentrações crescentes de glifosato, níveis de fósforo**
 164 **e dias após a aplicação sobre unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos**

Bactérias					
Variáveis	g.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Concentração glifosato	3	1.385	0.4616	18.32	< 0.001*
Dias após aplicação (D.A.A)	3	1.731	0.5771	22.91	< 0.001*
Níveis fósforo	1	0.680	0.6801	26.99	< 0.001*
Glifosato*D.A.A	9	5.159	0.5732	22.75	< 0.001*
Glifosato*Fósforo	3	0.904	0.3012	11.96	< 0.001*
D.A.A*Fósforo	3	1.464	0.488	19.37	< 0.001*
Glifosato*D.A.A*Fósforo	9	1.244	0.1382	5.48	< 0.001*
Resíduo	93	2.343	0.0252		
Fungos					
Variáveis	g.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Concentração glifosato	3	0.412	0.1372	1.33	0.27
Dias após aplicação (D.A.A)	3	1.352	0.4507	4.38	0.01*
Níveis fósforo	1	0.001	0.0007	0.01	0.94
Glifosato*D.A.A	9	2.337	0.2597	2.52	0.01*
Glifosato*Fósforo	3	0,825	0.2750	2.67	0.05*
D.A.A*Fósforo	3	0.571	0.1903	1.84	0.14
Glifosato*D.A.A*Fósforo	9	0.941	0.1046	1.02	0.43
Resíduo	93	9.580	0.1030		

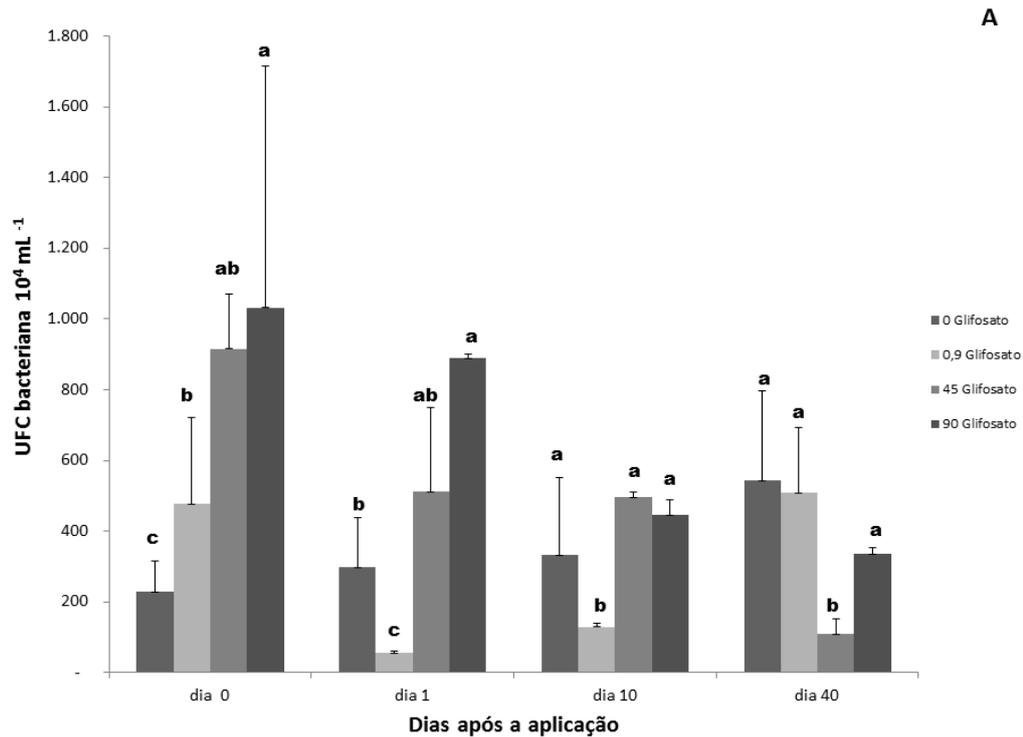
165 * Tratamentos significativos a 5% de probabilidade.

166 A diluição 10^{-4} foi a que melhor atendeu ao pré- requisito “quantidade de unidade
 167 formadora de colônia” para bactérias, conforme descritos por Moreira e Siqueira (2006),
 168 para os tratamentos testados. Na Tabela 2, observa-se que para bactéria, todos os
 169 tratamentos, bem como suas interações, foram significativos sobre a quantidade de ufc,

170 enquanto que para fungos, isoladamente, somente a variável dias após aplicação foi
171 significativa. O glifosato só foi significativo sobre ufc fúngica quando em interação dupla
172 com dias após aplicação.

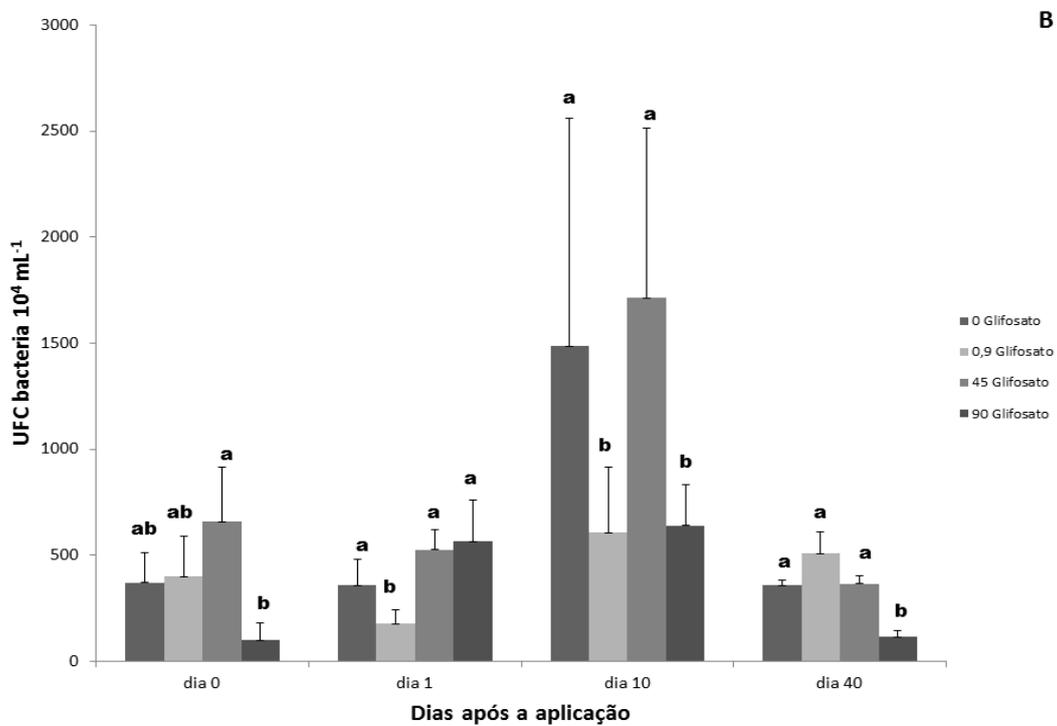
173 Na Figura 1(A) observa-se que a maior concentração de glifosato (90 kg ha^{-1} e. a.
174 de sal de isopropilamina) em interação com o nível recomendado de fósforo (270 kg ha^{-1}
175 P_2O_5) estimulou o número médio de ufc bacterianas em todas as datas avaliadas. No
176 entanto, observa-se na Tabela 3 que no decorrer dos dias essas ufc tenderam a diminuir, em
177 relação às primeiras 24h.

178 Na condição duplicada de fósforo, Figura 1 (B), constatou-se que a maior
179 concentração de glifosato aplicada ao solo teve efeito deletério sobre ufc bacteriana, exceto
180 no dia 1. Tal resultado corrobora com aqueles apresentados por Busse et al., 2001 ao
181 utilizar 500 mM de glifosato diretamente no meio de cultura como fonte de nutrientes e
182 energia para bactérias em 3 classes de solos da Califórnia.



183

184



185

186 **Figura 1.** Quantidade média (e desvio padrão) de ufc bacteriana no nível recomendado (A) e duplicado (B)
 187 de fósforo em interação com concentrações crescente de glifosato em kg ha⁻¹ de equivalente ácido de sal de
 188 isopropilamina, dentro dos dias após a aplicação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

189 Tal resultado sugere que uma concentração letal desse herbicida tenha ficado
190 disponível na solução do solo, uma vez que o alto teor de fósforo é capaz de dessorver o
191 glifosato (Prata et al, 2003; Da Cruz et al., 2002; Dion et al, 2001) para solução do solo, ou
192 ainda pela preferencia de sorção do fósforo em relação ao glifosato, ficando assim
193 disponível o herbicida para microbiota.

194 Gimsing & Borggaard (2001), relataram que a preferencia do fósforo ao glifosato
195 pelos coloides do solo está relacionada com a maior afinidade e o menor volume do íon
196 fosfato em relação ao radical metilfôsfônico da molécula do glifosato.

197 Constatou-se ainda uma tendência de aumento de ufc bacteriana aos 10 dias após a
198 aplicação do glifosato mesmo na condição duplicada de fósforo, o que reforça a capacidade
199 degradadora da microbiota, que nesta condição de fósforo, possivelmente tenha utilizado
200 em seu metabolismo o fósforo proveniente do glifosato.

201 Aos 40 dias, acredita-se que todo glifosato e parte do seu principal metabolito
202 AMPA (Acido aminometilfosfonico) tenham sido dissipados (Veiga et al., 2001) e
203 consequentemente o fósforo proveniente da molécula do glifosato, reduzindo assim, para
204 todas as doses testadas de glifosato nesta data de coleta, o número de ufc bacteriana.

205 Na Tabela 3 é possível observar que para a condição duplicada de fósforo,
206 constatou-se efeito adverso sobre ufc bacteriana no decorrer dos dias de avaliações frente
207 as diferentes concentrações de glifosato testadas.

208 A dose recomendada de glifosato, aos 1 e 10 dias após aplicação, na condição
209 duplicada de fósforo, aumentou significativamente ufc bacteriana. Para concentração de 45
210 kg ha⁻¹ esse efeito se estendeu até 40 dias após a aplicação, corroborando com Ernervika,

211 A. 2013, que detectou que a mineralização do glifosato aumentou com o aumento da sua
 212 concentração no solo.

213 No entanto, para a maior concentração testada de glifosato (90 kg ha⁻¹), a interação
 214 com a condição duplicada de fósforo teve efeito deletério sobre essas ufc, aos 40 dias após
 215 a aplicação dos tratamentos ao solo, semelhantemente ao comportamento constatado para a
 216 testemunha (0 kg ha⁻¹ de glifosato) Tabela 3.

Tabela 3. Valores médios de ufc bacteriana no desdobramento de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação e níveis de fósforo (letras minúscula) e de níveis de fósforo dentro de dias após aplicação e concentrações de glifosato

Dias após aplicação (D.A.A)	Concentrações de glifosato (kg ha ⁻¹ e.a sal de isopropilamina)							
	0		0,9		45		90	
	Fósforo (kg ha ⁻¹ P ₂ O ₅)							
	270	540	270	540	270	540	270	540
0	6,34 b A	6,54b A	6,64 a A	6,56b A	6,96 a A	6,79 b A	6,93 ab A	6,92 a A
1	6,42 ab A	6,54 b A	5,76 c B	6,23 c A	6,67 a A	6,72 b A	6,95 a A	6,73 a A
10	6,46 ab B	7,06 a A	6,11 b B	6,88 a A	6,70 a B	7,20 a A	6,64 bc A	6,79 a A
40	6,70 a A	6,56 b B	6,69 a A	6,70 ab A	6,02 b B	6,56 b A	6,53 c A	6,05 b B

217 Letras minúsculas comparam as médias na coluna e letras maiúsculas comparam as médias nas linha pelo teste de Tukey
 218 a 5%. Valores médios expressos em log x.

219

220 **Unidade Formadora de Colônia (ufc) de Fungos**

221 A diluição 10⁻³ foi a qual possibilitou a formação do número de colônias fúngicas
 222 entre 10 e 100 (Moreira e Siqueira, 2006).

223 Na Tabela 2 é possível observar que a variável dias após a aplicação, isolada ou em
 224 interação com a concentração de glifosato foi mais importante para o aumento da
 225 quantidade de ufc fúngica do que somente concentração de glifosato.

226

227

228

229

230

231 **Tabela 4. Valores médios de ufc fúngica na dupla interação entre glifosato e dias após aplicação.**
 232 **Desdobramento de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação (letra minúscula) e de dias**
 233 **após aplicação dentro de concentrações de glifosato (letras maiúsculas)**

Glifosato (kg ha ⁻¹ e.a sal de isopropilamina)	Dias após aplicação (D.A.A)			
	0	1	10	40
0	5,68 a A	5,23 a B	5,17 b B	5,01 a B
0,9	5,51 a A	5,30 a A	5,17 b A	5,32 a A
45	5,39 a AB	5,44 a AB	5,66 a A	5,12 a A
90	5,40 a A	5,50 a A	5,38 a A	5,36 a A

234 Letras minúsculas comparam as médias na coluna e letras maiúsculas comparam as médias nas linha pelo teste de Tukey
 235 a 5%. Valores médios expressos em log x.

