

FERNANDA APARECIDA RODRIGUES GUIMARÃES

**FITORREMEDIAÇÃO DE PICLORAM ASSOCIADA A FUNGOS MICORRÍZICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2013

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

G963m  
2013

Guimarães, Fernanda Aparecida Rodrigues, 1984-  
Fitorremediação de picloram associada a fungos  
micorrízicos / Fernanda Aparecida Rodrigues Guimarães.  
– Viçosa, MG, 2013.  
ix, 53f. : il. (algumas color.) ; 29cm.

Orientador: Francisco Affonso Ferreira  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.  
Inclui bibliografia.

1. Fitorremediação. 2. Solos - Descontaminação. 3. Plantas.  
4. Herbicidas. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-Graduação em  
Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 628.5

FERNANDA APARECIDA RODRIGUES GUIMARÃES

**FITORREMEDIAÇÃO DE PICLORAM ASSOCIADA A FUNGOS MICORRÍZICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 01 de Março de 2013.



Lino Roberto Ferreira  
(Coorientador)



Maria Catarina Megumi Kasuya  
(Coorientadora)



Paulo César de Lima



Francisco Affonso Ferreira  
(Orientador)

Aos meus pais Sebastião e Maria Gorete,  
pelo carinho e incentivo.

Dedico

Aos familiares, amigos.

Ofereço

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Viçosa e ao Programa de Pós-graduação em Produção Vegetal do Departamento de Fitotecnia (DFT), pela oportunidade de realizar o mestrado;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Capes e a FAPEMIG, pelo apoio financeiro;

Ao professor Francisco Affonso Ferreira, pela confiança, pelos conselhos e pela orientação;

Aos coorientadores Lino Roberto Ferreira e Maria Catarina Megumi Kasuya;

A equipe de Manejo Integrado de Plantas Daninhas em especial aos estagiários por toda ajuda e aos amigos Daniel Valadão e a Christiane pelos conselhos, amizade e incentivo sempre;

Aos amigos do laboratório de Associações Micorrízicas;

Enfim, a todos que me ajudaram chegar até aqui. Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Fernanda Aparecida Rodrigues Guimarães, filha de Sebastião Tristão Guimarães e Maria Gorete Rodrigues Guimarães, nasceu em 08 de maio de 1984 em Viçosa, Minas Gerais.

Ingressou, em 2005, no curso de Agronomia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, graduando-se Engenheira Agrônoma em janeiro de 2010. Em março de 2011, iniciou o Mestrado em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, submetendo-se à defesa da dissertação em 01 de março de 2013.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	vi
ABSTRACT.....	viii
1. INTRODUÇÃO GERAL .....	01
1.1. LITERATURA CITADA .....	05
2.ATIVIDADE RIZOSFÉRICA DE ESPÉCIES FITORREMEIADORAS DE SOLO CONTAMINADO PICLORAM .....	09
2.1. RESUMO .....	09
2.2. INTRODUÇÃO .....	11
2.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	12
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	14
2.5. AGRADECIMENTOS .....	20
2.6. LITERATURA CITADA .....	20
3. CRESCIMENTO E ACÚMULO DE BIOMASSA DE <i>Piriformospora indica</i> E VIABILIDADE DE ESPOROS DE <i>Glomus clarum</i> SOB EFEITO DO PICLORAM.....	23
3.1. RESUMO .....	23
3.2. INTRODUÇÃO .....	25
3.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	27
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	28
3.5. AGRADECIMENTOS .....	34
3.6. LITERATURA CITADA .....	34
4. INOCULAÇÃO DE ESPÉCIES FITOREMEIADORAS DO PICLORAM COM FUNGOS MICORRIZICOS E ENDOFÍTICOS.....	38
4.1. RESUMO .....	38
4.2. INTRODUÇÃO .....	40
4.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
4.5. AGRADECIMENTOS .....	49
4.6. LITERATURA CITADA .....	49
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	53

## RESUMO

GUIMARÃES, Fernanda Aparecida Rodrigues M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2013. **Fitorremediação de picloram associada a fungos micorrízicos.** Orientador: Francisco Affonso Ferreira. Coorientadores: Lino Roberto Ferreira e Maria Catarina Megumi Kasuya.

O picloram é utilizado para o controle de plantas daninhas em pastagens, apresentando longo período residual no solo, podendo intoxicar plantios sucessivos de espécies sensíveis. A fitorremediação associada à atividade microbiana na rizosfera das plantas é uma alternativa para redução de resíduos deste herbicida no solo. Objetivou-se avaliar a atividade microbiana associada à rizosfera das plantas fitorremediadoras, a inoculação com fungos no potencial fitorremediador das espécies, o crescimento e acúmulo de biomassa de *Piriformospora indica* e a viabilidade de esporos de *Glomus clarum* sob efeito do picloram. No primeiro experimento foi avaliada a atividade microbiana de solos não rizosféricos e rizosféricos contaminados com picloram. Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial 5 x 2, sendo o primeiro fator, solos rizosféricos cultivados com *Urochloa brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays* e solos sem cultivo não rizosféricos autoclavado e não autoclavado, e o segundo fator constou-se da ausência e presença do picloram (0 e 240 g ha<sup>-1</sup>) em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. As espécies foram cultivadas por 60 dias, após esse período, o solo rizosférico foi coletado e aplicado o herbicida. Foi estimado o C-CO<sub>2</sub> evoluído do solo aos 4, 8, 12, 16, 20 e 24 dias de incubação. Aos 24 dias foi determinado o carbono da biomassa microbiana (CBM) e calculado o quociente metabólico (*q*CO<sub>2</sub>). No segundo experimento, foram avaliados o crescimento e acúmulo de biomassa do fungo endófito *P. indica* e a viabilidade de esporos de *G. clarum* na presença de cinco doses de picloram, 0, 30, 120, 240 e 480 g ha<sup>-1</sup>. O crescimento radial da colônia em placa de Petri foi avaliado a cada seis dias, durante 24 dias, quando foi determinada a matéria seca micelial. A viabilidade dos esporos de *G. clarum* foi avaliada aos 15 dias após a inoculação em solução contendo as doses do herbicida. No terceiro experimento, foram avaliadas espécies *U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays* e ausência e presença de picloram (0 e 240 g ha<sup>-1</sup>), aplicado em pré-emergência e associadas ou não à inoculação dos fungos *G. etunicatum* ou *P. indica*. Foram avaliados a matéria seca da parte aérea e volume e matéria seca radicular das espécies, após 60 dias de cultivo. Após a retirada da espécie fitorremediadora do solo, foi feito o bioensaio com *Phaseolus vulgaris*, foi determinada após 35 dias de cultivo, a intoxicação. No primeiro experimento, o picloram alterou o CO<sub>2</sub> evoluído e não se observou efeito sobre o CBM e *q*CO<sub>2</sub> para os solos rizosféricos das espécies. O solo rizosférico cultivado com *Z.*

*mays* apresentou maior atividade microbiana na presença do picloram e a atividade microbiana na rizosfera de *P. maximum* e *U. brizantha* foi menor na presença do herbicida que em solos não contaminados com herbicida, sugerindo uma menor contribuição rizosférica dessas espécies na degradação do picloram. No segundo experimento, as doses de picloram testadas não influenciaram o crescimento micelial até 24 dias após a inoculação. Entretanto, doses acima de 240 g ha<sup>-1</sup> influenciaram negativamente o acúmulo de biomassa de *P. indica*. O aumento das doses do herbicida reduziu a viabilidade dos esporos. A inoculação com os fungos *P. indica* e *G. etunicatum* contribuiu na fitorremediação do picloram pelas espécies *Z. mays* e *P. maximum* e que quando feita inoculação a aplicação do herbicida não reduz o volume radicular e a produção de matéria seca radicular de *P. maximum*.

## ABSTRACT

GUIMARÃES, Fernanda Aparecida Rodrigues M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March 2013. **Phytoremediation of picloram associated with mycorrhizal fungi**. Adviser: Francisco Affonso Ferreira. Co-advisers: Lino Roberto Ferreira and Maria Catarina Megumi Kasuya.

Picloram is used for weed control in pastures, it has long toxic residual properties in the soil and can be toxic for successive plantings of susceptible species. The phytoremediation associated with microbial activity in rhizosphere of the plants, is an alternative to reduce the herbicides residue in the soil. This study is aimed to evaluate the microbial activity associated with the rhizosphere of the plants phytoremediator, the inoculation with fungi in phytoremediation potential of species, the growth biomass accumulation of *Piriformospora indica* and viability of spores of *Glomus clarum* under the effect of picloram. In the first experiment the microbial activity in the rhizosphere and non-rhizosphere soils contaminated with picloram were evaluated. The treatments were arranged in a factorial scheme 5 x 2, the first factor, rhizosphere soils cultivated with *Urochloa Brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays* and rhizosphere soil uncultivated and autoclaved and non-autoclaved, and the second factor consisted of the absence and presence of picloram (0 and 240 g ha<sup>-1</sup>) in a completely randomized design with three replications. The species were grown for 60 days, after this period, the rhizosphere soil was collected and the herbicide applied. The C-CO<sub>2</sub> that evolved from the soil at 4, 8, 12, 16, 20 and 24 days of incubation was assessed. At 24 days the microbial carbon biomass (CBM) was assessed and the metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>) was calculated. The second experiment evaluated the growth and biomass accumulation of the endophytic fungus *P. indicatus* and the viability of spores of *G. clarum* in the presence of five levels of picloram: 0, 30, 120, 240 and 480 g ha<sup>-1</sup>. The radial growth of the colony in a Petri dish was assessed every six days for 24 days and the dry matter mycelium was determined. The viability of the spores of *G. clarum* was evaluated 15 days after inoculation with a solution containing the herbicide dose. In the third experiment, we evaluated the species *U. Brizantha*, *P. maximum* and *Z. mays* and the absence and presence of picloram (0 and 240 g ha<sup>-1</sup>) applied at pre-emergence, with associated or not to the inoculation of the fungus *G. etunicatum* or *P.indica*. The shoot dry matter, root dry matter and root volume of the species were evaluated after 60 days of cultivation. After the removal of soil ensiformis a bioassay with *Phaseolus vulgaris* was established after 35 days of cultivation to determine the intoxication. In the first experiment, the picloram changed the evolved CO<sub>2</sub> and didn't affect the CBM and qCO<sub>2</sub> for rhizosphere soils of the species. The rhizosphere soil cultivated with

*Z. mays* showed higher microbial activity in the presence of picloram, and the microbial activity in the rhizosphere of *P. maximum* and *U. Brizantha* soils were lower in presence of the herbicide than in the non-contaminated soils with herbicide, suggesting a lower contribution of these species in the rhizospheric degradation of picloram. In the second experiment, levels of picloram tested did not affect mycelial growth up to 24 days after inoculation. However, levels above 240 g ha<sup>-1</sup> negatively influenced the biomass accumulation of *P. indica*, increasing the levels of the herbicide reduced the viability of spores. The inoculation with the fungi *P. indica* and *G. etunicatum* helped in phytoremediation of picloram by the species *Z. mays* and *P. maximum* and when inoculation was made by a herbicide application it did not reduce the root volume and root dry matter production of *P. maximum*.

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A obtenção de sistemas de produção que permitam atingir altas produtividades é um dos objetivos para o desenvolvimento da agricultura. Em relação à pecuária brasileira, a disponibilidade de pastagens é um dos fatores de maior evidência, que possibilita a produção de carne bovina e de leite com um grau considerável de competição em termos de custo de produção e qualidade.

A infestação de plantas daninhas é um dos fatores que dificulta o manejo das pastagens brasileiras, uma vez que apresentam alta capacidade de competição com as gramíneas cultivadas, sendo que algumas espécies podem intoxicar o gado.

Entre os métodos de controle de plantas daninhas em pastagem, o químico é dos mais empregados com a finalidade de inibir o desenvolvimento e/ou provocar a morte delas, entretanto, este método deve ser associado a outras práticas de controle. Fluroxypyr + picloram, 2,4-D + picloram, e triclopyr são alguns dos herbicidas utilizados em pastagem (Silva et al., 2007).

O picloram (ácido 4-amino 3,5,6 triclora- 2-piridinacarboxílico), pertence ao grupo dos herbicidas mimetizadores de auxinas, quando aplicado em plantas sensíveis, induz a proliferação celular de tecidos e a interrupção do floema, impedindo o movimento dos fotoassimilados das folhas para o sistema radicular. Em consequência dos efeitos desses herbicidas, estão sintomas de intoxicação como, epinastia das folhas e retorcimento do caule, engrossamento das gemas terminais e morte da planta em poucos dias ou semanas (Silva et al., 2007).

Entretanto algumas espécies de plantas, como gramíneas, podem apresentar seletividade a herbicidas auxínicos, esta está relacionada ao arranjo do tecido vascular em feixes dispersos, sendo estes protegidos pelo esclerênquima, essa característica pode prevenir a destruição do floema. Além disso, a seletividade está relacionada a reações de aril hidroxilação que resulta na perda da capacidade auxínica destes herbicidas e ainda, algumas espécies de plantas podem excretar estes herbicidas para o solo através de seu sistema radicular (Silva et al., 2007).

O picloram é aplicado em pós-emergência das plantas daninhas para o controle de dicotiledôneas arbustivas ou arbóreas, apresenta longo período residual. Este residual limita o uso do mesmo no sistema integração lavoura-pecuária, uma vez que provoca intoxicação de culturas como soja, feijão e outras dicotiledôneas que podem utilizadas neste sistema (Silva et al., 2007). A movimentação deste herbicida no solo está associada a alguns fatores como o tipo e conteúdo de argila, o teor de matéria orgânica e a umidade

do solo, pois o mesmo apresenta moderada a baixa sorção às partículas de argila (Grover, 1971; Walker et al., 1992; Belo., 2011).

Quando comparado aos demais herbicidas aplicados em pastagens, o picloram apresenta um dos maiores períodos de atividade residual nos solos, impedindo o cultivo de várias espécies sensíveis, a curto e médio prazo, pois pode permanecer no solo até três anos após a aplicação (Santos et al., 2007). Outro problema relacionado a esse herbicida é que quanto mais tempo o herbicida permanece no solo, maior o risco de contaminação dos lençóis freáticos rasos (Bovey & Richardson, 1991; Belo et al., 2011).

Alternativas biológicas como a fitorremediação podem ser utilizadas para amenizar problemas ambientais relacionados a herbicidas com longo residual no solo (Pires et al., 2001; Carmo et al., 2008). No Brasil, algumas pesquisas sobre fitorremediação de herbicidas como tebuthiuron (Pires et al., 2003; 2005 e 2006; Belo, 2006), trifloxysulfuron-sodium (Procópio et al., 2005 ; Santos et al., 2007, Belo, 2006), sulfentrazone (Belo et al., 2011), imazetapyr e do imazapic (Souto, 2011), confirmam a ação fitorremediadora de algumas espécies. Em relação à fitorremediação do picloram, alguns trabalhos já foram citados (Carmo et al., 2008; Procópio et al., 2008; Belo et al., 2011).

A fitorremediação é baseada na tolerância de algumas espécies a certos compostos e principalmente na capacidade que algumas espécies possuem de acelerar a retirada de compostos tóxicos do solo e da água. Consiste no uso de plantas associadas a comunidades microbianas à rizosfera para degradar, assimilar, metabolizar ou desintoxicar metais, ou imobilizar hidrocarbonetos, pesticidas e solventes (Cunningam et al., 1996).

Entre os mecanismos responsáveis pela fitorremediação de compostos tóxicos estão a translocação diferencial para os tecidos da planta, a volatilização, a degradação parcial ou total, a transformação em compostos menos tóxicos (Accioly & Siqueira, 2000; Scramin et al., 2001; Pires et al., 2003). Além disso, pode estar relacionada também à liberação de exsudatos radiculares, os quais estimulam a atividade microbiana, degradando o composto no solo, processo conhecido como rizodegradação (Cunningham et al., 1996; Silva et al., 2007).

