

CHRISTIANE AUGUSTA DINIZ MELO

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM SULFENTRAZONE  
ASSOCIADA A PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS**

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

VIÇOSA,  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2015

Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de  
Viçosa - Campus Viçosa

T

M527b  
2015  
Melo, Christiane Augusta Diniz, 1985-  
Biorremediação de solo contaminado com sulfentrazone associada a plantas e micro-organismos / Christiane Augusta Diniz Melo. - Viçosa, MG, 2015.  
xi, 122f. : il. ; 29 cm.

Orientador: Maurício Dutra Costa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Solos - Descontaminação. 2. Fitorremediação. 3. Herbicidas. 4. *Pseudomonas spp.*. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Fitotecnia. Programa de Pós-graduação em Fitotecnia. II. Título.

CDD 22. ed. 363.728

CHRISTIANE AUGUSTA DINIZ MELO

**BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM SULFENTRAZONE  
ASSOCIADA A PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS**

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

APROVADA: 19 de fevereiro de 2015.

  
Francisco Affonso Ferreira  
(Coorientador)

  
Francisco Cláudio Lopes de Freitas

  
Aroldo Ferreira Lopes Machado

  
José Barbosa dos Santos

  
Maurício Dutra Costa  
(Orientador)

*Aos meus queridos pais, José Arnaldo e Maria Augusta,  
ao meu irmão Douglas e ao meu noivo e companheiro Wilker,  
por todo amor e apoio durante essa jornada.*

*Dedico*

*Aos familiares e amigos de Viçosa e Itapeçerica.*

*Ofereço*

*“Suba o primeiro degrau com fé.  
Não é necessário que você veja toda a escada.  
Apenas dê o primeiro passo.”*

*Martin Luther King*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e pela força em todos os momentos.

A Universidade Federal de Viçosa (UFV) e ao Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, pela oportunidade de realizar o doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos orientadores, Maurício Dutra Costa e Francisco Affonso Ferreira, pela orientação na pesquisa, pela confiança, pela paciência e pelos ensinamentos passados.

Aos coorientadores Antonio Alberto da Silva e Lino Roberto Ferreira, pela contribuição, pela atenção e pela amizade em todos esses anos.

Aos professores Aroldo Lopes Ferreira Machado, Francisco Cláudio Lopes de Freitas e José Barbosa dos Santos, pela participação na banca examinadora e pelas sugestões e contribuições ao trabalho.

Ao professor do Departamento de Estatística da UFV Carlos Henrique Osório Silva, pelo auxílio nas análises de identidade de modelos da regressão.

A Equipe de manejo integrado de Plantas Daninhas (MIPD), pela convivência, pelos momentos de brincadeiras e pela parceria na execução das atividades. A união do grupo fez toda a diferença nessa caminhada!

Aos colegas do Laboratório de Ecologia Microbiana e Laboratório de Associações Micorrízicas (MIC), pela boa receptividade, pela paciência e auxílio nas atividades laboratoriais.

Ao colega Júlio Delvaux, pela ajuda na extração de rDNA dos isolados bacterianos e envio para sequenciamento.

Aos colegas André Marcos Massenssini e Sérgio Diaz, pelas sugestões práticas e dicas quanto ao planejamento dos trabalhos e utilização de equipamentos na MIC.

Aos amigos Ana Beatriz, pela ajuda e explicações quanto ao uso da cromatografia de alta eficiência, e Felipe Paolinelli, pelas contribuições no projeto e pela execução dos experimentos.

A todos os estagiários do MIPD e, em especial, aos granduandos Wendel, Douglas e Ramon (MIC), pela valiosa ajuda na montagem, condução e desmonte do experimento de casa de vegetação e análises no laboratório.

Aos funcionários do Vale da Agronomia, nas pessoas de Paulo Paiva e Luis Freitas, pela coleta de solo e ajuda sempre que necessária.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia, Tatiani e Lídia, pelo suporte e pronta disponibilidade em sanar as dúvidas sobre os assuntos administrativos.

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma colaboraram para que eu chegasse até aqui. Muito Obrigada!

## **BIOGRAFIA**

Christiane Augusta Diniz Melo, filha de José Arnaldo de Melo e Maria Augusta Resende Melo, nasceu em 17 de setembro de 1985 em Itapecerica, 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 2010, iniciou o Mestrado em Produção Vegetal pelo Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em fevereiro de 2012. Em março de 2012 ingressou no Doutorado em Produção Vegetal no mesmo programa e instituição, submetendo-se à defesa da tese em 19 de fevereiro de 2015.

## SUMÁRIO

|  |      |
|--|------|
| RESUMO .....   | viii |
| ABSTRACT .....   | x    |
| INTRODUÇÃO GERAL .....   | 1    |
| CAPÍTULO 1   |      |
| REFERENCIAL TEÓRICO: PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS NA BIORREMEDIÇÃO DE SOLOS COM HERBICIDAS .....                   | 4    |
| 1. Introdução .....  | 4    |
| 2. Biorremediação .....  | 5    |
| 2.1. Fitorremediação de solo com herbicidas .....  | 6    |
| 2.2. Micro-organismos na remediação de solos contaminados com herbicidas .....                                   | 9    |
| 3. Sulfentrazone .....   | 12   |
| 4. Considerações finais .....  | 14   |
| 5. Referências Bibliográficas .....  | 14   |
| CAPÍTULO 2   |      |
| ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DO SULFENTRAZONE .....                                     | 27   |
| RESUMO .....   | 27   |
| ABSTRACT .....   | 27   |
| INTRODUÇÃO .....   | 28   |
| MATERIAL E MÉTODOS .....   | 30   |
| RESULTADOS .....   | 33   |
| DISCUSSÃO .....  | 37   |
| AGRADECIMENTOS .....   | 40   |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....   | 40   |
| CAPÍTULO 3   |      |
| PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES FITORREMEIADORAS DE SOLO COM SULFENTRAZONE POR <i>Pseudomonas spp.</i> ..... | 46   |
| RESUMO .....   | 46   |
| ABSTRACT .....   | 47   |
| INTRODUÇÃO .....   | 47   |
| MATERIAL E MÉTODOS .....   | 49   |
| RESULTADOS .....   | 51   |
| DISCUSSÃO .....  | 63   |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| CONCLUSÕES .....                | 66 |
| AGRADECIMENTOS.....             | 66 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |

#### CAPÍTULO 4

|   |    |
|---|----|
| ATIVIDADE MICROBIANA DE SOLO COM SULFENTRAZONE ASSOCIADA A ESPÉCIES FITORREMEIADORAS E INOCULAÇÃO COM CONSÓRCIO BACTERIANO..... | 74 |
| RESUMO.....   | 74 |
| ABSTRACT.....   | 75 |
| INTRODUÇÃO .....  | 75 |
| MATERIAL E MÉTODOS .....  | 78 |
| RESULTADOS.....   | 80 |
| DISCUSSÃO .....   | 85 |
| CONCLUSÕES .....  | 89 |
| AGRADECIMENTOS.....   | 89 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....   | 89 |

#### CAPÍTULO 5

|  |     |
|--|-----|
| BACTÉRIAS E PLANTAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM SULFENTRAZONE..... | 97  |
| RESUMO.....  | 97  |
| ABSTRACT.....  | 97  |
| INTRODUÇÃO .....   | 98  |
| MATERIAL E MÉTODOS .....   | 100 |
| RESULTADOS.....  | 104 |
| DISCUSSÃO .....  | 110 |
| CONCLUSÕES .....   | 114 |
| AGRADECIMENTOS.....  | 114 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....  | 114 |

|                           |     |
|---------------------------|-----|
| CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 121 |
|---------------------------|-----|

## RESUMO

MELO, Christiane Augusta Diniz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2015. **Biorremediação de solo contaminado com sulfentrazone associada a plantas e micro-organismos.** Orientador: Maurício Dutra Costa. Coorientadores: Antonio Alberto da Silva, Francisco Affonso Ferreira e Lino Roberto Ferreira.

O uso de herbicidas que apresentam elevado efeito residual no solo, a exemplo do sulfentrazone, pode apresentar sérios problemas de intoxicação de espécies suscetíveis e risco de contaminação ambiental. A biorremediação é ferramenta indicada para descontaminação de solos com herbicidas, sendo que a associação de plantas remediadoras com micro-organismos pode aumentar a eficiência da biodegradação do sulfentrazone. Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a eficiência da associação entre um consórcio microbiano e plantas remediadoras na biorremediação de solo contaminado com o sulfentrazone. Primeiramente realizou-se o isolamento de bactérias capazes de crescer na presença do sulfentrazone a partir de amostras de solo com histórico de aplicação do mesmo. O gênero *Pseudomonas* predominou dentre os 26 isolados bacterianos obtidos. Após triagem, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* e três isolados de *Pseudomonas sp.* foram selecionados por serem mais eficientes na biodegradação do sulfentrazone. Posteriormente, foi montando um experimento em casa de vegetação em esquema fatorial 2x4x4, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O primeiro fator constituiu-se da inoculação ou ausência do consórcio bacteriano selecionado, o segundo fator foi composto pelo monocultivo e cultivo misto das espécies fitorremediadoras *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) e *Helianthus annuus* (girassol), além da ausência de cultivo e o terceiro fator pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste). Foram analisadas a capacidade de promoção de crescimento vegetal pelo consórcio bacteriano, a biomassa e a atividade microbiana do solo, assim como a eficiência da biorremediação por meio de bioensaio e cromatografia líquida de alta eficiência. A inoculação de solo com o consórcio bacteriano selecionado contribuiu para a promoção do crescimento das espécies *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*, bem como proporcionou aumento da biomassa e atividade microbiana de solos contaminados com o sulfentrazone. *Canavalia ensiformis* na presença de consórcio bacteriano foi capaz de estimular maior atividade da microbiota associada e sustentar maior biomassa microbiana. Contudo, esta apresentou menor eficiência na redução dos resíduos de sulfentrazone no solo. O monocultivo de *Helianthus annuus* e o cultivo

misto reduziram em 64 e 43% o tempo de meia-vida do sulfentrazone comparado ao solo cultivado com *Canavalia ensiformis* sem e com inoculação, respectivamente. O cultivo misto de *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus* e o monocultivo de *Helianthus annuus*, independente da inoculação do solo com consórcio bacteriano, são as técnicas mais eficientes de biorremediação do sulfentrazone no solo. Os isolados obtidos são capazes de promover o crescimento das espécies fitorremediadoras *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus* e apresentam potencial de uso em programas de biorremediação do sulfentrazone. A fitorremediação associada à bioaugmentação é técnica promissora para descontaminação de solos com o sulfentrazone.

## ABSTRACT

MELO, Christiane Augusta Diniz, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2015. **Bioremediation of soil contaminated with sulfentrazone associated with plants and micro-organisms.** Adviser: Maurício Dutra Costa. Co-advisers: Antonio Alberto da Silva, Francisco Affonso Ferreira and Lino Roberto Ferreira.

The use of herbicides that have a high residual effect on soil, such as sulfentrazone, can cause serious problems for toxicity of susceptible species and the risk of environmental contamination. Bioremediation is an appropriate tool for herbicide decontaminated soil, and the association of remediation plants with micro-organisms can increase the efficiency of sulfentrazone biodegradation. Given the above, the aim of this work was to evaluate the efficiency of a microbial consortium in association with remediation plants in the bioremediation of soil contaminated with sulfentrazone. First, the isolation of bacteria capable of growing in the presence of sulfentrazone from the soil samples with application historic of the herbicide was undertaken. The *Pseudomonas* genus predominates among the 26 bacterial isolates obtained. After screening *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* and three isolates of *Pseudomonas sp.* were selected because they were more efficient in the biodegradation of sulfentrazone. We then, conducted an experiment in a greenhouse using a factorial of 2x4x4, distributed in a completely randomized design with four replications. The first factor consisted of inoculation or the absence of the selected bacterial consortium; the second factor was composed of the monocultivation or mixed cultivation, of phytoremediator species *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus*, as well as the absence of cultivation; and the third factor was composed of the time of bioremediation (25, 45, 65 and 85 days after thinning). The ability to promote plant growth by the bacterial consortium, the biomass and the microbial activity, as well as the effectiveness of bioremediation by bioassay and high performance liquid chromatography, were determined. The soil inoculated with the selected bacterial consortium contributed to the growth promotion of the species *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus*, and it contributed to an increase of microbial biomass and activity of soil contaminated with sulfentrazone. *Canavalia ensiformis*, in the presence of the bacterial consortium, was able to stimulate greater microbial activity and sustain higher microbial biomass. However, this showed a lower efficiency in reducing sulfentrazone residue in the soil. The monoculture of *Helianthus annuus* and the mixed cultivation decreased the half-life

time of sulfentrazone by 64 and 43% compared to the soil with *Canavalia ensiformis* with and without inoculation, respectively. The mixed cultivation of *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus* and the monoculture of *Helianthus annuus*, independent of soil inoculated with bacterial consortium, are the most efficient techniques for bioremediation of sulfentrazone in the soil. The isolates are able to promote the growth of phytoremediator species *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus* and have the potential for use in sulfentrazone bioremediation programs. Phytoremediation associated with bioaugmentation is a promising technique for soil remediation with sulfentrazone.

## INTRODUÇÃO GERAL

Os herbicidas são produtos químicos utilizados na agricultura para garantir o crescimento e desenvolvimento das culturas livres da interferência de plantas daninhas. Muitos desses são persistentes, a exemplo do sulfentrazone, e podem, decorrido o período desejado de controle, permanecer por longo tempo no solo causando efeitos indesejáveis e colocando em risco a segurança ambiental.

A permanência desses herbicidas no solo por muito tempo pode acarretar sérios problemas como intoxicação de espécies suscetíveis cultivadas em sequência na mesma área e intoxicação de organismos não alvo, especialmente micro-organismos benéficos do solo, além de elevar os riscos de lixiviação e contaminação de águas superficiais e subterrâneas, o que gera grande preocupação ambiental.

Técnicas de biorremediação têm sido utilizadas como forma de descontaminação de solos com resíduos tóxicos de herbicidas. O cultivo de espécies vegetais remediadoras de solos contaminados com herbicidas tem sido bastante estudado no Brasil, contudo, a utilização de micro-organismos para descontaminação de solos com esses produtos é prática incipiente no país. Estudos envolvendo a fitorremediação de solos com herbicidas geralmente utilizam uma única espécie remediadora. No presente trabalho, testou-se a hipótese que a capacidade de fitorremediação do sulfentrazone pode ser incrementada com o cultivo simultâneo de duas espécies vegetais distintas.

Micro-organismos edáficos, especialmente bactérias e fungos, participam de forma significativa na eliminação ou redução dos níveis de herbicidas no solo pela sua capacidade degradadora. A principal via de degradação do sulfentrazone, assim como de outros herbicidas com residual longo, é a microbiana, a qual assume papel importante na persistência desses produtos no solo. Baseado no potencial apresentado por plantas e micro-organismos específicos em biodegradar herbicidas no solo, a associação desses pode acelerar o processo de remediação, tornando o solo apto a receber culturas sensíveis em menor tempo. No entanto, são escassos na literatura trabalhos envolvendo a utilização de plantas e de micro-organismos do solo na biorremediação de herbicidas em condições tropicais.

Assim, diante da frequente utilização do sulfentrazone no controle de plantas daninhas em culturas de grande importância econômica para o país, da preocupação em impedir a contaminação de solos e águas, da relevância da biorremediação para descontaminação de solos e da falta de informação a cerca da eficiência do processo

quando consórcios microbianos são utilizados conjuntamente com plantas fitorremediadoras, propôs-se a realização deste trabalho.

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a eficiência da associação entre um consórcio microbiano e plantas remediadoras na biorremediação de solo contaminado com o sulfentrazone. No capítulo 1 foi apresentado o referencial teórico que serviu como base para o desenvolvimento deste trabalho. Nele são abordados os papéis das plantas e micro-organismos na biorremediação de solos contaminados com herbicidas, bem como a caracterização do herbicida sulfentrazone. No capítulo 2 objetivou-se isolar e caracterizar bactérias capazes de utilizar o sulfentrazone como única fonte de carbono. A partir deste estudo foi possível selecionar os isolados mais eficientes na degradação do sulfentrazone *in vitro*. No capítulo 3 foi comprovado o potencial de promoção de crescimento de *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*, espécies fitorremediadoras do sulfentrazone, pelos isolados selecionados. No capítulo 4 foi estudada a biomassa e atividade microbiana associada a essas espécies vegetais, em monocultivo e em cultivo misto, em solo com o sulfentrazone. Por fim, no capítulo 5 foi avaliada a eficiência da biorremediação de solos com sulfentrazone pelo consórcio bacteriano previamente selecionado, por plantas fitorremediadoras e pela associação desses. Neste, os resíduos do sulfentrazone no solo após a inoculação e cultivo, por diferentes tempos e arranjos de plantas, foram detectados por meio de bioensaio e cromatografia líquida de alta eficiência.