236

237 Na Tabela 4 é possível observar que as diferentes concentrações de glifosato só
 238 foram significativas sobre ufc fúngica coleta de 10 dias após a aplicação, tendo as
 239 maiores concentrações, 45 e 90 kg ha⁻¹ de glifosato, incrementado respectivamente, em
 240 9,5% e 4,1% a quantidade de ufc fúngica em relação à testemunha (0 glifosato).

241 Ainda na Tabela 4 observa-se que a concentração de 45 kg ha⁻¹ de glifosato
 242 aumentou significativamente o número de ufc de fungos no decorrer dos dias e que as
 243 demais concentrações não interferiram sobre o número dessas ufc.

244

245 **Tabela 5. Valores médios de ufc fúngica no desdobramento de níveis de fósforo dentro de**
 246 **concentrações de glifosato (letras minúsculas) e de concentrações de glifosato dentro de cada nível de**
 247 **fósforo (letras maiúsculas)**

Níveis de Fósforo	Glifosato (kg ha ⁻¹ e.a sal de isopropilamina)			
	0	0,9	45	90
270	5,20 a B	5,33 a AB	5,34 a AB	5,54 a A
540	5,35 a A	5,32 a A	5,47 a A	5,29 b A

248 Letras minúsculas comparam as médias na coluna e letras maiúsculas comparam as médias na linha pelo teste de Tukey a
 249 5%. Valores médios expressos em log x.

250

251 No nível recomendado de fósforo constatou-se que a maior concentração de
 252 glifosato (90 kg ha⁻¹) incrementou em 6,5% o número de ufc fúngica em relação à
 253 testemunha (0 kg ha⁻¹ de glifosato). No entanto, para a mesma condição de glifosato foi
 254 evidenciado efeito deletério do mesmo quando em interação com a condição duplicada de
 255 fósforo. (Tabela 5).

256 **Carbono da biomassa microbiana**

257 **Tabela 6. Probabilidade associada dos efeitos de concentrações crescentes de glifosato, níveis de**
 258 **fósforo e dias após a aplicação sobre do carbono da biomassa microbiana total do solo.**

Variáveis	g.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Glifosato	3	66437,6	22145,9	5,943	< 0.001*
Dias após aplicação (D.A.A)	3	9250,1	3083,4	0,827	0,48
Níveis fósforo	1	27774,3	27774,3	7,453	< 0.01*
Glifosato*D.A.A	9	149327,7	16591,9	4,453	< 0.001*
Glifosato*Fósforo	3	22441,6	7480,5	2,007	0,11
Época*Fósforo	3	32389,4	10796,5	2,897	0,04
Glifosato*D.A.A*Fósforo	9	198882,4	22098,0	5,930	< 0.001*
Resíduo	96	357732,1	3726,4		

259 * Tratamentos significativos a 5% de probabilidade.

260 Embora dias após a aplicação isoladamente não tenha sido significativa sobre
 261 CBM, a interação tripla entre os tratamentos foram significativas (Tabela 6).

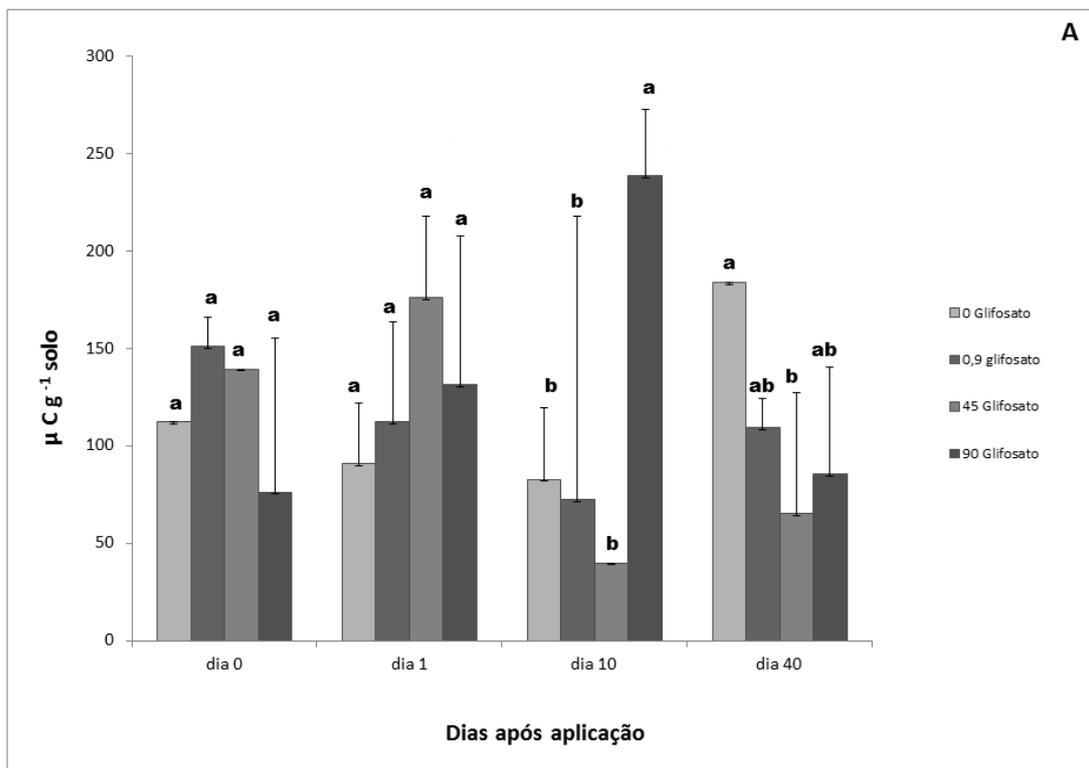
262 Na condição recomendada de fósforo, as concentrações de glifosato só foram
 263 significativas sobre o CBM aos 10 dias após a aplicação, tendo a maior concentração do
 264 herbicida aumentado o carbono da biomassa microbiana no solo (Figura 2 A).

265 Com a dose duplicada de fósforo, a maior concentração de glifosato tendeu a
 266 aumentar CBM em relação à testemunha (0 kg e.a ha⁻¹) em todas as datas avaliadas, sendo
 267 constatada diferença significativa nos dias 0 e 40 após a aplicação. (Figura 2 B)

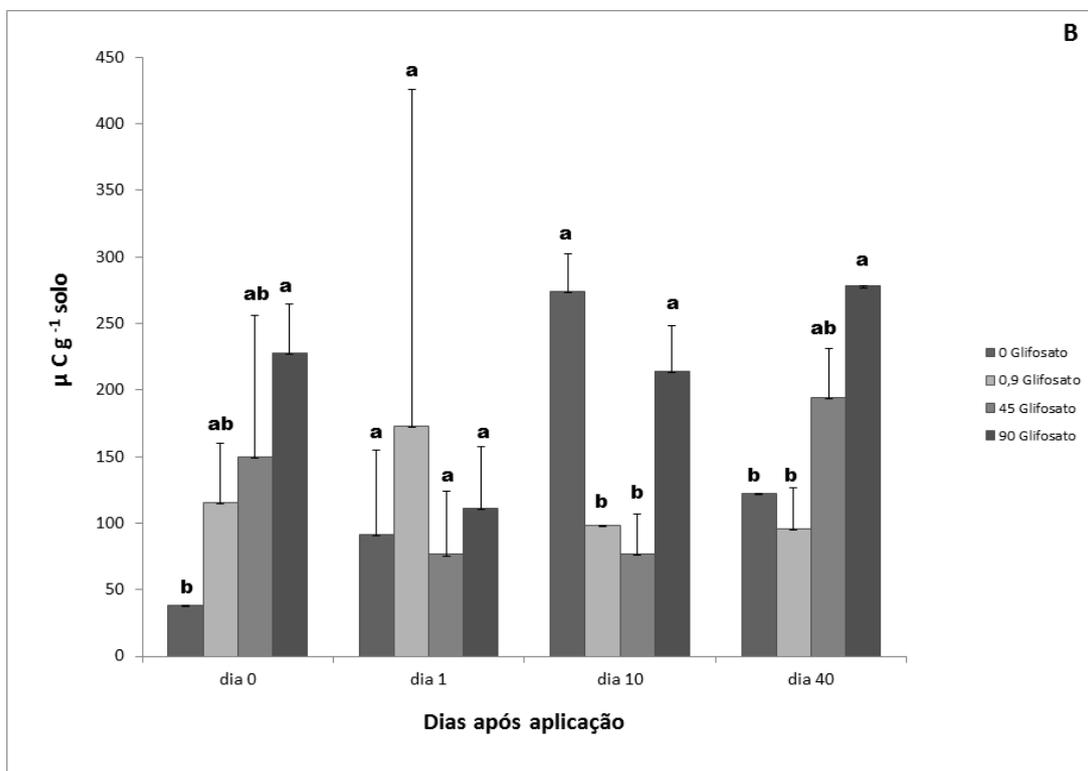
268

269

270



271



272

273

274

275

276

Figura 2. Carbono da biomassa microbiana total do solo (média e desvio padrão) no nível recomendado (A) e duplicado (B) de fósforo em interação com concentrações crescentes de glifosato dentro dos dias após a aplicação. Letras iguais não diferentemente si pelo teste de Tukey a 5%.

277 **Tabela 7. Valores médios do carbono da biomassa microbiana total do solo ($\mu\text{C g}^{-1}$) no desdobramento**
 278 **de concentrações de glifosato dentro de dias após aplicação e níveis de fósforo**

Dias após incubação (D.A.I)	glifosato (kg ha^{-1} e. a. sal de isopropilamina)							
	0		0,9		45		90	
	Fósforo ($\text{kg ha}^{-1}\text{P}_2\text{O}_5$)							
	270	540	270	540	270	540	270	540
0	112 aA	38 b A	151 a A	115 a A	139 ab A	150 ab A	76 b B	227a A
1	91 a A	91b A	112a A	173 a A	176 a A	76 b B	131ab A	111 b A
10	83 a B	274 a A	72 a A	99 a A	40 b A	77 b A	239 a A	214 ab A
40	184 a A	122b A	109a A	96 a A	65 ab B	194 a A	85 b B	278 a A

279 Letras minúsculas comparam as médias na coluna e letras maiúsculas comparam as médias na linha pelo teste de Tukey a 5%.

280 Na Tabela 7 observa-se que os diferentes níveis de fósforo foram significativos
 281 sobre CBM aos 0 e 40 dias após a aplicação para a concentração de 90 kg e.a sal de
 282 isopropilamina ha^{-1} e aos 40 dias para a concentração de 45 kg e.a sal de isopropilamina
 283 ha^{-1} , enquanto que na ausência de glifosato os níveis de fósforo foram significativos aos 10
 284 dias após a aplicação, tendo a condição duplicada aumentado CBM.

285 Aos 40 dias para as concentrações de 45 e 90 kg, a condição duplicada de fósforo
 286 proporcionou, respectivamente, aumento de 3,0 e 3,3 vezes o CBM. Ao 0 dia após a
 287 aplicação (aproximadamente 4h após a aplicação), na maior concentração de glifosato, a
 288 condição duplicada de fósforo aumentou em 3,0 vezes o CBM. (Tabela 7).

289

290 **Respiração Basal ($\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo)**

291 Não foi constatada diferença significativa na respiração basal total do solo para os
 292 tratamentos testados (Anexo A).

293 **Quociente metabólico ($\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g}^{-1} \text{ C-CBM dia}^{-1}$)**

294 Dentre as variáveis estudadas isoladamente, o nível de fósforo foi a mais
 295 importante para qMet (Anexo B), sendo que o glifosato e dias após a aplicação não foram
 296 significativas. No entanto, quando se interagiu glifosato com dias após a aplicação e níveis
 297 de fósforo com dias após a aplicação, constatou-se diferença significativa sobre o qMet.

298 Tal resultado demonstra a importância de se estudar as interações, pois isoladamente o
 299 glifosato não alterou qMet. A interação tripla não foi significativa (Anexo B).