Este último mecanismo é favorecido porque a rizosfera é uma região de atividade e crescimento microbiano aumentado em relação a regiões do solo sem interferências de raízes, a qual suporta o crescimento de populações microbianas até 100 vezes maiores que a região não rizosférica (Souto, 2011). Os exsudados radiculares das plantas contribuem não só para o aumento do crescimento microbiano como determina a composição

microbiana da rizosfera. Esta composição depende da espécie, idade da planta e tipo de solo (Campbell, 1985; Costa et al., 2000), bem como de outros fatores, como a exposição da planta a compostos tóxicos (Cunningham et al., 1996; Fernandez et al., 2009).

Encontrar uma espécie com potencial fitorremediador de herbicidas mimetizadores de auxinas pode ser difícil, pois esses podem causar distúrbios fisiológicos levando ao fechamento estomático por meio da menor absorção de água pelo sistema radicular, reduzindo a turgescência foliar, as taxas transpiratórias e a intensidade de distúrbios variam com a espécie. Esse grupo de herbicidas pode alterar os aspectos fotossintéticos até mesmo de plantas consideradas tolerantes (Machado et al., 2006; Zhao & Wang, 2010; Belo et al., 2011). Algumas gramíneas *Uruchloa brizantha*, *Uruchloa decumbens*, *Panicum maximum*, *Eleusine coracana* e *Zea mays* apresentam potencial fitorremediador (Carmo et al., 2008; Belo et al., 2011), porém os resíduos de picloram no solo podem alterar as variáveis fisiológicas dessas espécies, não afetando entretanto a produção de matéria seca da parte aérea, indicando tolerância das espécies ao herbicida (Belo et al., 2011).

A ação fitorremediadora de *Eleusine coracana* em solos contaminados foi evidenciada também por Silva et al. (2010), avaliando a meia-vida do herbicida em solo Argissolo Vermelho-Amarelo (PVA) e em Latossolo Vermelho-Amarelo (LVA), onde *E. coracana* reduziu em 56,6% e 49% a meia-vida do picloram no LVA e PVA, respectivamente, em comparação com os solos sem cultivos.

A densidade populacional da espécie fitorremediadora também influencia o processo de fitorremediação, assim, 172 plantas por metro quadrado de *E. coracana* e 122 plantas por metro quadrado de *P. maximum* foram as mais eficientes na descontaminação de solo contaminado com picloram, quando comparado as densidades de 0, 172, 344 e 516 plantas por metro quadrado de Capim-pé-de-galinha-gigante e de 0, 122, 244 e 366 plantas por metro quadrado para *P. maximum* (Procópio et al., 2008; Procópio et al., 2009)

Vários trabalhos demonstram a contribuição das plantas na estimulação da atividade microbiana para a degradação de herbicidas (Santos et al., 2007; Fernandez et al., 2009; Santos et al., 2010). Através da avaliação da atividade microbiana na rizosfera, pode-se inferir sobre o papel da microbiota na remediação dos herbicidas. Essa atividade pode ser estimada, indiretamente, por diferentes variáveis, tais como respiração basal do solo, carbono da biomassa microbiana (CBM) e quociente metabólico ( $qCO_2$ ). Estes parâmetros já foram relatados em alguns estudos sobre fitorremediação de solos contaminados com herbicidas (Pires et al., 2005; Santos et al., 2007; Reis et al., 2008; Santos et al., 2010).

Além da avaliação da atividade microbiana, a caracterização e a identificação de microrganismos, com capacidade para metabolizar compostos potencialmente tóxicos como herbicidas foi relatada em alguns trabalhos (Roque & Melo, 2000; Dellamatrice et al., 2004; Procópio & Mello, 2006; Colla et al., 2008; Martinez et al., 2008; Mattos, et al., 2010).

Bactérias potenciais degradadoras de sulfentrazone, por exemplo, foram identificadas: *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* e *Methylobacterium radiotolerans*, assim como os fungos: *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp. (Martinez et al., 2008).

Quanto a solos contaminados com herbicidas derivados das triazinas (atrazine e simazine) foi verificada a presença de fungos filamentosos pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. O crescimento de tais fungos em meio contaminado com a atrazine indicou a possibilidade de utilização desses fungos para trabalhos de biorremediação (Colla et al., 2008).

Além destes microrganismos, os endofíticos podem aumentar a tolerância de plantas às moléculas químicas tóxicas, contribuindo para remoção de poluentes, ou ainda, através da produção de enzimas, as quais favorecem respostas bioquímicas a estresses (Pallu, 2011), sendo esta produção de enzimas citada como uma característica expressa por fungos endofíticos (Maki, 2006).

O *P. indica* é um fungo micorrízico facilmente cultivável em culturas axênicas que apresenta capacidade de acumular compostos tóxicos ou prevenir a absorção destes pelas plantas. Este coloniza muitas plantas de importância econômica, atuando como promotor de crescimento (Oelmüller, et al., 2009; Bdage et al., 2010).

Os fungos micorrízicos também podem contribuir para o processo de remediação, pois plantas micorrizadas apresentam extensão do sistema radicular e à maior extensão do micélio extra radicular, o que facilita absorção de íons e de água do solo, aumentando a retenção de compostos tóxicos (Safir et al., 1990; Paula et al., 2007; Amora-Lazcano et al., 2010).

Pesquisas mostram que a inoculação com FMAs é capaz de aumentar a capacidade da *U. decumbens* em extrair metais pesados do solo nas quantidades 845, 142, 68 e 54% para Cu, Pb, Zn e Cd, por exemplo, além de aumentar a produção de matéria seca desta espécie (Silva et al., 2006).

Diversas espécies com potencial fitorremediador do picloram foram descritas, no entanto, faltam pesquisas relacionadas à microbiota associada a tais espécies. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade microbiana associada à rizosfera de espécies com potencial fitorremediador do picloram. Considerando ainda, os benefícios de microrganismos para o processo de descontaminação objetivou-se, também, a avaliação da inoculação com os fungos *P. indica* e *G. etunicatum* no desenvolvimento e no potencial fitorremediador de resíduos de picloram pelas espécies *U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays* e ainda o crescimento e produção de biomassa de *P.indica* em meio de cultura com doses crescentes de picloram e a viabilidade de esporos de *G. clarum* em solução contendo o mesmo herbicida.

### 1.1. LITERATURA CITADA

AMORA-LAZCANO E. et al. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. Currente Research, Technology. and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial biotechnology. A Mendez –Vilas (Ed.). pp. 251-256, 2010.

ACCIOLY, A. M. A & SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v. 1. p. 299-352.

BDAGE, U.S. et al. Interaction of Mycobiont: *Piriformospora Indica* with Medicinal plant and plants of Economic importance. **African Journal of Biotechnology**, v. 9 n.54, p. 9214-9226, 2010.

BELO, A.F. Técnicas para fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2006, 66p.

BELO, A. F. et al. Atividade fotossintética de plantas cultivadas em solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 885-892, 2011.

BOVEY, R.W. & RICHARDSON, C.W. Dissipation of clopyralid and picloram in soil and seep flow in the black lands of Texas. **Journal of Environmental Quality**, v. 20, p. 528-531, 1991.

CAMPBELL, R. Plant microbiology, Baltimore, Edward Arnold, 1985.191p.

CARMO, M. L. et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 301-313, 2008.

COLLA, L. M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solos contaminados com herbicidas triazínicos. **Ciência e agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COSTA, M. A. et al. Degradação de ametrina em areia quartzosa com adição de solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 43-48, 2000.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, n. 1, p. 55-114, 1996.

DELLAMATRICE, P. M & MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n.6, p.999-1003, 2004.

FERNANDEZ, G. et al. Evolução de CO<sub>2</sub> e atividades enzimáticas em amostras de solo tratado com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 601-608, 2009.

GROVER, R. Adsorption of picloram by soil colloids and various other adsorbents. **Weed Science**, v. 19, n. 4, p. 417-418, 1971.

MACHADO, R. F. et al. Reflexos do mecanismo de ação de herbicidas na qualidade fisiológica de sementes e na atividade enzimática em plântulas de arroz. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 28, n. 3, p. 151-160, 2006.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARTINEZ, C. O. et al. Caracterização de bactérias e fungos envolvidos na degradação de sulfentazona em solos. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Meio Ambiente**, 22 p. Embrapa Meio Ambiente. 2008.

MATTOS, M. L.T. et al. Metodologia para obtenção de fungos degradadores do herbicida glifosato. **Embrapa Clima Temperado**, 2010. 24 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 308).

OELMÜLLER, R. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological application. **Symbiosis**, v.49, p.1-17, 2009.

PALLU, A. P. S. et al. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAULA, A. M. et al. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.805-811, 2007.

PIRES, F. R. et al. Uso da fitorremediação na descontaminação do solo. In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS, 23., 2001, Viçosa. **Resumos...** Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. p. 104.

PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.335-341, 2003.

PIRES, F.R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 711-717, 2005.

PIRES, F. R. et al. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 92-97, 2006.

PROCÓPIO, S.O. et al. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.

PROCÓPIO, A. R. L & MELO, I. S. Potencial biotecnológico de rizobactérias degradadoras de propanil. **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente: 07 e 08 de novembro de 2006**.

PROCÓPIO, S. O. et al. Fitorremediação de solo contaminado com picloram por capim-pé-de-galinha-gigante (*Eleusine coracana*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.32, p. 2517-2524, 2008.

PROCÓPIO, S. O. et al. Efeito da densidade populacional de *Panicum maximum* (cultivar Tanzânia) na fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 30, n. 2, p. 295-304, 2009.

REIS, M. R. et al. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 323-331, 2008.

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

SAFIR, G.R. et al. Vesicular arbuscular mycorrhizae in a waste water irrigated old field ecosystem in Michigan. **Plant and Soil**, v.121, p.87-196, 1990.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 259-265, 2007.

SANTOS, E. A. et al. Atividade rizosférica de solo tratado com herbicida durante processo de remediação por *Stizolobium aterrimum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 1, p. 1-7, 2010.

SCRAMIN, S. et al. Utilização de plantas na remediação de solos contaminados por herbicidas – levantamento da flora existente em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 369-371.

SILVA, S. et al. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1749-1757, 2006.

SILVA, A. A. et al. Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

SILVA; L. O. C. et al. Persistência e fitorremediação do picloram em dois solos brasileiros. **XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas** 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP

SOUTO, M.K. **Fitorremediação de solo de várzea contaminado com os herbicidas imazetapir e imazapique**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, 2011, 111p.

WALKER, A. et al. Influence of temperature, soil moisture and soil characteristics on the persistence of alachlor. **Pest Science**, v. 35, n. 1, p. 109-116, 1992.

ZHAO, G. W & WANG, J. H. Effect of auxin on mesocotyl elongation of dark-grown maize under different seeding depths. **Journal of Plant Physiology**, v. 57, n. 1, p. 79-86, 2010.

## 2. ATIVIDADE RIZOSFÉRICA DE ESPÉCIES FITORREMEIADORAS DE SOLO CONTAMINADO COM PICLORAM

### 2.1. RESUMO

O picloram apresenta longo período residual no solo e a fitorremediação pode ser uma alternativa para redução desses resíduos, podendo estar associada ao efeito exercido pela microbiota rizosférica. A atividade microbiana de solos não rizosféricos e rizosféricos contaminados com picloram foi avaliada, usando tratamentos organizados em esquema fatorial 5 x 2, sendo 5 tipos de cultivos, solos rizosféricos cultivado com *Urochloa brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays* e solos sem cultivo não rizosférico autoclavado e não autoclavado, combinados com ausência e presença (240 g ha<sup>-1</sup>) de picloram. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado com três repetições. As espécies foram cultivadas por 60 dias. Em seguida o solo rizosférico foi coletado e sob ele foi aplicado o herbicida. Estimou-se o C-CO<sub>2</sub> evoluído do solo aos 4, 8, 12, 16, 20 e 24 dias de incubação. Aos 24 dias foi determinado o carbono da biomassa microbiana (CBM) pelo método de irradiação por micro-ondas e calculado o quociente metabólico (qCO<sub>2</sub>). O herbicida alterou o C-CO<sub>2</sub> evoluído e não se observou efeito sobre o CBM e qCO<sub>2</sub> para os solos rizosféricos das espécies. A rizosfera de *Zea mays* apresentou maior atividade microbiana na presença do picloram e a atividade microbiana na rizosfera de *P. maximum* e *U. brizantha* foi menor na presença do herbicida que em solos não contaminados, sugerindo uma menor degradação rizosférica do picloram por essas espécies.

**Palavras chaves:** Fitorremediação, herbicida, rizosfera, respirometria

## **RHIZOSPHERIC ACTIVITY SPECIES OF PHYTOREMEDIATOR SOIL CONTAMINATED WITH PICLORAM**

### **2.2. ABSTRACT**

Picloram has long soil toxicity residuals and phytoremediation can be an alternative to reduce these wastes and may be associated with the effect exerted by the rhizospheric microbiota. Microbial activity in the rhizosphere and rhizosphere soils, not contaminated with picloram were evaluated using treatments arranged in a factorial scheme 5 x 2, 5 types of crops rhizosphere, soils cultivated with *Urochloa Brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays* and uncultivated soils and autoclaved rhizosphere and non-autoclaved combined with presence and absence of (240 g ha<sup>-1</sup>) picloram. We used a completely randomized design with three replications. The species were grown for 60 days. Then the rhizosphere soil was collected and under it was applied the herbicide. The C-CO<sub>2</sub> that evolved from the soil at 4, 8, 12, 16, 20 and 24 days of incubation was evaluated at 24 days. Microbial carbon biomass (CBM) was determined by the method of microwave irradiation and the metabolic quotient (qCO<sub>2</sub>) was calculated. The herbicide altered the evolved C-CO<sub>2</sub> and there was no effect on the CBM and qCO<sub>2</sub> for rhizosphere soils of the species. The rhizosphere of *Zea mays* showed higher microbial activity in the presence of picloram and microbial activity in the rhizosphere of *P. maximum* and *U. Brizantha* and it was lower in the presence of the herbicide in uncontaminated soils, suggesting a lower rhizospheric degradation of picloram by these species.

**Keywords:** Phytoremediation, herbicide, rhizosphere, respirometry

### 2.3. INTRODUÇÃO

A aplicação de herbicidas que apresentam efeito residual no solo se torna importante para aquelas culturas que possuem longo PCPI (período crítico de prevenção à interferência), promovendo redução dos custos do controle das plantas daninhas (Belo et al., 2011). Entretanto, a persistência no solo pode acarretar toxicidade em culturas sensíveis semeadas em sucessão, processo conhecido como “*carryover*” (Bovey et al., 1982).

Dentre os herbicidas utilizados em pastagens, destaca-se o picloram (ácido 4-amino 3,5,6 triclora- 2-piridinacarboxílico), aplicado em pós-emergência para o controle de dicotiledôneas arbustivas ou arbóreas (Silva et al., 2007). Apresenta longo período residual, podendo permanecer no solo por anos, causando intoxicação em culturas em sucessão como a soja, o feijão, o algodão e outras dicotiledôneas (D’Antonino et al., 2009), além de risco de contaminação dos lençóis freáticos rasos, devido à lixiviação (Bovey & Richardson, 1991; Belo et al., 2011).

Como alternativa para reduzir o residual do picloram no solo, destaca-se a fitorremediação, que se baseia no cultivo de espécies vegetais capazes de retirar compostos tóxicos do ambiente (solo e água), por fitodegradação ou fitoestimulação da microbiota associada as espécies capazes de metabolizar o produto, promovendo assim sua descontaminação (Cunningham et al., 1996). Para o picloram, Carmo et al. (2008) observaram que as gramíneas *U. brizantha*, *U. decumbens*, *P. maximum*, *E. coracana* e *Z. mays* apresentaram potencial para remediação.

A rizosfera é uma região de intensa atividade e crescimento microbiano aumentado em relação a regiões do solo sem interferência de raízes (Fernandez et al, 2009), a qual suporta o crescimento de populações microbianas até 100 vezes maiores que a região não rizosférica (Moreira & Siqueira, 2006). Os exsudados radiculares das plantas contribuem não só para o aumento do crescimento microbiano como determina a composição da rizosfera. Esta composição depende da espécie, idade da planta e tipo de solo (Costa et al., 2000), bem como de outros fatores, como a exposição da planta a compostos tóxicos (Cunningham et al., 1996; Fernandez et al., 2009).