# **CAPÍTULO 1**

# REFERENCIAL TEÓRICO: PLANTAS E MICRO-ORGANISMOS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS COM HERBICIDAS

## 1. Introdução

O solo é um ecossistema complexo onde diversos micro-organismos desempenham papel importante na manutenção da fertilidade e na produtividade das culturas por meio de interações com componentes biológicos e físico-químicos (AHEMAD et al., 2009; ILIEVA; VASILEVA, 2014; KOSEV; VASILEVA, 2014). Além disso, os micro-organismos do solo, especialmente bactérias e fungos, atuam de forma ativa e significativa na degradação de xenobióticos, sendo determinantes na persistência dessas moléculas no ambiente (OHMES et al., 2000; DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2004; OTENIO et al., 2005; MARTINS et al., 2007; SILVA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2010; SHARMA et al., 2011; NITISAKULKAN et al., 2014).

Dentre as substâncias químicas estranhas à vida ou não encontradas naturalmente no ambiente, há diversos herbicidas utilizados na agricultura. Alguns desses herbicidas apresentam longo efeito residual no solo. Tal comportamento é importante em situações onde o período total de prevenção da interferência (PTPI) das plantas daninhas sobre as culturas é longo, exercendo controle efetivo durante o período necessário, sem que haja necessidade de repetidas aplicações para manter a cultura livre de competição pelos recursos do meio (PROCÓPIO et al., 2009). No entanto, após o término do PTPI, que muitas vezes coincide com a cobertura do solo pela cultura, a presença do herbicida neste ambiente passa a ser indesejável. Herbicidas de longa atividade residual no solo como picloram, tebuthiuron, imazapyr, imazaquin, trifloxysulfuron-sodium e sulfentazone estão entre os mais problemáticos.

Problemas como *carryover* (ARTUZI; CONTIERO, 2006; DAN et al., 2010; MANCUSO et al., 2011), intoxicação a organismos não alvo (VIEIRA et al., 2007; LANE et al., 2012; SILVA et al., 2014), lixiviação e contaminação de águas subterrâneas (SANTOS et al., 2015 [no prelo]), *runoff* e contaminação de águas superficiais (MARCHESAN et al., 2010; OTTO et al., 2012) podem ser ocasionados por esses herbicidas.

Nesse sentido, aumenta-se a preocupação em impedir ou remediar tais efeitos negativos causados pela presença desses herbicidas no solo. A remediação de uma área contaminada pode ser química (quelatos, reagentes), física (retirada da camada contaminada; injeção de ar) ou biológica (micro-organismos e plantas) (PROCÓPIO et

al., 2009), destacando-se esta última medida para aplicação em áreas agricultáveis submetidas à aplicação de herbicidas.

Dentro da biorremediação, o emprego de espécies vegetais fitorremediadoras de herbicidas tem sido bastante estudado no Brasil (SANTOS et al., 2004a; PIRES et al., 2006; CARMO et al., 2008; PROCÓPIO et al., 2008; BELO et al., 2011; MADALÃO et al., 2012; MONQUERO et al., 2013), contudo a utilização de micro-organismos do solo como bactérias e fungos para biorremediar áreas contaminadas ainda é pouco pesquisada no país.

A fitorremediação destaca-se dentro das técnicas de biorremediação pelo baixo custo e eficiência na descontaminação de solos. Comumente emprega-se uma única espécie, que reúne uma série de características desejáveis, além da tolerância, devidamente escolhida em seleção prévia. Estudos envolvendo a utilização de cultivo misto formado por duas espécies distintas, embora escassos na literatura, permitem explorar, ao mesmo tempo e na mesma área, a capacidade fitorremediadora de ambas, que além de melhorar a fitoestimulação da microbiota associada, pode aumentar a rizodegradação e a eficiência do processo de biorremediação.

Ademais, a introdução de micro-organismos comprovadamente degradadores de herbicidas em campos agrícolas, caracterizada pela bioaugmentação, poderá trazer também benefícios diretos às plantas.

## **2. Biorremediação**

Dentre as inúmeras tecnologias para remediação, ressalta-se a biorremediação, como uma opção para promover a destoxificação do local ou a remoção de elementos contaminantes do solo. A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos, sejam micro-organismos e, ou plantas, que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando-os em substâncias menos tóxicas ou inertes (JACQUES et al., 2010). Essa biotecnologia vem sendo utilizada há anos em vários países e, em certos casos, apresenta menor custo e maior eficiência na remoção dos contaminantes do que as técnicas físicas e químicas, sendo atualmente utilizada no tratamento de diversos resíduos e na remediação de áreas degradadas (BAMFORTH; SINGLETON, 2005; OTENIO et al., 2005; MARTINS et al., 2007; JESUS et al., 2009; XU et al., 2009; ZHANG et al., 2013; NITISAKULKAN et al., 2014).

Para remoção dos contaminantes do ambiente, técnicas de biorremediação *in situ* podem ser utilizadas, como atenuação natural, bioaumentação, bioestimulação e fitorremediação ou técnicas de biorremediação *ex situ*, como compostagem, “landfarming” e biorremediadores (JACQUES et al., 2007). Devido aos riscos ambientais envolvidos com as técnicas de biorremediação *ex situ*, tais como a escavação, a manipulação, o transporte e o armazenamento de materiais contaminados, as técnicas *in situ* têm sido mais empregadas (PROCÓPIO et al., 2009).

A biorremediação é relatada por vários autores (PIRES et al., 2003ab; PROCÓPIO et al., 2005; CHELINHO et al., 2010) como prática promissora para descontaminação de ambientes que receberam a aplicação de herbicidas. A seleção da estratégia mais efetiva de biorremediação está baseada nas características dos produtos (solubilidade, estrutura molecular, volatilidade, peso específico e suscetibilidade ao ataque microbiano), da área contaminada, bem como da eficiência dos organismos vivos isolados ou em consórcio.

O desenvolvimento de pesquisas com biorremediação pode gerar novas tecnologias ou aperfeiçoar aquelas já existentes, o que é essencial para o incremento de novos projetos de descontaminação ambiental tanto de solos, quanto de outros ambientes (LEONEL et al., 2010).

## **2.1. Fitorremediação de solo com herbicidas**

A fitorremediação, dentro da biorremediação, é uma técnica que envolve o emprego de plantas e a microbiota associada, além de práticas agrônômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos para o ecossistema (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000).

Nos últimos anos, principalmente no Brasil, a pesquisa envolvendo a fitorremediação, além do cunho ambiental (SCRAMIN et al., 2001), recebeu forte impulso para utilização em áreas agricultáveis, com trabalhos que evidenciaram a possibilidade de se empregar plantas para reduzir os resíduos de herbicidas e, conseqüentemente, a toxicidade a culturas suscetíveis, cultivadas em áreas que receberam tais compostos (SANTOS et al., 2007). Trabalhos têm difundido a utilização de plantas na remediação de poluentes e alguns apontam a eficiência dessas na remediação de herbicidas como tebuthiuron (PIRES et al., 2006, 2005), trifloxysulfuron

sodium (SANTOS et al., 2004a), picloram (PROCÓPIO et al., 2008) e sulfentrazone (MADALÃO et al., 2012; BELO et al., 2011).

A utilização da fitorremediação é baseada na seletividade, natural ou desenvolvida, que algumas espécies exibem a determinados tipos de compostos ou mecanismos de ação (CUNNINGHAM et al., 1996). Esse fato pode ser de ocorrência comum em espécies agrícolas melhoradas geneticamente e por várias espécies de plantas daninhas, tolerantes ou resistentes a certos herbicidas ou grupos de herbicidas. Essa seletividade deve-se ao fato de que os herbicidas podem ser translocados para outros tecidos da planta e subsequentemente volatilizados; podem ainda sofrer parcial ou completa degradação; serem transformados em compostos menos tóxicos ou serem combinados e, ou ligados a tecidos das plantas (compartimentalização) (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000; SCRAMIN et al., 2001).

Para seleção de espécies fitorremediadoras são avaliadas um número elevado de espécies, cuja escolha é baseada em características desejáveis como tolerância e capacidade de reduzir os resíduos tóxicos de herbicidas, rápido crescimento, facilidade de cultivo, propagação e aquisição, e, no caso de lavouras, que a espécie escolhida tenha baixo potencial de tornar-se planta daninha (PIRES et al., 2003b; SANTOS et al., 2007). No Brasil já foram selecionadas plantas com capacidade fitorremediadora dos herbicidas trifloxysulfuron-sodium (SANTOS et al., 2004b; PROCÓPIO et al., 2004), tebuthiuron (PIRES et al., 2003a), picloram (CARMO et al., 2008; SILVA et al., 2012), sulfentrazone (MADALÃO et al., 2012; BELO et al., 2011), diclosulam (MONQUERO et al., 2013) e imidazolinonas (imazethapyr + imazapic e imazapyr + imazapic) (GALON et al., 2014).

Após diversas etapas de um processo minucioso de seleção, as leguminosas *Stizolobium aterrimum* (mucuna-preta) e *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) mostraram-se capazes de reduzir os resíduos do herbicida trifloxysulfuron-sodium no solo, em casa de vegetação e posteriormente a campo (SANTOS et al., 2004ab; 2007; PROCÓPIO et al., 2006; 2007; BELO et al., 2007). Em procedimentos semelhantes, as mesmas espécies também conseguiram fitorremediar ambientes com resíduos de tebuthiuron, todavia, em níveis menos expressivos (PIRES et al., 2005; 2006), notadamente por seu maior espectro de ação e persistência no solo (MEYER; BOVEY, 1988). Belo et al. (2011) e Madalão et al. (2012) selecionaram *Helianthus annuus* e *Canavalia ensiformis*, como as espécies mais eficientes na remediação de solos contaminados com o sulfentrazone. Resultados preliminares evidenciaram que as

espécies *Brachiaria brizantha*, *B. decumbens* e *Avena strigosa* mostraram-se indiferentes à presença do picloram+2,4-D no solo (SILVA et al., 2006) e Carmo et al. (2008) selecionaram *Eleusine coracana* e *Panicum maximum* Jacq. cv. Tanzânia-1 como espécies potencialmente remediadoras do picloram.

A eficiência do processo de remediação é assegurada quando a fitoextração seguida da fitotransformação, resulta na mineralização ou na formação de metabólitos não tóxicos ou menos tóxicos que a molécula original. Tal resultado é desejável especialmente em áreas agrícolas que envolvam culturas importantes e sensíveis no sistema de sucessão/rotação.

A rizodegradação associada à fitoestimulação é importante mecanismo de fitorremediação, já que é um processo que envolve a degradação da molécula no ambiente rizosférico em resposta ao estímulo à atividade microbiana nas proximidades das raízes por meio da liberação de exsudatos e enzimas via planta (WILSON, et al., 2000; BAIS et al., 2006). Além desta, pode ocorrer a rizovolatilização ou rizoestabilização do herbicida no solo, as quais consistem, respectivamente, na volatilização do contaminante, transformando-o, na rizosfera, a uma forma volátil, a qual é liberada na atmosfera e na imobilização, lignificação ou humificação do contaminante na rizosfera da espécie vegetal, ficando o contaminante inativo no solo, mesmo que preservando sua integridade molecular (PROCÓPIO et al., 2009). Vários trabalhos demonstram a contribuição das plantas na estimulação da atividade microbiana para a degradação de herbicidas no solo (SANTOS et al., 2007; FERNANDEZ et al., 2009; SANTOS et al., 2010).

Outros mecanismos biológicos da fitorremediação são a fitoacumulação e a fitovolatilização. A fitoacumulação consiste no armazenamento do contaminante nas raízes ou em outros órgãos, sem modificação das moléculas do xenobiótico (aprisionamento). A fitovolatilização, à semelhança do que pode acontecer na rizosfera, pode ocorrer após a fitoextração e até mesmo após a fitoacumulação. A afirmação precisa sobre quais mecanismos são mais atuantes na fitorremediação de determinado herbicida, bem como a identidade e toxicidade dos subprodutos da transformação e o compartimento da planta em que são armazenados, ainda são gargalos a serem desvendados pelos pesquisadores.

Algumas respostas que buscam elucidar a tolerância de plantas e os mecanismos de degradação de herbicidas foram obtidas por Merini et al. (2009), que atestaram a eficiência de *Lolium multiflorum* na fitorremediação do herbicida atrazine. Estes autores

observam que *L. multiflorum* apresentava alta taxa de degradação inicial do atrazine e sua tolerância a este herbicida estava relacionada ao aumento do seu metabolismo, por meio de desintoxicação enzimática via P450. Também Sulmon et al. (2007) verificaram que a aplicação exógena de sacarose em meio de cultivo e em solo cultivado com *Arabidopsis thaliana* pode aumentar o crescimento, a tolerância e a fitoacumulação do atrazine por esta espécie.

A grande maioria dos trabalhos disponíveis na literatura investiga o efeito do cultivo de uma única espécie na remediação de áreas contaminadas com herbicidas. Contudo, a utilização de duas ou mais espécies com potencial remediador do herbicida em questão, na mesma área, pode ser boa estratégia para aumentar a eficiência do processo. Em trabalho realizado na China foi evidenciado que a comunidade mista formada de *Phragmites australis* e *Acorus calamus* exibiu maior percentagem de biodegradação do butachlor comparado aos resíduos encontrados em solos rizosféricos de três comunidades vegetais puras de *P. australis*, *A. calamus* e *Zizania aquatica* (YANG et al., 2013). Segundo os autores, a meia-vida do butachlor nos solos rizosféricos da comunidade mista foi 33, 51 e 57% mais curta em comparação com as três comunidades vegetais puras, respectivamente (YANG et al., 2013).

Embora a fitorremediação de herbicidas tenha despertado o interesse da comunidade científica, são escassas as pesquisas associando a fitorremediação com a introdução de micro-organismos comprovadamente degradadores de herbicidas em campos agrícolas, especialmente em relação ao sulfentrazone, o qual é amplamente utilizado em extensas áreas com culturas de grande importância econômica para o país.

## **2.2. Micro-organismos na remediação de solos contaminados com herbicidas**

Bactérias e fungos são considerados os principais responsáveis pela transformação dos herbicidas no solo (OLIVEIRA JR.; REGITANO, 2009). A degradação de substâncias xenobióticas por micro-organismos presentes no solo depende da presença de várias enzimas que realizam metabolismo para seu crescimento, e dessa forma conseguem remediar os compostos químicos, reduzir as concentrações presentes no ambiente ou torná-los menos tóxicos (LEONEL et al., 2010).

Processos de biodegradação de substratos com herbicidas podem ocorrer de acordo com a atuação de uma espécie, ou, mais comumente, de várias espécies de micro-organismos do solo. A molécula herbicida pode ser utilizada pelos micro-

organismos como fonte de nutriente e energia. No entanto, a estrutura química do produto pode ser modificada pela microbiota sem obtenção de energia para o seu crescimento, o que caracteriza o cometabolismo. Uma vez que micro-organismos presentes em solos são capazes de degradar e mineralizar herbicidas, pode-se desenvolver a biorremediação de sítios contaminados empregando-se micro-organismos selecionados.

A degradação cometabólica de tribenuron methyl, um herbicida do grupo químico das sulfonilureias, por uma estirpe bacteriana NyZ42 de *Pseudomonas* isolada de solo contaminado, elevou a eficiência da degradação em cerca de 80% em meio mínimo líquido dentro de quatro dias, quando foi utilizada glicose ou succinato como fonte de carbono suplementar. Os autores relatam que essa estirpe era incapaz de utilizar tribenuron methyl como única fonte de carbono (ZHANG et al., 2013).

A degradação de atrazina pode ocorrer por linhagens individuais de *Pseudomonas sp.* (MANDELBAUM et al., 1995; KATZ et al., 2001), *Rhodococcus rhodochrous* (SINGH et al., 2004), *Aerobacterium sp.*, *Microbacterium sp.*, *Bacillus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Deinococcus sp.* ou *Delftia acidovorans* (VARGHA et al., 2005), bem como por um consórcio de espécies, tais como *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Nocardia sp.*, *Rhizobium sp.* e *Variovorax paradoxus* (SMITH et al., 2005). Alguns micro-organismos podem, enzimaticamente, levar à completa mineralização do herbicida por meio de reações de N-desalquilação ou N-desaminação das cadeias laterais, produzindo subprodutos como o desetilatrizona (DEA) e desisopropilatrizona (DIA).