300 **Tabela 8. Valores médios do quociente metabólico ($\mu\text{g CO}_2/\mu\text{g Cmic}^{-1}\text{dia}^{-1}$) no desdobramento de dias**
 301 **após aplicação dentro de níveis de fósforo**

Dias após Aplicação	Níveis de fósforo ($\text{kg ha}^{-1} \text{P}_2\text{O}_5$)	
	270	540
0	0,96 ab A	0,80 a A
1	0,83 a A	1,01 a A
10	1,66 b B	0,70 a A
40	1,13 ab A	0,74 a A

302 Letras minúsculas comparam médias na coluna e maiúsculas na linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de
 303 Tukey a 5%
 304

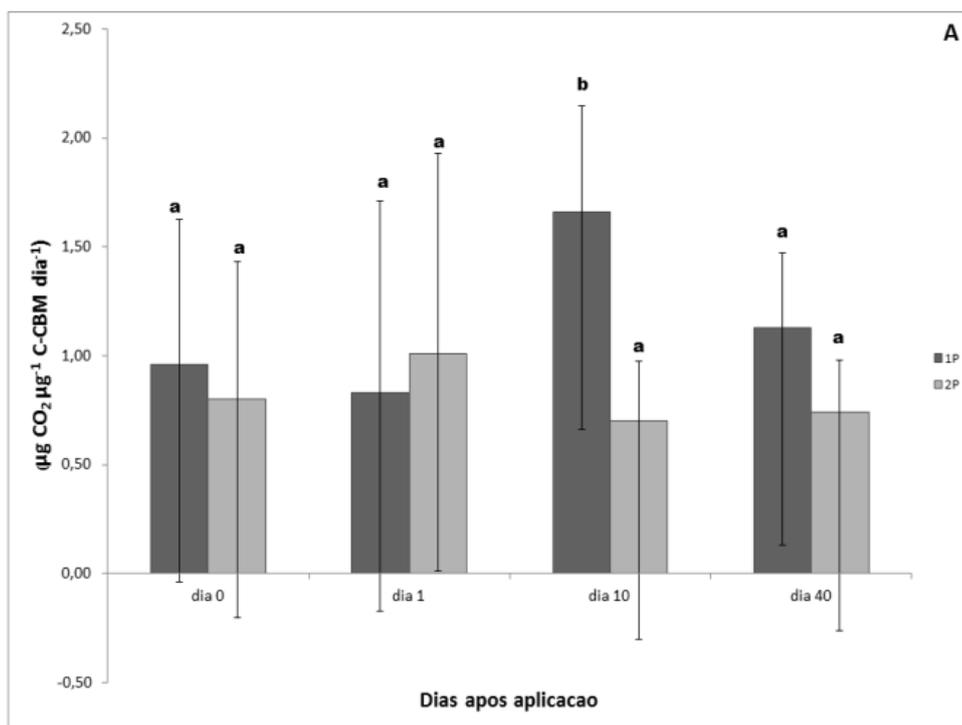
305 Na interação dupla entre dias após a aplicação e fósforo, o nível recomendado de
 306 fósforo no decorrer dos dias teve um efeito negativo sobre qMet, porém de curto prazo,
 307 pois somente aos 10 dias após a aplicação (Tabela 8). Para a condição duplicada de fósforo
 308 não se constatou diferença significativa com o decorrer dos dias de aplicação.

309 Ao se comparar o efeito entre os níveis de fósforo no decorrer dos dias (Tabela 8),
 310 constatou-se que o mesmo só foi significativo sobre qMet aos 10 dias, sendo a condição
 311 duplicada a que proporcionou maior eficiência microbiana em utilizar o substrato (Figura 3
 312 A).

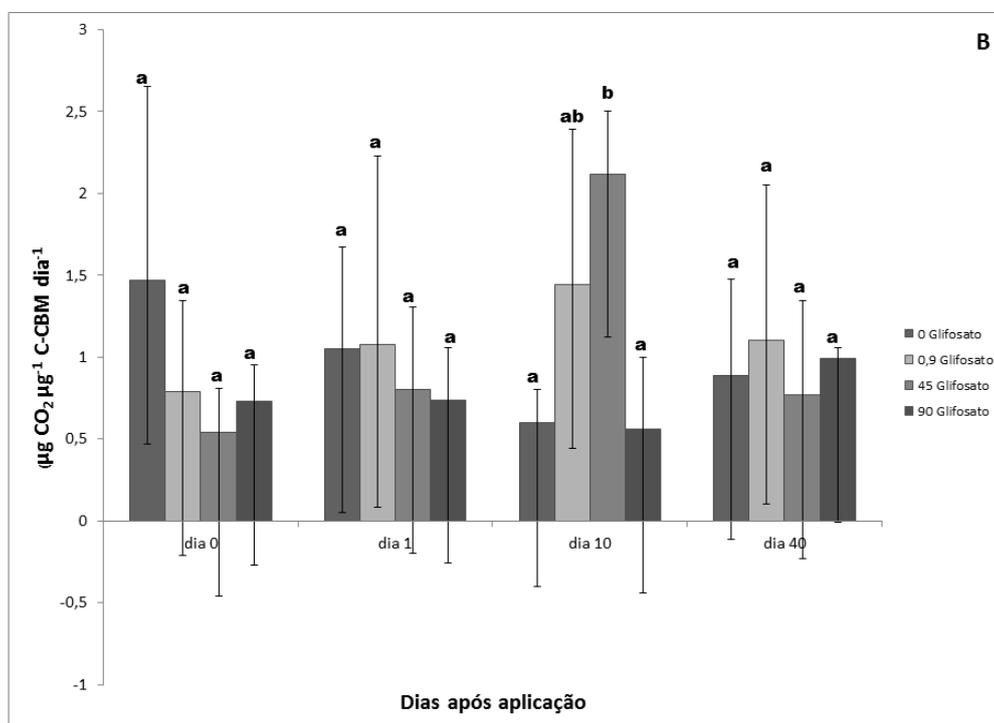
313 Na condição duplicada de fósforo constatou-se que a concentração de 45 kg ha^{-1} de
 314 glifosato reduziu significativamente a eficiência microbiana aos 10 dias após a aplicação
 315 (Figura 3 B). No entanto, tal redução pareceu passageira e de curto prazo, uma vez que no
 316 decorrer dos dias de avaliação, aos 40 dias após a aplicação, tal redução não foi constatada
 317 (Anexo B).

318

319



320
321
322



323
324
325
326

Figura 3. Quociente metabólico (média e desvio padrão) nos desdobramentos dos níveis de fósforo dentro dos dias após aplicação (A) e das concentrações de glifosato dentro dos dias após aplicação (B). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%

327 Constatou-se que no decorrer dos dias, a maior concentração de glifosato (90 kg ha⁻¹
328 e.a glifosato) reduziu de forma significativa a eficiência microbiana aos 40 dias após a
329 aplicação em relação ao demais dias de coleta (Anexo B)

330 **Quociente microbiano (%)**

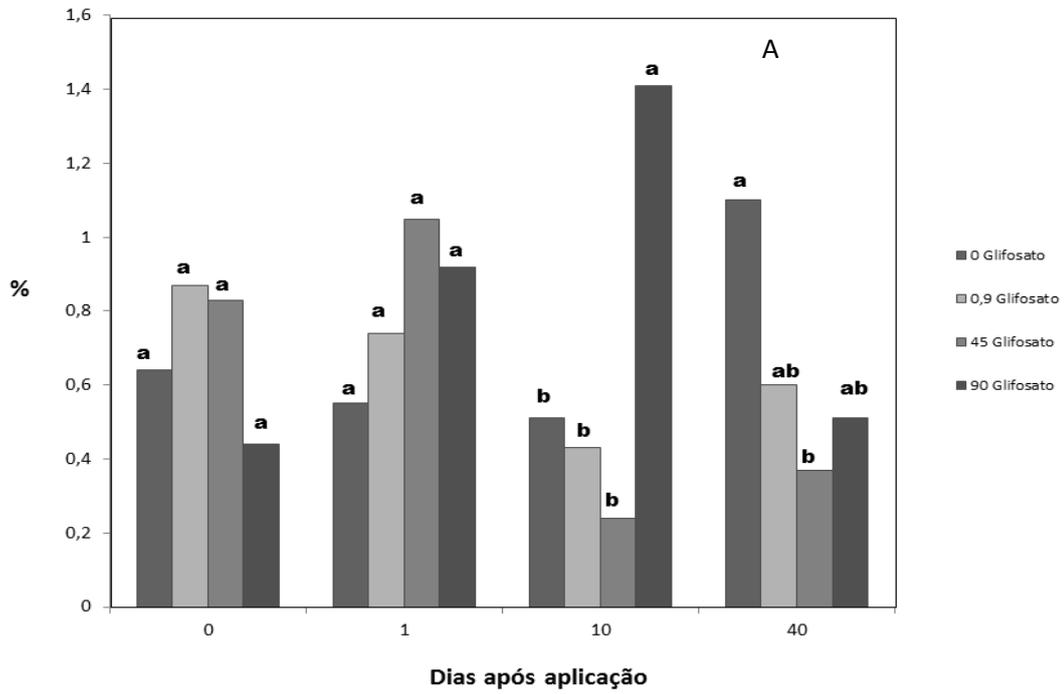
331 Para o quociente microbiano, isoladamente, tanto o glifosato quanto o nível de
332 fósforo foram significativos sobre a participação do carbono microbiano no carbono
333 orgânico total do solo, bem como a tripla interação entre as variáveis estudadas (Anexo C).

334 No nível recomendado de fósforo as diferentes concentrações de glifosato só foram
335 significativas sobre o qMic aos 10 e 40 dias após a aplicação dos tratamentos conforme
336 observa-se na Figura 4 A, sendo que, os 10 dias a maior concentração de glifosato
337 aumentou o quociente em 2,77 vezes (Anexo D) em relação à testemunha. Aos 40 dias, no
338 entanto, a concentração de 45 kg ha⁻¹ de glifosato reduziu de forma significativa o qMic em
339 relação à testemunha (Figura 4 A).

340 Na condição duplicada de fósforo, observa-se que as concentrações de 45 e 90 kg
341 ha⁻¹ e glifosato, foram significativas sobre o qMic aos 1 e 40 dias e aos 10 e 40 dias após a
342 aplicação, respectivamente (Figura 4 B). A maior concentração de glifosato aumentou
343 qMic em ambas as datas de coleta em 5,33 e 2,33 vezes aos 10 e 40 dias após a aplicação
344 respectivamente, enquanto que na mesma condição de fósforo, a concentração de 45 kg ha⁻¹
345 de glifosato, reduziu o qMic aos 1 e 10 após a aplicação (Anexo D).