Vários trabalhos demonstram a contribuição das plantas na estimulação da atividade microbiana para a degradação de herbicidas (Santos et al., 2007; Fernandez et al., 2009; Santos et al., 2010). Através da avaliação da atividade microbiana na rizosfera, pode-se inferir sobre o papel da microbiota na remediação dos herbicidas. Essa atividade

pode ser estimada, indiretamente, por diferentes variáveis, tais como respiração basal do solo, pelo carbono da biomassa microbiana (CBM) e pelo quociente metabólico ( $qCO_2$ ). Estes parâmetros já foram relatados em alguns estudos envolvendo solos contaminados com herbicidas (Pires et al., 2005; Santos et al., 2007; Reis et al., 2008; Santos et al., 2010).

Diversas espécies com potencial fitorremediador do picloram foram descritas, no entanto, faltam pesquisas relacionadas à microbiota associada a tais espécies. Portanto, o objetivo deste trabalho foi determinar a atividade microbiana associada à rizosfera de algumas destas espécies.

## 2.4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico de textura argilosa (56% argila, 6% silte e 38% areia). A análise química do solo apresentou pH (água) de 5,3; teor de matéria orgânica de 3,5 dag kg<sup>-1</sup>; P e K de 47,4 e 98 mg dm<sup>-3</sup> respectivamente; Ca, Mg, Al, H+Al, SB, CTC(t) e CTC (T); 2,2; 0,7; 0; 6,44; 3,15; 3,15 e 9,59 cmolc dm<sup>-3</sup> respectivamente.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com três repetições. Cada vaso com capacidade volumétrica de 3 L, preenchido com substrato, representou uma unidade experimental. Os tratamentos foram organizados em esquema fatorial 5 x 2, sendo que o primeiro fator foi constituído de solos rizosféricos de três espécies fitorremediadoras (*U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays*), e solos sem cultivo não rizosféricos autoclavado e não autoclavado, na ausência e presença (240 g ha<sup>-1</sup>) de picloram, correspondente a 1 L ha<sup>-1</sup> do produto comercial (Padron). As espécies vegetais foram cultivadas por 60 dias em solo sem resíduo de herbicida. Após esse período realizou-se a eliminação da parte aérea das plantas e foi coletado o solo aderido às raízes para aplicação do picloram. Amostras de solo mantidas sob as mesmas condições, mas sem cultivo, também foram coletadas para serem usadas como controle (solo não rizosférico). Posteriormente as essas amostras foram peneiradas em peneiras de malha de 2,0 mm. Metade das amostras do solo sem cultivo foram autoclavadas por 40 minutos a 121°C, uma única vez, com intenção de reduzir a população microbiana.

Os solos rizosféricos e não rizosféricos foram colocados em vasos de 280 cm<sup>3</sup>, onde em seguida foi aplicado o picloram. Foi usado um pulverizador costal pressurizado à CO<sub>2</sub>,

equipado com dois bicos TTI 110.02, espaçados 0,5 m de largura, mantidos a pressão de 200 kPa e volume de calda de 150 L ha<sup>-1</sup>.

Um dia após a aplicação do herbicida, retirou-se amostras de 100 g de solo dos vasos, ajustou-se a umidade para 80% da capacidade de campo, para a fase de respirometria. Essas amostras foram colocadas em um respirômetro para avaliar a respiração microbiana, carbono da biomassa microbiana (CBM), e o quociente metabólico ( $qCO_2$ ), conforme metodologia de Reis et al. (2008). A respiração microbiana foi estimada a partir da quantidade de CO<sub>2</sub> evoluído de amostras de 100 g do solo, capturado em frascos contendo 100 mL de NaOH (0,25 mol L<sup>-1</sup>), em sistema de fluxo de ar contínuo (isento de CO<sub>2</sub> e umidade). Dois frascos sem amostras de solo foram incubados, constituindo-se amostras em branco.

A taxa respiratória do solo foi avaliada aos 4, 8, 12, 16, 20, 24 dias de incubação por titulação indireta do NaOH com HCl (0,5 mol L<sup>-1</sup>), determinando-se o excesso de NaOH que não reagiu com o CO<sub>2</sub> evoluído das amostras de solo. A cada avaliação os frascos eram repostos com 100 mL de solução de NaOH (0,25 mol L<sup>-1</sup>).

Após 24 dias de incubação retirou-se 18 g de solo de cada frasco para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM). Esta foi determinada utilizando o método descrito por Vance et al. (1987), modificado por Islam & Weil (1998), no qual as amostras foram tratadas com radiação de micro-ondas por tempo previamente calculado (60 + 60 segundos), em vez da fumigação com clorofórmio.

O CBM foi extraído das amostras (irradiadas e não irradiadas) de solo com 80 mL da solução de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 M); em seguida, as amostras foram submetidas à agitação por 30 min, em mesa agitadora horizontal, permanecendo em repouso durante mais 30 min. Após o repouso, as amostras foram filtradas em papel Whatman nº 42. Em tubo digestor foi adicionado 10 mL do filtrado e os reagentes: 2 mL de solução de K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (0,0667 M) e 10 mL de solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. O volume foi completado para 100 mL e adicionadas oito gotas do indicador Ferroim. Em seguida, foi feita a titulação com solução 0,033 mol L<sup>-1</sup> de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> até mudança da cor para vermelho-vítreo. A partir dos valores obtidos da evolução do C-CO<sub>2</sub> e CBM, foi calculado o  $qCO_2$  ( $\mu\text{g C-CO}_2 \mu\text{g}^{-1}\text{CBM d}^{-1}$ ), dividindo-se a média diária do C-CO<sub>2</sub> evoluído do solo pelo CBM determinado no solo.

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas por meio do teste de Tukey  $P \leq 0,05$  de probabilidade de erro. Para analisar os efeitos do tempo de incubação na taxa respiratória do solo utilizou-se análise de regressão.

Os modelos foram escolhidos com base na significância dos coeficientes da regressão, testados pelo teste t, e no coeficiente de determinação.

## 2.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

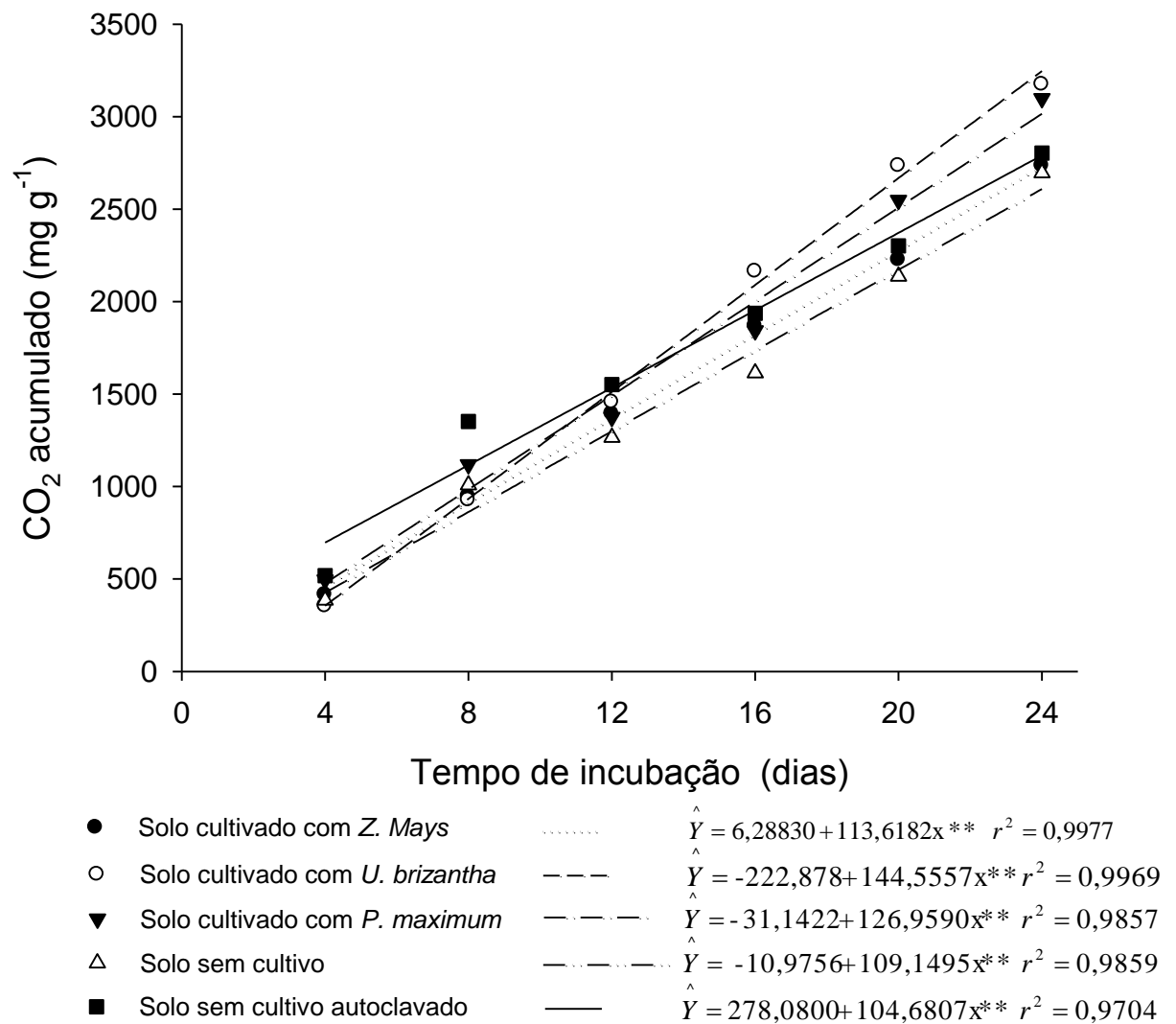
Houve interação entre o tipo de cultivo e herbicida influenciando o CO<sub>2</sub> evoluído por dia (Tabela 1). Como efeito herbicida, observou-se maior evolução diária para o solo cultivado com *Z. mays* na presença do picloram, não sendo verificado o mesmo para os demais tratamentos. Em relação ao tipo de cultivo constatou-se que, na ausência do picloram, não houve diferença, mas na presença do picloram os únicos tratamentos que diferiram entre si foram o solo cultivado com *Z. mays* e solo sem cultivo, com maior evolução diária de CO<sub>2</sub> para o solo cultivado.

**Tabela 1.** Evolução diária de CO<sub>2</sub> (µg g<sup>-1</sup> solo dia<sup>-1</sup>) na ausência e presença (240g ha<sup>-1</sup>) de picloram, em função dos tipos de cultivo do solo

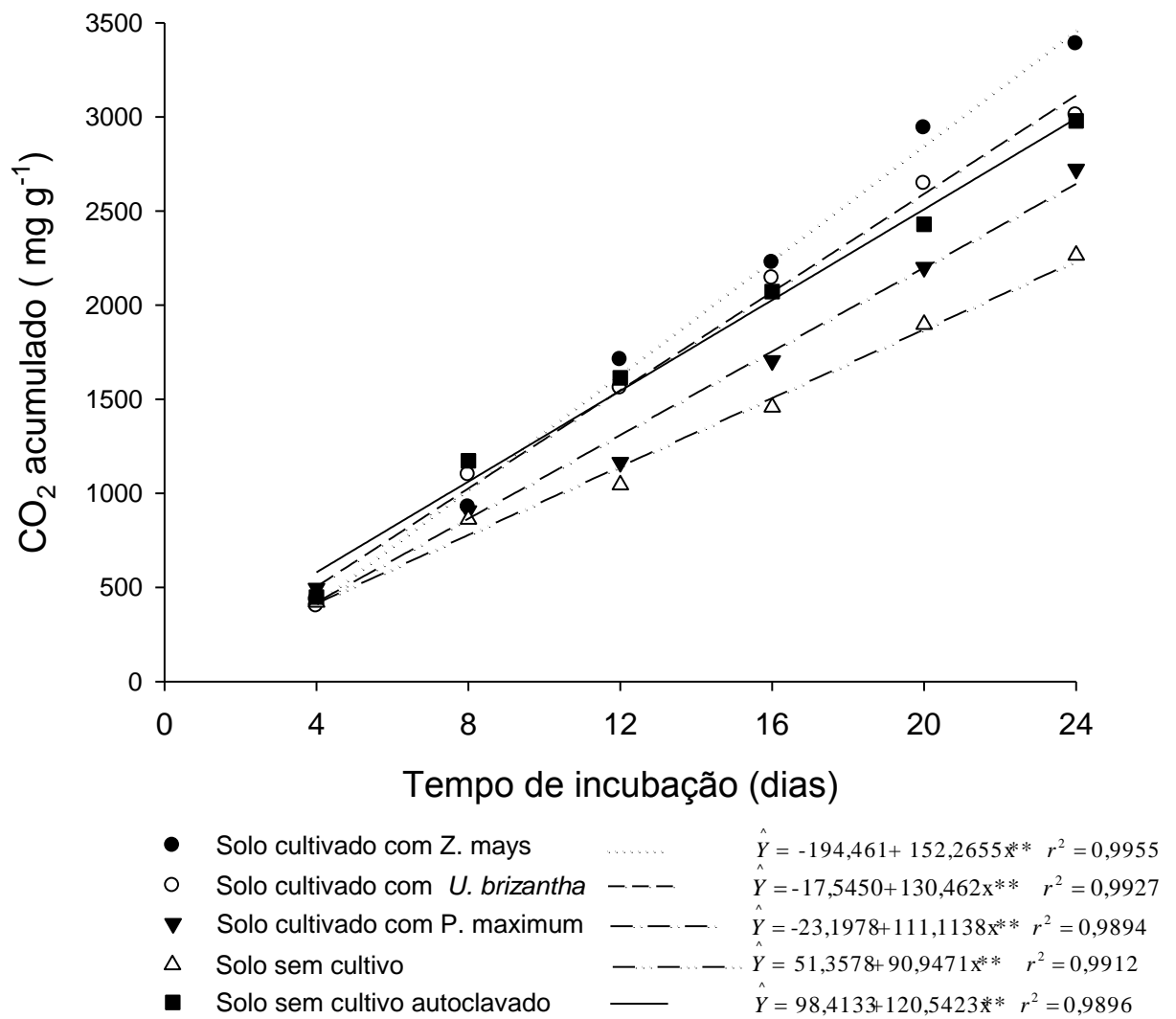
Tipos de cultivo	Ausência	Presença
	CO <sub>2</sub> (µg g <sup>-1</sup> solo dia <sup>-1</sup> )	
Rizosférico de <i>Zea mays</i>	105,80aB	160,03aA
Rizosférico de <i>Urochloa brizantha</i>	140,94aA	113,06abA
Rizosférico de <i>Panicum maximum</i>	129,10aA	113,44abA
Não rizosférico sem cultivo	112,29aA	94,34bA
Não rizosférico sem cultivo autoclavado	122,60aA	124,13abA
CV (%)	18,23	

Médias seguidas por letras iguais minúsculas na coluna e maiúsculas na linha não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Na quantificação do CO<sub>2</sub> evoluído ao longo de 24 dias de incubação, a liberação de CO<sub>2</sub> foi influenciada pelo tipo de cultivo do solo e pela presença do herbicida (Figuras 1 e 2). Analisando os diferentes tipos de cultivo dos solos (rizosféricos e não rizo-sféricos), ficou evidenciado maior desprendimento de CO<sub>2</sub> para o solo rizo-sférico de *U. brizantha* na ausência do herbicida, seguidos do solo rizo-sférico de *P. maximum* e solo sem cultivo autoclavado (Figura 1).



**Figura 1.** Evolução acumulada de CO<sub>2</sub> ausência do picloram, em solos de diferentes tipos de cultivos ao longo de 24 dias de incubação.



**Figura 2.** Evolução acumulada de CO<sub>2</sub> presença de picloram, em solo de diferentes tipos de cultivos ao longo de 24 dias de incubação.

O solo sem cultivo apresentou menor desprendimento do CO<sub>2</sub> tanto na ausência como na presença do herbicida comparado aos demais solos em estudo, mesmo comparado ao solo sem cultivo autoclavado (Figuras 1 e 2). A maior evolução de CO<sub>2</sub> do solo autoclavado em relação ao solo sem cultivo pode estar relacionada à morte dos microrganismos pela autoclavagem, com liberação de carbono que pode ser utilizado como fonte de energia para a microbiota sobrevivente. A menor atividade metabólica nos solos não rizosféricos pode ser explicada pela ausência de plantas no solo, não havendo atividade rizosférica e conseqüentemente o não fornecimento de C através da exsudação radicular das plantas, o que acarreta menor quantidade de microrganismos em relação aos solos rizosféricos (Sandmann & Loos, 1984; Reis, et al., 2008).