A degradação do s-metolachlor foi detectada por diversas espécies de bactérias identificadas como *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Enterobacter aerogenes* (MARTINS et al., 2007). Após 5 dias de incubação a 35°C, o consórcio bacteriano proporcionou diferença média de 14,42% na concentração do herbicida e em 10 dias diferença de 35,01%. Além disso, os autores verificaram a presença de halos em torno das colônias, comprovando a hipótese da degradação do s-metolachlor.

O isolamento de dez fungos de solo contaminado com atrazina e de cinco fungos em solo com atrazina + simazina foi realizado por Colla et al. (2008). Através da identificação, constatou-se que esses pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Representantes dos dois primeiros gêneros apresentaram maior

velocidade de crescimento radial em solo contaminado com atrazine e com a mistura, apresentando potencial para serem utilizados em processos de biorremediação.

Bactérias e fungos envolvidos na degradação do sulfentrazone em solos sem histórico da aplicação do herbicida, mas suplementados com crescentes concentrações do mesmo, foram isolados e identificados (Martinez et al., 2008ab; 2010). Segundo os autores, dentre as espécies de bactérias isoladas com potencial de degradação deste herbicida estão *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia picketti* e *Methylobacterium radiotolerans*. Os fungos com potencial de degradação do sulfentrazone pertencem aos gêneros *Cladosporium*, *Eupenicillium*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Chrysosporium* e *Metarrhizium*.

Dellamatrice e Monteiro (2004) isolaram do solo um consórcio de três espécies de bactérias *Acinetobacter johnsonii* e duas espécies de *Bacillus sp.* cultivadas em meio contendo diuron como fonte de carbono. Nesse estudo apenas a espécie *A. johnsonii* foi capaz de metabolizar a molécula.

Essas pesquisas demonstram a versatilidade metabólica e a diversidade de micro-organismos com potencial degradativo que podem ser empregados na remediação de solos com herbicidas. Dessa forma, o isolamento, caracterização e identificação dos micro-organismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos herbicidas são essenciais para incorporá-los aos processos de biorremediação.

A bioaumentação com micro-organismos comprovadamente degradadores de uma molécula herbicida, em associação com a fitorremediação pode acelerar o processo de descontaminação de solos com herbicidas. Além da capacidade degradadora, algumas bactérias isoladas de solos podem apresentar a habilidade de promover o crescimento vegetal. (Rizo)bactérias promotoras do crescimento facilitam o crescimento das plantas diretamente através do auxílio na aquisição de recursos (nitrogênio, fósforo e minerais essenciais) e da modulação dos níveis de hormônios vegetais, ou indiretamente, através da diminuição dos efeitos inibidores de diversos fitopatógenos (AHEMAD; KIBRET, 2014). Vários estudos têm demonstrado o aumento da sanidade e da produtividade de diferentes espécies de plantas pela aplicação de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas em condições normais e sob algum tipo de estresse, como por exemplo, solos contaminados com herbicidas (AHEMAD; KHAN, 2010; 2011; AHEMAD; KIBRET, 2014).

A possibilidade de isolar micro-organismos do solo que reúnem tais características benéficas pode permitir grandes avanços nos estudos de biorremediação de herbicidas em solos agrícolas.

### 3. Sulfentrazone

Dentre os herbicidas com longo efeito residual no solo e de larga utilização destaca-se o sulfentrazone. O sulfentrazone (N- {2,4- dicloro- 5- [4- (difluorometil)- 4,5- diidro- 3- metil- 5- oxo- 1H- 1,2,4- triazol- 1- il] fenil} metanesulfonamida) é recomendado para aplicação em pré-emergência nas culturas de soja, cana-de-açúcar, café, eucalipto, citros, fumo e abacaxi (AGROFIT, 2014). Apresenta como características físico-químicas: alta solubilidade em água (780 mg L<sup>-1</sup> a pH 7,0), baixa pressão de vapor (1 x 10<sup>-9</sup> mmHg a 25 °C), baixa sorção (K<sub>oc</sub>=43), constante de dissociação (pK<sub>a</sub>) 6,56 e coeficiente de partição (K<sub>ow,pH7</sub>) 9,79 (IUPAC, 2014), tendo como principal via de degradação no solo a microbiana (MARTINEZ et al., 2008ab; 2010).

O sulfentrazone possui amplo espectro de ação e é eficiente no controle da maioria das plantas daninhas dicotiledôneas, de algumas gramíneas anuais e perenes e das ciperáceas. O controle se dá através da ruptura da membrana celular, iniciando pela inibição da enzima PROTOX (protoporfirinogênio oxidase) na biossíntese da clorofila.

A persistência do sulfentrazone aplicado na cultura da soja foi determinada em 376 dias após a aplicação (DAA) de 0,6 kg ha<sup>-1</sup> do ingrediente ativo (i.a.), enquanto na dose de 1,20 kg ha<sup>-1</sup> i.a., não foi possível determinar o final da persistência, pois, mesmo na última época amostrada (539 DAA), a beterraba, espécie utilizada como bioindicadora, mostrou-se sensível ao herbicida (BLANCO; VELINI, 2005). Em outro estudo a persistência desse herbicida, aplicado na cultura da cana-de-açúcar, foi determinada em 601 DAA na dose de 0,6 kg ha<sup>-1</sup> i.a. e 704 DAA na dose de 1,20 kg ha<sup>-1</sup> i.a. (BLANCO et al., 2010).

A meia-vida do sulfentrazone no solo foi reportada em experimentos de campo e de laboratório variando entre 24 e 302 dias, dependendo das condições experimentais e edafoclimáticas locais (OHMES et al., 2000; CHEN, 2003; MARTINEZ et al., 2008ab; BRUM et al., 2013). A meia-vida do sulfentrazone foi estimada em 146,5 e 172,4 dias em Latossolo Vermelho e Argissolo Vermelho, respectivamente, mantidos a 27°C, 70% de umidade e fortificados com 0,7 µg g<sup>-1</sup> i.a. (MARTINEZ et al., 2008ab). Em trabalho

realizado por BRUM et al. (2013) sob diferentes condições de umidade, temperatura e profundidades avaliadas, a meia-vida do sulfentrazone variou de 34 a 116 dias.

A sorção e dessorção do sulfentrazone foram estudadas em dez solos brasileiros com diferentes características físico-químicas e texturais por meio de cromatografia líquida de alta eficiência e bioensaio (PASSOS et al., 2013; FREITAS et al., 2014; MADALÃO, 2014). Em todos os solos foi verificado baixo potencial de sorção e dessorção do herbicida. De modo geral, a sorção nesses trabalhos foi maior em solos com teores de matéria orgânica e argila mais elevados.

De acordo com Vivian et al. (2006), a maioria dos resíduos de sulfentrazone detectada em Argissolo Vermelho-Amarelo encontra-se na profundidade de 0-10 cm, sendo baixo o potencial de lixiviação em solos argilosos. Por outro lado, os autores encontraram elevada persistência do sulfentrazone nesse solo, com efeito negativo sobre sua microbiota. Em trabalho utilizando colunas de solo, bioensaio e três precipitações, a presença do sulfentrazone foi observada até a camada de 10 cm do Latossolo Vermelho-Escuro, mesmo com a maior precipitação (106 mm) (BACHEGA et al., 2009). Contudo, esses autores observaram aumento do efeito tóxico do sulfentrazone em plantas de *S. bicolor* com o aumento da precipitação. Também em ensaio de lixiviação, foi constatada atividade residual do herbicida até 40 cm de profundidade, na precipitação de 80 mm, nos solos de textura média e argilosa (MONQUERO et al., 2010).

Rossi et al. (2005), utilizando como planta teste o sorgo (*Sorghum bicolor*) para avaliar a lixiviação do sulfentrazone em dois tipos de solo, submetidos a diferentes regimes pluviométricos, determinaram que sob precipitação de 90 mm o herbicida foi detectado até 12,5 cm de profundidade na coluna contendo Nitossolo Vermelho. Comportamentos distintos do sulfentrazone foram verificados em três solos com maior movimentação descendente do produto, na dose de 0,75 kg ha<sup>-1</sup> i.a., naquele de textura franco-arenosa até 27,5 cm, seguido pelos solos de textura argilosa com baixo e alto teor de matéria orgânica até 25 e 17,5 cm, respectivamente (MELO et al., 2010a). Elevado efeito residual do sulfentrazone (0,5 kg ha<sup>-1</sup>) após 60 dias da aplicação nesses três solos também foi verificado (MELO et al., 2010b).

Além de persistente, o sulfentrazone apresenta mobilidade no solo e potencial de lixiviação (IUPAC, 2014). Tais características fazem com que este herbicida seja bastante estudado pela comunidade científica, demandando, frente à inexistência de informações, pesquisas associando micro-organismos degradadores do sulfentrazone

com plantas fitorremediadoras na tentativa de elevar a eficiência do processo de biorremediação de solos contaminados com o produto.

#### **4. Considerações finais**

A biorremediação é importante ferramenta para descontaminação de solos com resíduos de herbicidas. Embora o uso de plantas no processo seja bastante estudado, a bioaugmentação com micro-organismos comprovadamente degradadores em solos agrícolas ainda é pouco aplicada. Nesse sentido, novas perspectivas são apresentadas nos próximos capítulos explorando o potencial de duas espécies fitorremediadoras do sulfentrazone em cultivo misto e em associação com bactérias capazes de biodegradar este herbicida.

#### **5. Referências Bibliográficas**

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. (ed.). **Tópicos em Ciência do solo**. v.1. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2000. p. 299 - 352.

AHEMAD M.; KIBRET M. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. **Journal of King Saud University – Science**, v. 26, p. 1 - 20, 2014.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 735 - 745, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A.; WANI, P. A. Remediation of herbicides contaminated soil using microbes. In: Khan, M. S., Zaidi, A., Musarrat, J. (ed.), **Microbes in Sustainable Agriculture**. Nova Science Publishers, New York, USA. 2009. p. 261 - 284.

AGROFIT - **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2014. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10 de novembro de 2014.

ARTUZI, J. P.; CONTIERO, R. L. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1119 - 1123, 2006.

BACHEGA, T. F.; PAVANI, M. C M. D.; ALVES, P. L. C. A.; SAES, L. P.; BOSCHIERO, M. Lixiviação de sulfentrazone e amicarbazone em colunas de solo com adição de óleo mineral. **Planta Daninha**, v. 27, n. 2, p. 363 - 370, 2009.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233 - 266, 2006.

BAMFORTH, S.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723 - 736, 2005.

BELO, F. A; COELHO, A. T. C. P.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B. Potencial de Espécies Vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 821 - 828, 2011.

BELO, A. F.; SANTOS, E. A.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; CECON, P. R.; SILVA, L.L. Fitorremediação de solo adubado com composto orgânico e contaminado com trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 25, n. 2, p. 251 - 258, 2007.

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D.; BATISTA FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 71 - 75, 2010.

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com soja e seu efeito em culturas sucedâneas. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 693 - 700, 2005.

BRUM, C. S.; FRANCO, A. A.; JÚNIOR, R. P. S. Degradação do herbicida sulfentrazone em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 558 - 564, 2013.

CARMO, M. L.; PROCOPIO, S. O.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BARROSO, A. L. L.; SILVA, G. P.; CARMO, E. L.; BRAZ, G. B. P.; SILVA, W. F. P.; BRAZ, A. J. B. P.; PACHECO, L. P. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 301 - 313, 2008.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A. M.; VIEGAS, C. A.; SOUSA, J. P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas sp.* ADP. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 568 - 578, 2010.

CHEN, A. Sulfentrazone. In: LEE, P.W. (ed). **Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals**, v. 1. John Wiley, Chichester, 2003. p. 564 - 577.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809 - 813, 2008.

COUTINHO, H. D.; BARBOSA, A. R. Fitorremediação: Considerações Gerais e Características de Utilização. **Silva Lusitana**, v. 15, n. 1, p. 103 - 117, 2007.

CUNNINGHAM, S. D.; ANDERSON, T. A.; SCHWAB, A. P. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. **Advances in Agronomy**, v. 56, p. 55 - 114, 1996.

DAN, H. A.; DAN, L. G. M.; BARROSO, A. L. L.; PROCÓPIO, S. O.; OLIVEIRA JR., R. S.; SILVA, A. G.; LIMA, M. D. B.; FELDKIRCHER, C. Residual activity of herbicides used in soybean on grain sorghum crop succession. **Planta Daninha**, v. 28, n. spe., p. 1087 - 1095, 2010.

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.; PITELLI, R. A.; CADENAZZI, M. 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.

FREITAS, M. A. M.; PASSOS, A. B. R. J.; TORRES, L. G.; MORAES, H. M. F.; FAUSTINO, L. A.; ROCHA, P. R. R.; SILVA, A. A. Sorção do sulfentrazone em diferentes tipos de solo determinada por bioensaios. **Planta Daninha**, v. 32, n. 2, p. 385 - 392, 2014.

GALON, L.; LIMA, A. M.; GUIMARÃES, S.; BELARMINO, J. G.; BURG, G. M.; CONCENÇO, G.; BASTIANI, M. O.; BEUTLER, A. N.; ZANDONA, R. R.; RADÜNZ, A. L. Potential of plant species for bioremediation of soils applied with imidazolinone herbicides. **Planta Daninha**, v. 32, n. 4, p. 719 - 726, 2014.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J. da; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 280 - 287, 2010.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192 - 1201, 2007.

JESUS, S. L.; ARÉVALO, R. A.; ROMÃO, G. O.; ROSSI, L. M.; COSCIONE, A. R.; NOGUEIRA, N. L. Potencial de utilização de *Cyperus rotundus* na descontaminação de

áreas de descarte de resíduos industriais com elevados teores de metais. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 641 - 645, 2009.

ILIEVA, A.; VASILEVA, V. Effect of presowing treatment of seeds with insecticides on parameters related to nodulation and nitrate reduction in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. **Journal of Central European Agriculture**, v. 15, p. 23 - 32, 2014.

IUPAC - **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 2014. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/601.htm>. Acesso em: 02 de agosto de 2014.

KATZ, I.; DOSORETZ, C. G.; MANDELBAUM, R. T.; GREEN, M. Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of *Pseudomonas* ADP. **Water Research**, v. 35, p. 3272 - 3275, 2001.

KOSEV, V.; VASILEVA, V. Some studies on the selection of forage pea (*Pisum sativum* L.) to increase the symbiotic nitrogen fixing potential. **International Journal of Pharmaceutical and Life Science**, v. 5, p. 3570 - 3579, 2014.

LANE, M.; LORENZ, N.; SAXENA, J.; RAMSIER, C.; DICK, R. P. Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants treated with glyphosate. **Pedobiologia - International Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 153 - 159, 2012.

LEONEL, L. V.; NASCIMENTO, E. G. do; BERTOZZI, J.; BÔAS, L. A. V.; BÔAS, G. T. V. Biorremediação do solo. **Terra e Cultura**, n. 51, ano 26, Julho a Dezembro de 2010.

MADALÃO, J. C.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; CHAGAS, K.; NASCIMENTO, A.F.; GARCIA, G. O. Fitorremediação de solos contaminados com o herbicida sulfentrazone por espécies de adubos verdes. **Revista Ciencia Agrária**, v. 55, n. 4, p. 288 - 296, 2012.

MADALÃO J. C. **Fitorremediação do sulfentrazone em argissolo vermelho-amarelo e sua sorção e dessorção em diferentes tipos de solos**. 2014. Tese

(Doutorado em Fitotecnia). Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“*Carryover*”). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 2, p. 151 - 164, 2011.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L., WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the striazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1451 - 1457, 1995.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053 - 1059, 2010.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. Microbial degradation of sulfentrazone in a Brazilian Rhodic Hapludox Soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 209 - 217, 2010.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. **Geoderma**, v. 147, p. 56 - 62, 2008a.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 879 - 886, 2008b.

MARTINS, P. F.; MARTINEZ, C. O.; CARVALHO, G.; CARNEIRO, P. I. B.; AZEVEDO, R. A.; PILEGGI, S. A. V.; MELO, I. S.; PILEGGI, M. Selection of microorganisms degrading S-Metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 153 - 159, 2007.

MELO, C. A. D.; MEDEIROS, W. N.; TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S.; FERREIRA, L. R. Lixiviação de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen no perfil de três solos. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 385 - 392, 2010a.

MELO, C. A. D.; MEDEIROS, W. N.; TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; FERREIRA, G. L.; PAES, F. A. S. V.; REIS, M. R. Efeito residual de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen em três solos. **Planta Daninha**, v. 28, n. 4, p. 835 - 842, 2010b.

MERINI, L. J.; BOBILLO, C.; CUADRADO, V.; CORACH, D.; GIULIETTI, A. M. Phytoremediation potential of the novel atrazine tolerant *Lolium multiflorum* and studies on the mechanisms involved. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 3059 - 3063, 2009.