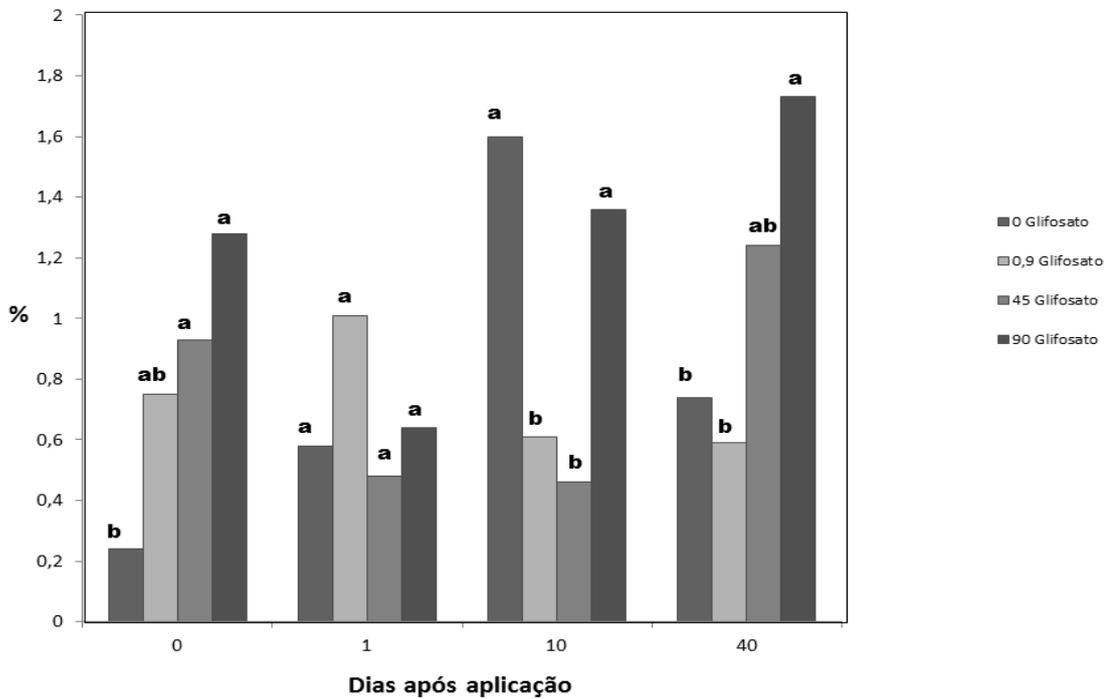
346

A



347

B

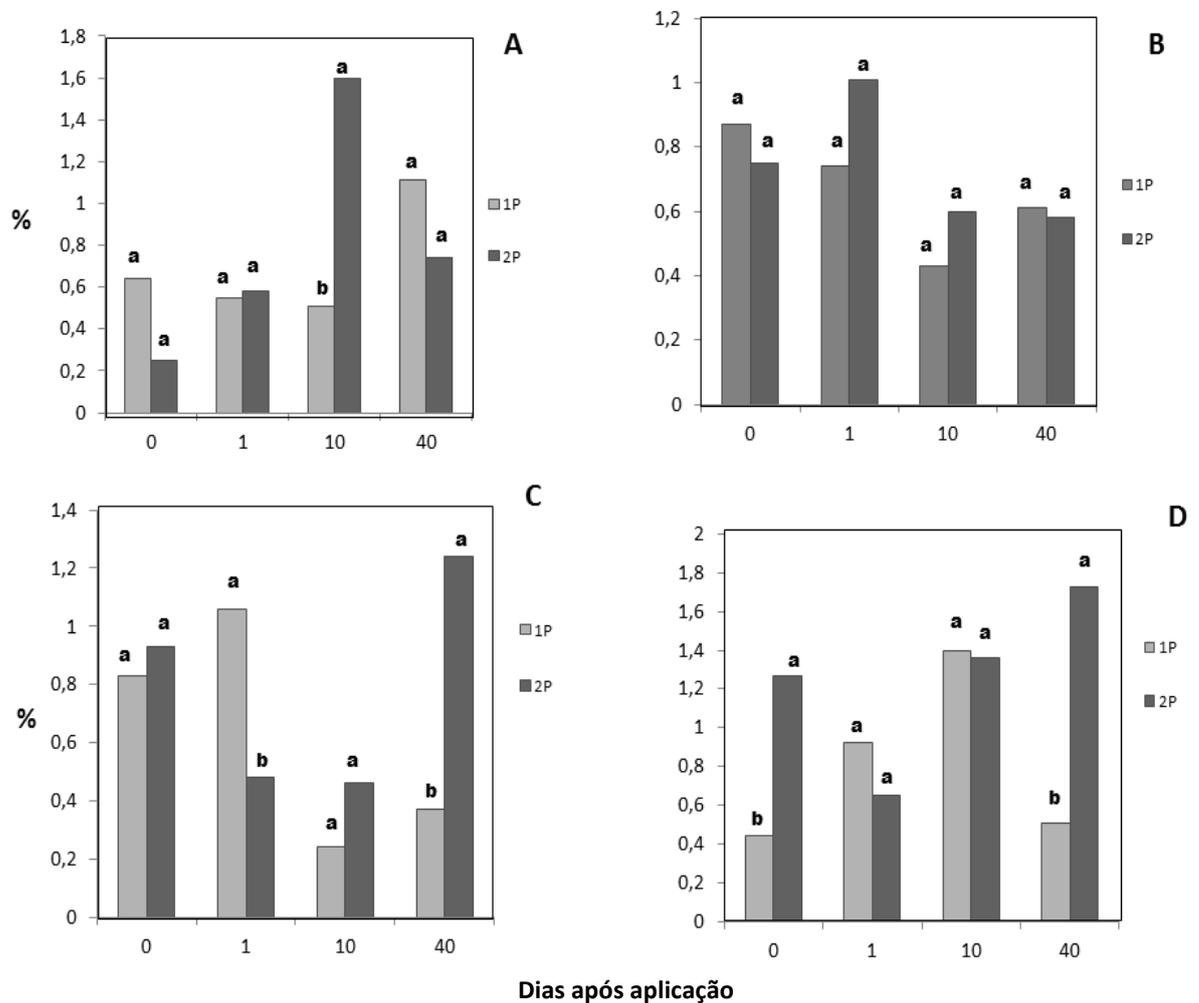


348
349
350
351
352

Figura 4. Quociente microbiano sob doses crescentes de glifosato no nível recomendado de fósforo (A) e duplicado (B) dentro dos dias após a aplicação. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%.

353 Na Figura 5 observa-se que os diferentes níveis de fósforos foram significativos
 354 somente para as concentrações de 45 e 90 kg ha⁻¹ de glifosato. Na concentração de 45 kg
 355 ha⁻¹ de glifosato, no dia 1 após a aplicação, a dose duplicada de fósforo reduziu qMIC
 356 enquanto que aos 40 dias após a aplicação a dose duplicada de fósforo aumentou qMIC
 357 (Figura 5 C). Observa-se ainda que para na concentração de 90 kg ha⁻¹ de glifosato (Figura
 358 5 D), aos 0 e 40 dias após a aplicação, a condição duplicada de fósforo favoreceu o qMIC.

359



360 **Figura 5.** Valor percentual do quociente microbiano (qMIC) sob doses crescentes de glifosato: (A) 0
 361 glifosato, (B) 0,9 kg ha⁻¹, (C) 45 kg ha⁻¹ e (D) 90 kg ha⁻¹ e.a. de sal de isopropilamina em interação com duas
 362 condições de fósforo (1P) 270 kg ha⁻¹ e (2P) 540 kg ha⁻¹ de P₂O₅ nas 4 datas de aplicação testadas (0, 1, 10 e
 363 40 dias). Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5%
 364
 365
 366
 367

368 **DISCUSSÃO**

369 **Unidades formadoras de colônias de bactérias e fungos**

370 A capacidade de degradar glifosato está difundida entre as bactérias do solo, e
371 muitas cepas de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Shigella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas*,
372 *Rhizobium*, *Agrobacterim*, *Bacillus* e *Anthrobacter* são capazes de crescer com fosfatos
373 como única fonte de fósforo, nitrogênio e carbono (Krzysko & Lupicka, 1997; Olawale et
374 al, 2011; Shushkova et al., 2012)

375 Fungos também foram encontrados degradando a molécula de glifosato (Mattos,
376 2002). Castro Júnior (2006) identificou cepas de *Fusarium* spp no solo eficientes em
377 degradar glifosato mesmo quando submetidas a uma alta concentração do herbicida (100
378 ppm), no decorrer de 5 dias.

379 A degradação do glifosato no solo, conforme Amarante e Santos (2002), pode
380 seguir duas vias principais: a primeira consiste na transformação do glifosato em sarcosina
381 por ação da bactéria *Agrobacterium radiobacter* ou da *Enterobacter aeroneges* (enzima
382 C-P liase); a segunda rota consiste na transformação do glifosato em ácido
383 aminometilfosfônico (AMPA) sob a ação da bactéria *Antrobacter atrocyneus* e
384 *Flavobacterium* sp e do próprio metabolismo da planta.

385 O aumento do número de ufc bacteriana (Figura 1) e fúngica (Tabela 4) no solo
386 deste estudo, no nível recomendado de fósforo, mesmo com a maior dose de glifosato
387 testada (100 vezes), em todas as datas de coleta justifica-se pela constituição da molécula
388 deste herbicida (Moreira e Siqueira, 2006) associada ao seu tempo de meia vida em
389 brasileiros (Araujo et al, 2003) a qual por sua vez é reflexo da sua velocidade de sorção ao
390 solo (Prata et al, 2000; Chen et al, 2007; Ermakova et al, 2010).

391 Abarkelli et al, 2003 verificaram para duas classes de solos do Brasil que a dose de
392 2,16 mg de glifosato kg^{-1} de solo foi suficiente para estimular o número de ufc de fungos e
393 de actinomicetos.

394 A redução de ufc bacteriana observada aos 40 dias na condição recomendada de
395 fósforo parece estar relacionada com outros fatores aqui não determinados, tais como a
396 presença de metabólitos deste herbicida ou até mesmo com a redução da disponibilidade
397 do fósforo proveniente de sua molécula.

398 Sabe-se que o fósforo é nutriente para os microrganismos do solo (Heinonem-
399 Tanski et al., 1985), atuando como fator de crescimento intrínseco, pois é utilizado na
400 síntese celular e no transporte de energia (Moreira e Siqueira, 2006). Através da clivagem
401 da ligação C-P, catalisada por C-P liases, os microrganismos são capazes de extrair o
402 fósforo da molécula do glifosato e de utilizá-lo (Hove-Jensen et al, 2014).

403 Conte et al. (2002), constataram um rápido acúmulo de fósforo na biomassa
404 microbiana, na camada de 0-10 cm de um Latossolo Vermelho distroférico típico,
405 cultivado com soja no sistema de plantio direto após adição de apenas 20 kg ha^{-1} de P_2O_5
406 com posterior diminuição.

407 Tais resultados ainda respaldam-se no que fora afirmado por Heander et al, 2012
408 que os efeitos do glifosato e de seu principal metabolito, AMPA, no solo, nos
409 microrganismos e sobre as interações biológicas podem ser complexas e multidirecional.

410 Já, na condição duplicada de fósforo após 40 dias de exposição desses
411 microrganismos à maior concentração de glifosato, o número dessas ufc reduziu
412 significativamente (Figura 2 e Tabelas 3), confirmando a capacidade da alta concentração
413 de fósforo no solo em manter a molécula de glifosato por mais tempo na solução do solo

414 (Prata et al, 2003), quer por dessorção (Gimsing and Borggaard, 2001; Dion et al., 2001),
415 quer pela preferencia do íon fosfato ao radical metilfôsfonico da molécula do glifosato
416 pelos coloides do solo (Gimsing & Borggaard, 2001).

417 Embora não tenha testado interações, Busse et al., 2001 constataram efeito deletério
418 do glifosato sobre bactérias e fungos quando adicionado diretamente ao meio de cultura
419 como fonte alternativa de nutrientes e de energia.

420 Ocorre que da decomposição de uma alta concentração de glifosato,
421 consequentemente, libera-se para a solução do solo uma alta concentração de seu principal
422 metabolito, AMPA, e o mesmo pode ter atuado de forma deletéria sobre os
423 microrganismos avaliados, já que sua decomposição está sujeita a uma gama menor de
424 microrganismos do solo.

425 Para Araújo et al., 2003, em 2 solos brasileiros, a concentração de AMPA
426 aumentou até 32 dias após a aplicação de 2,16 mg kg⁻¹ de glifosato. Galli et al., 2005
427 constatou tempo de meia vida do glifosato em 47 solos distintos de 32 dias.

428 O AMPA, acido metil fosfônico, é o principal metabolito da molécula do glifosato
429 proveniente da degradação microbiana, (Franz et al., 1997; Mattos et al., 2002; Barja e
430 Afonso, 2005) pela presença de enzimas de alta especificidade com organofosfarados, a C-
431 P liase.

432 Portanto, acredita-se que o efeito deletério constatado sobre as ufc de bactérias
433 (Figura 2) e fungos (Tabela 4) cultivados, extraídos das amostras de solo que receberam a
434 maior concentração do herbicida glifosato (90 kg ha⁻¹ e. a glifosato) e de fósforo (540 kg
435 ha⁻¹ P₂O₅), coletadas aos 40 dias após a aplicação dos tratamentos seja devido,

436 possivelmente, pela alta concentração de AMPA livre na solução do solo e não do
437 glifosato.

438 **Carbono da biomassa microbiana total do solo**

439 A biomassa microbiana do solo é definida como a fração viva da matéria orgânica
440 menor que $5-10 \mu\text{m}^3$ e geralmente é expressa em $\mu\text{g CO}_2 \text{ g}^{-1}$ solo seco (Jenkinson & Ladd,
441 1981). A sua estimativa é utilizada como bioindicador e propriedade ecológica do solo por
442 determinar o carbono microbiano por unidade de peso de solo (Andréa & Moreno Hollweg,
443 2004).

444 Partindo do princípio de que a biomassa microbiana do solo é um compartimento
445 regulado pela disponibilidade de substrato orgânico (Souza & Melo, 2000), o aumento
446 significativo do valor médio do CBM detectado na condição de maior concentração de
447 glifosato em interação com o nível recomendado de fósforo (Figura 2 A), confirma a
448 capacidade da microbiota heterotrófica em utilizar este herbicida.

449 Tal resultado corrobora com Haney et al 2002 que detectaram aumento do CBM em
450 9 solos distintos da Georgia e do Texas tratados com $234 \text{ mg i.a de glifosato kg}^{-1}$ solo.

451 O fato deste incremento no CBM ser significativo somente aos 10 dias após a
452 aplicação e somente com a maior dose de glifosato quando da condição recomendada de
453 fósforo no solo, sugere que este seja o período necessário para que o excesso de glifosato na
454 solução do solo seja incorporado ao solo em forma de carbono microbiano. (Figura 2 A).

455 Em solo sob plantio direto dessecado com $0,7 \text{ kg ha}^{-1}$ de glifosato, Zilli et al. (2007)
456 constataram aumento da CBM do solo após 4 dias da semeadura direta da soja. Tal
457 diferença no tempo de degradação do glifosato entre os estudos pode estar relacionada não
458 só com as doses do produto mas, principalmente, com o tempo de aclimação demandado
459 pelas populações microbianas dos diferentes solos, uma vez que a taxa e a frequência de

460 exposição desses micrororganismos ao químico em questão, interferem no tempo de
461 aclimatação dos mesmos (Douglas et al., 1991)

462 De acordo com Stenberg (1999), maior quantidade de carbono da biomassa
463 microbiana reflete a presença de maior quantidade de matéria orgânica ativa no solo, capaz
464 de manter elevada taxa de decomposição de restos vegetais e, portanto, de reciclar mais
465 nutrientes.

466 Aos 0 e 40 dias, na condição recomendada de fósforo constatou-se efeito negativo
467 do glifosato sobre CBM quando da maior concentração de 90 kg ha⁻¹ de seu equivalente
468 ácido aplicado ao solo. Tal fato parece estar relacionado com interações não avaliadas
469 neste estudo tal como soja x glifosato sobre a microbiota (Zilli et al., 2007), uma vez que
470 no decorrer dos dias, na ausência de glifosato e na mesma condição de fósforo não se
471 observou diferença significativa sobre CBM (Tabela 6).