A análise da evolução de CO<sub>2</sub> de cada espécie em função da aplicação ou não do herbicida, mostrou que o solo rizosférico de *Z. mays* e o solo sem cultivo autoclavado apresentaram maior desprendimento de CO<sub>2</sub> na presença do herbicida (Figuras 2). Entretanto, para o solo rizosférico de *Z. mays* ficou evidenciada maior diferença entre o CO<sub>2</sub> evoluído sob efeito do picloram, observado pela maior inclinação da reta (coeficiente angular de 152,27) quando aplicado herbicida ( Figura 2).

Já foram relatados que para solos tratados com ametryn, atrazine e glyphosate, maiores taxas respiratórias foram encontradas em solos cultivados em relação ao controle, o que indica uma possível metabolização desses herbicidas pela biota do solo (Costa et al., 2000; Moreno et al., 2007; Reis et al., 2008). Reis et al., (2008) observaram maior quantidade de CO<sub>2</sub> evoluído em solos rizosféricos tratados com ametryn, trifloxysulfuron-sodium e ametryn+trifloxysulfuron-sodium. Esses herbicidas provocaram desequilíbrio na comunidade microbiana, inibindo populações específicas, indicando, segundo Sakamoto & Obo (1994), que houve a utilização da biomassa microbiana dessas células mortas como fonte de C e energia, aumentando, conseqüentemente, a liberação de CO<sub>2</sub>.

A maior evolução de CO<sub>2</sub> foi observada no solo contaminado com herbicida e cultivado com *Z. mays* pode estar relacionada ainda à maior concentração de microrganismos e abundância de exsudados provenientes do desenvolvimento da espécie vegetal, o que pode ser atribuído à fitoestimulação da microbiota associada à rizosfera (Santos et al., 2010). Outra possibilidade seria que a microbiota associada às raízes de *Z. mays* seja capaz de além de tolerar o picloram, utilizá-lo como substrato para seu metabolismo, como já foi relatado para as espécies *Kochia scoparia*, fitorremediadora de atrazine (Anderson & Coats, 1995; Perkovich et al., 1995) e para feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) em solo contaminado com tebuthiuron (Pires et al., 2005).

Elevados valores de CO<sub>2</sub> desprendido pode ser um indicativo de adaptação da microbiota nativa à presença do herbicida (Pires et al., 2005).

A elevada respiração basal do solo nem sempre pode estar relacionada a efeitos benéficos sobre os microrganismos. Não só a mudança no metabolismo microbiano, como também a degradação de compostos usados como fonte de nutriente ou intoxicação por xenobióticos, diminuem a eficiência de utilização do carbono, promovendo em ambos os casos aumento na emissão de CO<sub>2</sub> (Santos et al., 2007).

O comportamento da evolução de CO<sub>2</sub> do solo cultivado com *P. maximum* e *U. brizantha* foi semelhante ao solo sem cultivo, sendo verificada menor evolução de CO<sub>2</sub> na presença do herbicida comparado a ausência do herbicida (Figura 1 e 2). Isto pode ser um indicativo que a detoxificação do picloram por esta espécie talvez esteja mais associada à fitodegradação e à tolerância que essa espécie exibe ao herbicida do que à contribuição rizosférica (Pires et al., 2005).

Resultados semelhantes foram obtidos por Alvey & Crowley (1996) na mineralização do atrazine em solos cultivados com *Z. mays* e para mineralização do tebutiuron em solos cultivados com *Pennisetum americanum* e *Estizolobium Aterrimum*, de acordo com o Pires et al. (2005). Em ambos não houve diferença na evolução do CO<sub>2</sub> entre solos cultivados e não cultivados, quando tratados com os herbicidas. A menor evolução de CO<sub>2</sub> dos solos cultivados com *P. maximum* e *U. brizantha*, pode ser devido ao efeito tóxico do picloram sobre a microbiota, reduzindo a respiração basal.

Práticas agrícolas, como a aplicação de herbicidas, podem gerar efeitos negativos no solo, os quais podem ser verificados através da avaliação do carbono associado à biomassa microbiana. Não houve interação entre os fatores tipo de cultivo solo e presença ou ausência do herbicida, sobre o CBM (Tabela 2). A alteração ou não do CBM do solo depende de diversos fatores, como do herbicida e dose aplicada, do tipo de solo, da espécie da planta e da microbiota e suas interações. Desta maneira, nem sempre a aplicação de herbicidas leva a alterações do CBM do solo (Reis et al., 2008).

Para análise dos fatores isolados, o carbono proveniente da biomassa microbiana das amostras de solo foi influenciado somente pelo tipo de cultivo (Tabela 2). Evidenciou-se maior valor para o solo cultivado com *Z. mays*, para os demais solos não foi verificada diferença para o CBM.

**Tabela 2.** Carbono da biomassa microbiana (CBM -  $\mu\text{g g}^{-1}$  solo) e quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ - $\mu\text{g g}^{-1}$  dia<sup>-1</sup> de  $\text{CO}_2$  por  $\mu\text{g g}^{-1}$  de CBM) após aplicação de picloram em solos rizosféricos e sem cultivo, após incubação por 24 dias

Tipos de cultivos	CBM	$q\text{CO}_2$
	Rizosférico de <i>Z. ea mays</i>	266,80 a <sup>1</sup>
Rizosférico de <i>Urochloa brizantha</i>	161,14 b	1,03ba
Rizosférico de <i>Panicum maximum</i>	159,21 b	0,81ba
Não rizosférico sem cultivo	135, 57b	1,08ba
Não rizosférico sem cultivo autoclavado	79,61 b	1,718a
Picloram		
Ausência	143,39 a	0,99 a
Presença (240 g ha <sup>-1</sup> )	177,54 a	1,06 a
CV (%)	37,90	61,60

<sup>1/</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Considerando que os herbicidas podem influenciar positiva ou negativamente a microbiota do solo levando à redução ou aumento da biomassa microbiana e/ou da taxa respiratória, estimar os efeitos de estresse sobre a biota do solo, por meio somente desses dois parâmetros nem sempre tem se mostrado o mais indicado (Reis et al., 2008). Deste modo, recomenda-se avaliações mais representativas como o quociente metabólico ( $q\text{CO}_2$ ), o qual resulta da relação entre o  $\text{CO}_2$  liberado e o total da biomassa microbiana por unidade de tempo. Menores valores  $q\text{CO}_2$  estão relacionados a maior estabilidade do CBM e da matéria orgânica no solo, ou seja, o C que não é perdido como  $\text{CO}_2$  pela respiração é incorporado aos tecidos microbianos (Anderson & Domsch, 1985; Reis et al., 2008).

Foi observado maior  $q\text{CO}_2$  para o solo não rizosférico autoclavado, entretanto, o solo rizosférico de *Z. mays* foi o único que diferiu deste, apresentando menor quociente metabólico, o que indica maior estabilidade da biomassa microbiana associada a esta espécie (Tabela 2).

Alguns trabalhos evidenciaram maiores valores de  $q\text{CO}_2$  em solos submetidos a aplicação de herbicidas, indicando menor eficiência na utilização de C pela microbiota edáfica (Santos et al., 2007; Santos et al., 2010). No entanto, neste trabalho não foi observada diferença significativa nos valores do  $q\text{CO}_2$  quando aplicado o herbicida (Tabela 2).

O único fator alterado pela presença do herbicida foi a evolução de CO<sub>2</sub>, entretanto através da análise isolada desta não se pode concluir efeitos do picloram sobre a microbiota. Assim, como a aplicação do picloram não provocou nenhum efeito sobre o CBM e sobre o qCO<sub>2</sub> nos solos rizosféricos das espécies que apresentam potencial para fitorremediação do mesmo, isto indica contribuição rizosférica para descontaminação de solos tratados com picloram. Entretanto, a rizosfera de *Z. mays* milho apresentou maior atividade microbiana na presença do picloram e a atividade microbiana em rizosfera de *P. maximum* e *U. brizantha* foi menor na presença do herbicida que em solos não tratados, sugerindo uma menor contribuição rizosférica dessas espécie na rizodegradação do picloram. Indica que a espécie vegetal afeta a atividade rizosférica, podendo interferir na rizodegradação.

Conclui-se que a atividade rizosférica na fitorremediação do picloram dos solos cultivados com *P. maximum* e *U. brizantha* é menor que a atividade rizosférica dos solos cultivados com *Z. mays* e que o picloram não afeta o CBM e qCO<sub>2</sub> de nenhum solos.

## 2.6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Capes e a FAPEMIG pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

## 2.7. LITERATURA CITADA

ALVEY, S. & CROWLEY, D. E. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. **Environmental Science & Technology**, v.27, p. 1596-1603, 1996.

ANDERSON, T. H & DOMSCH, K. H. Determination of ecophysiological maintenance carbon requirements of soil microorganisms in a dormant state. **Biology and Fertility of Soils**, v. 1, n. 2, p. 81-89, 1985.

ANDERSON, T. A. & COATS, J. R. Screening rhizosphere soils amples for the ability to mineralize elevated concentrations of atrazine and metolachlor. **Journal of Environmental Science and Health**, v.30, p. 473-484, 1995.

BELO, A. F.et al. Atividade fotossintética de plantas cultivadas em solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 885-892, 2011.

BOVEY, R. W. et al. Soil persistence of tebuthiuron in the Clay pan Resource Area of Texas. **Weed Science**, v. 30, n. 2, p. 140-144, 1982.

- BOVEY, R.W. & RICHARDSON, C.W. Dissipation of clopyralid and picloram in soil and seep flow in the black lands of Texas. **Journal of Environmental Quality**, v. 20, p. 528-531, 1991.
- CARMO, M. L. et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 301-313, 2008.
- COSTA, M. A. et al. Degradação de ametrina em areia quartzosa com adição de solo rizosférico de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 24, p. 43-48, 2000.
- CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, n. 1, p. 55-114, 1996.
- D'ANTONINO, L. et al. Efeitos de culturas na persistência de herbicidas auxínicos no solo. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 371-378, 2009.
- FERNANDEZ, G. et al. Evolução de CO<sub>2</sub> e atividades enzimáticas em amostras de solo tratado com herbicidas. **Planta Daninha**, v. 27, n. 3, p. 601-608, 2009.
- ISLAM, K. R & WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, n. 4, p. 408-416, 1998.
- MORENO, J. L. et al. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. **Applied Soil Ecology**, v. 35, n. 1, p. 120-127, 2007.
- MOREIRA, F. S. M & SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras, UFLA, 2006.
- PERKOVICH, B. S. et al. Enhanced mineralization of [<sup>14</sup>C] atrazine in *Kochia scoparia* rhizospheric soil from a pesticide contaminated site. **Pesticide Science**, v. 46, p. 391-396, 1996.
- PIRES, F. R. et al. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, p. 627-634, 2005.
- REIS, M. R. et al. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 323-331, 2008.
- SAKAMOTO, K & OBO, Y. Effects of fungal to bacterial ratio on the relationship between CO<sub>2</sub> evolution and total soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, v. 17, n. 1, p. 39-44, 1994.
- SANDMANN, E. R & LOOS M. A. Enumeration of 2,4-D degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media: high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Chemosphere**, v. 13, n. 9, p. 1073-1084, 1984.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 259-265, 2007.

SANTOS, E. A. et al. Atividade rizosférica de solo tratado com herbicida durante processo de remediação por *Stizolobium aterrimum*. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 40, n. 1, p. 1-7, 2010.

SILVA, A. A. et al. Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

VANCE, E. D. et al. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703-707, 1987.

### **3. CRESCIMENTO E ACÚMULO DE BIOMASSA DE *Piriformospora indica* E VIABILIDADE DE ESPOROS DE *Glomus clarum* SOB EFEITO DO PICLORAM**

#### **3.1. RESUMO**

O picloram é utilizado para o controle de plantas daninhas dicotiledôneas em pastagens e apresenta longo período residual no solo, podendo intoxicar plantios sucessivos de espécies sensíveis. O crescimento de diversos fungos filamentosos em meio contaminado com herbicidas indica a possibilidade de utilização de fungos no processo de biorremediação. O crescimento e acúmulo de biomassa do fungo micorrízico *Piriformospora indica* e a viabilidade de esporos de *Glomus clarum* foram avaliados na presença de cinco doses de picloram, 0, 30, 120, 240 e 480 g ha<sup>-1</sup>. Discos de 0,9 cm de diâmetro contendo micélio crescido foram transferidos para placas de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo meio de cultura acrescido das doses do herbicida. O crescimento radial da colônia foi avaliado a cada seis dias, durante 24 dias, quando foi determinada a massa seca micelial. Avaliou-se também o efeito das doses de picloram sobre a viabilidade dos esporos aos 15 dias após a inoculação em solução de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) 1g L<sup>-1</sup>. As doses de picloram testadas não reduziram o crescimento micelial até 24 dias após a inoculação. Entretanto reduziu o acúmulo de biomassa de *P. indica* em relação ao tratamento sem herbicida e o aumento das doses do herbicida reduziu também a viabilidade dos esporos de *G. clarum*. Conclui-se que o herbicida não interfere no crescimento radial de *P. indica* e interfere negativamente na viabilidade de esporos de *G. clarum*.

**Palavras chaves:** Crescimento radial, fungos, herbicida

**GROWTH AND ACCUMULATION OF BIOMASS OF *Piriformospora indica*  
AND FEASIBILITY OF SPORES IN EFFECT FROM *Glomus clarum* OF  
PILCORAM**

**3.2. ABSTRACT**

Picloram is used to control dicotyledonous weeds in pastures and has long residual soil toxicity for successive plantings of susceptible species. The growths of several filamentous fungi in contaminated mediums with herbicides indicate the potential use of these fungi in the bioremediation process. The growth and biomass accumulation of mycorrhizal fungus *Piriformospora indica* and the viability of spores of *Glomus clarum* were evaluated in the presence of five levels of picloram, 0, 30, 120, 240 and 480 g ha<sup>-1</sup>. Discs of 0.9 cm diameter containing mycelia grown were transferred to Petri dishes of 9.0 cm diameter, containing culture medium with levels of the herbicide. The radial growth of the colony was evaluated every six days, for 24 days, when it was determined that it reached mycelial dry weight. Also assessed were the levels and effects of picloram on the viability of spores, at 15 days after the inoculation of a solution of iodinitrotetrazolium chloride (INT) 1g L<sup>-1</sup>. The levels of picloram tested did not reduce the mycelial growth up to 24 days after inoculation. However, it reduced the biomass accumulation of *P. indica* in relation to the treatment without herbicide, and increased herbicide rates also reduced the viability of spores of *G. clarum*. It is concluded that the herbicide does not interfere with the radial growth of *P. indica* and impairs the viability of spores of *G. clarum*.

**Keywords:** Radial growth, fungi, herbicide

### 3.3. INTRODUÇÃO

Entre os compostos tóxicos presentes no solo, destacam-se alguns herbicidas de longo período residual, que ocasionam danos ambientais nos ecossistemas edáfico e aquático, afetando, por exemplo, o desenvolvimento de organismos não alvo, como microrganismos do solo (Rosa et al., 2010). Um exemplo de herbicida de longo residual no solo é o picloram, que é muito utilizado em pastagens, podendo permanecer no solo por até três anos, causando danos em culturas sucessoras sensíveis (Silva et al., 2007).

Nesse contexto, são fundamentais estudos de técnicas que possibilitem a despoluição de áreas, reduzindo os efeitos de tais produtos sobre a microbiota do solo. Uma alternativa para a descontaminação é a fitorremediação. Entre diversos mecanismos responsáveis pela remediação, os mais relatados na literatura são a extração, promovida pela própria planta (Susarla et al., 2002) e a fitoestimulação. Na fitoestimulação a planta remediadora libera no solo compostos que estimulam a microbiota rizosférica a metabolizar o xenobiótico, processo conhecido como rizodegradação (Santos et al., 2007).