MEYER, R. E.; BOVEY, R. W. Tebuthiuron formulation and placement effects on response of woody plants and soil residue. **Weed Science**, v. 36, p. 373 - 378, 1988.

MONQUERO, P. A.; SILVA, P. V.; SILVA HIRATA, A. C.; TABLAS, D. C.; ORZARI, I. Lixiviação e persistência dos herbicidas sulfentrazone e imazapic. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 185 - 195, 2010.

MONQUERO, P. A.; CÔRREA, M. C.; BARBOSA, L. N.; GUTIERREZ, A.; ORZARI, I.; HIRATA, A. C. S. Seleção de espécies de adubos verdes visando à fitorremediação de diclosulam. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 127 - 135, 2013.

NITISAKULKAN, T.; OKU, S.; KUDO, D.; NAKASHIMADA, Y.; TAJIMA, T.; VANGNAI, A. S.; JUNICHI, K. Degradation of chloroanilines by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* T57. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 3, p. 292 - 297, 2014.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v. 14, p. 100 - 105, 2000.

OLIVEIRA JR., R. S.; REGITANO, J. B. Dinâmica de pesticidas no solo. In: MELO, V. F.; ALLEONI, L. R. F. (ed.). **Química e Mineralogia do Solo**, Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 2009. p. 187 - 241.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCM 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258 - 261, 2005.

OTTO S.; CARDINALI, A.; MAROTTA, E.; PARADISI, C.; ZANIN, G. Effect of vegetative filter strips on herbicide runoff under various types of rainfall. **Chemosphere**, v. 88, p. 113 - 119, 2012.

PASSOS, A. B. R. J.; FREITAS, M. A. M.; TORRES, L. G.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F. Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, n. 8, p. 646 - 650, 2013.

PIRES, F. R.; PROCÓPIO, S. O.; SOUZA, C. M.; SANTOS, J. B.; SILVA, G. P. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 92 - 97, 2006.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; TOTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. 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.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; SANTOS, E. A. Seleção de plantas tolerantes ao tebuthiuron e com potencial para fitorremediação. **Revista Ceres**, v. 50, n. 291, p. 583 - 594, 2003a.

PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação de solos contaminados por herbicidas. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 335 - 341, 2003b.

PROCÓPIO, S. de O.; PIRES, F. P.; SANTOS, J. B. dos; SILVA, A. A. **Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 32p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 53).

PROCÓPIO, S.O.; CARMO, M. L.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; BRAZ, G. B. P.; SILVA, W. F. P.; BARROSO, A. L. L.; SILVA, G. P.; CAMO, E. L.; BRAZ, A. J. B. P. Fitorremediação de solo contaminado com picloram por capim-pé-de-galinha-gigante (*Eleusine coracana*). **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 2517 - 2523, 2008.

PROCÓPIO, S. O., SANTOS, J. B., PIRES, F. R., SILVA, A. A., SANTOS, E. A.; CARGNELUTTI FILHO, A. Development of bean plants in soil contaminated with trifloxysulfuron-sodium after *Stizolobium aterrimum* and *Canavalia ensiformis* cultivation. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 87 - 96, 2007.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; PIRES, F. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium por diferentes densidades populacionais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L). DC.). **Ciência Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 444 - 449, 2006.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; PIRES, F. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Potencial de espécies vegetais para a remediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 23, n. 1, p. 9 - 16, 2005.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Seleção de plantas com potencial para fitorremediação de solos contaminados com o herbicida trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 315 - 322, 2004.

ROSSI, C. V. S.; ALVES, P. L. C. A.; MARQUES JUNIOR, J. Mobilidade do sulfentrazone em Latossolo Vermelho e em Chernossolo. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 701 - 710, 2005.

SANTOS, E. A. ; CORREIA, N. M. ; SILVA, J. R. M. ; VELINI, E. D. ; PASSOS, A.B.R.J. ; DURIGAN, J. C. Detecção de herbicidas em água subterrânea na microbacia do Córrego Rico (SP). **Planta Daninha**, no prelo, 2015.

SANTOS, E. A.; COSTA, M. D.; FERREIRA, L. R.; REIS, M. R.; FRANÇA, A. C.; SANTOS, J. B. 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.

SANTOS, E. A.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L. R.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. 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, J. B.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L. R.; PIRES, F. R. Fitorremediação de áreas contaminadas por herbicidas. In: SILVA, A. A.; SILVA, J. F. (ed.) **Tópicos em manejo de plantas daninhas**. Viçosa: UFV, 2007. p.249 - 278.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JUNIOR, J. I.; SANTOS, E. A.; FERREIRA, L. R. Fitorremediação do herbicida trifloxysulfuron-sodium. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 223 - 330, 2004a.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; PIRES, F. R.; RIBEIRO JÚNIOR, J. I.; SANTOS, E. A. Seletividade do herbicida trifloxysulfuron sodium para fins de fitorremediação. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 129-141, 2004b.

SCRAMIN, S.; SKORUPA, L. A.; MELO, I. S. 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.

SHARMA, S. K.; JOHRI, B. N.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P.; PRASAD, S. V. S. Selection of plant growth-promoting *Pseudomonas spp.* that enhanced productivity of

soybean-wheat cropping system in central India. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1127 - 1142, 2011.

SILVA, G. S.; MELO, C. A. D.; FIALHO, C. M. T.; TUFFI SANTOS, L. D.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. Impact of sulfentrazone, isoxaflutole and oxyfluorfen on the microorganisms of two forest soils. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 292 - 299, 2014.

SILVA, L. O. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; ROCHA, P.R.R.; D'ANTONINO, L. Ação de *Eleusine coracana* na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 627 - 632, 2012.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I.; PILEGGI, M. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 522 -525. 2007.

SILVA, L. L.; FERREIRA, L. R.; SANTOS, J. B.; BELO, A. F.; SILVA, A.A. Seleção de espécies tolerantes aos herbicidas triclopyr e 2,4-D + picloram. In: Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 25. **Anais...** Brasília, DF, 2006. p. 230.

SINGH P.; SURI C. R.; CAMEOTRA S. S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 317, p. 697 - 702, 2004.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. **Microbial Ecology**, v. 53, p. 265 - 273, 2005.

SULMON, C.; GOUESBET, G.; BINET, F.; MARTIN-LAURENT, F.; EL AMRANI, A.; COUÉE, I. Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Pollution**, v. 145, p. 507 - 515, 2007.

VARGHA, M.; TAKATS, Z.; MÁRIALIGETI, K. Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. **Water Research**, v. 39, p.1560 - 1568, 2005.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; SILVEIRA, A. P. D. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant Soil**, v. 300, p. 95 - 103, 2007.

VIVIAN, R.; REIS, M. R.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. F.; GUIMARÃES, A. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A.A. Persistência de sulfentrazone em Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Planta daninha**, v. 24, n. 4, p. 741 - 750, 2006.

XU, J., LI, X. S., XU, Y. J., QIU, L. H., PAN, C. P. Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. **Chemosphere**, v. 74, p. 682 - 687, 2009.

WILSON, P. C.; WHITWELL, T.; KLAINE, S. J. Phytotoxicity, uptake, and distribution of <sup>14</sup>C-simazine in *Acorus gramineus* and *Pontederia cordata*. **Weed Science**, v. 48, p. 701-709, 2000.

YANG, C.; YULAI, W.; WANG, M.; CHEN, H. Plant species influence microbial metabolic activity and butachlor biodegradation in a riparian soil from Chongming Island, China. **Geoderma**, v. 193 - 194, p. 165 - 171, 2013.

ZHANG, J. J.; CHEN, Y. F.; FANG, T.; ZHOU, N. Y. Co-metabolic degradation of tribenuron methyl, a sulfonyleurea herbicide, by *Pseudomonas sp.* strain NyZ42. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 76, p. 36 - 40, 2013.

## **CAPÍTULO 2**

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DO SULFENTRAZONE

**RESUMO:** O sulfentrazone apresenta longo efeito residual no solo, o que pode não só inviabilizar o cultivo de espécies sensíveis em sucessão, como também aumentar os riscos de contaminação ambiental. A principal via de degradação é a microbiana, sendo determinante na persistência desse herbicida no solo. Contudo, ainda são escassas as informações a cerca dos micro-organismos responsáveis pela degradação do sulfentrazone no solo. Assim, objetivou-se isolar e caracterizar bactérias capazes de utilizar o sulfentrazone, na formulação comercial, como única fonte de carbono. O isolamento de bactérias potencialmente degradadoras do sulfentrazone foi realizado a partir de amostras de solo com histórico recente de aplicação do herbicida e os isolados identificados com base no sequenciamento de rDNA. Posteriormente, avaliou-se, o crescimento dos isolados e a capacidade de degradação do sulfentrazone utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. Foram obtidos, em cultura pura, 26 isolados bacterianos potencialmente degradadores do sulfentrazone. Por meio da análise das sequências de rDNA, constatou-se a predominância de espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os isolados apresentaram capacidade diferenciada de degradação do sulfentrazone. A presença do herbicida no meio de cultura reduziu a fase log de quatro isolados. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* e três isolados de *Pseudomonas sp.* apresentaram maior capacidade de degradação do sulfentrazone, a qual variou de 4 a 15%. Este é o primeiro relato de espécies do gênero *Pseudomonas* como degradadoras do sulfentrazone. Os isolados obtidos apresentam potencial de uso em programas de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

**Palavras-chave:** herbicida, atividade residual, *Pseudomonas*, biodegradação

## ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA SULFENTRAZONE DEGRADATION

**ABSTRACT:** Sulfentrazone has a high residual effect on soil, which can not only derail the cultivation of susceptible species in cropping sequences, but can also increase the risk of environmental contamination. The major route of degradation is microbial

sulfentrazone, a determinant for the persistence of this herbicide in soil. However, there is little information in the literature about the effectiveness of soil bacteria in the biodegradation of sulfentrazone. This study aimed to isolate and characterize bacteria capable of sulfentrazone use, in the commercial formulation, as the sole carbon source. The isolation of potentially degrading bacteria sulfentrazone was performed on soil samples with a recent history of herbicide application. The identification of isolates was based on rDNA sequencing. Subsequently, we evaluated the growth rate of bacterial isolates and the degradation ability of sulfentrazone for high performance liquid chromatography. Twenty-six bacterial isolates, potentially degraders of the sulfentrazone, were obtained in a pure culture. Through analysis of rDNA sequences, there was a predominance of species of bacteria of the genus *Pseudomonas*. The isolates showed different degradation abilities of sulfentrazone. The presence of the herbicide in the culture medium decreased the log phase of four isolates. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* and three isolates of *Pseudomonas sp.* showed a higher degradation ability of sulfentrazone, ranging from 4 to 15%. This is the first report of the genus *Pseudomonas* species as sulfentrazone degraders. The isolates have the potential for use in bioremediation of contaminated soils with sulfentrazone programs.

**Keywords:** herbicide, residual activity, *Pseudomonas*, biodegradation

## INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas é prática comum na atual agricultura, permitindo o cultivo de extensas áreas devido à praticidade de aplicação, redução de custos e eficiência de controle das plantas daninhas. O uso de herbicidas que apresentam elevado efeito residual no solo, a exemplo do sulfentrazone, embora seja eficiente por estender o período de controle, pode apresentar sérios problemas de intoxicação de espécies suscetíveis em plantios sequenciais (*carryover*), inviabilizando o cultivo dessas espécies na área em decorrência da presença de resíduos no solo em níveis tóxicos.

O sulfentrazone possui registro para aplicação em pré-emergência das plantas daninhas em culturas como soja, cana-de-açúcar, café e eucalipto (AGROFIT, 2014), as quais são largamente cultivadas no Brasil. Em conjunto, essas culturas ocupam área de, aproximadamente, 45,8 milhões de hectares (CONAB, 2014; ABRAF, 2013). A

dinâmica de herbicidas aplicados em pré-emergência das plantas daninhas depende de características do próprio produto, do solo, bem como do clima. Ao ser aplicado diretamente no solo, iniciam-se os processos de retenção, transformação e transporte, podendo persistir por meses e até anos. O sulfentrazone apresenta meia-vida estimada no solo entre 24 e 302 dias, variando de acordo com as condições experimentais e edafoclimáticas da região (OHMES et al. 2000; CHEN, 2003; MARTINEZ et al. 2008ab; BRUM et al., 2013), além de baixa sorção (PASSOS et al., 2013; FREITAS et al., 2014).

A elevada persistência do sulfentrazone aumenta os riscos de lixiviação e contaminação de águas subterrâneas, o que gera, do ponto de vista ambiental, grande preocupação. A principal via de degradação do sulfentrazone é a microbiana (MARTINEZ et al., 2010), a qual é determinante da persistência desse herbicida no solo. Assim, como forma de descontaminação de solos submetidos a aplicações de herbicidas, técnicas de biorremediação têm sido utilizadas. A biorremediação consiste no emprego de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos, sejam plantas e, ou micro-organismos e suas enzimas, que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando-os em substâncias menos tóxicas ou inertes (JACQUES et al., 2010).

Os micro-organismos do solo, principalmente bactérias e fungos, participam de forma significativa na eliminação ou redução de resíduos de herbicidas pela sua capacidade degradadora (OHMES et al., 2000; DELLAMATRICE; MONTEIRO 2004; MARTINS et al., 2007; SILVA et al., 2007; MARTINEZ et al., 2010). Processos de degradação de herbicidas podem ocorrer mediante atuação de uma espécie, ou, mais comumente, de várias espécies de micro-organismos do solo. Uma vez presentes no solo, esses micro-organismos são capazes de degradar e até mineralizar herbicidas, possibilitando a biorremediação de áreas contaminadas. Assim, o isolamento, a identificação e a caracterização de micro-organismos edáficos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos produtos químicos potencialmente tóxicos são essenciais para utilização em programas de biorremediação.

Extensa é a gama de micro-organismos edáficos atuando na biotransformação de herbicidas no solo. O processo de biodegradação e mineralização do atrazine envolve a participação de diversos micro-organismos e suas enzimas, sendo *Pseudomonas spp.* as espécies mais bem caracterizadas e amplamente estudadas como mineralizadora dessa molécula (CHELINHO et al., 2010; EL-BESTAWY et al., 2013). Estudos detectaram a

degradação do s-metolachlor pelas bactérias de solos *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Pseudomonas alcaligenes* e *Enterobacter aerogenes* (MARTINS et al., 2007). Bactérias e fungos capazes de utilizar diuron e 2,4-D como fonte de carbono, respectivamente, também foram isolados de solos contaminados com estes herbicidas (DELLAMATRICE; MONTEIRO 2004; SILVA et al., 2007). *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia picketti*, *Methylobacterium radiotolerans*, *Cladosporium sp.*, *Eupenicillium sp.*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Chrysosporium* e *Metarrhizium* cresceram em meio contendo o sulfentrazone, indicando possibilidade de degradação do herbicida e utilização desses micro-organismos em estudos de biorremediação (MARTINEZ et al., 2008ab; 2010).

Apesar da importância da microbiota do solo na biotransformação do sulfentrazone, são escassas as informações na literatura a cerca da eficiência de bactérias na degradação desse herbicida. Diante da diversidade genética e da capacidade de metabolismo integrado apresentada pela comunidade microbiana para a transformação de herbicidas em substâncias menos tóxicas, objetivou-se isolar e caracterizar bactérias capazes de utilizar o sulfentrazone, na formulação comercial, como única fonte de carbono.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *Isolamento e identificação de bactérias do solo potencialmente degradadoras do sulfentrazone*

Amostras compostas de um Argissolo Vermelho Amarelo de textura franco argilo-arenosa com histórico recente de aplicação (6 meses) do herbicida sulfentrazone (1000 g ha<sup>-1</sup>) foram coletadas na profundidade de 0 - 10 cm no campo experimental Diogo Alves de Melo da Universidade Federal de Viçosa, localizado a 20° 46' S e 42° 52' W. O solo apresentava as seguintes características químicas: pH (água) 6,51; matéria orgânica 4,06 dag kg<sup>-1</sup>; P e K 17,1 e 104 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente; Ca, Mg, Al, H + Al e CTC efetiva 4,12; 0,87; 0,0 e 2,1 e 5,26 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente.