472 Na condição duplicada de fósforo, a maior concentração de glifosato aos 10 e 40
473 dias proporcionou aumento significativo do CBM (Figura 2 B) e possivelmente esteja
474 relacionado com o tempo de disponibilidade e com a concentração remanescente na
475 solução do solo do herbicida para ação microbiana.

476 Tal fato é positivo do ponto de vista da ciclagem de nutrientes, imobilização e
477 estoque de carbono orgânico no sistema (Reis et al., 2009). Gama-Rodrigues et al. (2008)
478 corroboram tal fato no que tange não somente no papel da biomassa microbiana para fluxo
479 de C e N e ciclagem de nutrientes, mas também na associação da mesma com o potencial
480 de produtividade do solo.

481 O nível duplicado de fósforo pareceu ter efeito negativo, porém passageiro sobre
482 CBM somente quando em interação com a concentração de 45 kg ha⁻¹ de glifosato e ao 1
483 dia após a aplicação enquanto que, na ausência de glifosato a condição duplicada de
484 fósforo aumentou em 3,30 vezes o CBM aos 10 dias após a aplicação (Tabela 6).

485 Tal resultado está em conformidade com o número de ufc bacteriana para o
486 tratamento em questão (Figura 1B) o que sugere que pelo menos parte desses
487 microrganismos sejam bactérias capazes de crescer em meio cultivado.

488 **Respiração basal**

489 A atividade microbiana do solo tem sido frequente e eficientemente determinada
490 pela taxa de respiração basal, a qual se refere à oxidação biológica da matéria orgânica a
491 CO₂ pelos microrganismos aeróbios além de ocupar uma posição chave no ciclo do
492 carbono dos ecossistemas terrestres (Alef, 1995). Sua medição é considerada uma
493 estimativa indireta da velocidade de decomposição da matéria orgânica ou de algum
494 material adicionado ao solo (Severino et al., 2004), ou seja, do carbono prontamente
495 mineralizável.

496 Embora com a adição de glifosato no solo tenha-se observado uma tendência de
497 estímulo da respiração basal em relação à testemunha, neste estudo não foi constatada
498 diferença significativa para nenhum dos tratamentos testados (Anexo A). Andrighetti
499 (2011) avaliando a biodegradação do glifosato dosado equivalentemente a 25,2 g i.a ha⁻¹
500 ¹,utilizando-se de análises da atividade microbiana durante 32 dias e da biomassa
501 microbiana em 6 solos distintos, constatou que embora os microrganismos pudessem
502 utilizar a molécula do herbicida como fonte de carbono para o seu metabolismo, a mesma
503 não incrementou a respiração microbiana medida pela evolução do CO₂ através da
504 hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA).

505 Mesmo o glifosato sendo uma fonte de C prontamente disponível para
506 microrganismos heterotróficos e sua maior concentração ter apresentado efeito estimulante
507 no CBM aos 10 dias após aplicação na condição recomendada de fósforo (Figura 2 A), o
508 mesmo não apresentou efeito indutor sobre respiração basal do solo. Gomez et al. (2008),

509 em situação semelhante não constataram diferença significativa sobre a respiração basal do
510 solo.

511 Kummer et al. (2008) ao utilizarem ensilagem de cana-de-açúcar como indutor da
512 respiração basal em diferentes manejos de solo corroboraram o efeito da fonte de carbono
513 utilizada neste trabalho (glifosato) sobre a respiração basal do solo.

514 Tal condição sugere a supressão de grupos de microrganismos do solo, uma vez que
515 houve aumento significativo no valor médio do carbono da biomassa microbiana total,
516 frente a maior concentração de glifosato, no entanto, não foi constatado diferença na
517 respiração do solo.

518 Zilli et al. (2007) constataram supressão de uma bactéria com 90% de homologia
519 com *Herbaspirillum* sp. em solos do Cerrado de Roraima dessecado com glifosato e de
520 primeiro ano de cultivo de soja, no sistema de semeadura direta. Contrariamente, Bariuso
521 e Mellado (2012) não identificaram mudanças significativas na estrutura das comunidades
522 bacterianas em dois solos distintos da Espanha, sob cultivo de algodão tolerante ao
523 glifosato.

524 Numa outra vertente, associando ainda a planta de soja como mais um fator de
525 interação com a rizosfera, Zobiolo et al. (2010) verificaram que o glifosato afetou a
526 habilidade de soja tanto G1 quanto G2 em suprimir a colonização e a infecção de suas
527 raízes por *Fusarium* sp. Todavia Njiti et al. (2003) atribuíram tal fato ao genótipo do
528 hospedeiro e não aos tratamentos com glifosato ou à utilização de materiais transgênicos.

529 Arantes et al. (2007) através de radiorespirometria *in vitro*, constataram que o
530 glifosato reduziu a respiração microbiana total em dois solos distintos após a calagem. Tal
531 diferença pode ser atribuída as diferentes metodologias empregadas para determinação da
532 mesma.

533

534 **Quociente metabólico**

535 A relação entre a respiração basal e o carbono da biomassa microbiana, RB:CBM,
536 qMet ou qCO₂, reflete a qualidade do solo partindo do pressuposto de que à medida que a
537 biomassa microbiana se torna eficiente em utilizar recursos, menor será a quantidade de
538 carbono desprendida do solo na forma de CO₂, sendo o mesmo imobilizado nas células
539 microbianas.

540 Neste estudo os diferentes níveis de fósforo influenciaram mais o qMet,
541 isoladamente, do que o glifosato, porém o glifosato em interação com dias após aplicação
542 teve efeito significativo sobre o qMet (Tabela 8). A condição duplicada de fósforo (540 kg
543 ha⁻¹P₂O₅) aos 10 dias após a sua aplicação teve efeito positivo na eficiência microbiana
544 (Figura 3 A). Segundo Tólola e Cheaer (2002) e Mercante et al. (2004), baixos valores
545 neste índice refletem um ambiente mais estável e mais próximo do seu estado de
546 equilíbrio.

547 Resultados de Bezerra et al. (2008) diferem dos obtidos neste estudo, uma vez que
548 os mesmos não observaram diferença significativa para o quociente metabólico sob doses
549 crescentes de fósforo.

550 A concentração de 45 kg ha⁻¹ de glifosato, aos 10 dias após sua aplicação (Figura 3
551 B) reduziu a eficiência microbiana em 253% em relação à testemunha (Anexo B). No
552 entanto, a maior concentração de glifosato aplicada ao solo não apresentou diferença
553 estatística sobre o valor médio de qMet em relação à testemunha.

554 Em conformidade com os dados observados nestas condições (45 kg ha⁻¹ de e.a
555 glifosato x 10 dias após a aplicação, independente do nível de fósforo testado) para os
556 resultados de ufc bacteriana, Figura 1 A e B e fúngicas (Tabela 4), relacionando-os com os
557 dados de CBM, tal resultado de RB reforça a hipótese de supressão de grupos específicos
558 de microrganismos para este tratamento (Anexo E).

559 **Quociente microbiano**

560 O acúmulo de carbono no solo ao longo do tempo está diretamente relacionado com
561 a relação entre o carbono microbiano e o carbono orgânico total do solo (qMic) (Mercante
562 et al., 2004), bem como a qualidade nutricional da matéria orgânica (Ghani et al., 2003).
563 Assim sendo, o conhecimento de tal relação, CBM:COT é importante ferramenta como
564 medida para o biomonitoramento da matéria orgânica do solo (Sparling, 1992).

565 Neste trabalho verificou-se que tanto para condição recomendada (Figura 4 A) aos
566 10 dias após a aplicação como para a condição duplicada de fósforo (Figura 4 B) aos 40
567 dias após a aplicação, a maior concentração de glifosato aumentou significativamente o
568 valor médio de qMic, indicando para essas interações acúmulo de carbono orgânico ao
569 longo do tempo na biomassa microbiana e conseqüentemente, menor perda de CO₂ para
570 atmosfera (Cardoso et al., 2009).

571 Silva et al., 2007 verificaram aumento no qMic em área dessecada com 2,4 kg ha⁻¹
572 i.a de glifosato (1,4 kg ha⁻¹ e.a de glifosato) após 60 dias de semeadura de feijão.

573 Na ausência de glifosato, o aumento de qMic aos 10 dias se deu por conta da
574 condição duplicada de fósforo (Figura 5 A) em conformidade com o observado para o
575 CBM (Tabela 6).

576 As mudanças na razão Cmic:Corg refletem o padrão do aporte de matéria orgânica
577 do solo, a eficiência da conversão do carbono microbiano, as perdas de carbono do solo e a
578 estabilização do carbono orgânico pela fração mineral do solo. Essas razões indicam se o
579 conteúdo de carbono está se mantendo estável ou variando de acordo com as condições
580 impostas ao sistema (Sparling, 1992).

581 Os resultados do qMic seguiram a mesma tendência observada para CBM,
582 respondendo de forma adversa nas interações propostas nos tratamentos. No entanto,
583 correlações positivas entre o CBM e qMic foram constatadas aos 10 dias após aplicação do

584 nível duplicado de fósforo na ausência de glifosato (Figura 5 A) e aos 40 dias após
585 aplicação no nível duplicado de fósforo nas concentrações de 45 kg ha⁻¹ (Figura 5 C) e 90
586 kg ha⁻¹ (Figura 5 D) de glifosato.

587 No decorrer dos dias de avaliação, na condição recomendada de fósforo, para as
588 maiores concentrações testadas de glifosato, o efeito negativo das mesmas sobre o qMic foi
589 passageiro em relação ao dia 0 após a aplicação, ou seja, após aproximadamente 4h de
590 aplicação dos tratamentos ao solo (Anexo D).

591 Carneiro et al. (2008), verificaram que em diferentes sistemas de manejo de uso de
592 um Latossolo, que o comportamento do qMic também foi adverso.

593 A condição duplicada em interação com a maior concentração de glifosato foi
594 estável sobre qMic no decorrer dos dias, no entanto em relação a condição recomendada de
595 fósforo, constatou-se aumento do qMic aos 0 e 40 dias após a aplicação da maior
596 concentração de glifosato testada, reforçando mais uma vez a hipótese deste estudo.

597

598 **CONCLUSÕES**

599 Embora o impacto sobre o microbiota do solo e os processos biológicos sejam
600 dificilmente determinados com precisão, devido a natureza, heterogeneidade, dinâmica e
601 resposta adaptativa da comunidade microbiana. (Fortes et al., 2007), neste estudos foi
602 possível concluir que:

603 Nas condições experimentais constatou-se que, embora a maior concentração de
604 glifosato associado ao nível recomendado de fósforo no solo tivesse aumentado
605 significativamente o número médio de ufc fúngica e bacteriana nos dias iniciais após
606 aplicação, tal fato não refletiu significativamente sobre o CBM ou sobre a RB e

607 consequentemente, não alterou a eficiência metabólica da microbiota total do solo (qMet)
608 nem participação da mesma no carbono orgânico total do solo (qMic).

609 A maior concentração de glifosato associada ao maior nível de fósforo apresentou
610 efeito deletério sobre ufc bacteriana aos 40 dias e sobre ufc fúngica sem, contudo, interferir
611 negativamente na atividade microbiana do solo.

612 Nas condições agronômicas ideias de uso do glifosato e do fósforo para este solo,
613 não foram constatados efeitos negativos da interação entre os mesmos nas diferentes datas
614 de coleta sobre as variáveis analisadas.

615

616

617

618

619

620

621

622

623

624

625

626

627

628

629

630

631

632 **BIBLIOGRAFIA CITADA**

- 633 Alef, K.; Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*.
634 London, Academic Press, 1995, 568p.
- 635 Amarante Jr. O. P. de; Santos, T. C. R. dos. 2002. Glifosato: propriedades, toxicidade,
636 usos e legislação. *Química Nova*, 25:4:589-593
- 637 Anderson, T.H.; Domsch, K.H. 1993. The metabolic quotient for CO₂ (qCO₂) as a specific
638 activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the
639 microbial biomass of forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 25: 393-395.
- 640 Andréa, M.M.; Moreno Hollweg, M.J. 2004. Comparação de métodos para determinação
641 de biomassa microbiana em dois solos. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 28: 981-986.
- 642 Andrighetti, M.S. Biodegradação de glifosato por bactérias de solos cultivados com
643 macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida. Dissertação de Mestrado.
644 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 109p.
645
- 646 APROSOJA, 2013. Associação dos produtores de soja e milho de Mato - Grosso
647 (www.aprosoja.com.br). Acesso em 05/11/2013.
- 648 Arantes, S.A.C.M. 2007. Retenção e degradação de ¹⁴C-glifosato e remobilização dos seus
649 resíduos ligados em diferentes classes de solos. Dissertação de doutorado. Universidade de
650 São Paulo/ Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, São Paulo, 121p.
- 651 Araújo, A.S.F.; Monteiro, R.T.R.; Abarkeli, R.B. 2003. Effects of glyphosate on microbial
652 activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*, 52:799-804.
- 653 Barriuso, J.; Mellado, R.P. 2012. Glyphosate affects the rhizobacterial communities in
654 glyphosate-tolerant cotton. *Applied Soil Ecology*, 55:20-26.
- 655 Bezerra, R.G.D.; Santos, T.M.C. dos; Albuquerque, L.S. de Campos, V.B.; Prazeres, S. da
656 S. 2008. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar submetido a doses
657 de fósforo. *Revista Verde*, 3:4:64-69.
- 658 Bohm, G.B.; Castilho, D.; Pigosso, G.; Trechez, D.; Rombaldi, C.V. 2007. Efeito do
659 controle de plantas concorrentes na biomassa e atividade microbiana em planossolo
660 cultivado com soja BRS 244RR. *Revista Brasileira de Agrociência*, 13:4: 503-508.
- 661 Busse, M.D.; Ratcliff, A.W.; Shestak, C. J.; Powers, R.F. 2000. Non-target effects of
662 glyphosate on soil microbes. *California Weed Science Society*, 52: 146-150.
- 663 Busse, M.D.; Ratcliff, A.W.; Shestak, C. J.; Powers, R.F. 2001. Glyphosate toxicity and
664 the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. *Soil Biology
665 and Biochemistry*, 33:1777-1789.
666
- 667 Carneiro, M.A.C.; Assis, P.C.R.; Melo, L.B. de C.; Pereira, H.S.; Paulino, H.B.;
668 Silveira Neto, A.N. da. 2008. Atributos bioquímicos em dois solos de cerrado sob
669 diferentes sistemas de manejo e uso. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 38:276-283.