Diversas pesquisas têm demonstrado que os microrganismos do solo associados às plantas aumentam a eficiência do processo de remediação (Barac et al., 2004; Lamego e Ribas, 2007; Nakatani et al., 2008; Souza et al., 2011). Neste sentido, microrganismos endofíticos podem aumentar a tolerância de plantas às moléculas químicas tóxicas, contribuindo para remoção de poluentes ou produzindo enzimas, que favorecem respostas bioquímicas a estresses (Maki, 2006; Pallu, 2011). Estes microrganismos são encontrados dentro do tecido vegetal sem, entretanto, causar qualquer efeito sintomático (Petrini, 1991).

Além da associação com microrganismos endofíticos, as espécies vegetais formam associação simbiótica com alguns fungos Glomeromycota, como as micorrizas arbusculares (FMAs). Estas podem contribuir em programas de fitorremediação, pois se associam com cerca de 80 a 90 % das plantas terrestres (Amora-Lazcano et al., 2010).

O *P. indica* é um fungo micorrízico facilmente cultivável em culturas axênicas, que coloniza muitas plantas de importância econômica, incluindo espécies arbóreas da agrosilvicultura, hortícolas e da floricultura (Oelmüller, et al., 2009). Atua como promotor de crescimento (Bdage et al., 2010), além de apresentar aplicabilidade em programas de fitorremediação, pois microrganismos endofíticos podem acumular e/ou metabolizar compostos tóxicos ou prevenir a absorção destes pelas plantas (Amora-Lazcano et al., 2010).

Já foi relatado que fungos micorrízicos presentes em áreas de “landfarming” (método de biorremediação que consiste na degradação biológica de resíduos em uma camada superior de solo, que é periodicamente revolvida para haver aeração), por exemplo, podem proteger as

plantas contra os efeitos tóxicos desses poluentes, além de estimular a degradação de compostos tóxicos no solo (Binet et al., 2000; Liu et al., 2004; Paula et al., 2007; Nakatani et al., 2008) ou, ainda, melhorar o estado nutricional e reduzir o efeito tóxico dos compostos (Siqueira et al., 1991; Binet et al., 2000). Plantas micorrizadas, também, podem apresentar maior sistema radicular, aumentando a capacidade de absorção de íons e de água do solo, aumentando também a retenção de compostos tóxicos, que estão relacionadas à maior extensão do micélio extraradicular (Safiret al., 1990; Paula et al., 2007; Amora-Lazcano et al., 2010).

Entre as técnicas utilizadas para avaliar a tolerância e capacidade de degradação dos microrganismos a herbicidas, estão o isolamento de microrganismos de solo contaminado e o crescimento de microrganismos em meio de cultura contaminado com estes compostos.

O isolamento de microrganismos diretamente de solos contaminados já foi relatado em alguns trabalhos (Colla et al., 2008; Mattos et al., 2008; Martinez et al., 2010). Entretanto, apesar dos locais contaminados atuarem como um meio de cultivo seletivo para os microrganismos, por permanecerem somente aqueles microrganismos adaptados ao poluente, muitas vezes não é possível o isolamento e o crescimento dos mesmos em meio de cultura (Muyzer et al., 1993), o que dificulta a utilização destes microrganismos resistentes a compostos tóxicos em programas de biorremediação. Assim, o crescimento de microrganismos já isolados em meio de cultura contaminado com compostos tóxicos é uma alternativa para determinar o potencial que muitos microrganismos apresentam para a degradação de tais produtos.

A seleção de fungos inoculantes específicos são características que podem contribuir para o sucesso da estabilização de plantas em áreas contaminadas (Bertolazi et al., 2010) e a abundância e viabilidade de propágulos como esporos de fungos micorrízicos determinam a persistência dos FMAs no solo em situações adversas, como aquelas oriundas de modificações no uso do solo, como aplicação de agrotóxicos (Brundrett et al., 1996). Por isso é importante avaliar os efeitos de compostos tóxicos sobre esses propágulos.

Considerando os possíveis benefícios oriundos da associação das plantas com os fungos *G. clarum* e *P. indica* no desenvolvimento das plantas e conseqüentemente no processo de fitorremediação de compostos tóxicos no solo, como picloram, e ainda a carência de informação sobre o efeito de herbicidas sobre tais microrganismos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o crescimento e produção de biomassa de *P.indica* e a viabilidade de esporos de *G. clarum* sob doses crescentes de picloram.

### 3.4. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos em laboratório em condições controladas conforme descrito a seguir.

#### a) *Piriformospora indica*

Foram avaliadas cinco doses de picloram, 0, 30, 120, 240 e 480 g ha<sup>-1</sup> no crescimento e produção de biomassa *in vitro* do fungo *P. indica*, utilizando-se o delineamento em blocos casualizados, com seis repetições.

O herbicida Padron na concentração de 240 g L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo picloram foi filtrado, em filtro biológico (milipore 0,22 µm), posteriormente foi diluído em água destilada autoclavada, considerando para diluição um volume de calda de 100 L ha<sup>-1</sup> e dose de 240 g ha<sup>-1</sup> de picloram. Desta solução diluída foram preparadas as doses, sendo colocados 0; 15,9; 31,8; 63,6 e 127,2 µL separadamente em cada placa, correspondendo às doses citadas anteriormente, calculada em função da área da placa utilizada.

O fungo *P. indica* foi multiplicado previamente em placas de Petri em meio de cultura BDA (Batata-Dextrose-Agar) e incubados a 25 °C por 15 d. Posteriormente, um disco de 0,9 cm de diâmetro contendo micélio crescido foi transferido para o centro de cada placa de Petri de 9,0 cm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de cultura (BDA) acrescido, ou não, de diferentes doses do picloram. As placas foram incubadas em estufa do tipo BOD, a 25 °C, no escuro. A cada seis dias foram efetuadas medições do crescimento radial das colônias, até que a colônia de um dos tratamentos ocupasse todo o diâmetro da placa. As avaliações do crescimento radial do micélio foram realizadas com o auxílio de uma régua, medindo-se o diâmetro da colônia em dois sentidos perpendiculares, previamente marcados.

Após a última avaliação do crescimento foi determinada a matéria seca micelial. Para esta determinação, o meio de cultura com micélio fungico foi colocado em cerca de 250 mL de água e levado ao forno de micro-ondas até a solubilização total do ágar. Logo após, a matéria úmida foi recolhida em recipiente de massa conhecida, colocadas em estufa a 70 °C, até obtenção da massa constante.

#### b) *Glomus clarum*

Esporos de *G. clarum* foram multiplicados em raízes de cenoura em meio mínimo. Para a extração dos mesmos, o meio foi cortado em fragmentos de 1 cm<sup>2</sup>, os quais foram transferidos para um Becker autoclavado contendo 50 mL de tampão citrato. A solução foi mantida em banho maria a 30 °C por 30 min.

O efeito das doses de picloram sobre a viabilidade dos esporos também foi avaliado, utilizando delineamento em blocos casualizados com cinco repetições, para as mesmas doses citadas anteriormente. Após a extração dos esporos e obtenção da suspensão, 50 µL da suspensão de esporos foram distribuídos individualmente em orifícios de uma placa de ELISA. O Padron na concentração de 240 g L<sup>-1</sup> do ingrediente ativo de picloram foi filtrado em filtro biológico (miliopore 0,22 µm) e diluído em água autoclavada, considerando para diluição um volume de calda de 100 L ha<sup>-1</sup> e dose de 240 g ha<sup>-1</sup> de picloram. As doses foram preparadas da mesma forma citada anteriormente e calculadas em função do diâmetro dos orifícios da placa (0,7 cm), sendo colocado o equivalente a 0,048; 0,096; 0,193; 0,385 e 0,77 µL da solução diluída separadamente em cada orifício da placa. Posteriormente as placas foram mantidas em estufa do tipo BOD, a 25 °C, por 15 d.

A avaliação da viabilidade foi feita aos quinze dias após a incubação, pela adição de 50 µL de solução de cloreto de iodonitrotetrazólio (INT) 1 g L<sup>-1</sup> (Lima et al., 2007) em cada orifício das placas de ELISA. Estas foram deixadas em temperatura ambiente e na ausência de luz por 24 h. Foram considerados viáveis os esporos que reagiram com o INT, ficando avermelhados, e considerados não viáveis aqueles sem conteúdo celular ou com conteúdo citoplasmático que não reagiram com o INT, mantendo sua coloração natural (Walley & Germida, 1995; Lima et al., 2007). Foi realizada a contagem dos esporos viáveis e não viáveis, sendo calculada a porcentagem de esporos viáveis.

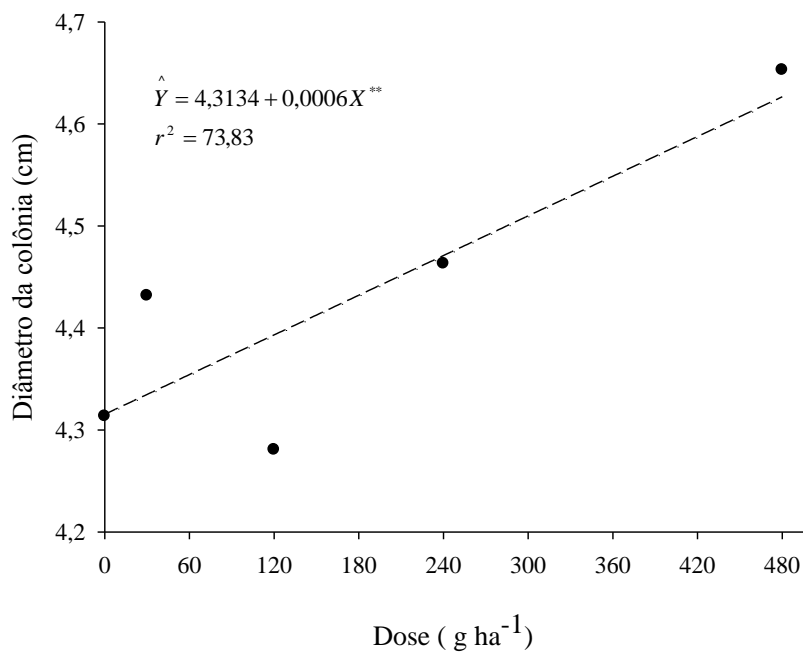
Os dados foram submetidos à análise de variância e em seguida foi feita a análise de regressão para os dados.

### **3.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O crescimento e acúmulo de biomassa de *P. indica* e a viabilidade de *G. clarum* sob efeito do picloram estão representados nas Figuras de 1 a 4.

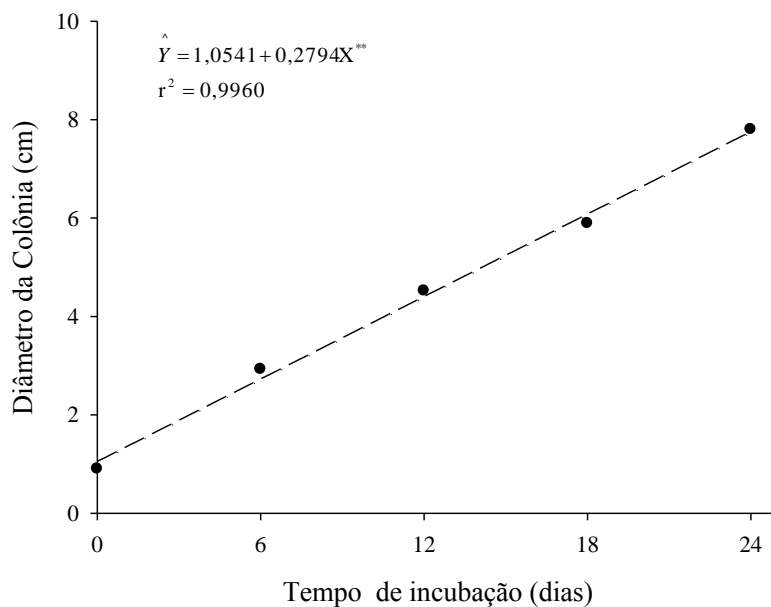
Houve efeito da dose e tempo de incubação sobre o crescimento radial do micélio, não sendo observada interação entre os dois fatores. Na análise isolada dos fatores, o crescimento radial do micélio de *P. indica* apresentou comportamento linear crescente em função da dose (Figura 1) e do tempo de incubação (Figura 2). Este comportamento pode ser um indicativo de utilização do herbicida como fonte de nutriente e ainda capacidade de adaptação do fungo na presença do herbicida, considerando que a maior dose utilizada correspondeu a duas vezes a dose recomendada pelo fabricante. Para o fungo *Mycelia sterilia* foi observado comportamento semelhante em concentrações elevadas de glyphosate (Mattos et al., 2010). Em meio de cultura suplementado com sulfentrazone na concentração de 0,7 µg g<sup>-1</sup>, os fungos

*Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp e as linhagens bacterianas *Ralstonia pickettii*, *Acinetobacter calcoaceticus* e *Rhizobium radiobacter* também foram selecionadas como potenciais degradadoras, por apresentar crescimento em dose do herbicida de até 10 vezes superior à dose de campo (Martinez et al., 2008).



**Figura 1.** Crescimento radial do micélio de *Piriformospora indica* em função da dose de picloram.

\*\*Significativo pelo teste “t” a 1% de probabilidade de erro



**Figura 2.** Crescimento radial do micélio de *Piriformospora indica* em função do tempo de incubação.

\*\*Significativo pelo teste “t” a 1% de probabilidade de erro.

Para solo contaminado com 2,4-D, os fungos como *Serratia marcescens* e *Penicillium sp.* apresentaram um grande potencial para biorremediação, quando analisados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (Silva et al., 2007). Fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meios contendo atrazine na concentração de 50 ppm, indicando a possibilidade de serem usados em estudos de biorremediação de solos contaminados com herbicidas derivados das triazinas através do uso das técnicas de bioaumento (Colla et al., 2008). Como comportamento semelhante foi apresentado pelo *P. indica* em meio contaminado com picloram, indicando que o mesmo pode ser utilizado para remediação deste herbicida utilizando a mesma técnica.

O tryclopyr e 2,4-D, herbicidas com mecanismos de ação semelhante ao do picloram, reduziram significativamente o crescimento radial de espécies de fungos ectomicorrízicos em concentrações maiores que 1000 ppm e nenhuma das espécies de fungos apresentou um crescimento maior na presença desses herbicidas (Estok et al., 1989), o que difere do resultado encontrado neste trabalho, onde o crescimento do fungo em estudo não foi inibido pelo herbicida. Por outro lado, Ibola (1978) encontrou que o 2,4-D teve pouco efeito sobre o crescimento da colônia dos fungos *Tricholoma saponaceum*, *T. pessundatum* e *Amanita citrina* a uma concentração de 10 ppm. Os herbicidas butafenacil, 2,4-D, metribuzim, S-metolachlor

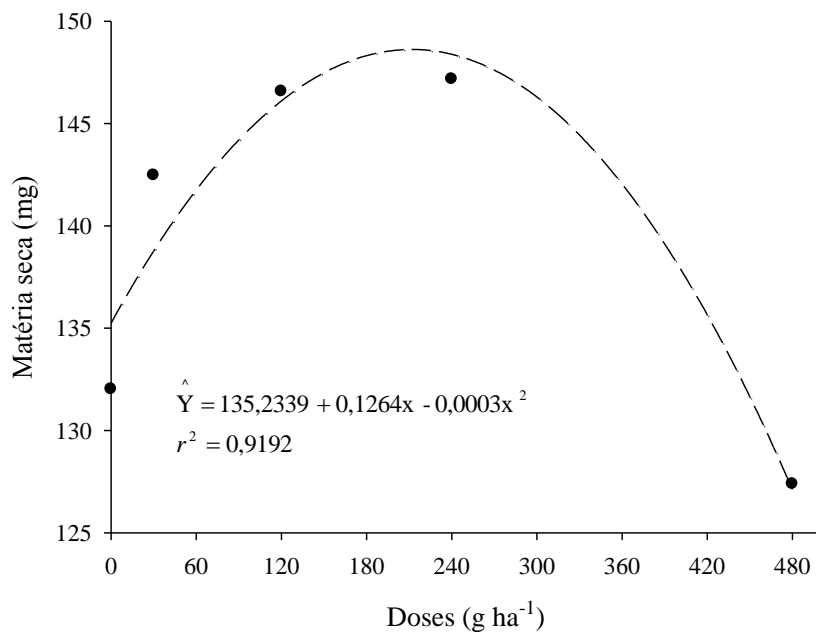
e trifloxyssulfuron-sodium reduziram significativamente tanto o crescimento vegetativo como a reprodução de *Metarhizium anisopliae* (Costa et al., 2004).