Posteriormente, 15 g da amostra de solo foram inoculadas em 150 mL de meio mínimo líquido (1,0 L água; 3,0 g NaNO<sub>3</sub>; 1,0 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; pH 6,8) suplementado com 1000 µg mL<sup>-1</sup> do ingrediente ativo (i.a.) sulfentrazone na formulação comercial Boral<sup>®</sup> (500 g L<sup>-1</sup> i.a.) como única fonte de carbono e energia. Os frascos foram mantidos a 30°C, sob agitação a 150 rpm por 15 dias. Após 1, 3, 7 e 15 dias de incubação realizou-se diluições seriadas de 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-6</sup>

preparadas em solução salina (NaCl 0,85%). De cada diluição foram retiradas 5 alíquotas de 0,1 mL para o plaqueamento em meio de cultura mínimo sólido, na composição descrita acima, acrescida de 16,0 g L<sup>-1</sup> de ágar e de 1,0 mL de solução de ciclohexamida (10,0 mg mL<sup>-1</sup>), suplementado com a formulação comercial do sulfentrazone (1000 µg mL<sup>-1</sup> i.a.). As placas de Petri foram incubadas a 30°C por 5 dias. As colônias de bactérias que cresceram usando o produto comercial como única fonte de carbono foram repicadas para isolamento de culturas puras através da técnica de esgotamento de inóculo em superfície.

Na identificação dos isolados bacterianos foi realizada a extração de DNA bacteriano, utilizando-se o kit Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification. O gene rDNA 16S foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os primers P027(5' - GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG - 3') e R1392 (5' - ACG GGC GGT GTG TAC - 3') em reações com volume final de 50 µL contendo 0,5 µL de cada primer, 0,5 µL de dNTPs, 2,25 µL de MgCl<sub>2</sub> e 0,15 µL de Taq DNA Polimerase. O produto da reação de PCR foi sequenciado pela empresa Macrogen (Korea). A reação de amplificação foi conduzida em termociclador com os seguintes ciclos: 3 minutos de desnaturação inicial a 95°C, 35 ciclos (um minuto de desnaturação a 95°C, um minuto de hibridização a 56°C e dois minutos de alongação a 72°C), e extensão final a 72°C durante cinco minutos. Para análise das sequências de bases utilizou-se o programa “blastN” do banco de dados do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

#### ***Capacidade de degradação do sulfentrazone na formulação comercial in vitro***

As colônias de bactérias isoladas e identificadas anteriormente foram testadas quanto à capacidade de degradação do sulfentrazone na formulação comercial Boral<sup>®</sup>. O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e os tratamentos constituíram dos 26 isolados previamente identificados.

Os isolados foram cultivados em caldo nutriente (1,0 L água; 2,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0 g NaCl; 3,0 g extrato de carne; 5,0 g peptona; pH 6,8) por 10 horas até a densidade óptica (DO) de 0,6. Frascos com 50,0 mL de meio mínimo líquido, suplementado com 1000 µg mL<sup>-1</sup> i.a., foram inoculados com 0,1 mL de inóculo e incubados a 30°C, 150 rpm, por 10 dias. Após o período de incubação, alíquotas de 2,0 mL foram coletadas, em triplicata, acondicionadas em eppendorfs e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido. As amostras foram descongeladas, filtradas em membrana de 0,45 µm e armazenadas em vials de 1,5 mL. A concentração final do ingrediente ativo na solução

foi estimada por um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, modelo Shimadzu LC 20AT, detector UV-Vis (Shimadzu SPD 20A), coluna C<sub>18</sub> de aço inox (Shimadzu VP- ODS Shim-pack 250 mm x 4,6 mm d.i.) segundo metodologia descrita por Silva et al. (2007) e adaptada para o sulfentrazone (fase móvel: 50 : 50 (v/v) ACN : H<sub>2</sub>O + 0,1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, fluxo 1,0 mL min<sup>-1</sup> e comprimento de onda 214 nm).

### ***Crescimento dos isolados na presença do herbicida***

Após a seleção dos isolados mais eficientes, foram analisadas as taxas de crescimento dos mesmos na presença e ausência do sulfentrazone (padrão técnico 92% de pureza). O ensaio foi conduzido em placas de Elisa contendo 96 células com capacidade de 250 µL cada. Utilizaram-se dois meios de cultura (140 µL), meio mínimo e caldo nutriente, suplementados com o herbicida sulfentrazone (40 µL) na concentração de 0,7 µg mL<sup>-1</sup>. Os meios foram inoculados com os seis isolados (10 µL) a partir de culturas com DO de 0,6. Como padrão de comparação, os isolados foram também cultivados em meio caldo nutriente sem a presença do herbicida. Ademais, na mesma placa foram mantidas amostras branco sem a presença de isolado bacteriano.

As placas foram incubadas a 30°C por 28 h, sendo o crescimento bacteriano avaliado em intervalos de duas horas, por meio de leituras de absorvância em espectrofotômetro a 560 nm. O experimento foi montado em esquema fatorial 3 x 14, no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. Os tratamentos constaram da combinação, para cada isolado, dos três meios de cultura e dos tempos de avaliação (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 horas).

### ***Capacidade de degradação do sulfentrazone padrão técnico in vitro***

Neste ensaio utilizou-se o padrão técnico sulfentrazone, na concentração de 0,7 µg mL<sup>-1</sup> (correspondente à dose de 700 g ha<sup>-1</sup>) e os isolados previamente selecionados. A metodologia e condições experimentais foram as mesmas descritas no estudo da capacidade de degradação do sulfentrazone na formulação comercial. O experimento foi montado no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições e seis tratamentos.

### ***Análise estatística dos dados obtidos***

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias agrupadas pelo critério de Scott-Knott (p≤0,05) no ensaio de capacidade de degradação do

sulfentrazone na formulação comercial e comparadas pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) no ensaio similar utilizando o padrão técnico. No ensaio de crescimento dos isolados na presença do herbicida, as médias foram analisadas por regressão ( $p \leq 0,05$ ). As curvas de crescimento bacteriano foram ajustadas no modelo sigmoidal  $\hat{y} = \frac{a}{1 + e^{-\frac{x-x_0}{b}}}$  em que:  $\hat{y}$  é a variável resposta de interesse (Abs 560 nm), X é o tempo em horas, a é assíntota correspondente ao valor máximo da variável em questão; b é a inclinação da resposta da variável e  $X_0$  é o ponto de inflexão da curva e corresponde ao tempo, em horas, necessário para a ocorrência de 50% de resposta.

## RESULTADOS

Em cultura pura, 26 isolados bacterianos foram capazes de crescer na presença da formulação comercial do sulfentrazone. As colônias isoladas, usadas na obtenção de cultura pura, eram morfológicamente diferentes, apresentando características distintas como coloração, formato da borda, presença de brilho, halo e rugosidade.

Após o sequenciamento do rDNA e análise do banco de dados do NCBI foi possível identificar, em nível de espécie, 9 dos 26 isolados bacterianos (Tabela 1). Com exceção do isolado 21, que foi identificado como *Burkholderia cepacia*, as demais bactérias pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 1).

Na avaliação da capacidade de degradação do sulfentrazone pelos isolados, na formulação comercial, verificaram-se habilidades distintas quanto à metabolização da molécula e redução da concentração inicial do princípio ativo em meio de cultura. Os 26 isolados foram agrupados em quatro grupos, sendo a máxima degradação observada nos tratamentos compostos pelos isolados 4, 17, 3, 5, 22 e 15, todos do gênero *Pseudomonas*, com redução média de 5% da concentração inicial (Tabela 1). Somente oito isolados não apresentaram a capacidade de degradar o sulfentrazone nas condições experimentais avaliadas.

Os seis isolados mais eficientes na degradação do sulfentrazone na presença do produto comercial foram então selecionados para caracterização quanto à taxa de crescimento e à capacidade de metabolização da molécula herbicida.

Tabela 1: Isolados bacterianos identificados pelo sequenciamento do gene rDNA 16S, concentração final e percentual de redução de sulfentrazone em meio mínimo líquido cultivado com os isolados bacterianos e o produto comercial Boral<sup>®</sup> (1000 µg mL<sup>-1</sup> i.a.), após 10 dias de incubação a 150 rpm e 30°C.

| Isolado    | Espécie                            | Concentração sulfentrazone (µg mL <sup>-1</sup> ) |                | Percentual de redução |
|------------|------------------------------------|---|----------------|-----------------------|
| Iso 4      | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 941,6798  | d <sup>1</sup> | 5,83%                 |
| Iso 17     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 943,9897  | d              | 5,61%                 |
| Iso 3      | <i>Pseudomonas lutea</i>           | 952,2564  | d              | 4,78%                 |
| Iso 5      | <i>Pseudomonas putida</i>          | 953,2818  | d              | 4,68%                 |
| Iso 22     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 954,4537  | d              | 4,56%                 |
| Iso 15     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 955,2790  | d              | 4,47%                 |
| Iso 8      | <i>Pseudomonas lutea</i>           | 957,5155  | c              | 4,25%                 |
| Iso 7      | <i>Pseudomonas putida</i>          | 960,3685  | c              | 3,97%                 |
| Iso 14     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 960,7043  | c              | 3,93%                 |
| Iso 24     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 961,6727  | c              | 3,83%                 |
| Iso 11     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 965,4236  | c              | 3,46%                 |
| Iso 6      | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 965,7633  | c              | 3,42%                 |
| Iso 1      | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 968,0413  | c              | 3,20%                 |
| Iso 23     | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 973,5768  | b              | 2,64%                 |
| Iso 10     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 974,3055  | b              | 2,57%                 |
| Iso 25     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 975,0884  | b              | 2,49%                 |
| Iso 9      | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 975,5928  | b              | 2,44%                 |
| Iso 20     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 979,4486  | b              | 2,06%                 |
| Iso 19     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 985,0841  | a              | 1,49%                 |
| Iso 26     | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 993,7920  | a              | 0,63%                 |
| Iso 2      | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 994,6529  | a              | 0,53%                 |
| Iso 13     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 996,9870  | a              | 0,30%                 |
| Iso 18     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 998,0056  | a              | 0,20%                 |
| Iso 16     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 999,2301  | a              | 0,08%                 |
| Iso 12     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 999,7382  | a              | 0,03%                 |
| Iso 21     | <i>Burkholderia cepacia</i>        | 999,8726  | a              | 0,01%                 |
| Testemunha | Sem inoculação                     | 1000,0000   | a              |                       |
| CV         |                                    | 0,88%   |                |                       |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo critério de agrupamento Scott-Knott (p>0,05).

O meio mínimo enriquecido com o sulfentrazone não foi capaz de suportar o crescimento de nenhum dos isolados bacterianos, os quais apresentaram taxa de crescimento bastante reduzida (Figura 1). A presença do herbicida em meio caldo nutriente afetou negativamente o crescimento de *P. putida*, *P. lutea*, *P. plecoglossicida* e *Pseudomonas sp.* (Iso 17) com redução da fase log. Em meio caldo nutriente sem herbicida, a fase estacionária de tais isolados foi atingida em valores de absorvância

superiores aos observados nos tratamentos com adição do herbicida (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D).

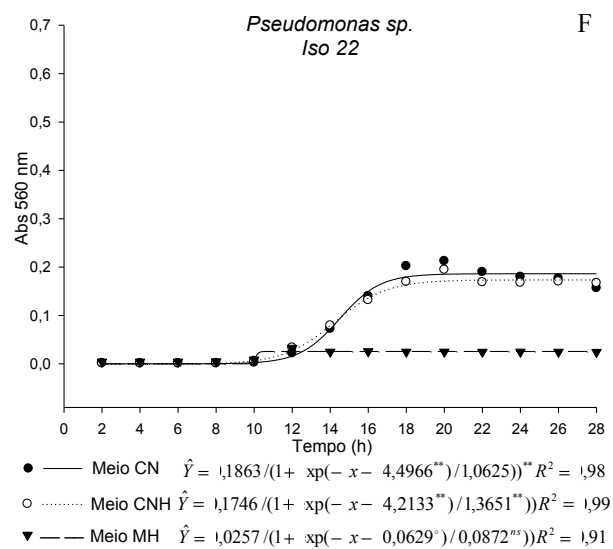
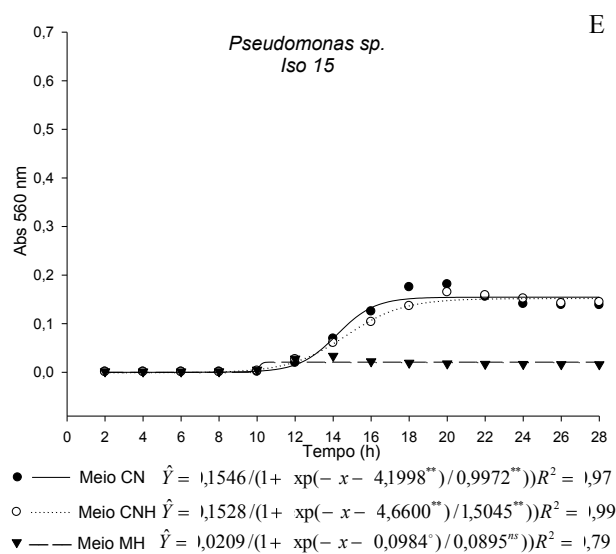
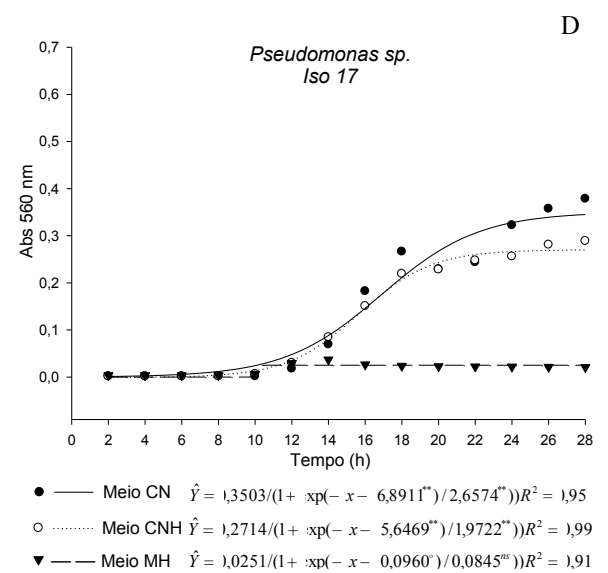
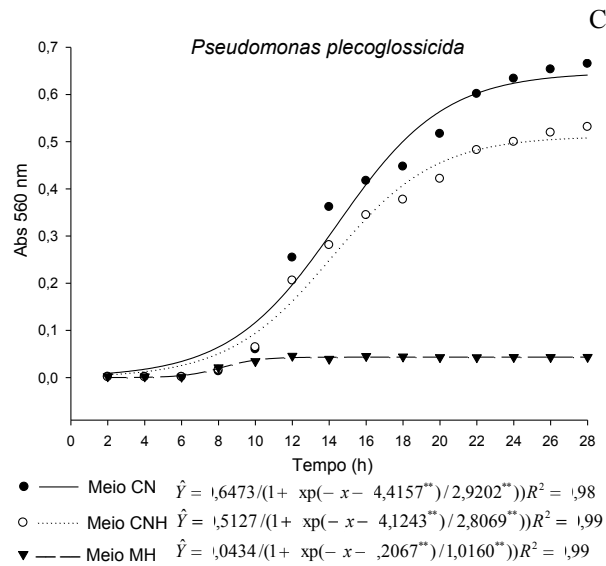
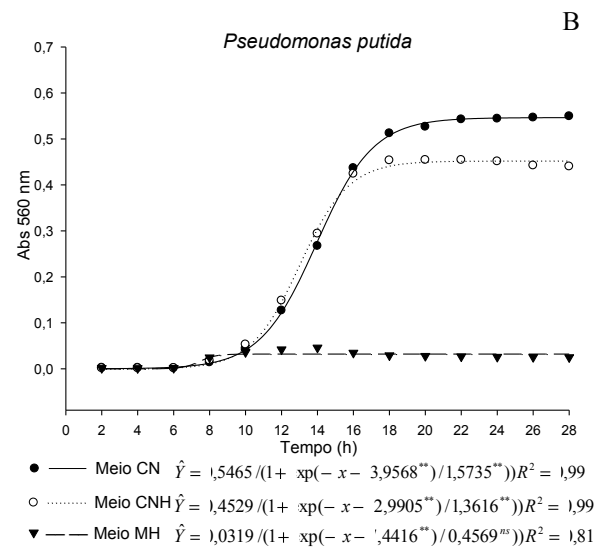
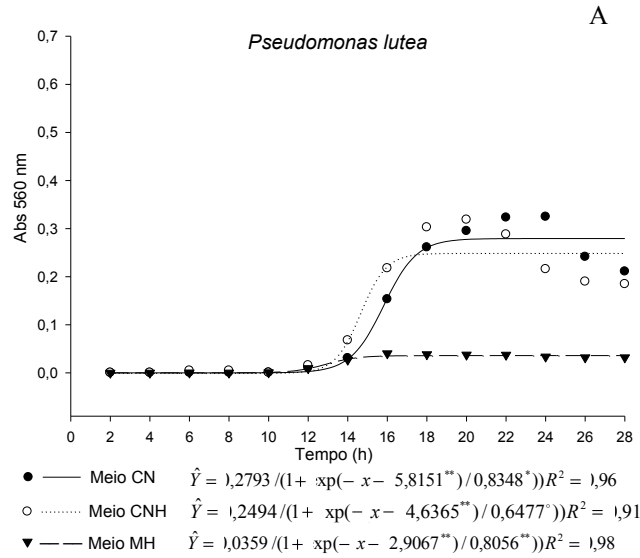


Figura 1: Crescimento de *Pseudomonas lutea* (A), *Pseudomonas putida* (B), *Pseudomonas plecoglossicida* (C), e três isolados de *Pseudomonas sp.* (Iso 17 (D), Iso 15 (E) e Iso 22 (F), respectivamente) cultivados em meio caldo nutriente sem (Meio CN) e com herbicida (Meio CNH) e meio mínimo (Meio MH) na presença do sulfentrazone (padrão técnico -  $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 28 horas.