- 670 Castro Júnior, J.V. 2006. Avaliação do impacto do herbicida glifosato na microbiota do
671 solo e biodegradação por cepas de Fusarium. Dissertação de Mestrado, Faculdade de
672 Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 108p.
673
- 674 Cheah, U.B.; Kirkwood, R.C.; Lum, K.Y. 1998. Degradation of four commonly used
675 pesticides in Malasyan agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*
676 *Washington*, 46:3: 1217-1223.
- 677 Conte, E.; Anghinoni, I., Rhein Heimer, D.S. 2002. Fósforo da biomassa microbiana e
678 atividade de fosfatase ácida após aplicação de fosfato em solo no sistema de plantio direto.
679 *Revista brasileira de ciências do solo*, 26:925-930.
- 680 EMBRAPA – CNPS. 1997. Manual de métodos de análise de solo / Centro nacional de
681 pesquisa de solos. (Ed. 2ª rev e atual.)- Rio de Janeiro, 212p.
- 682 EMBRAPA - CNPS. Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília: Embrapa-SPI;
683 Rio de Janeiro: Embrapa-Solos, Brasília, 2006, 306 p.
- 684 EMBRAPA – CNPS. 2009. Manual de análises química de solos, plantas e fertilizantes.
685 Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009, 627 p.
- 686 Ermakova, I. T; Kiseleva, N. I; Shushkova, T; Zharikov, M; Zharikov, G. A; Leontievsky,
687 A. A. 2010. Bioremediation of glyphosate-contaminated soils. *Applied Microbiology and*
688 *Biotechnology*, 88:2 pp 585-594
- 689 Gama-Rodrigues, E.F.; Gama-Rodrigues, A.C. 2008. Biomassa microbiana e ciclagem de
690 nutrientes. In: Santos, G.A.; Silva, L.S.; Canellas, L.P.; Camargo, F.A.O.; Eds.
691 *Fundamentos da matéria orgânica do solo ecossistemas tropicais e subtropicais.*
692 2.ed. Porto Alegre, Metrópole, p.159-170.
693
- 694 Ghani, A.; Dexter, M.; Perrott, K.W. 2003. Hot-water extractable carbon in soils: a
695 sensitive measurement for determining impacts of fertilization, grazing and cultivation.
696 *Soil Biology & Biochemistry*, 35:9:1231-1243.
697
- 698 Gimsing, A.L.; Borggaard, O.K. 2001. Effect of KCl and CaCl₂ as background electrolytes
699 on the competitive adsorption of glyphosate and phosphate on goethite. *Clays Clay Miner.*
700 40: 270-275.
- 701 Gomez, E.; Ferreras, L.; Lovotti, L.; Fernandez, E. 2008. Impact of glyphosate application
702 on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina.
703 *European Journal of soil biology*, 45:163-167.
- 704 Haney, R.L.; Senseman, S.A.; Hons, F.M.; Zuberer, D.A. 2000. Effect of glyphosate on
705 soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, 48:89-93.
- 706 Hoven-Jensen, B; Zechel, D. L; Jochinsem, B. 2014. Utilization of glyphosate as
707 phosphate source: bichemistry and genetics of bacteria carbon- phosphorus genes lyases.
708 *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 78(1):176.
- 709

- 710 IMEA, 2013. Instituto mato-grossense de economia agropecuária (www.imea.com.br). Acesso em
711 10/11/2013.
- 712 Jenkinson, D.S.; Powlson, D.S. 1976b. The effects of biocidal treatments on metabolism in
713 soil - V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biology and Biochemistry* 8: 209-213.
- 714 Jenkinson, D.S.; Ladd, J.M. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover.
715 In: Paul, E.A.; Ladd, J.N (Eds.). *Soil Biochemistry*. V.5. Dekker, New York, p.415-471.
- 716 Jenkinson, D.S.; 1988, Determination of microbial biomass carbono and Nitrogen in soil.
717 In: Wilson JR (ed). *Advences in nitrogen cycling in agricultural ecosystems*, CAB,
718 Wallingford, p p 368-386,
- 719 Krzysko-Lupicka, T.; Orlik, A. 1997. The use of glyphosate as the sole source of
720 phosphorus or carbon for the selection of soil-borne fungal strains capable to degrade this
721 herbicide. *Chemosphere* 34:2601-2605.
- 722 Kummer, L. Barros, Y.J.; Schäfer, R.F.; Ferreira, A.T. dos S.; Freitas M.P.; Paula, R.A.;
723 Dionísio, J.A. 2008. Respiração e biomassa microbiana em solos sob diferentes sistemas de
724 uso. *Scientia Agraria*, 9:4:559-563.
725
- 726 Lane, M.; Lorenz, N.; Saxena, J.; Ramsier, C.; Dick, R.P. 2012. Microbial activity,
727 community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants
728 treated with glyphosate. *Pedologia – International Journal of Soil Biology*, 55:153-159.
729
- 730 Larson, W. E.; Pierce, F. J. 1994. The dynamics of soil quality as a measure of sustainable
731 management. In: Doran, J.W.; Coleman, D.C.; Bezdicek, D.F.; Stewart, B.A. (Ed.)
732 *Defining soil quality for a sustainable environment*. Soil Science Society
733 of America: American Society of Agronomy, p.37-5.
734
- 735 Liphadzi, K.B.; Al-Khatib, K.; Bensch, C.N.; Stalhlman, P.W.; Dille, J.A.; Todd, T.; Rice,
736 C.W.; Horak, M.J.; Head, G. 2005. Soil microbial and nematode communities as affected
737 by glyphosate and tillage practices in a glyphosate-resistant cropping system. *Weed
738 Science*, Champaign, 53:4:536-545.
- 739 Mercante, F.M; Fabricio, A.C; Machado, L.A.Z; Silva, W.M. 2004. Parâmetros
740 microbiológicos como indicadores de qualidade do solo sob sistemas integrados de
741 produção agropecuária. Dourados, Embrapa Agropecuária Oeste, 2004. 27p. (Boletim de
742 pesquisa e desenvolvimento, 20).
- 743 Moreira, F.M.S.; Siqueira, J.O. 2006. *Microbiologia e bioquímica do solo*. 2ª ed. UFLA,
744 Lavras, 2006, 729p.
- 745 Njiti, V.N.; Myers, O. Jr.; Schoerder, D.; Lightfoot, D. 2003. Roundup ready soybean:
746 glyphosate effects on *Fusarium solani* root colonization and sudden death syndrome.
747 *Agronomy Journal*, 95: 1140-1145.
- 748 Odum, E. P. 1985. Trends expected in stressed ecosystems. *BioScience*, Londres, 35: 419-
749 422.

- 750 Prata, F.; Lavorenti, A. 2000. Comportamento de herbicidas no solo: influência da matéria
751 orgânica. *Revista Biociência*. Taubaté, v.6, 2: 17-22.
- 752 Prata, F.; 2002. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina.
753 Dissertação de doutorado, Escola Superior de Agricultura Luíz de Queiroz/ Universidade de
754 São Paulo, Piracicaba, Brasil.
- 755 Prata, F.; Cardinali, V.C.do B.; Lavorenti, A.; Tornisielo, V.L.; Reginato, J.B. 2003.
756 Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. *Scientia*
757 *Agricola*, v.60, 1: 175-180.
- 758 Perez, K.S.; Ramos, M.L.G. & McManus, C. 2004. Carbono da biomassa microbiana em
759 solo cultivado com soja sob diferentes sistemas de manejo nos Cerrados. *Pesquisa*
760 *agropecuária brasileira*, 39:567-573.
- 761 Pinto-Júnior, O.B.; Sanches, L.; Dalmolin, A.C.; Nogueira, J.S. de. 2009. Efluxo de CO₂
762 do solo em floresta de transição Amazônia Cerrado e em área de pastagem. *Acta*
763 *Amazonica*, 39:4:813-822.
- 764 Ratcliff, A.W.; Busse, M.D.; Shestak, C. J. 2006. Changes in microbial community
765 structure following herbicide (glyphosate) additions to forest soils. *Applied Soil Ecology*,
766 34: 114-124.
- 767 Reis, M.R.; Silva, A.A.; Freitas, M.A.M.; Pereira, J.L.; Costa, M.D.; Picanço, M.C.;
768 Ferreira, E.A.; Belo, A.F.; Coelho, A.T.C.P.; Silva, G.R. 2009. Impacto do glyphosate
769 associado a inseticida e fungicida na atividade microbiana e no potencial de solubilização
770 de fosfato em solo cultivado com soja RoundupReady. *Planta Daninha*, v.27, 4: 729-737.
- 771 Severino, L.S.; Costa, F. X.; Beltrão, N.E.M., Lucena, M.A. 2004. Mineralização da torta
772 de mamona, esterco bovino e bagaço de cana estimada pela respiração microbiana. *Revista*
773 *de biologia e ciências da Terra*, 5:1.
- 774 Sparling, G.P. 1992. Ratio of microbial biomass carbon to soil organic carbon as a
775 sensitive indicator of changes in soil organic matter. *Austr. J. soil Res.*, 30: 195-207.
- 776
- 777 Shushkova, T. V.; Ermakova, I. T.; Sviridov, A. V.; Leontevsky, A. A. 2012.
778 Biodegradation of glyphosate by soil bacteria: optimization of cultivation and the method
779 for active biomass storage. *Microbiology*, 81:1 pp 44-50.
- 780 Tótola, M.R.; Chaer, G.M. 2002. Microrganismos e processos microbiológicos como
781 indicadores da qualidade dos solos. *Tópicos em ciências do solo*. Sociedade brasileira de
782 ciências do solo, 2:195-276.
- 783 Veiga, F. et al., 2001. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a
784 forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of total environment*. 271:1-3: 135-
785 144.
- 786

- 787 Vianello, R. L.; Alves, A. R. 1991. Meteorologia básica e aplicações. UFV, Viçosa, MG,
788 Brasil, Editora da UFV. 1991, 449p.
- 789 Wollum, A.G. 1982. Cultural methods for soil microorganisms. In: Page, A.L.; Miller,
790 R.H.; Keeney, D.R. (Ed.). Methods of soil analysis. Madison : Soil Science Society of
791 America, p.781-802.
- 792 Zilli, J.E.; Smiderle, O.J.; Neves, M.C.P.; Rumjanek, N.G. 2007. População microbiana em
793 solo cultivado com soja e tratado com diferentes herbicidas em área de cerrado no estado
794 de Roraima. *Acta Amazonica*, 37:2: 201-212.
- 795 Zobiole, L.H.S.; Kremer, R.J.; Oliveira Jr., Constantin, J. 2010. Glyphosate affects micro-
796 organisms in rhizosphere of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied*
797 *Microbiology*.

798 **LISTA DE FIGURAS**

799

Figura 1. Quantidade média (e desvio padrão) de ufc bacteriana no nível **8/9** recomendado (A) e duplicado (B) de fósforo em interação com concentrações crescente de glifosato em kg ha^{-1} de equivalente ácido de sal de isopropilamina, dentro dos dias após a aplicação.

Figura 2. Carbono da biomassa microbiana total do solo (média e desvio padrão) no **13** nível recomendado (A) e duplicado (B) de fósforo em interação com concentrações crescentes de glifosato dentro dos dias após a aplicação.

Figura 3. Quociente metabólico nos desdobramentos dos níveis de fósforo dentro **16** dos dias após aplicação (A) e das concentrações de glifosato dentro dos dias após aplicação (B).

Figura 4. Quociente microbiano sob doses crescentes de glifosato no nível **18** recomendado de fósforo (A) e duplicado (B) dentro dos dias após a aplicação.