No presente trabalho, mesmo utilizando elevadas concentrações do picloram por placa, nenhuma dose foi capaz de inibir o crescimento do *P. indica* (Figura 1), mostrando que o fungo apresenta capacidade de crescimento na presença do herbicida, o que pode estar relacionada à diversidade de sistemas enzimáticos que este fungo apresenta, conferindo-lhe capacidade de adaptação, ou ainda de degradação deste pesticida (Mattos et al., 2010).

Através do resultado encontrado neste trabalho onde o crescimento do fungo em estudo não foi afetado por elevadas concentrações do herbicida em comparação aos demais trabalhos citados, respostas diferenciadas podem ser apresentadas por fungos diferentes mesmo utilizando herbicidas com mecanismos de ação semelhantes, isto porque os herbicidas podem apresentar efeitos tóxicos, nenhum efeito, e estimulação no crescimento de fungos micorrízicos, dependendo da espécie do fungo, do herbicida e da dosagem utilizada (Trappe et al., 1984).

Leão et al. (2012) verificaram para os herbicidas pendimethalin ( $1,75 \text{ kg ha}^{-1}$ ), carfentrazone-ethyl ( $0,0625 \text{ kg ha}^{-1}$ ), oxadiazon ( $1 \text{ kg ha}^{-1}$ ), para controle de plantas daninhas no arroz na proporção de 0, 25, 50, 75, 100 e 200% da dose recomendada, que isolados de *Trichoderma sp.* responderam de forma diferenciada ao mesmo herbicida quanto ao crescimento radial do micélio.

Apesar do crescimento radial da colônia em placa de Petri ser utilizado em diversos trabalhos como parâmetro para avaliar o efeito de compostos tóxicos aos microrganismos, o acúmulo de matéria seca fúngica também deve ser levado em consideração para tal avaliação. Neste trabalho, o micélio apresentou maior crescimento em extensão na presença de doses mais elevadas (Figura 1), contudo estas proporcionaram menores acúmulos de matéria seca do fungo (Figura 3). O máximo acúmulo de massa seca foi observado na dose de  $210,67 \text{ g ha}^{-1}$  do picloram (Figura 3). Este comportamento pode ser explicado pelo efeito indireto do herbicida, que pode diminuir o aproveitamento do meio, resultando na diminuição da biomassa microbiana acumulada ou ainda na estratégia do fungo para escapar da condição de estresse alcançando pontos do substrato que não contenham herbicidas.



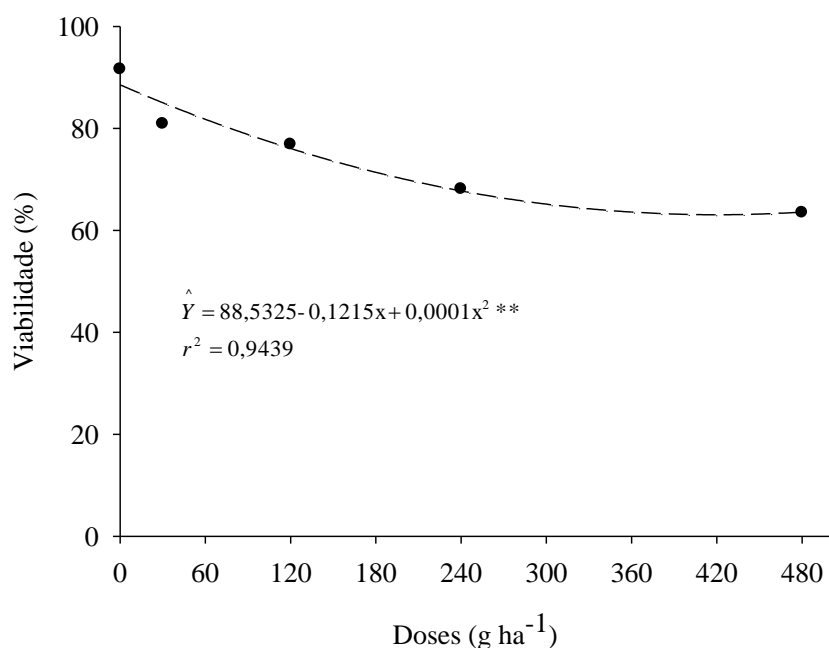
**Figura 3.** Matéria seca (MS) do fungo *Piriformospora indica* inoculado em meio contendo doses crescentes do picloram.

\*\*Significativo pelo teste “t” a 1% de probabilidade de erro

Em condições controladas, meios contaminados com herbicidas tendem a apresentar maior intoxicação aos microrganismos, devido a alguns fatores como: possibilidade de maior produção de hifas em meios de cultura ricos em nutrientes o que pode aumentar a intoxicação; maior facilidade de difusão dos produtos químicos pelo ágar, em comparação ao solo; degradação lenta dos compostos em meio de cultura em relação ao solo e possível ocorrência de degradação por processos inorgânicos, fotoquímicos, volatilização, lixiviação e adsorção no solo (Estok et al., 1989).

A capacidade de crescimento apresentada por *P. indica* em meio contaminado com doses crescentes de picloram é um indicativo que este herbicida não foi tóxico nas concentrações testadas e ainda o fungo pode apresentar potencial para degradar o herbicida, isso sugere o desenvolvimento de futuros estudos em biorremediação de locais contaminados através de técnicas de bioaugmentação. Entretanto, é apenas uma etapa para o processo de seleção, sendo necessárias ainda, avaliações em solo, onde os processos são mais dinâmicos e ainda através de análise da degradação do herbicida em meio de cultura por meio de cromatografia líquida de alta eficiência.

Em relação aos esporos de FMAs, as elevadas doses de picloram influenciaram negativamente a viabilidade, observando-se redução de até 30,21 % da viabilidade dos esporos para a dose de 480 g ha<sup>-1</sup> presença do herbicida de acordo com a equação (Figura 4).



**Figura 4.** Viabilidade de esporos de *Glomus clarum* após quinze dias imersos em solução contendo doses crescentes de picloram

\*\*Significativo pelo teste “t” a 1% de probabilidade de erro.

Como esporos de fungos micorrízicos determinam a persistência dos FMAs no solo em situações adversas, como aquelas oriundas de modificações no uso do solo, como aplicação de agrotóxicos, por exemplo, a abundância e a viabilidade de propágulos como esporos de fungos micorrízicos fica comprometida na presença do herbicida e, conseqüentemente, poderá afetar as possíveis associações com espécies que apresentam potencial para fitorremediação do picloram. Ademais, o estabelecimento da simbiose se inicia pela ativação dos propágulos do fungo (Bertolazi et al., 2010).

Resultados encontrados in vitro apresentam uma tendência de comportamento da viabilidade do esporo na presença do herbicida, já em condições de campo onde o contato do herbicida com os esporos não é direto este efeito pode ser menos expressivo. Além disso, a redução da viabilidade foi mais expressiva na dose recomendada e no dobro da dose recomendada, no solo devido aos processos de degradação e perda, é provável que o herbicida seja encontrado em menores concentrações e, portanto, afete menos a viabilidade dos propágulos.

São escassos trabalhos envolvendo herbicidas e a viabilidade de esporos de FMAs, entretanto inúmeros estudos relataram o efeito de tais produtos sobre a micorrização e sobre o número de propágulos infectivos (Malty et al., 2006; Kumar et al., 1999; Peixoto et al., 2010). Possivelmente a inibição da micorrização observada pode estar relacionada à diminuição da viabilidade dos esporos na presença de herbicidas.

Em experimento em casa de vegetação com a cultura da soja, o herbicida glyphosate promoveu a inibição na micorrização quando foram inoculadas as espécies *Glomus etunicatum*, *Glomus fasciculatum* e *Scutelospora heterogama* (Silva et al., 2006). Por outro lado, Malty et al. (2006) não observaram esse efeito inibitório do glyphosate (450 a 3600 g ha<sup>-1</sup>) na colonização de plantas de soja pelos fungos *Gigaspora margarita*, *Glomus etunicatum* e *Scutelospora heterogama*. A aplicação de o 2,4-D aumentou a porcentagem de infecção e o número de propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em espécies agrofloretais (Kumar et al., 1999). Portanto, esses efeitos estão relacionados ao tipo de herbicida, tipo de solo, sistema de cultivo, espécie de fungo e da planta estudada (Peixoto et al., 2010). Observa-se, portanto, que a interação entre herbicida e FMAs é variável e dependente do tipo de produto utilizado e da cultura em estudo. Nesse sentido, estudos in vitro constituem uma etapa do processo de avaliação do efeito de herbicidas sobre a viabilidade de propágulos de fungos micorrízicos arbusculares.

Conclui-se que o herbicida não interfere no crescimento radial de *P. indica* e interfere negativamente na viabilidade de esporos de *G. clarum*.

### 3.6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a FAPEMIG e a capes pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

### 3.7. LITERTURA CITADA

AMORA-LAZCANO E. et al. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. Currente Research, Technology. and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial biotechnology. A Mendez –Vilas (Ed.). pp. 251-256, 2010.

BDAGE, U.S. et al. Interaction of Mycobiont: *Piriformospora Indica* with Medicinal plants and plants of Economic importance. **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.54, p. 9214-9226, 2010.

BARAC, T. et al. Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. **Nature Biotechnology**, v.22, n.5, p.583-588, 2004.

BINET, P. et al. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. **Plant and Soil**, v.227, p.207-213, 2000.

BERTOLAZI, A.A et al. O papel das ectomicorrizas na biorremediação dos metais pesados no solo. **Natureza online**, v.8, n., p. 24-31, 2010.

BRUNDRETT, M. C. et al. Mycorrhizas in the Kakadu region of tropical Austrália. II. Propagules of mycorrhizal fungi in disturbed habitats. **Plant and Soil**, Dordrecht, v. 184, n. 1, p. 173-184, 1996.

COLLA, L. M. et al. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solos contaminados com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

COSTA, E. A. D et al. Efeito de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar no desenvolvimento in vitro do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorokin. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v.14, 2004.

ESTOK D. et al. Effects of the herbicides 2,4-D, glyphosate, hexazinone, and triclopyr on the growth of three species of ectomycorrhizal fungi. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.42, p.835-839, 1989.

IBOLA, C. The influence of 2,4-D on ectomycorrhizal symbiosis in pine and spruce seedlings. **European Journal of Plant Pathology**, v. 8, n.379-383, 1978.

KUMAR, P. P. et al. Interaction of some agrochemicals and VAM-fungi on growth of two agroforest tree species in nursery. **Journal of Mycology and Plant Pathology**, v. 29, n. 3, p. 385-388, 1999.

LEÃO, E. U et al. Efeito de diferentes herbicidas sobre isolados de *Trichoderma* spp. XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS 2012, Campo Grande, MS.

LIMA, R. L. F. A. et al. Propágulos de fungos micorrízicos arbusculares em solos deficientes em fósforo sob diferentes usos, da região semi-árida no nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.31, p.257-268, 2007.

LIU, S.L. et al. Degradation of benzo(a) pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 26, p.285-293, 2004.

LAMEGO, F. P. & VIDA, R. A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição. **Revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 17, p. 9-18, 2007.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MALTY, J. S. et al. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbiotróficos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.41, n.2, p.285-291, 2006.

MARTINEZ, C. O. et al. Caracterização de bactérias e fungos envolvidos na degradação de sulfentazona em solos. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Meio Ambiente**, 22 p. Embrapa Meio Ambiente. 2008.

MATTOS, M. L.T. et al. Metodologia para obtenção de fungos degradadores do herbicida glifosato. **Embrapa Clima Temperado**, 2010. 24 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 308).

MUYZER, G. et al. Profiling of Complex Microbial Populations by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis of Polymerase Chain Reaction-Amplified Genes Coding for 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n. 3, p.695-670,1993.

NAKATANI, A. S. et al. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de “Landfarming” de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1501-1512, 2008.

OELMÜLLER, R. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological application. **Symbiosis**, v.49, p.1-17, 2009.

PALLU, A. P. S. et al. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de- açúcar**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAULA, A. M. et al. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.805-811, 2007.

PEIXOTO, M. F. S. P et al. Ação do trifluralin na micorrização e crescimento de plantas de amendoim (*Arachis hypogaea*). **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 609-614, 2010.

PETRINI, O. Fungal endophytic of tree leaves. In: Andrews J. and Hirano SS (eds) **Microbial ecology of leaves**. Springer Verlag, p 179-197, 1991.

ROSA, D. D et al. Efeito de herbicidas sobre agentes fitopatogênicos. **Acta Scientiarum Agronomy**, v. 32, n. 3, p. 379-383, 2010.

SAFIR, G.R. et al. Vesicular arbuscular mycorrhizae in a waste water irrigated old field ecosystem in Michigan. **Plant and Soil**, v.121, p.87-196, 1990.

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 259-265, 2007.

SILVA, A. C. et al. Micorrização e épocas de dessecação de *Brachiaria brizanta* no desenvolvimento da soja. **Planta Daninha**, v. 24, n. 2, p. 271-277, 2006.

SIQUEIRA, J.O. et al. VA-mycorrhizae and mycorrhiza stimulating isoflavonoid compounds reduce plant herbicide injury. **Plant and Soil**, v.134, p.233-242, 1991.

SOUZA, L. A. et al. tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p.1441-1451, 2011.

SILVA, A. A. et al. Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

SILVA, T. M. et al. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p.522-525, 2007.

SUSARLA, S. et al. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**, v. 18, p. 647-658, 2002.

TRAPPE, J.M. et al. Reactions of mycorrhizal fungi and mycorrhiza formation to pesticides. **Annual Review of Phytopathology**, v. 22, p.331-359, 1984.

WALLEY, F.L. & GERMIDA, J.J. Estimating the viability of vesicular-arbuscular mycorrhizae fungal spores using tetrazolium salts as vital stains. **Mycologia**, v.87, p.273-279, 1995.

## 4. FITOREMEDIÇÃO DE PICLORAM ASSOCIADA COM FUNGOS MICORRIZICOS

### 4.1. RESUMO

O picloram é utilizado em pastagens, podendo apresentar longo período residual no solo. Entre as alternativas para redução de seus resíduos no solo destaca-se a fitorremediação. Fungos micorrízicos apresentam potencial biotecnológico e aplicabilidade em programas de fitorremediação. O objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação com fungos micorrizicos no desenvolvimento e no potencial fitorremediador de resíduos de picloram no solo pelas espécies *Urochloa brizantha*, *Panicum maximum* e *Zea mays*. O experimento foi conduzido em esquema fatorial (3 x 2 x 3) + 2, em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. O primeiro fator foi constituído pelo cultivo das espécies fitorremediadoras, *U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays*, o segundo da ausência e presença do de picloram (0 e 240 g ha<sup>-1</sup>), aplicado em pré-emergência e o terceiro fator constou da inoculação com os fungos *Glomus etunicatum* e *Piriformospora indica* e não inoculação. Vasos sem cultivo com e sem aplicação de herbicida foram considerados como testemunhas. As três espécies de plantas foram cultivadas em vasos por 60 dias. Foram avaliados o volume radicular e a matéria seca da raiz e da parte aérea. O solo foi utilizado para a semeadura do feijão, planta indicadora da presença do picloram, deixando quatro plantas por vaso. Aos 35 dias após a emergência (DAE) foi avaliada a intoxicação das plantas. Conclui-se a inoculação com os fungos *P. indica* e *G. etunicatum* contribui na fitorremediação do picloram pelas espécies *Z. mays* e *P. maximum* e que quando feita inoculação, a aplicação do herbicida não reduz o volume radicular e a produção de matéria seca radicular de *P. maximum*.