\*\* , \* , ° e <sup>ns</sup> significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente, pelo Teste t.

Na presença do sulfentrazone *P. lutea* teve a fase lag reduzida e as fases log e estacionária antecipada em cerca de 2h (Figura 1A). *P. plecoglossicida* e *Pseudomonas sp.* (Iso 17) não apresentaram fase estacionária típica em decorrência do intervalo de tempo amostrado, que não foi suficiente para detectar a interrupção do crescimento dos isolados (Figuras 1C e 1D).

Os isolados identificados como *Pseudomonas sp.* (Iso 15 e Iso 22) não tiveram alteração na curva de crescimento na presença do herbicida, mas por outro lado, apresentaram taxas de crescimento mais baixas (Figuras 1E e 1F). *P. plecoglossicida* foi o isolado com crescimento mais elevado, expresso pelos maiores valores de absorbância, porém foi também o mais sensível à presença do herbicida, com redução de aproximadamente 21% da fase exponencial de crescimento após 22 h de incubação (Figura 1 C).

Na presença do padrão técnico verificou-se redução de até 15% do ingrediente ativo pelo isolado 22 (*Pseudomonas sp.*), sendo as menores alterações observadas por *P. putida* e *P. lutea* (Tabela 2).

Tabela 2: Concentração final e percentual de redução do sulfentrazone em meio mínimo líquido cultivado com os isolados bacterianos e o padrão técnico sulfentrazone (92% de pureza), na concentração de  $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ , após 10 dias de incubação a 150 rpm e 30°C

| Isolado    | Espécie                            | Concentração sulfentrazone ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) | Percentual de redução |
|------------|------------------------------------|--|-----------------------|
| Iso 3      | <i>Pseudomonas lutea</i>           | 0,6666 ab <sup>1</sup>                               | 4,77%                 |
| Iso 5      | <i>Pseudomonas putida</i>          | 0,6512 abc   | 6,97%                 |
| Iso 17     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 0,6357 bcd   | 9,20%                 |
| Iso 15     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 0,6139 bcd   | 12,30%                |
| Iso 4      | <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> | 0,5983 cd  | 14,53%                |
| Iso 22     | <i>Pseudomonas sp.</i>             | 0,5948 d   | 15,03%                |
| Testemunha | Sem inoculação                     | 0,7000 a   |                       |
| CV         |                                    |  | 3,6%                  |

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p>0,05).

O isolado de *Pseudomonas sp.* (Iso 22) apesar da pequena taxa de crescimento (Figura 1F), foi o mais eficiente na degradação e diminuição da concentração inicial do ingrediente ativo (Tabela 2).

## DISCUSSÃO

O meio de enriquecimento utilizado no isolamento pode ter favorecido determinadas bactérias mais tolerantes ao herbicida, impondo pressão de seleção e inviabilizado o crescimento daquelas sensíveis aos possíveis ingredientes tóxicos presentes na formulação comercial. Dessa forma, possibilitou que espécies do gênero *Pseudomonas*, mais adaptadas ao conjunto de condições estipuladas, se tornassem dominantes no meio.

Neste estudo, 25 espécies do gênero *Pseudomonas*, além de *Burkholderia cepacia*, isoladas do solo, foram tolerantes e potencialmente degradadoras do herbicida sulfentrazone (Tabela 1). A tolerância desses 26 isolados à formulação comercial não resultou em habilidade de utilização do ingrediente ativo como fonte de carbono e energia por todos. A degradação do herbicida pode ser limitada pela presença de substâncias tóxicas e por condições desfavoráveis à sobrevivência e à atividade dos micro-organismos degradadores. Temperatura, oxigênio, pH e umidade são alguns fatores importantes que podem interferir na eficiência e, ou capacidade de degradação de um composto em meio de cultura ou no solo. Martinez et al. (2010) verificaram efeito da temperatura na degradação do sulfentrazone por micro-organismos em amostras de solo fortificadas com o herbicida, sendo os maiores níveis de degradação encontrados em solos incubados nas temperaturas de 30 e 40°C.

A família Pseudomonadaceae apresenta espécies amplamente distribuídas no solo e comumente encontradas em associação com as plantas. *Pseudomonas lutea*, *P. plecoglossicida* e *P. putida* foram relatadas na literatura como bactérias capazes de promover o crescimento vegetal, seja por meio da solubilização de fosfatos, produção de hormônios, sideróforos ou pela atividade antifúngica (PEIX et al., 2004; JHA et al., 2009; DESHWAL; KUMAR, 2013). A capacidade de degradação do sulfentrazone por bactérias representa grande potencial de biorremediação de solos agrícolas contaminados com esse herbicida. No solo, essas bactérias podem ter a atividade degradadora potencializada pela associação com plantas fitorremediadoras.

Bactérias do gênero *Pseudomonas* também apresentam versátil capacidade de degradar xenobióticos em ambientes aquáticos ou em solos contaminados. São relatadas

na literatura a atuação de espécies desse gênero participando da degradação de carbaril, atrazina, trifluralina, tolueno, benzeno, xileno, s-metolachlor, sulfonilureias e cloroanilinas (CHAPALAMADUGO; CHAUDHRY, 1991; MANDELBAUM et al. 1995; BELINASSO et al., 2003; OTENIO et al., 2005; MARTINS et al., 2007; XU et al., 2009; ZHANG et al., 2013; NITISAKULKAN et al., 2014). *Pseudomonas sp.* em 24 horas de cultivo foi capaz de mineralizar 80% de atrazina em cultura líquida (MANDELBAUM et al., 1995). Três estirpes de *Pseudomonas* reduziram a concentração de trifluralina em torno de 5% em meio líquido durante 30 dias de incubação (BELINASSO et al., 2003). Também em meio líquido foi relatado a completa transformação de carbaril a 1-naftol em 40 horas de crescimento de *Pseudomonas sp.* isolada de solo contaminado com esse inseticida (CHAPALAMADUGO; CHAUDHRY, 1991). A degradação de s-metolachlor foi verificada pelas espécies de bactérias *Klebsiella pneumoniae pneumoniae*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Enterobacter aerogenes*, as quais após 5 e 10 dias de incubação a 35°C, proporcionaram diferença média de 14,42 e 35,01% na concentração do herbicida, respectivamente (MARTINS et al., 2007).

Bactérias com potencial de degradação do sulfentrazone foram isoladas e identificadas como *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia picketti* e *Methylobacterium radiotolerans*, contudo, a capacidade de degradação do herbicida por essas bactérias em meio de cultura não foi investigada (MARTINEZ et al., 2010; 2008ab). Este é o primeiro relato de espécies do gênero *Pseudomonas* como degradadoras do sulfentrazone.

O insucesso do crescimento dos isolados em meio mínimo (Figura 1) provavelmente está relacionado com a limitação de nutrientes advinda da concentração de sulfentrazone muito baixa para suportar o crescimento microbiano, diferentemente do meio caldo nutriente que é meio rico em fontes de carbono e energia para os organismos.

A redução da fase de log na presença do herbicida por quatro dos seis isolados (Figura 1A, 1B, 1C e 1D), em caldo nutriente, pode estar associada à menor eficiência de utilização dos recursos disponíveis no meio. Na presença do herbicida houve redução da capacidade de suporte do crescimento bacteriano. Tal resultado pode ser explicado pelo fato que em condições de estresse, parte da energia disponível ao organismo é despendida para manter mecanismos moleculares e bioquímicos de tolerância ao estressor, em detrimento da produção de biomassa celular (SCHIMEL et al., 2007).

Muitos são os relatos a cerca dos efeitos deletérios de herbicidas sobre o crescimento de micro-organismos benéficos do solo. O crescimento de isolados bacterianos solubilizadores de fosfato provenientes da rizosfera de cana-de-açúcar foi reduzido pela presença dos herbicidas trifloxysulfuron-sodium e ametryn isolados ou em mistura (TIRONI et al., 2009). Atrazine, alachlor e 2,4-D causaram redução da taxa de crescimento da estirpe de *G. diazotrophicus* (PAL 5) em meio de cultura, levando este último a decréscimo de 50% do crescimento (MADHAIYAN et al., 2006). Santos et al. (2006) avaliando o efeito de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici* evidenciaram maior inibição causada pelo paraquat seguido da mistura comercial de fomesafen e fluazifop-p-butil (Robust<sup>®</sup>).

A degradação máxima do sulfentrazone por *Pseudomonas lutea*, *P. plecoglossicida*, *P. putida* e três isolados de *Pseudomonas sp.*, na formulação comercial Boral<sup>®</sup>, foi em média de 5% (Tabela 1). Contudo, na presença do ingrediente ativo como única fonte de carbono a capacidade de degradação de alguns desses foi triplicada (Tabela 2). A diferença de concentração utilizada nos dois ensaios, bem como a presença de possíveis aditivos tóxicos na formulação comercial estão diretamente relacionadas à atividade dos micro-organismos e à degradabilidade do sulfentrazone no meio. Os aditivos presentes na formulação podem afetar os micro-organismos e, em certos casos, até mesmo modificar o efeito do agroquímico (MALKONES, 2000). Segundo esse autor, os aditivos atuam reduzindo a tensão superficial e facilitando a penetração dos agroquímicos, o que pode tornar as bactérias mais sensíveis à sua ação. Santos et al. (2005) observaram que a formulação comercial do glyphosate aumentava seu efeito tóxico contra *Bradyrhizobium*, quando comparado ao equivalente ácido puro.

Através do segundo ensaio de degradação do sulfentrazone foi confirmada a capacidade de utilização da molécula como única fonte de carbono para o crescimento bacteriano (Tabela 2). A degradação de herbicidas pode ocorrer pelo metabolismo central ou através do cometabolismo, que requer outra fonte de carbono e energia para sustentar o crescimento microbiano. A degradação cometabólica de tribenuron methyl, um herbicida do grupo químico das sulfonilureias, por uma estirpe bacteriana NyZ42 de *Pseudomonas* isolada de solo contaminado, elevou a eficiência da degradação em cerca de 80% em meio mínimo líquido dentro de quatro dias, quando foi utilizada glicose ou succinato como fonte de carbono suplementar. Os autores relatam que essa estirpe era incapaz de utilizar tribenuron methyl como única fonte de carbono (ZHANG et al., 2013). Assim, o potencial de degradação do sulfentrazone no solo poderá ser maior pela

indução do cometabolismo em virtude da existência de fontes de carbono prontamente oxidáveis nesse ambiente.

## CONCLUSÕES

É possível isolar bactérias degradadoras do sulfentrazone a partir de solo com histórico de aplicação do herbicida. *Pseudomonas* é o gênero predominante entre os isolados obtidos. Os isolados bacterianos variam quanto à capacidade de degradar o ingrediente ativo na formulação comercial ou no padrão técnico. Os isolados obtidos apresentam potencial de uso em programas de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa e apoio concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAF – Associação Brasileira de Produtores de Florestas Plantadas. Anuário estatístico ABRAF 2013 ano base 2012 / ABRAF – Brasília: 2013. 148 p.

BELINASSO, M. de L.; GREER, C. W.; PERALBA, M. do C.; HENRIQUES, J. A. P.; GAYLARDE, C. C. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 191 - 194, 2003.

BRUM, C. S.; FRANCO, A. A.; JÚNIOR, R. P. S. Degradação do herbicida sulfentrazone em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 558 - 564, 2013.

CHAPALAMADUGO, S.; CHAUDHRY, G. R. Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas sp.* and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, p. 744 - 755, 1991.

CHELINHO, S.; MOREIRA-SANTOS, M.; LIMA, D.; SILVA, C.; VIANA, P.; ANDRÉ, S.; LOPES, I.; RIBEIRO, R.; FIALHO, A. M.; VIEGAS, C. A.; SOUSA, J. P. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas sp.* ADP. **Journal of Soils and Sediments**, v. 10, p. 568 - 578, 2010.

CHEN, A. Sulfentrazone. In: LEE, P.W. (ed). **Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals**, v. 1. John Wiley, Chichester, 2003. p. 564 - 577.

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de grãos. 2014. **Levantamento da Safra de Grãos, Café, Cana-de-Açúcar e Laranja (Área Plantada, Produtividade e Produção)**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br/conteudos.php?a=1253&>> Acesso em: 7 de novembro de 2014.

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.

DESHWAL, V. K.; KUMAR, P. Plant growth promoting activity of Pseudomonads in Rice crop. **Internacional Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 2, n.11, p. 152 - 157, 2013.

EL-BESTAWY, E.; SABIR, J.; MANSY, A. H.; ZABERMAWI, N. Isolation, identification and acclimatization of Atrazine-resistant soil bacteria. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 2, p. 119 - 130, 2013.

FREITAS, M. A. M.; PASSOS, A. B. R. J.; TORRES, L. G.; MORAES, H. M. F.; FAUSTINO, L. A.; ROCHA, P. R. R.; SILVA, A. A. Sorção do sulfentrazone em diferentes tipos de solo determinada por bioensaios. **PlantaDaninha**, v. 32, n. 2, p. 385 - 392, 2014.

JACQUES, R. J. S.; SILVA, K. J. da; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 280 - 287, 2010.

JHA, B. K.; PRAGASH, M. G.; CLETUS, J.; RAMAN, G.; SAKTHIVEL, N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent *Pseudomonad* strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.25, p. 573 - 581, 2009.

MADHAIYAN, M., POONGUZHALI, S.; HARI, K., SARAVANAN, V. S.; TONGMIN, S. Influence of pesticides on the growth rate and plant-growth promoting traits of *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 84, n. 2, p. 143 - 154, 2006.

MALKONES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities - a review. **Journal of Plant Diseases and Protection**, v. 8, n. 5, p. 781 - 789, 2000.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas sp.* that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1451 - 1457, 1995.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L.R. Microbial degradation of sulfentrazone in a brazilian Rhodic Hapludox soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 209 - 217, 2010.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. **Geoderma**, v. 147, p. 56 - 62, 2008a.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 879 - 886, 2008b.

MARTINS, P. F.; MARTINEZ, C. O.; CARVALHO, G. DE; CARNEIRO, P. I. B.; AZEVEDO, R. A.; PILEGGI, S. A. V.; MELO, I. S. DE; PILEGGI, M. Selection of microorganisms degrading s-metolachlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p.153 - 159, 2007.

NITISAKULKAN, T.; OKU, S.; KUDO, D.; NAKASHIMADA, Y.; TAJIMA, T.; VANGNAI, A. S.; JUNICHI, K. Degradation of chloroanilines by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida* T57. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 117, n. 3, p. 292 - 297, 2014.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v. 14, p. 100 - 105, 2000.

OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258 - 261, 2005.

PASSOS, A. B. R. J.; FREITAS, M. A. M.; TORRES, L. G.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F. Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, n. 8, p. 646 - 650, 2013.

PEIX, A.; RIVAS, R.; SANTA-REGINA, I.; MATEOS, P. F.; MARTÍNEZ-MOLINA, E.; RODRÍGUES-BARRUECO, C.; VELÁZQUES, E. *Pseudomonas lutea* sp. nov., a novel phosphate-solubilizing bacterium isolated from the rhizosphere of grasses. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, p. 847 - 850, 2004.

SANTOS, J. B.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; JAKELAITIS, A.; VIVIAN, R.; SANTOS, E. A. Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. **Planta Daninha**, v. 24, n. 3, p. 457 - 465, 2006.

SANTOS, J. B.; FERREIRA, E. A.; KASUYAB, M. C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. de O. Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. **Crop Protection**, v. 24, n. 6, p. 543 - 547, 2005.