Figura 5. Valor percentual do quociente microbiano (qMIC) sob doses crescentes de **19** glifosato: (A) testemunha, (B) $0,9 \text{ kg ha}^{-1}$, (C) 45 kg ha^{-1} e (D) 90 kg ha^{-1} e.a. de sal de isopropilamina em interação com duas condições de fósforo (1P) 270 kg ha^{-1} e (2P) 540 kg ha^{-1} de P_2O_5 nas 4 datas de aplicação testadas (0, 1, 10 e 40 dias).

800

801

802

803

804

805

806

807

808

809

810 **APÊNDICES**

811 **Apêndice A-** Protocolo diluição seriada e Spread –Plate (Wollum 1982)

812 Dilution series

813 The purpose of the dilution series is to produce a readily countable set of plates by
814 making a range of dilutions and assaying all of them. The organisms are, in theory, diluted
815 out to extinction. As such between pure water sample and the least concentrated dilution,
816 there should be between two and three countable plates which can be used to calculate the
817 total number of culturable organisms within an environmental sample. These are made up
818 with Ringer’s solution (see recipes and media) to prevent the cells from lysis during the
819 experiment. Dilution series are made up in the laminar flow cabinet in an attempt to
820 prevent contamination from external sources introducing a bias into the experiment. Other
821 than the initial water sample, the dilution is made by transferring from one tube to the next
822 to create a serial dilution series.

823 These dilutions will be used in the following spread plate protocol:

824 This technique is used with environmental samples to obtain isolated colonies and
825 enumerate the number of culturable cells contained within a sample.

826 This protocol is completed within a laminar flow cabinet.

827 1. Label the Petri dish (this will contain the specific solid agar required for the experiment)
828 – name, constituents of plate, sample and dilution.

829 2. Pipette 100µl of the sample onto the centre of the agar plate

830 3. Using a sterile, disposable, plastic spreader cover the surface of the agar with the sample
831 NB/ this is best done by rotating the plate while keeping the spreader in contact with the
832 edge of the plate and the agar surface

833 4. Dispose of all pipette tips and spreaders in the offensive waste bin

834 5. Petri dishes once inoculated are stored upside down and incubates.

835 In the context of this experiment the agar plates are incubated at room temperature for

836 24 hours to one week depending on the growth time of the specific organisms.

837 The rationale behind using 100µl of each dilution is that this will make calculating the
838 total number of organisms present in the sample much easier
839

840 **Apêndice B – Metodologia Fumigação-Incubação**

841 O método utilizado para a quantificação do carbono da biomassa microbiana do solo foi
842 adaptado de Jenkinson e Powelson (1976) e realizado em quadruplicata para cada amostra
843 que foi retirada do campo. Primeiramente, o solo teve a sua umidade corrigida para 60 %
844 da capacidade de campo e em seguida as amostras de 100 g foram acondicionadas em
845 sacos plásticos de 500 ml. Posteriormente foram pesados, em quadruplicata, 23 g de solo
846 de cada tratamento em Becker de 50 ml e fumigada conforme segue.

847 Os beckeres contendo as amostras a serem fumigadas foram colocados em
848 dessecadores contendo um béquer com 20 mL de clorofórmio. Os dessecadores, após
849 terem a parede interna recoberta com papel toalha umedecido com água, foram fechados
850 com a utilização de vaselina e submetidos a vácuo por 10 min e deixados em repouso em
851 temperatura ambiente e no escuro por 48 h. Enquanto eram fumigadas as amostras, foram
852 pesadas das amostras originais (não fumigadas), em frascos que seriam posteriormente
853 hermeticamente fechados, mais 25 g de solo de cada amostra, em quadruplicata e ainda
854 mais 2 g para posterior incubação das amostras fumigada. Após a fumigação, os
855 dessecadores foram abertos para aeração e eliminação do clorofórmio. Para a retirada do
856 clorofórmio, os dessecadores foram submetidos ao vácuo com bomba de ar por cerca de 3
857 min.

858 Os frascos contendo as amostras não fumigadas também foram deixados em
859 repouso no escuro por 48 h em temperatura ambiente. Às amostras fumigadas foram
860 adicionados 2 g do solo da mesma amostra não-fumigada (reinoculação), seguindo-se a
861 homogeneização delas.

862 A seguir, realizou-se a incubação das amostras em frascos herméticos de 280 mL,
863 onde foi colocado um frasco plástico contendo 20 mL de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Os frascos
864 herméticos foram vedados com parafilme e fechados manualmente.

865 Os potes foram incubados no escuro, a 25 ± 2 °C, por 7 dias. Para cada repetição,
866 incubou-se um frasco sem solo (branco), mas com NaOH 0,5 mol L⁻¹. Ao final do período
867 de incubação, o NaOH dos frascos das amostras fumigadas e não fumigadas foram
868 titulados com HCl 0,3 mol L⁻¹. Para isso, em cada frasco de 20 mL de NaOH, adicionou-se
869 3 mL de solução saturada de BaCl₂, e 3 gotas do indicador (fenolftaleína à 1 %), mantendo

870 a solução sob agitação magnética. O NaOH dos frascos sem solo (branco) também foram
871 titulados.

872 Após a titulação do NaOH, calculou-se a quantidade de C-CO₂ liberada das
873 amostras fumigadas e não fumigadas, e os cálculos foram efetuados segundo Alef e
874 Nannipieri (1995), onde:

875 O carbono da biomassa microbiana foi calculado a partir da fórmula:

$$876 \quad \text{CBM } (\mu\text{g C g solo}^{-1}) = (\text{C fumigado} - \text{C não-fumigado}) / \text{kc.}$$

877 Para o kc assumiu-se o valor de 0,45 convertido em CO₂ durante os 7 dias de
878 incubação, após a fumigação (Jenkinson 1988).

879 Os valores para a respiração basal foram obtidos por meio da seguinte fórmula:

$$880 \quad \text{RB } (\mu\text{g C-CO}_2 \text{ g solo}^{-1}) = (\text{C amostra não fumigada} - \text{C branco}) \times \text{molaridade}$$

881 **exata do HCl x 6 x volume NaOH/ massa de solo seco.**

882 Para a determinação do quociente metabólico, utilizou-se a fórmula:

$$883 \quad \text{qMet } (\mu\text{g CO}_2 \mu\text{g C mic dia}^{-1}) = \text{respiração basal} / \text{carbono da biomassa}$$

884 **microbiana.**

885 O quociente microbiano foi calculado pela fórmula:

$$886 \quad \text{qMic } (\mu\text{g C g solo}^{-1}) = (\text{carbono da biomassa microbiana} / \text{carbono orgânico}) /$$

887 **tempo de incubação.**

888

889

890

891

892

893

894

895 **Anexos**896 **Anexo A - Probabilidade associada dos efeitos de concentrações crescentes de glifosato, níveis de**
897 **fósforo e dias após a aplicação sobre a respiração basal da microbiota total do solo**

Variáveis	g.L.	S.Q.	Q.M.	F	P
Glifosato	3	6137,5	2045,8	0,581	0,63
Dias após aplicação (D.A.A)	3	2425,6	808,5	0,230	0,88
Níveis fósforo	1	5532,2	5532,2	1,572	0,21
Glifosato*D.A.A	9	38930,2	4325,6	1,229	0,29
Glifosato*Fósforo	3	5812,5	1937,5	0,551	0,65
D.A.A.*Fósforo	3	18307,6	6102,5	1,734	0,16
Glifosato*D.D.A.*Fósforo	9	33048,5	3672,1	1,044	0,42
Resíduo	96	337793,3	3518,7		

898 *Tratamentos significativos a 5% de probabilidade.

899

900 **Anexo B - Valores médios do quociente metabólico ($\mu\text{g CO}_2/\mu\text{g Cmic}^{-1}\text{dia}^{-1}$) no desdobramento de dias**
901 **após aplicação dentro de concentrações de glifosato**

Dias após incubação	glifosato (kg ha^{-1} e. a. sal de isopropilamina)			
	0	1	10	40
0	1,47 a B	1,05 a B	0,60 a A	0,89 a A
0,9	0,79 a A	1,08 a A	1,44 ab B	1,10 a B
45	0,54 a A	0,80 a A	2,12 b B	0,78a A
90	0,73 a A	0,74 a A	0,55 a A	0,99 a B

902 Letras minúsculas comparam médias na coluna e maiúsculas na linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de
903 Tukey a 5%

904

905

906 **Anexo C - Probabilidade associada dos efeitos de concentrações crescentes de glifosato, níveis de**
907 **fósforo e dias após a aplicação sobre o quociente microbiano do solo submetido a diferentes**
908 **tratamentos**

FV	g.L	S.Q	Q.M	Fc	P
Glifosato	3	2.482441	0.827480	6.586	0.0004*
Dias após aplicação (D.A.A)	3	0.323378	0.107793	0.858	0.4657
Níveis Fósforo	1	1.143828	1.143828	9.104	0.0033*
Glifosato*D.A.A	9	5.568528	0.618725	4.925	0.0000*
Glifosato*fósforo	3	0.667403	0.222468	1.771	0.1579
D.A.A*fósforo	3	1.590703	0.530234	4.220	0.0075*
Glifosato*D.A.A*fósforo	9	6.608891	0.734321	5.845	0.0000*
Erro	96	12.061000	0.125635		
Total corrigido	127	30.446172			

919 *Tratamentos significativos a 5% de probabilidade

920

921

922

923

924

925

926

927

928

929

930
931
932

Anexo D - Valores médios do quociente microbiano (%) em interação tripla: glifosato x fósforo x dias após aplicação

glifosato (kg ha ⁻¹ e.a sal de isopropilamina)								
Dias após aplicação	0		0,9		45		90	
	Fósforo (kg ha ⁻¹ P ₂ O ₅)							
	270	540	270	540	270	540	270	540
0	0,64 a A	0,25 b A	0,87 a A	0,75 a A	0,83 ab A	0,93 ab A	0,44 b B	1,27 ab A
1	0,55 a A	0,58 b A	0,74 a A	1,01 a A	1,06 a A	0,48 b B	0,92 ab A	0,65 b A
10	0,51 a B	1,60 a A	0,43 a A	0,60 a A	0,24 b A	0,46 b A	1,40 a A	1,36 a A
40	1,11 a A	0,74 b A	0,61 a A	0,58 a A	0,37 b A	1,24 a B	0,51 b B	1,73 a A

933 Letras minúsculas comparam médias na coluna e maiúsculas na linha. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de
934 Tukey a 5%.

935
936
937
938

Anexo E – Atributos bioquímicos e contagem de bactérias em função das diferentes concentrações de glifosato em dois níveis de fósforo para o dia 10 após a aplicação

Glifosato (kg ha ⁻¹)	COT (g kg ⁻¹)	CBM (µg g solo ⁻¹)	RB (mg g solo ⁻¹ dia ⁻¹)	qMic (%)	UFC bac. Log x
270 kg ha⁻¹ P₂O₅					
0	19,37 a	82,80 b	86,58 a	0,51 b	6,46 a
0,9	20,30 a	72,38 b	96,58 a	0,43 b	6,11 b
45	19,94 a	39,80 b	123,45 a	0,24 b	6,70 a
90	20,07 a	238,53 a	148,75 a	1,41 a	6,65 a
540 kg ha⁻¹ P₂O₅					
0	20,38 a	274,05 a	34,58 a	1,60 a	7,06 ab
0,9	19,46 a	98,68 b	78,12 a	0,61 b	6,88 b
45	19,77 a	76,93 b	82,35 a	0,46 b	7,20 a
90	18,86 a	214,43 a	111,08 a	1,36 a	6,79 b

939 Médias seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.
940 COT – carbono orgânico total; CBM – carbono da biomassa microbiana; RB – respiração basal microbiana; qMic – quociente
941 microbiano; UFC bac. – unidade formadora de colônia de bactéria.

942
943
944

Anexo F- Normas da revista Acta Amazônica na qual este artigo único está configurado.
Disponível em: <http://www.scielo.br/revistas/aa/pinstruc.htm>

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. Submissões que não estejam de acordo com as normas são devolvidas aos autores.