**Palavras chaves:** *Urochloa brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays*, inoculação

## PHYTOREMEDIATION OF PICLORAM ASSOCIATED WITH MYCORRHIZAL FUNGI

### 4.2. ABSTRACT

Picloram is used in pastures, and may have long soil residual toxicity. Among the alternatives to reduce the waste on the ground stands phytoremediation. Mycorrhizal fungi have potential to be applied in biotechnological and phytoremediation programs. The aim of this study was to evaluate the inoculation with mycorrhizal fungi in the development and potential phytoremediation of picloram residues in the soil by *Urochloa Brizantha* species, *Panicum maximum* and *Zea mays*. The experiment was conducted in a factorial scheme (3 x 2 x 3) + 2, in a completely randomized design with three replications. The first factor was composed in the crop species phytoremediator, *U. Brizantha*, *P. maximum* and *Zea mays*, the second in the absence and presence of picloram (0 and 240 g ha<sup>-1</sup>) with a pre-emergence applied and the third factor consisted of the fungi *Glomus etunicatum* and *Piriformospora indica* with inoculation and non-inoculation. Vessels without cultivation, with and without herbicide application were considered as witnesses. The three plant species were grown in pots for 60 days. We evaluated the root volume and the root and shoot dry matter. This soil was used for the seeding of bean plants to indicate the presence of picloram, leaving four plants per pot. At 35 days after emergence (DAE) plant intoxication was evaluated. It was concluded that inoculation with the fungi *P. indica* and *G. etunicatum* helped in phytoremediation of picloram by the species *Z. mays* and *P. maximum* and that when inoculation occurred from the herbicide application, it did not reduce the root volume and root dry matter production of *P. maximum*.

**Keywords:** *Urochloa Brizantha*, *Panicum maximum*, *Zea mays*, inoculation

### 4.3. INTRODUÇÃO

Dentre os herbicidas utilizados em pastagens, destaca-se o picloram (ácido 4-amino 3,5,6 triclora- 2-piridinacarboxílico), aplicado em pós-emergência das dicotiledôneas arbustivas ou plantas arbóreas. Este herbicida pode apresentar longo período residual (Silva et al., 2007), dependendo das características físicas e químicas do solo e da intensidade de chuva após aplicação (D'Antonino et al., 2009).

Alternativas biológicas podem ser utilizadas para diminuir os resíduos de herbicidas (Pires et al., 2001; Carmo et al., 2008). Entre estas, destaca-se a fitorremediação, que está relacionada à capacidade de algumas espécies vegetais de acelerar a retirada ou decomposição de compostos tóxicos do ambiente.

Embora a fitorremediação seja eficiente para remoção de compostos tóxicos no solo, esta pode ser dificultada quando os resíduos são herbicidas, devido à necessidade de se encontrar espécies que apresentem além da capacidade fitorremediadora, seletividade ao herbicida em estudo e ainda devido a elevada diversidade molecular e às transformações que os herbicidas estão sujeitos quando atingem o solo (Pires et al., 2003; Santos et al., 2006; Assis et al., 2010).

Em relação aos herbicidas de longo residual no solo, algumas pesquisas com o tebuthiuron (Pires et al., 2003 e 2005; Belo, 2006), trifloxysulfuron-sodium (Procópio et al., 2005 ; Santos et al., 2007, Belo, 2006), sulfentrazone (Belo et al., 2011), imazetapyr e imazapic (Souto, 2011), mostram, na prática, algumas espécies consideradas fitorremediadoras. Para o picloram, algumas gramíneas apresentam potencial fitorremediador tais como, *Uroclhoa brizantha*, *Uroclhoa decumbens*, *Panicum maximum*, *Eleusine. coracana* e *Zea mays* (Carmo et al., 2008). De modo geral, as plantas da família das poaceas apresentam tolerância aos herbicidas auxínicos, pré-requisito básico para ser utilizada como fitorremediadoras (Belo et al., 2011).

As espécies fitorremediadoras apresentam tolerância a certos compostos tóxicos, através de mecanismos de translocação diferencial para os tecidos da planta, pela degradação parcial ou total, ou pela transformação em compostos menos tóxicos (Accioly & Siqueira, 2000; Scramin et al., 2001; Pires et al., 2003). Além disso, a remediação pode estar relacionada à liberação de exsudatos radiculares, os quais podem estimular a atividade microbiana, degradando o composto no solo, processo conhecido como rizodegradação (Cunningham et al., 1996; Silva et al., 2007).

Algumas pesquisas têm associado o efeito de microrganismos do solo ao processo de remediação de poluentes (Nakatani et al., 2008; Souza et al., 2011). A caracterização e a

identificação de microrganismos, com capacidade para metabolizar compostos potencialmente tóxicos, como herbicidas foi relatada por alguns autores (Roque & Melo 2000; Dellamantrice et al., 2004; Procópio & Mello 2006; Silva et al., 2007; Martinez et al., 2008; Mattos, et al., 2010).

Entre os microrganismos, os endofíticos podem aumentar a tolerância de plantas às moléculas químicas fitotóxicas, contribuindo para remoção de poluentes, ou ainda, através da produção de enzimas, as quais favorecem respostas bioquímicas a estresses (Pallu, 2011 e Maki, 2006).

O *P. indica* é um fungo micorrízico, facilmente cultivável em culturas axênicas e apresenta capacidade de acumular compostos tóxicos e prevenir a absorção destes pelas plantas. Este coloniza muitas plantas de importância econômica, atuando como promotor de crescimento (Oelmüller, et al., 2009; Bdage et al., 2010).

Além dos microrganismos endofíticos, fungos micorrízicos também podem contribuir para o processo de remediação. Plantas micorrizadas apresentam maior sistema radicular, devido à maior extensão do micélio extra-radicular, isto facilita a absorção de íons e de água do solo e aumenta a retenção de compostos tóxicos (Safir et al., 1990; Paula et al., 2007; Amora-Lazcano et al., 2010).

Pesquisas mostram que inoculação com FMAs é capaz de aumentar a capacidade da *U. decumbens* em extrair metais pesados do solo nas quantidades 845, 142, 68 e 54% para Cu, Pb, Zn e Cd, por exemplo, em relação a mesma espécie cultivada em solo não inoculado. A inoculação pode promover maior produção de matéria seca das plantas. Além disso, as gramíneas associam-se a fungos micorrízicos arbusculares (FMA) que exercem grande influência sobre estas plantas, constituindo-se em importantes componentes bióticos do ecossistema (Silva et al., 2006). Alguns trabalhos mostraram que inoculação com fungos micorrízicos aumenta a produção de raízes, o peso total e o comprimento das raízes (Hodge et al., 2000; Bressan & Vasconcellos, 2002).

Os fungos micorrízicos apresentam potencial biotecnológico e aplicabilidade em programas de fitorremediação e diversas pesquisas mostraram a seleção de plantas com potencial para fitorremediar o picloram. Entretanto, são escassas as informações envolvendo a bioaugmentação no processo de remediação deste. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a inoculação com fungos no desenvolvimento das espécies *U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays* observando o potencial fitorremediador de cada espécie.

#### 4.4. MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação. O solo coletado em área sem histórico de aplicação de herbicidas, foi classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo Distrófico típico, textura argilosa (56% argila, 6% silte e 38% areia) com pH (água) de 5,3; teor de matéria orgânica de 3,5 dag kg<sup>-1</sup>; P e K de 47,4 e 98 mg dm<sup>-3</sup> respectivamente; Ca, Mg, Al, H+Al, SB, CTC(t) e CTC (T); 2,2; 0,7; 0; 6,44; 3,15; 3,15 e 9,59 cmolc dm<sup>-3</sup> respectivamente.

Foi usado o esquema fatorial (3 x 2 x 3) + 2, no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. O primeiro fator foi constituído pelo cultivo das espécies *U. brizantha*, *P. maximum*, e *Z. mays* (Híbrido *DKB. 350PRO*) o segundo de constou da ausência ou presença de picloram (240 g ha<sup>-1</sup>), aplicadas em pré- emergência e o terceiro fator constou da inoculação ou não com os fungos *G. etunicatum* e *P.indica*.

Primeiramente foi feita a avaliação do potencial de inóculo de fungos micorrízicos arbusculares do solo. Os esporos foram obtidos pelo método do peneiramento úmido (Gerdman e Nicolson, 1963), seguido de centrifugação em solução de sacarose (Jenkins, 1964). Foi realizada a contagem do número de esporos de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) de 10 amostras de solo e a média de esporos foi de 30 esporos em 50 g de solo. O pH do solo foi corrigido utilizando 2,5 t ha<sup>-1</sup> de calcário dolomítico de PNRT 96% e adubado com 200g de N por m<sup>3</sup> de solo, utilizando como fonte sulfato de amônia, 1 Kg de Superfosfato Simples por m<sup>3</sup> de solo e 122 g de K<sub>2</sub>O por m<sup>3</sup> de solo, utilizando como fonte KCl.

Após determinação do potencial de inóculo e do preparo do solo, este foi colocado em vasos de 8,0 L revestidos internamente com filme de polietileno, com o objetivo de evitar perda do herbicida por lixiviação. Os mesmos foram irrigados ajustando-se a umidade em valor próximo a 80% da capacidade de campo. Em seguida foi feita a aplicação do herbicida picloram com um pulverizador, pressurizado a CO<sub>2</sub>, equipado com bicos TT110.02, espaçados de 0,5 m, calibrado para aplicação de 150 L ha<sup>-1</sup> de calda herbicida e utilizando a dose equivalente a 240 g ha<sup>-1</sup> de picloram.

A semeadura de *U. brizantha*, *P. maximum* e *Z. mays* foi realizada um dia após a aplicação do picloram. No momento da semeadura os vasos foram inoculados separadamente com 100 esporos de *G. etunicatum* por planta e três discos de 1 cm<sup>2</sup> de *P. indica* por planta. Ambos inoculos colocados cerca de 5 cm abaixo da superfície do solo do vaso.

Após a emergência, foi realizado o desbaste, deixando-se três plantas por vaso e feitas irrigações diárias.

Aos 60 dias as plantas foram colhidas separando a parte aérea e o sistema radicular. Após a retirada do solo aderido as raízes, estas foram lavadas e depois imersas em uma proveta de volume conhecido de água e por diferença foi determinado o volume radicular. A matéria seca da parte aérea e do sistema radicular foi determinada em estufa a 72 °C.

Após a retirada das plantas do vaso, solo foi utilizado para a semeadura da espécie de feijão como planta indicadora da presença do picloram, distribuindo seis sementes por vaso de 280 cm<sup>3</sup>. Após a emergência foram deixadas quatro plantas por vaso. Aos 35 dias após a emergência (DAE), foi avaliada a intoxicação visual, considerando os sintomas retorcimento do caule, epinastia das folhas, paralisação do crescimento até morte da planta, sendo atribuída % de intoxicação em relação à testemunha sem aplicação de herbicida.

#### 4.5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O volume radicular de *U. brizantha* foi influenciado pela inoculação com *G. etunicatum*, sendo 62 % maior em relação ao tratamento não inoculado, na ausência de herbicida. Entretanto, na inoculação com *P. indica*, não foi observada diferença de volume radicular em relação ao tratamento não inoculado. Quanto à produção de matéria seca de raiz e da parte aérea de *U. brizantha* não foi observada diferença entre os tratamentos, tanto na ausência quanto na presença do herbicida (Tabela 1).

Em relação ao volume radicular para *Z. mays*, não foi observada diferença entre os tratamentos na ausência do herbicida. Quanto à produção de matéria seca radicular e da parte aérea, a inoculação com *G. etunicatum* proporcionou maior produção de matéria seca em relação ao tratamento inoculado com *P. indica* e não diferiu do tratamento não inoculado. Quando aplicado herbicida observou-se efeito negativo na produção de matéria seca apenas para o tratamento inoculado com *G. etunicatum* (Tabela 1).

Para *P. maximum*, foi observado efeito negativo da aplicação do picloram no volume radicular e na produção de matéria seca de raiz, apenas para o tratamento não inoculado (Tabela 1), o que pode estar relacionado à dose utilizada neste trabalho. Resultados encontrados por Belo et al. (2011) mostraram que resíduos de picloram no solo foram capazes de alterar algumas variáveis fisiológicas de gramíneas como *U. brizantha*, porém a produção de matéria seca da parte dessa espécie não foi alterada até a dose de 160 g ha<sup>-1</sup>, ou seja em uma dose menor que a utilizada neste trabalho.

Efeitos positivos da inoculação com FMAs foram encontrados por Costa et al. 2012, verificando incrementos de até 353% na produção de matéria seca de *U. brizantha* cv. Marandu. Inoculando fungos micorrízicos em plantas de *U. decumbens*, Silva et al. (2006)

também encontraram resposta positiva, sendo obtido até 182% de matéria seca superior à produção obtida nas plantas não inoculadas, o que mostra que espécies de braquiária respondem positivamente a inoculação e que este efeito pode influenciar o potencial de extração de compostos tóxicos do solo. Entretanto, neste trabalho não foi observado efeito positivo da inoculação no acúmulo de matéria de *U. brizantha*.

Outros autores (Bressan et al., 2002) encontraram efeito positivo da inoculação com FMAs para *Z. mays*. A inoculação com os fungos de *G. clarum* e *G. etunicatum* promoveu maior peso radicular, alcançando valores superiores a 30% na produção de matéria seca comparadas com as plantas sem inoculação. Campos et al. (2010) avaliando a matéria seca radicular de genótipos de milho, também verificaram que os mesmos responderam positivamente à inoculação de FMA, entretanto, no mesmo trabalho para a produção de matéria seca da parte aérea, apenas alguns genótipos responderam positivamente a inoculação com FMA. A resposta apresentada no presente trabalho pode estar relacionada ao fato de que as plantas apresentam grande variabilidade na resposta à inoculação de FMA, esta parece ser controlada geneticamente, através das variações fisiológicas dos endófitos e dos mecanismos de infecção, podendo ocorrer especificidade até mesmo ao nível de variedades (Costa et al. 2012; Reis et al., 2008).

Neste trabalho, não foi verificada diferença entre os tratamentos inoculados e não inoculados quanto à produção de matéria seca das espécies. Uma hipótese seria o fato de o solo utilizado não ter sido autoclavado e ter sido encontrada uma densidade média de 30 esporos por 50 g de solo. Assim, mesmo inoculando o solo, devido à presença de esporos nativos do solo, pode ter ocorrido igualdade com o tratamento controle (não inoculado), em relação as respostas positivas dos fungos na produção de matéria seca das plantas (Carneiro et al., 2007).

No bioensaio, para a quantificação dos resíduos de picloram no solo, foram observados elevados sintomas de intoxicação para todos os tratamentos (Figura 1), entretanto verificou-se efeito da espécie fitorremediadora e do tipo de inoculo e interação entre os dois fatores, nos sintomas de intoxicação. Para os solos inoculados com *P. indica*, observou menor intoxicação quando o solo utilizado para o bioensaio foi cultivado com *Z. mays* (Tabela 2 e Figura 1). Em relação aos solos inoculados com *G. etunicatum*, foi observado menor intoxicação para os solos cultivados com *P. maximum* e *Z. mays*. Para os solos não inoculados, menor intoxicação foi observada para os solos cultivados com *U. brizantha* e *Z. mays* (Tabela 2 e Figura 1).

Comparando o efeito dos inoculos dentro de cada tipo de cultivo, foi observado efeito do positivo da inoculação para os solos cultivados com *Z. mays* e *P. maximum*, sendo para primeira espécie menores sintomas de intoxicação para o solo inoculado com *P. indica*.

Para *P. maximum* maior intoxicação foi observada quando não foi feita a inoculação. Relacionando este resultado com os resultados encontrados na Tabela 1, verificamos que, para os tratamentos não inoculados houve efeito negativo da aplicação do herbicida sobre o volume radicular e sobre a produção de matéria seca radicular de *P. maximum*, esse efeito negativo pode ter influenciado na fitorremediação do herbicida pelas plantas não inoculadas e mostrou-se efeito positivo da inoculação de ambos fungos na fitorremediação do picloram (Tabela 2 e Figura 1).

Para o solo cultivado com *U. brizantha*, foi observado maior sintoma de intoxicação para os solos inoculados com *G. etunicatum*, relacionando este resultado com os resultados encontrados na tabela 1, verificamos que quando foi feita a inoculação com *G. etunicatum*, aplicação do herbicida afetou negativamente no volume radicular, o que pode ter contribuído para menor eficiência fitorremediadora da espécie (Tabela 1 e 2)

Os solos inoculados cultivados com *Z. mays* e *P. maximum* apesar de terem apresentado elevados sintomas de intoxicação, estes foram menores que no tratamento não inoculado, indicando efeito positivo da inoculação para o processo de remediação do picloram (Tabela 1). Entretanto, estes elevados sintomas de intoxicação podem estar relacionados, a elevada dose utilizada no trabalho, ou ainda, ao tempo de cultivo das espécies fitorremediadora, que pode ter sido insuficiente.