SCHIMEL, J. P.; BALSER, T. C.; WALLENSTEIN, M. Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. **Ecology**, v. 88, n. 6, p. 1386 - 1394, 2007.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M. Degradation of 2,4-d herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 522 - 525, 2007.

TIRONI, S. P.; REIS, M. R.; GALON, L.; FREITAS, M. A. M.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A.; BARBOSA, M. H. P.; PETERNELLI, L. A. Ação de herbicidas na atividade de bactérias solubilizadoras de fosfato da rizosfera de cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 27, n. 4, p. 747 - 754, 2009.

XU, J., LI, X. S., XU, Y. J., QIU, L. H., PAN, C. P. Biodegradation of pyrazosulfuron-ethyl by three strains of bacteria isolated from contaminated soils. **Chemosphere**, v. 74, p. 682 - 687, 2009.

ZHANG, J. J.; CHEN, Y. F.; FANG, T.; ZHOU, N. Y. Co-metabolic degradation of tribenuron methyl, a sulfonyleurea herbicide, by *Pseudomonas sp.* strain NyZ42. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 76, p. 36 - 40, 2013.

## **CAPÍTULO 3**

## PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO DE ESPÉCIES FITORREMEIADORAS DE SOLO COM SULFENTRAZONE POR *Pseudomonas spp.*

**RESUMO:** Bactérias degradadoras do sulfentrazone que apresentam potencial para promover o crescimento vegetal podem trazer tanto benefícios diretos às plantas remediadoras quanto ao solo no processo de biorremediação. Diante disso, objetivou-se avaliar a resposta da inoculação de bactérias do gênero *Pseudomonas* em solo contaminado com o sulfentrazone sobre o crescimento das espécies remediadoras *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco) e *Helianthus annuus* (girassol). O experimento foi conduzido em casa de vegetação em esquema fatorial 2x2x4, para cada espécie fitorremediadora, no delineamento inteiramente casualizado com quatro repetições. O primeiro fator constituiu-se pela presença ou ausência de inoculação com consórcio bacteriano selecionado, o segundo fator foi composto pelo cultivo com a mesma espécie ou com a outra espécie e o terceiro pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste (DAD)). Avaliou-se, ao final de cada tempo e para cada uma das espécies, a área foliar, o volume de raiz e a matéria seca da raiz, do caule e de folhas. Ambas as fitorremediadoras apresentaram menor crescimento quando cultivadas juntamente com uma planta da própria espécie. A inoculação proporcionou maior acúmulo de área foliar, matéria seca de folhas, caule e raiz e volume radicular de *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*, com aumentos variando de 18 a 55%. Girassol respondeu positivamente à inoculação somente no cultivo por 45 DAD, não sendo influenciado pela combinação de plantas. Feijão-de-porco apresentou incrementos no crescimento quando cultivado em solo inoculado, em todos os tempos estudados, a depender da combinação de plantas. Os resultados encontrados comprovam a capacidade de promoção de crescimento das plantas pelos isolados de *Pseudomonas spp.* degradadores do sulfentrazone. Tal habilidade apresentada pelo consórcio bacteriano e pelas plantas pode contribuir para o processo de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

**Palavras-chave:** *Canavalia ensiformis*, *Helianthus annuus*, herbicida, bactérias promotoras de crescimento de plantas

## GROWTH PROMOTION OF PHYTOREMEDIATOR SPECIES OF SOIL WITH SULFENTRAZONE BY *Pseudomonas spp.*

**ABSTRACT:** Degrading bacteria of sulfentrazone with the potential to promote plant growth can bring direct benefits to both remedial plants and the soil in the process of bioremediation. The objective of this paper was to evaluate the bacterial inoculation response of *Pseudomonas* in soil contaminated with sulfentrazone on the growth of remediating species *Canavalia ensiformis* (jack bean) and *Helianthus annuus* (sunflower). The experiment was conducted in a greenhouse with a 2x2x4 factorial for each phytoremediator species, in a completely randomized design with four replications. The first factor consisted of the presence or absence of inoculation with the selected bacterial consortium; the second factor consisted of cultivation with the same species or with another species; and the third factor consisted of the time of bioremediation (25, 45, 65 and 85 days after thinning (DAT)). At the end of each time period and for each species, we evaluated leaf area, root volume and dry matter of root, stem and leaves. Both phytoremediators showed lower growth when cultured together with a plant of their own species. Inoculation provided an increase in leaf area, dry matter of leaves, stem and root, and root volume of *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus*, ranging from 18 to 55%. *Helianthus annuus* responded positively to inoculation only in cultivation for 45 DAT, not being influenced by the combination of plants. *Canavalia ensiformis* showed increases in growth when grown in soil inoculated during the entire study, depending on the combination of plants. The results confirm the growth promoting ability of plants by isolates of *Pseudomonas spp.* sulfentrazone degraders. This ability, of the bacterial consortium and of the plants, can greatly contribute to the process of bioremediation of contaminated soils with sulfentrazone.

**Keywords:** *Canavalia ensiformis*, *Helianthus annuus*, herbicide, plant growth promoting bacteria

## INTRODUÇÃO

A fitorremediação, dentro da biorremediação, é uma das técnicas mais estudadas, destacando-se devido ao baixo custo e eficiência na descontaminação de solos com resíduos de herbicidas. A aplicação desta técnica vem sendo consolidada e impulsionada pelo crescente número de trabalhos que evidenciaram a possibilidade de se empregar plantas para reduzir a toxicidade de herbicidas a culturas suscetíveis

semeadas em sequência na mesma área (PIRES et al., 2006; SANTOS et al., 2006; PROCÓPIO et al., 2007; PROCÓPIO et al., 2009).

O sulfentrazone é um herbicida que apresenta longo efeito residual no solo, e por esse motivo pode causar problemas de *carryover*, inviabilizando o cultivo de espécies sensíveis em sucessão. Ademais, a permanência do produto no solo por longo tempo eleva os riscos de lixiviação e contaminação de águas subterrâneas. Nesse sentido, aumenta-se a preocupação em impedir ou remediar os efeitos negativos da presença desse herbicida no solo.

*Canavalia ensiformis*, uma leguminosa empregada comumente como adubo verde e com potencial fitorremediador de diferentes herbicidas, e *Helianthus annuus*, uma oleaginosa cultivada em diversas regiões do país, foram selecionadas como plantas fitorremediadoras do sulfentrazone e testadas quanto à capacidade e eficiência de redução dos resíduos tóxicos do mesmo no solo, por meio de bioensaios (BELO et al., 2011; MADALÃO et al., 2012).

No Brasil, embora os estudos de fitorremediação de ambientes com herbicidas tenham ganhado destaque e difusão na comunidade científica, a associação entre plantas e bactérias na biorremediação de solos contaminados ainda é pouco investigada.

Muitas espécies de bactérias, em sua maioria associadas à rizosfera, demonstraram a capacidade de promover o crescimento de plantas, sendo denominadas (rizo)bactérias promotoras de crescimento vegetal. Essas bactérias podem induzir o crescimento e desenvolvimento das plantas, direta ou indiretamente. A influência direta inclui a produção de fitohormônios, como por exemplo, ácido indolacético, auxinas e ácido giberélico (AHEMAD; KHAN, 2012), a solubilização de fosfatos (JHA et al., 2009a), a produção de sideróforos (JHA et al., 2009a) e a fixação biológica de nitrogênio (JHA et al., 2009b). Indiretamente, essas bactérias podem atuar como agentes de controle biológico de fitopatógenos, liberando substâncias como  $\beta$ -glucanases, proteases, celulasas, quitinases e ácido cianídrico (JAHANIAN et al., 2012; ALMAGHRABI et al., 2013; HERNÁNDEZ-LEÓN et al., 2015).

Vários gêneros e espécies de bactérias já foram relatados com tal capacidade. Gêneros como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Klebsiella*, dentre outros, têm demonstrado ação promotora de crescimento em espécies agrônômicas perenes e anuais (PIMENTEL et al., 2008; SHARMA et al., 2011; ZUCARELI et al., 2011; ALMAGHRABI et al., 2013), bem como em espécies florestais (BRUNETTA et al., 2010; ANGULO et al., 2014). A inoculação de sementes de milho com isolados de

*Pseudomonas* e *Azospirillum* foi capaz de promover o crescimento das plantas, em nível de campo, aumentando a altura, o peso de sementes, o número de sementes por espiga, a área foliar, bem como a matéria seca (GHOLAMI et al., 2009). Experimentos em casa de vegetação e em campo demonstraram que o tratamento com inoculação de *Pseudomonas jessenii* PS06 e *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 aumentou a produtividade de *Cicer arietinum* (grão de bico), sendo 52% maior do que nos tratamentos não inoculados (VALVERDE et al., 2006).

Embora reconhecida a importância dos micro-organismos na degradação de herbicidas no solo, pesquisas envolvendo a inoculação desses em solos contaminados são ainda escassas. A seleção de bactérias degradadoras do sulfentrazone, aliada à possibilidade de atuarem também como promotoras do crescimento vegetal podem aumentar as chances de sucesso e otimização do processo de biorremediação. Diante do exposto objetivou-se avaliar a resposta da inoculação de bactérias do gênero *Pseudomonas* em solo contaminado com o sulfentrazone sobre o crescimento das espécies remediadoras *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em ambiente protegido pertencente ao Departamento de Fitotecnia da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa - MG. Cada unidade experimental correspondeu a vasos com capacidade de 12 dm<sup>3</sup> (28,5 cm de diâmetro e 30 cm de altura) preenchidos com 10 kg de um Argissolo Vermelho Amarelo distrófico de textura franco-argilo-arenosa (25% de argila, 12% de silte e 63% de areia) com as seguintes características químicas: pH (água) 6,1; matéria orgânica 4,12 dag kg<sup>-1</sup>; P e K 6,9 e 200 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente; Ca, Mg, Al, H + Al e CTC efetiva 3,7; 1,0; 0,0 e 1,15 e 5,21 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente. Antes do preenchimento dos vasos o solo foi previamente adubado com sulfato de amônio (0,20 g dm<sup>-3</sup> de N) e superfosfato simples (1,80 g dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), segundo Cantarutti et al. (2007).

Posteriormente, realizou-se a aplicação do sulfentrazone com um pulverizador costal, com pressão constante mantida à CO<sub>2</sub>, acoplado de barra com duas pontas tipo leque TT110 02, espaçadas de 0,5 m, trabalhando à pressão de 250 kPa, com volume de calda de aproximadamente 140 L ha<sup>-1</sup>, na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup> i.a. As condições climáticas no momento da aplicação foram T = 27 °C, UR = 72% e velocidade do vento de 1,9 km h<sup>-1</sup>.

Após a aplicação do herbicida, realizou-se a semeadura das espécies fitorremediadoras do sulfentrazone *Canavalia ensiformis* (MADALÃO et al., 2012) e *Helianthus annuus* (cultivar Tera 860 HO) (BELO et al., 2011). A semeadura foi realizada a 5 cm de profundidade utilizando-se 6 sementes por vaso. Decorridos 15 dias da semeadura realizou-se o desbaste deixando duas plantas da mesma espécie ou uma de cada (cultivo misto) em cada unidade experimental.

Metade dos vasos foi inoculada com consórcio bacteriano selecionado com base no potencial de degradação dos isolados realizado em estudo prévio. O consórcio foi formado por seis isolados identificados como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* e três isolados de *Pseudomonas sp.*. Estes foram cultivados separadamente em meio caldo nutriente (1,0 L água; 2,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0 g NaCl; 3,0 g extrato de carne; 5,0 g peptona; pH 6,8) por, aproximadamente, 10 h a 30°C e 150 rpm até densidade óptica de 0,6. O meio foi submetido à centrifugação (5000 rpm, 5 min, 4°C) e as células bacterianas suspensas em solução salina ((NaCl 0,85%). O consórcio foi estabelecido pipetando-se volumes de solução de cada um dos seis isolados de modo a garantir igual quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC mL<sup>-1</sup>) de cada espécie, totalizando 12 mL de solução e inoculação de 4,5 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo nos tratamentos correspondentes, após o desbaste.

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arranjos em esquema fatorial 2x2x4 para cada espécie fitorremediadora. O primeiro fator foi composto pela presença ou ausência de inoculação com consórcio bacteriano selecionado, o segundo fator foi composto pelo cultivo com a mesma espécie ou com a outra espécie, e o terceiro pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste (DAD)). Nos referidos tempos de biorremediação, as plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) encontravam-se nos estádios vegetativos V2 a V3, V4 a V5, V6 a V7 e V8 a V9, e as plantas de girassol (*Helianthus annuus*) nos estádios V16 a V18, R1 a R3, R5.1 a R5.8 e R 5.10 a R6, respectivamente.

As plantas de feijão-de-porco e girassol foram cultivadas por 25, 45, 65 e 85 DAD, sendo ao final de cada tempo coletadas as folhas, o caule rente ao solo e o sistema radicular das mesmas. Determinou-se a área foliar (AF - cm<sup>2</sup>/planta) utilizando-se medidor de área foliar LI-3100 e com as raízes lavadas obteve-se o volume de raízes (VR - cm<sup>3</sup>/planta) pelo método do volume de água deslocado em proveta graduada (CARRIGAN; FREY, 1980). O material vegetal foi acondicionado, separadamente, em

sacos de papel e colocados em estufa com circulação forçada de ar a  $65 \pm 2^\circ \text{C}$  até atingir massa constante, para obtenção da matéria seca de folhas (MSF - g/planta), de caule (MSC - g/planta) e de raízes (MSR - g/planta) em balança semianalítica de precisão.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F a 5% de probabilidade. Efetuou-se o desdobramento da interação significativa, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os efeitos dos tempos de biorremediação foram avaliados por análise de regressão e a escolha dos modelos baseada na significância dos coeficientes, no fenômeno biológico e no coeficiente de determinação. Utilizou-se o teste de identidade de modelos da regressão (Littell et al., 2006).

## RESULTADOS

### *Girassol*

Como efeito da interação tripla, a área foliar acumulada por planta de girassol foi maior quando esta conviveu com uma planta de feijão-de-porco por 45 DAD em solo inoculado com consórcio bacteriano. O mesmo comportamento foi evidenciado nas plantas cultivadas por 65 e 85 DAD, independente da inoculação do solo (Tabela 1).

Tabela 1: Área foliar acumulada por planta de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                    | Área foliar (cm <sup>2</sup> /planta) |                 |                |    |
|----------------------------|---------------------------------------|-----------------|----------------|----|
|                            | Com inoculação                        |                 | Sem inoculação |    |
|                            | 25 DAD                                |                 |                |    |
| Girassol + Girassol        | 1451,67                               | Aa <sup>1</sup> | 1470,82        | Aa |
| Girassol + Feijão-de-porco | 1441,30                               | Aa              | 1802,31        | Aa |
|                            | 45 DAD                                |                 |                |    |
| Girassol + Girassol        | 3981,83                               | Ab              | 4029,00        | Aa |
| Girassol + Feijão-de-porco | 5380,00                               | Aa              | 3719,50        | Ba |
|                            | 65 DAD                                |                 |                |    |
| Girassol + Girassol        | 4512,67                               | Ab              | 4653,17        | Ab |
| Girassol + Feijão-de-porco | 6320,65                               | Aa              | 5990,67        | Aa |
|                            | 85 DAD                                |                 |                |    |
| Girassol + Girassol        | 3455,00                               | Ab              | 3443,67        | Ab |
| Girassol + Feijão-de-porco | 5713,31                               | Aa              | 5330,00        | Aa |
| CV (%)                     | 10,84                                 |                 |                |    |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada tempo, não diferem entre si pelo Teste F ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

Efeito positivo da inoculação do solo com bactérias do gênero *Pseudomonas* sobre o acúmulo de área foliar do girassol foi verificado quando este conviveu com a leguminosa por 45 DAD (Tabela 1).

Como resultado do desdobramento dos cultivos e da inoculação dentro dos tempos de biorremediação, observou-se identidade entre os modelos Girassol + Girassol com e sem inoculação, sendo apresentado em uma curva comum. Estes tratamentos acumularam, ao longo do tempo, menor área foliar do que aqueles compostos pelo cultivo misto de girassol + feijão-de-porco (Figura 1). Plantas de girassol, na presença de uma planta de feijão-de-porco e inoculação, destacaram-se frente às demais combinações e chegaram a acumular área foliar máxima de 6550,52 cm<sup>2</sup> aos 67 DAD (Figura 1). Para todos os tratamentos, os dados de área foliar se ajustaram ao modelo polinomial quadrático, com aumento até atingir um ponto máximo (Figura 1).