1. O tamanho máximo de um arquivo individual deve ser 2 MB.
2. O manuscrito deve ser acompanhado de uma carta de submissão indicando que: a) os dados contidos no trabalho são originais e precisos; b) que todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo; c) a contribuição apresentada à Revista não foi previamente publicada e nem está em processo de publicação, no todo ou em parte em outro veículo de divulgação. A carta de submissão deve ser carregada no sistema da Acta Amazonica como "documento suplementar".
3. Os manuscritos são aceitos em português, espanhol e inglês, mas encorajam-se contribuições em inglês. A veracidade das informações contidas numa submissão é de responsabilidade exclusiva dos autores.
4. A extensão máxima para artigos e revisões é de 30 páginas (ou 7500 palavras, excluindo a folha de rosto), dez páginas (2500 palavras) para Notas Científicas e cinco páginas para outros tipos de contribuições.
5. Os manuscritos formatados conforme as Instruções aos Autores são enviados aos editores associados para pré-avaliação. Neste primeiro julgamento são levados em consideração a relevância científica, a inteligibilidade do manuscrito e o escopo no contexto amazônico. Nesta fase, contribuições fora do escopo da Revista ou de pouca relevância científica são rejeitadas. Manuscritos aprovados na pré-avaliação são enviados para revisores (pelo menos dois), especialistas de instituições diferentes daquelas dos autores, para uma análise mais detalhada.
6. Uma contribuição pode ser considerada para publicação, se tiver recebido pelo menos dois pareceres favoráveis no processo de avaliação. A aprovação dos manuscritos está fundamentada no conteúdo científico e na sua apresentação conforme as Normas da Revista.
7. Os manuscritos que necessitam correções são encaminhados aos autores para revisão. A versão corrigida deve ser encaminhada ao Editor, via sistema da Revista, no prazo de DUAS semanas. Uma carta de encaminhamento deve ser também carregada no sistema da Revista, detalhando as correções efetuadas. Nessa carta, recomendações não incorporadas ao manuscrito devem ser explicadas. Todo o processo de avaliação pode ser acompanhado no endereço, <http://mc04.manuscriptcentral.com/aa-scielo>.
8. Seguir estas instruções para preparar e carregar o manuscrito:
 - a. Folha de rosto (Title page): Esta página deve conter o título, nomes (com último sobrenome em maiúscula), endereços institucionais completos e endereços eletrônicos dos autores. Os nomes das instituições não devem ser abreviados. Usar um asterisco (*)

para indicar o autor correspondente.

Carregar este arquivo selecionando a opção: "Title page"

b. Corpo do manuscrito (main document). O corpo do manuscrito deve ser organizado da seguinte forma: Título, Resumo, Palavras-Chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Bibliografia Citada, Legendas de figuras e Tabelas. Para submissões em português ou espanhol incluir: título, resumo e palavras-chave em inglês.

Carregar este arquivo como "Main document".

c. Figuras. São limitadas a sete em artigos. Cada figura deve ser carregada em arquivo separado e estar em formato gráfico (JPG ou TIFF). Deve ser em alta qualidade e com resolução de 300 dpi. Para ilustrações em bitmap, utilizar 600 dpi.

Carregar cada um destes arquivos como "Figure".

d. Tabelas. São permitidas até cinco tabelas por artigo. Utilizar espaço simples e a função "tabela" para digitar a tabela. As tabelas podem ser carregadas como arquivos separados OU inseridas no corpo do manuscrito (main document) após as legendas das figuras.

9. As Notas Científicas são redigidas separando os tópicos (i.e. Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão) em parágrafos, mas sem incluir os títulos das seções. Notas Científicas, como no caso do artigo, também devem conter: Título, Nomes e endereços institucionais e eletrônicos dos autores, Resumo, Palavras-Chave e os tópicos do artigo completo incluindo título em inglês, abstract e keywords. São permitidas até três figuras e duas tabelas. Carregar as diferentes partes do manuscrito como descrito no Item 8.

10. Nomes dos autores e endereço institucional completo, incluindo endereço electrónico DEVEM ser cadastrados no sistema da Revista no ato da submissão.

11. **IMPORTANTE:** Os manuscritos não formatados conforme as Normas da Revista NÃO são aceitos para publicação.

FORMATO E ESTILO

12. Os manuscritos devem ser preparados usando editor de texto (e.g. doc ou docx), utilizando fonte "Times New Roman", tamanho 12 pt, espaçamento duplo, com margens

de 3 cm. As páginas e as linhas devem ser numeradas de forma contínua. Para tabelas ver Item 8d.

13. Título. Justificado à esquerda, com a primeira letra maiúscula. O título deve ser conciso evitando-se o uso de nomes científicos.

14. Resumo. Deve conter até 250 palavras (150 palavras no caso de Notas Científicas), deve conter de forma sucinta, o objetivo, a metodologia, os resultados e as conclusões enfatizando aspectos importantes do estudo. O resumo deve ser autossuficiente para a sua compreensão. Os nomes científicos das espécies e demais termos em latim devem ser escritos em itálico. Siglas devem ser evitadas nesta seção; porém, se necessárias, o significado deve ser incluído. Não utilizar referências bibliográficas no resumo.

15. Palavras-chave. Devem ser em número de três a cinco. Cada palavra-chave pode conter dois ou mais termos. Porém, não devem ser repetidas palavras utilizadas no título.

16. Introdução. Enfatizar o propósito do trabalho e fornecer, de forma sucinta, o estado do conhecimento sobre o tema em estudo. Especificar claramente os objetivos ou hipóteses a serem testados. Esta seção não deve exceder de 35 linhas. Não incluir resultados ou conclusões e não utilizar subtítulos na Introdução.

17. Material e Métodos. Esta seção deve ser organizada cronologicamente e explicar os procedimentos realizados, de tal modo que outros pesquisadores possam repetir o estudo. O procedimento estatístico utilizado deve ser descrito nesta seção. O tipo de análise estatística aplicada aos dados deve ser descrita. Procedimentos-padrão devem ser apenas referenciados. As unidades de medidas e as suas abreviações devem seguir o Sistema Internacional e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas. Equipamento específico utilizado no estudo deve ser descrito (modelo, fabricante, cidade e país de fabricação, entre parênteses). Por exemplo: "A fotossíntese foi determinada usando um sistema portátil de trocas gasosas (Li-6400, Li-Cor, Lincoln, NE, USA)". Material testemunho (amostra para referência futura) deve ser depositado em uma ou mais coleções científicas e informado no manuscrito. NÃO utilizar sub-títulos nesta seção. Utilizar negrito, porém não itálico ou letras maiúsculas para os subtítulos.

18. Aspectos éticos e legais. Para estudos que exigem autorizações especiais (e.g. Comitê de Ética/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, IBAMA, CNTBio, INCRA/FUNAI, EIA/RIMA, outros) informar o número do protocolo e a data de aprovação. É responsabilidade dos autores o cumprimento da legislação específica relacionada a estes aspectos.

19. Resultados. Os resultados devem apresentar os dados obtidos com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto toda a informação contida em tabelas e figuras.

Algarismos devem estar separados de unidades. Por exemplo, 60 °C e NÃO 60° C, exceto para percentagem (e.g., 5% e NÃO 5 %). Utilizar unidades e símbolos do Sistema Internacional e simbologia exponencial. Por exemplo, cmol kg⁻¹ em vez de meq/100g. Não apresentar a mesma informação (dados) em tabelas e figuras simultaneamente. Não utilizar sub-subtítulos nesta seção.

20. Discussão. A discussão deve ter como alvo os resultados obtidos. Evitar mera especulação. Entretanto, hipóteses bem fundamentadas podem ser incorporadas. Apenas referências relevantes devem ser incluídas. As conclusões devem conter uma interpretação sucinta dos resultados e uma mensagem final que destaque as implicações científicas do trabalho. As conclusões podem ser apresentadas como um tópico separado ou incluídas no final da seção Discussão.

21. Agradecimentos devem ser breves e concisos. **Incluir agência(s)** de fomento. NÃO abreviar nomes de instituições.

22. Bibliografia Citada. Pelo menos 70% das referências devem ser artigos de periódicos científicos. As referências devem ser preferencialmente dos últimos 10 anos, evitando-se exceder 40 citações. Esta seção deve ser organizada em ordem alfabética e deve incluir apenas citações mencionadas no manuscrito. Para referências com mais de dez autores, relacionar os seis primeiros seguido de *et al.* Nesta seção, o título do periódico NÃO deve ser abreviado. Observar os exemplos abaixo:

a) Artigos de periódicos:

Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

b) Dissertações e teses:

Ribeiro, M.C.L.B. 1983. *As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil.* Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/ Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.

c) Livros:

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. *Principles and procedures of statistics: a biometrical*

approach. 2da ed. McGraw-Hill, New York, 1980, 633p.

d) Capítulos de livros:

Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Ed.). *Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia*. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p.3-10.

e) Citação de fonte eletrônica:

CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Acesso em 19/05/1999.

f) Citações com mais de dez autores:

Tseng, Y.-H.; Kokkotou, E.; Schulz, T.J.; Huang, T.L.; Winnay, J.N.; Taniguchi, C.M.; *et al.* 2008. New role of bone morphogenetic protein 7 in brown adipogenesis and energy expenditure. *Nature*, 454:1000-1004.

23. Citações de referências no texto. As referências devem seguir ordem cronológica. Para duas ou mais referências do mesmo ano citar conforme a ordem alfabética. Exemplos:

a) Um autor:Pereira (1995) ou (Pereira 1995).

b) Dois autores:Oliveira e Souza (2003) ou (Oliveira e Souza 2003).

c) Três ou mais autores:Rezende *et al.* (2002) ou (Rezende *et al.* 2002).

d) Citações de anos diferentes (ordem cronológica):Silva (1991), Castro (1998) e Alves (2010) ou (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

e) Citações no mesmo ano (ordem alfabética):Ferreira *et al.* (2001) e Fonseca *et al.* (2001); ou (Ferreira *et al.* 2001; Fonseca *et al.* 2001).

FIGURAS

24. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser de alta resolução, em preto e branco com

alto contraste, numerados sequencialmente em algarismos arábicos. NÃO usar tonalidades de cinza em gráficos de dispersão (linhas ou símbolos) ou gráficos de barra. Em gráfico de dispersão usar símbolos abertos ou sólidos (círculos, quadrados, triângulos, ou losangos) e linhas em preto (contínuas, pontilhadas ou tracejadas). Para gráfico de barra, usar barras pretas, bordas pretas, barras listradas ou pontilhadas. Na borda da área de plotagem utilizar uma linha contínua e fina, porém NÃO usar uma linha de borda na área do gráfico. Em figuras compostas cada uma das imagens individuais deve ser identificada com uma letra maiúscula posicionada no canto superior direito, dentro da área de plotagem.

25. Evitar legendas desnecessárias na área de plotagem. Nos títulos dos eixos ou na área de plotagem NÃO usar letras muito pequenas (< tamanho 10 pt). Nos eixos usar marcas de escala internas. NÃO usar linhas de grade horizontais ou verticais, exceto em mapas ou ilustrações similares. O significado das siglas utilizadas deve ser descrito na legenda da figura. Cada eixo do gráfico deve ter o seu título e a unidade. Evitar muitas subdivisões nos eixos (cinco a seis seriam suficientes). Em mapas incluir escala e pelo menos um ponto cardeal.

26. As figuras devem ser elaboradas de forma compatível com as dimensões da Revista, ou seja, largura de uma coluna (8 cm) ou de uma página 17 cm e permitir espaço para a legenda. As ilustrações podem ser redimensionadas durante o processo de produção para adequação ao espaço da Revista. Na figura, quando for o caso, a escala deve ser indicada por uma barra (horizontal) e, se necessário, referenciadas na legenda da figura. Por exemplo, barra = 1 mm.

27. Citação de figuras no texto. As figuras devem ser citadas com letra inicial maiúscula, na forma direta ou indireta (entre parêntesis). Por exemplo: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, a figura deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exemplo: "Figura 1. Análise...". Definir na legenda o significado de símbolos e siglas usados. Figuras devem ser autoexplicativas.

28. Figuras de outras autorias. Para figuras de outras autorias ou publicadas anteriormente, os autores devem informar explicitamente no manuscrito que a permissão para reprodução foi concedida. Carregar no sistema da Revista (não para revisão), como documento suplementar, o comprovante outorgado pelo detentor dos direitos autorais.

29. Adicionalmente às figuras inseridas no sistema em formato TIFF ou JPG, os gráficos preparados usando Excel ou SigmaPlot podem ser carregados como arquivos suplementares (selecionando a opção Not for review).

30. Ilustrações coloridas. Fotografias e outras ilustrações devem ser preferencialmente em preto e branco. Ilustrações coloridas são aceitas, mas o custo de impressão é por conta dos autores. Sem custo para os autores, podem ser usadas ilustrações em preto e branco na versão impressa e coloridas na versão eletrônica. Nesse caso, isso deve ser

informado na legenda da figura. Por exemplo, adicionando a sentença: "Esta figura é colorida na versão eletrônica". Esta última informação é para os leitores da versão impressa.

31. Os autores podem ser convidados a enviar uma fotografia colorida, para ilustrar a capa da Revista. Nesse caso, não há custos para os autores.

TABELAS

32. As tabelas devem ser organizadas e numeradas sequencialmente com algarismos arábicos. A numeração e o título (legenda) devem estar em posição superior à tabela. A tabela pode ter notas de rodapé. O significado das siglas e dos símbolos utilizados na tabela (cabeçalhos, etc.) devem ser descritos no título. Usar linhas horizontais acima e abaixo da tabela e para separar o cabeçalho do corpo da tabela. Não usar linhas verticais.

33. As tabelas devem ser elaboradas em editor de texto (e.g. doc ou docx) e não devem ser inseridas no texto como imagem (e.g. no formato JPG).

34. A citação das tabelas no texto pode ser na forma direta ou indireta (entre parêntesis), por extenso, com a letra inicial maiúscula. Por exemplo: Tabela 1 ou (Tabela 1). Na legenda, a tabela deve ser numerada seguida de ponto antes do título: Por exemplo: "Tabela 1. Análise...". Tabelas devem ser autoexplicativas.