Já foi relatado que para o cultivo de *P. maximum* por um período de 90 dias em solo contaminado com picloram na dose de  $160 \text{ g ha}^{-1}$ , a fitorremediação não foi eficiente, pois os resíduos do picloram no solo ocasionaram elevada intoxicação às plantas de soja, por outro lado, quando a contaminação inicial foi de  $80 \text{ g ha}^{-1}$  foi observado intoxicação nas plantas de soja inferiores a 57% (Assis et al., 2010). Entretanto, cultivo prévio de *E. coracana* por 60 dias reduziu a contaminação do solo com picloram e permitiu crescimento inicial satisfatório das plantas de soja e de tomate aplicação prévia de até  $160 \text{ g ha}^{-1}$  de picloram. Períodos superiores a 60 dias não resultaram em aumento da descontaminação do picloram (Carmo et al., 2008a). Fica evidenciado que o período de cultivo e a dose aplicada pode influenciar nos resultados do processo de fitorremediação. Outro fator relacionado são as espécies fitorremediadoras, que possuem diferentes níveis de tolerância ao picloram e inclusive pode haver diferenças entre cultivares dentro de uma mesma espécie (Carmo et al. 2008).

Conclui-se a inoculação com os fungos *P. indica* e *G. etunicatum* contribui na fitorremediação do picloram pelas espécies *Z. mays* e *P. maximum* e que quando feita inoculação a aplicação do herbicida não reduz o volume radicular e a produção de matéria seca radicular de *P. maximum*, podendo contribuir para o processo de fitorremediação.

**Tabela 1.** Produção de matéria seca e volume radicular de espécies fitorremediadoras de picloram em função da inoculação com fungos micorrízicos e da presença ou ausência de picloram

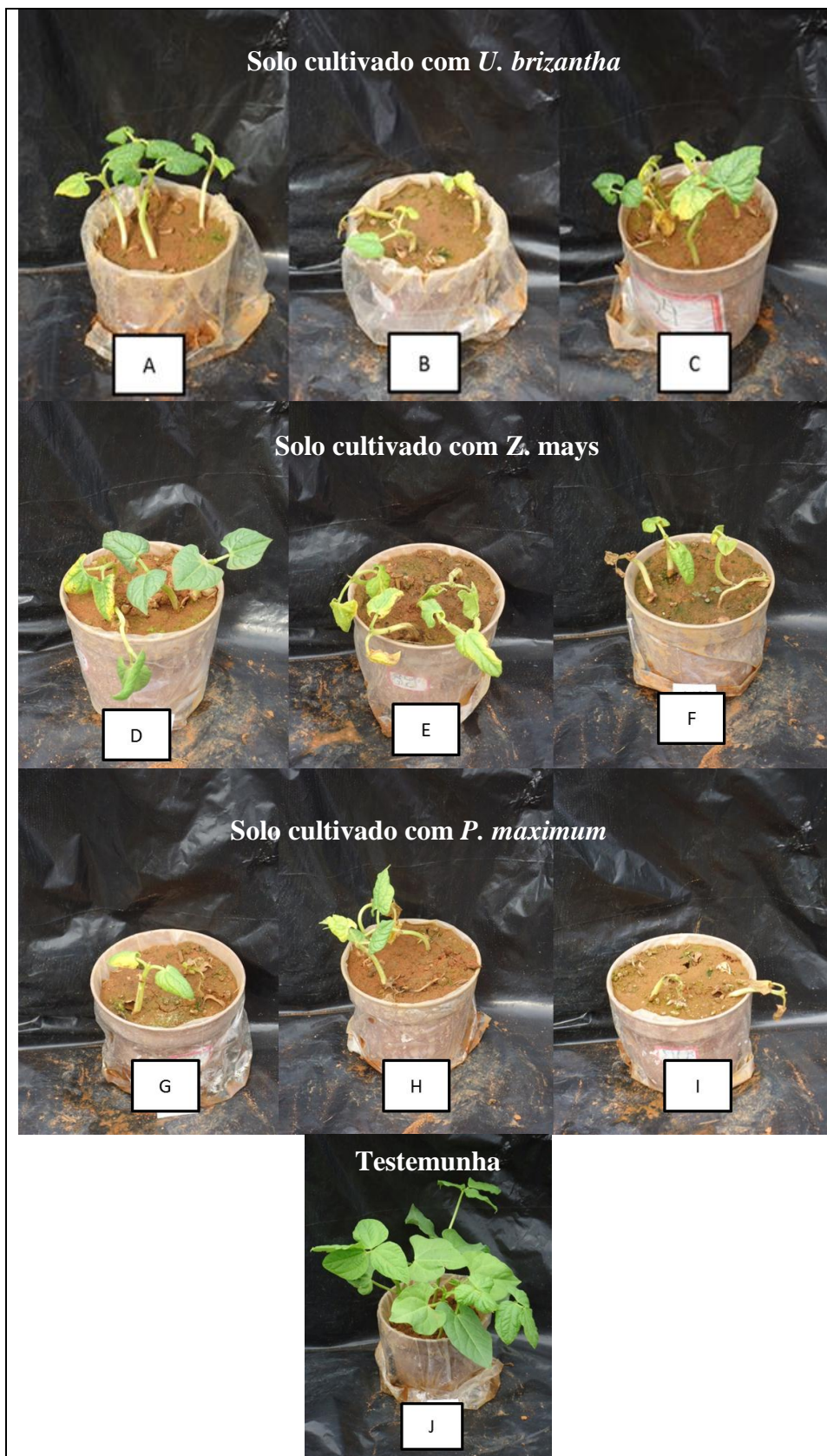
Inoculo	Volume radicular (cm <sup>3</sup> )		Matéria seca - raiz (g)		Matéria seca - parte aérea (g)	
	Sem herbicida	Com herbicida	Sem herbicida	Com herbicida	Sem herbicida	Com herbicida
<i>Urochloa brizantha</i>						
<i>P. indica</i>	25,00abA	21,11aA	3,60aA	2,99aA	5,66aA	5,95aA
<i>G. etunicatum</i>	31,67aA	19,44aB	4,23aA	3,85aA	6,71aA	4,98aA
Não inoculado	19,44bA	17,22aA	2,90aA	2,96aA	6,57aA	6,20aA
CV (%)	18,38		28,04		23,58	
Média geral	22,31		3,42		6,01	
<i>Zea mays</i>						
<i>P. indica</i>	56,67aA	45,00bA	6,43bA	7,22aA	10,87bA	11,11aA
<i>G. etunicatum</i>	65,83aA	56,00abA	10,54aA	7,31aB	17,54aA	11,65aB
Não inoculado	61,67aA	75,00aA	8,95abA	9,51aA	14,26abA	14,13aA
CV (%)	18,54		24,01		24,32	
Média geral	60,13		8,32		7,36	
<i>Panicum maximum</i>						
<i>P. indica</i>	22,22abA	18,89aA	3,59aA	3,22aA	8,73aA	7,07aA
<i>G. etunicatum</i>	16,00bA	17,78aA	3,23aA	3,17aA	7,89aA	6,85aA
Não inoculado	25,55aA	16,44aB	4,78aA	2,90aB	7,57aA	6,03aA
CV (%)	17,84		25,22		24,32	
Média geral	19,59		3,48		7,36	

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

**Tabela 2.** Intoxicação de *Phaseolus vulgaris* cultivados em solos previamente cultivados com espécie fitorremediadoras e inoculado ou não

Inoculo	Espécie Fitorremediadora		
	<i>U. brizantha</i>	<i>Z. mays</i>	<i>P. maximum</i>
	Intoxicação (%)		
<i>P. indica</i>	86,76bA	73,33bB	81,67bAB
<i>G. etunicatum</i>	98,00aA	76,66abB	85,00bB
Não inoculado	76,60bB	86,67aAB	96,67aA
CV (%)		7,54	
Média		84,62	

Médias seguidas por uma mesma letra minúscula na coluna e maiúscula na linha não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.



**Figura 1.** Intoxicação de *Phaseolus vulgaris* cultivado em solos previamente cultivados com espécie fitorremediadoras em solos contaminados com picloram e inoculado ou não. Tipo de inoculo: *P. indica* - A e G; *G. clarum* - B e H; Não inoculado - C, I, J Testemunha: Solo sem cultivo sem aplicação de herbicida - J

#### 4.6. AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Capes e a Fapemig pelo apoio financeiro para execução do trabalho.

#### 4.7. LITERATURA CITADA

ACCIOLY, A. M. A. SIQUEIRA, J. O. Contaminação química e biorremediação do solo. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V.; V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R. **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2000. v.1. p. 299-352.

AMORA-LAZCANO E. ET AL. Rhizospheric plant-microbe interactions that enhance the remediation of contaminated soils. *Currente Research, Technology. and Education* **Topics in Applied Microbiology and Microbial biotechnology**. A Mendez –Vilas (Ed.). pp. 251-256, 2010.

ASSIS, R.L. et al. Fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram por plantas de *Panicum maximum* em função do teor de água no solo. **Engenharia Agrícola**, v.30, n.5, p.845-853, 2010.

BDAGE, U.S. et al. Interaction of mycobiont: *Piriformospora Indica* with Medicinal plants and plants of Economic importance. **African Journal of Biotechnology**, Vol. 9 n.54, p. 9214-9226, 2010.

BELO, A.F. Técnicas para fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Viçosa, 2006, 66p.

BELO, A.F.et al. Atividade fotossintética de plantas cultivadas em solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 885-892, 2011.

BRESSAN, W. & VASCONCELLOS, C. A. Alterações morfológicas no sistema radicular do milho induzidas por fungos micorrízicos e fósforo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 4, p. 509-517, 2002.

CAMPOS, D. T. S. et al. Crescimento e micorrização de genótipos de milho em casa de vegetação. **Bragantia**, v. 69, n. 3, p. 555- 562, 2010.

CARMO, M. L.et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 301-313, 2008.

CARMO, M. L.et al . Influência do período de cultivo do Capim-pé-de-galinha gigante (*Eleusine coracana*) na fitorremediação de solo contaminado com picloram. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 26, n. 3, p. 601-609, 2008.

CARNEIRO,R. F. V. et al. Inoculação micorrízica arbuscular e doses de fósforo na produção do capim-andropogon, em substrato não estéril. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, v.2 p. 212- 218, 2007.

COSTA, N. L. et al. Efeito de micorrizas arbusculares sobre o crescimento e nutrição mineral de *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência Animal. Brasileira**, v.13, n.4, p. 406-411, 2012.

CUNNINGHAM, S. D. et al. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, n.1, p. 55-114, 1996.

D'ANTONINO, L. et al. Efeitos de culturas na persistência de herbicidas auxínicos no solo. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 371-378, 2009.

DELLAMATRICE, P. M & MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Vol.47, n.6, p.999-1003, 2004.

GERDEMANN, J.W. & NICOLSON, T.H. Spores of mycorrhizal *Endogone* extracted from soil by wet-sieving and decanting. **Transactions of the British Mycological Society**, v.46, p.235-244, 1963.

HODGE, A. et al. An arbuscular mycorrhizal inoculation enhances root proliferation in, but not nitrogen capture from, nutrient rich patches in soil. **New Phytologist**, v. 154, n. 3, p. 575-584, 2000.

JENKINS, W. A rapid centrifugal-flotation technique for separating nematodes from soil. **Plant Disease Report**, v.48, p.692, 1964.

NAKATANI, A. S. et al. Comunidades microbianas, atividade enzimática e fungos micorrízicos em solo rizosférico de "Landfarming" de resíduos petroquímicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1501-1512, 2008.

MAKI, C. S. **Diversidade e potencial biotecnológico de fungos endofíticos de cacau (*Theobroma cacao* L.)**. 2006. 128 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

MARTINEZ, C. O. et al. Caracterização de bactérias e fungos envolvidos na degradação de sulfentazona em solos. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento Embrapa Meio Ambiente**, 22 p. Embrapa Meio Ambiente. 2008.

MATTOS, M. L.T. et al. Metodologia para Obtenção de Fungos Degradores do Herbicida Glifosato. **Embrapa Clima Temperado**, 2010. 24 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 308).

OELMÜLLER, R. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological application. **Symbiosis**, v.49, p.1–17, 2009.

PALLU, A. P. S. et al. **Potencial biotecnológico de fungos do gênero *Penicillium* e interação com cana-de-açúcar**. 2010. 130 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

PAULA, A. M. et al. Contaminação do solo com antraceno e creosoto e o crescimento vegetal e a colonização micorrízica pelo *Glomus etunicatum*. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 31, p.805-811, 2007.

PIRES, F. R. et al. Uso da fitorremediação na descontaminação do solo. In: ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS, 23., 2001, Viçosa. Resumos... Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. p. 104.

PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.335-341, 2003.

PIRES, F.R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 711-717, 2005.

PROCÓPIO, S.O. et al. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida Trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9-16, 2005.

PROCÓPIO, A. R. L & MELO, I. S. Potencial biotecnológico de rizobactérias degradadoras de propanil. **Anais da Jornada Acadêmica da Embrapa Meio Ambiente: 07 e 08 de novembro de 2006**.

REIS, E. F. et al. Absorção de fósforo em doze genótipos de milho inoculados com fungo micorrízico arbuscular em solo de cerrado. **Ciência Rural**, v.38, n.9, 2008.

SAFIR, G.R. et al. Vesicular arbuscular mycorrhizae in a waste water irrigated oldfield ecosystem in Michigan. **Plant and Soil**, v.121, p.87-196, 1990.

SANTOS, M.V. et al. Eficácia e persistência no solo de herbicidas utilizados em pastagem. **Planta Daninha**, v. 24, p.391-398, 2006.

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

SANTOS, E. A. et al. Fitoestimulação por *Stizolobium aterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 259-265, 2007.

SCRAMIN, S. et al. Utilização de plantas na remediação de solos contaminados por herbicidas – levantamento da flora existente em áreas de cultivo de cana-de-açúcar. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 369-371.

SILVA, S. et al. Fungos micorrízicos no crescimento e na extração de metais pesados pela braquiária em solo contaminado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.41, n.12, p.1749-1757, 2006.

SILVA, A. A. et al. Herbicidas: classificação e mecanismo de ação. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (Eds.). **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2007. 367 p.

SOUTO, M.K. Fitorremediação de solo de várzea contaminado com os herbicidas imazetapir e imazapique. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Maria, 2011, 111p.

SOUZA, L. A.et al. tolerância e potencial fitorremediador de *Stizolobium aterrimum* associada ao fungo micorrízico arbuscular *Glomus etunicatum* em solo contaminado por chumbo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 35, p.1441-1451, 2011.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a atividade rizosférica de espécies fitorremediadoras do picloram, o efeito deste herbicida no crescimento e acúmulo de biomassa do fungo micorrízico *P. indica* e sobre a viabilidade de esporos de *G. clarum* e ainda, o efeito da inoculação dos fungos *P. indica* e *G. etunicatum* no desenvolvimento e sobre o potencial fitorremediador de espécies vegetais remediadoras do picloram.

A atividade rizosférica foi diferenciada entre as espécies fitorremediadoras, sendo maior para o solo cultivado com *Z. mays* em relação aos solos rizosférico de *P. maximum* e *U. brizantha*, sugerindo uma menor contribuição rizosférica dessas espécies na rizodegradação do picloram. Quanto ao crescimento micelial de *P. indica*, este não foi afetado pelas doses do picloram, entretanto o aumento das doses do herbicida diminuiu a produção de massa seca micelial e a viabilidade dos esporos de *G. clarum*. A inoculação com os fungos *P. indica* e *G. etunicatum* contribuiu com a fitorremediação do picloram pelas espécies *Z. mays* e *P. maximum*, embora tenha sido observado elevados sintomas de intoxicação, talvez pelo período de cultivo ter sido curto.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecermos melhor o efeito rizosférico e ainda sugere uma possível utilização de fungos micorrízicos na fitorremediação do picloram.