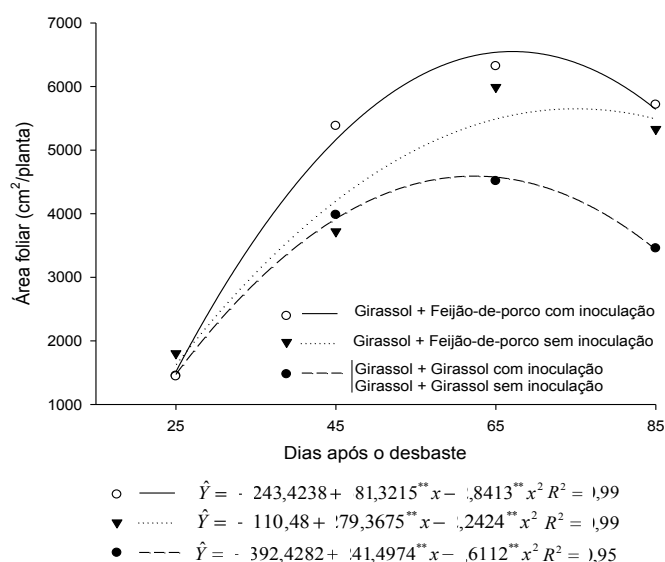


Figura 1: Área foliar acumulada por planta de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, ° e ns significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente, pelo Teste t.

Plantas de girassol submetidas à competição interespecífica por 45 DAD apresentaram menor volume de raiz. A convivência com uma planta da mesma espécie por 65 e 85 DAD foi mais danosa, com reduções de 17 e 31% do volume de raiz do

girassol, respectivamente (Tabela 2). A inoculação proporcionou aumento do volume de raiz do girassol cultivado por 45 DAD (Tabela 2).

Tabela 2: Volume de raiz (cm<sup>3</sup>/planta) de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Volume de raiz (cm <sup>3</sup> /planta) |                      |         |          |          |
|--|----------------------|---------|----------|----------|
| Cultivo                                  | Tempo (DAD)          |         |          |          |
|  | 25                   | 45      | 65       | 85       |
| Girassol + Girassol                      | 17,92 a <sup>1</sup> | 65,00 a | 100,42 b | 79,58 b  |
| Girassol + Feijão-de-porco               | 22,50 a              | 41,65 b | 121,67 a | 115,83 a |
| Inoculação                               | 25                   | 45      | 65       | 85       |
| Com                                      | 17,08 a              | 62,50 a | 106,25 a | 100,83 a |
| Sem                                      | 23,33 a              | 44,17 b | 115,83 a | 94,58 a  |
| CV (%)                                   | 19,93                |         |          |          |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, para cada fator, não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

Desdobrando a interação cultivo x tempo, verificou-se que, a partir de 68 DAD, houve redução do volume de raiz do girassol cultivado com outro girassol. Plantas de girassol cultivadas juntamente com o feijão-de-porco, até o final do experimento, apresentaram volume de raiz crescente (Figura 2A). Ao longo do tempo de biorremediação, não foi verificada diferença significativa no volume de raiz de plantas de girassol cultivadas em solo inoculado ou não inoculado com o consórcio bacteriano (Figura 2B).

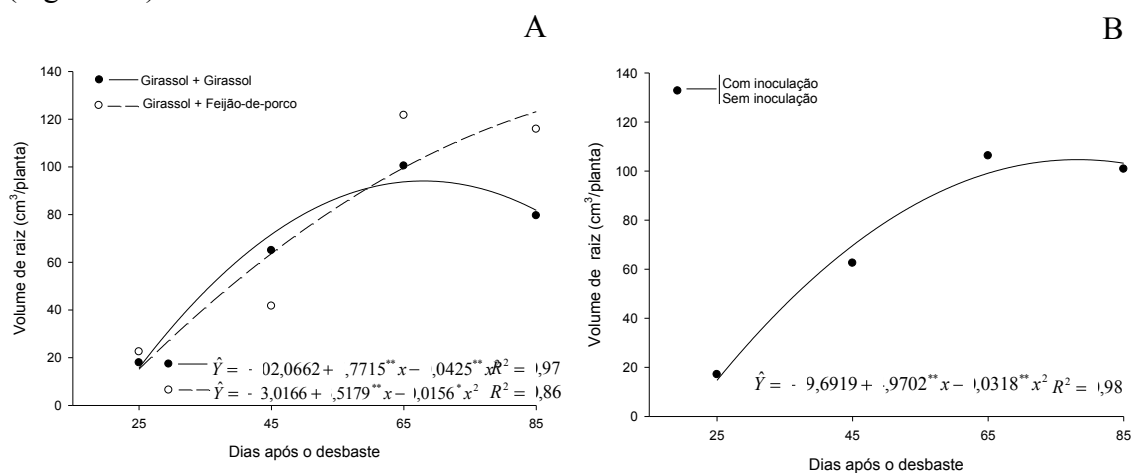


Figura 2: Volume de raiz (cm<sup>3</sup>/planta) de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco (A), por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano (B).

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, ° e ns significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

O acúmulo de matéria seca de raiz pelo girassol, aos 65 e 85 DAD, foi menor nas plantas submetidas à competição intraespecífica do que no cultivo misto (Tabela 3). Aumento superior a 50% na MSR foi evidenciado nas plantas de girassol aos 45 DAD como efeito da presença de bactérias *Pseudomonas* no solo (Tabela 3).

Tabela 3: Matéria seca de raiz acumulada por planta de girassol, em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca de raiz (MSR - g/planta) |                     |        |         |         |
|---------------------------------------|---------------------|--------|---------|---------|
| Cultivo                               | Tempo (DAD)         |        |         |         |
|                                       | 25                  | 45     | 65      | 85      |
| Girassol + Girassol                   | 1,06 a <sup>1</sup> | 6,02 a | 10,10 b | 13,51 b |
| Girassol + Feijão-de-porco            | 1,15 a              | 4,19 a | 14,85 a | 17,90 a |
| Inoculação                            | 25                  | 45     | 65      | 85      |
| Com                                   | 0,97 a              | 6,93 a | 12,18 a | 16,10 a |
| Sem                                   | 1,24 a              | 3,28 b | 12,78 a | 15,31 a |
| CV (%)                                | 20,73               |        |         |         |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, para cada fator, não diferem entre si pelo Teste F ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

Ao longo dos 85 DAD, o tratamento girassol + feijão-de-porco acumulou maior MSR do que girassol + girassol evidenciado pela maior inclinação da reta (Figura 3A). Com relação ao efeito da inoculação ao longo do tempo de biorremediação, este não foi significativo, sendo a MSR apresentada em uma única curva linear crescente (Figura 3B).

Verificou-se para MSC significância nas interações cultivo x tempo e cultivo x inoculação. No desdobramento da primeira, maior acúmulo de matéria seca do caule foi observado nos cultivos de girassol + feijão-de-porco por 65 e 85 DAD (Tabela 4). Contudo, não foi constatada diferença entre os cultivos ao longo dos tempos de biorremediação, sendo a máxima MSC atingida aos 69 DAD (Figura 4).

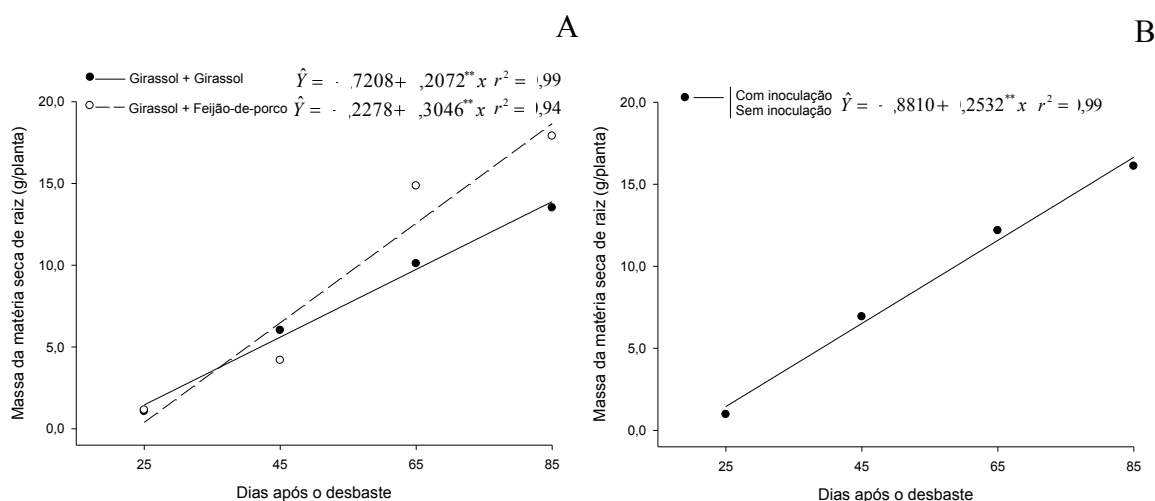


Figura 3: Matéria seca de raiz acumulada por planta de girassol, em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco (A), por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano (B).

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, ° e <sup>ns</sup> significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

Também na interação cultivo x inoculação, girassol + girassol apresentou menor MSC em relação ao cultivo misto, independente da bioaugmentação com consórcio bacteriano. Somente na combinação girassol + feijão de porco, a adição de micro-organismos selecionados ao solo proporcionou maior acúmulo de matéria seca do caule (Tabela 4).

Tabela 4: Matéria seca do caule acumulada por planta de girassol, em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca do caule (MSC - g/planta) |                     |         |          |         |
|--|---------------------|---------|----------|---------|
| Cultivo                                | Tempo (DAD)         |         |          |         |
|  | 25                  | 45      | 65       | 85      |
| Girassol + Girassol                    | 2,33 a <sup>1</sup> | 13,46 a | 28,31 b  | 19,89 b |
| Girassol + Feijão-de-porco             | 2,32 a              | 11,11 a | 42,40 a  | 35,73 a |
| Inoculação                             | Com                 |         | Sem      |         |
| Girassol + Girassol                    | 16,26 Ab            |         | 15,74 Ab |         |
| Girassol + Feijão-de-porco             | 24,99 Aa            |         | 20,78 Ba |         |
| CV (%)                                 | 17,48               |         |          |         |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada tempo, não diferem entre si pelo Teste F ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

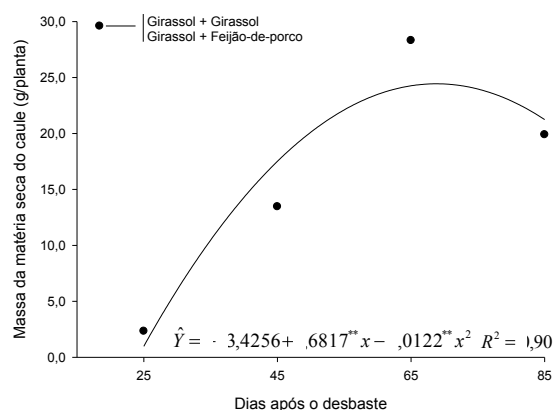


Figura 4: Matéria seca do caule acumulada por planta de girassol, em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, ° e ns significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

A MSF acumulada por planta de girassol foi 15, 34 e 39% menor em cultivo com a mesma espécie por 45, 65 e 85 DAD, respectivamente (Tabela 5). Assim como para volume de raiz (Tabela 2) e MSR (Tabela 3), a inoculação do solo proporcionou aumento da MSF do girassol cultivado até 45 DAD (Tabela 5).

Tabela 5: Matéria seca de folhas acumulada por planta de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca de folhas (MSF – g/planta) |                     |         |         |         |
|---|---------------------|---------|---------|---------|
| Cultivo                                 | Tempo (DAD)         |         |         |         |
|   | 25                  | 45      | 65      | 85      |
| Girassol + Girassol                     | 4,77 a <sup>1</sup> | 15,42 b | 19,84 b | 20,17 b |
| Girassol + Feijão-de-porco              | 5,48 a              | 18,08 a | 29,85 a | 32,85 a |
| Inoculação                              | 25                  | 45      | 65      | 85      |
| Com                                     | 5,02 a              | 19,08 a | 24,81 a | 26,38 a |
| Sem                                     | 5,23 a              | 14,43 b | 24,98 a | 26,83 a |
| CV (%)                                  | 11,42               |         |         |         |

<sup>1</sup>/Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, para cada fator, não diferem entre si pelo Teste F ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

O cultivo de girassol com feijão-de-porco propiciou maior acúmulo de matéria seca de folhas no decorrer do tempo, como evidenciado na Figura 5A. A inoculação do

solo com bactérias selecionadas proporcionou às plantas de girassol maior MSF do que aquelas não inoculadas (Figura 5B).

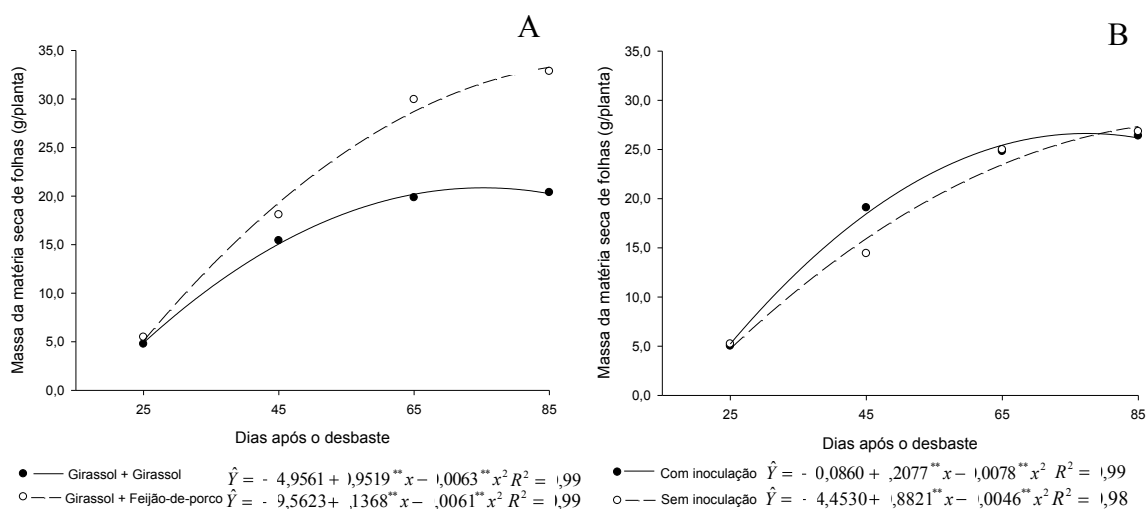


Figura 5: Matéria seca de folhas acumulada por planta de girassol em cultivo com a mesma espécie ou com feijão-de-porco (A), por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano (B).

\*\* , \* , <sup>o</sup> e <sup>ns</sup> significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

### ***Feijão-de-porco***

Para as variáveis de crescimento do feijão-de-porco verificou-se interação tripla significativa para volume de raiz, MSF e MSC, enquanto para área foliar e MSR realizou-se o desdobramento das interações duplas significativas.

O convívio com plantas da mesma espécie por 65 e 85 DAD provocou redução da área foliar acumulada por plantas de feijão-de-porco (Tabela 6). Maior área foliar foi observada em plantas de feijão-de-porco cultivadas em solo inoculado por 25 e 45 DAD, proporcionando aumento de 51 e 26%, respectivamente, em relação às plantas cultivadas em solo não inoculado (Tabela 6).

O tratamento feijão-de-porco + girassol apresentou, ao longo do tempo de biorremediação, aumento linear crescente da área foliar, diferentemente do que foi observado na presença de outra planta da mesma espécie, cujos aumentos foram decrescentes a partir de 45 DAD (Figura 6A). Plantas cultivadas em solos inoculados acumularam área foliar superior às plantas de feijão-de-porco cultivadas em solo não inoculado com consórcio bacteriano, por quase todo o tempo de estudo (Figura 6B).

Tabela 6: Área foliar acumulada por planta de feijão-de-porco, em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Área foliar (cm <sup>2</sup> /planta) |                       |           |           |           |
|---------------------------------------|-----------------------|-----------|-----------|-----------|
| Cultivo                               | Tempo (DAD)           |           |           |           |
|                                       | 25                    | 45        | 65        | 85        |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco     | 395,83 a <sup>1</sup> | 1405,29 a | 2006,13 b | 2301,83 b |
| Feijão-de-porco + Girassol            | 537,75 a              | 1818,25 a | 3241,00 a | 3455,50 a |
| Inoculação                            | 25                    | 45        | 65        | 85        |
| Com                                   | 627,58 a              | 1854,38 a | 2596,00 a | 2687,63 a |
| Sem                                   | 306,00 b              | 1369,17 b | 2651,13 a | 3069,50 a |
| CV (%)                                | 18,69                 |           |           |           |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna, para cada fator, não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

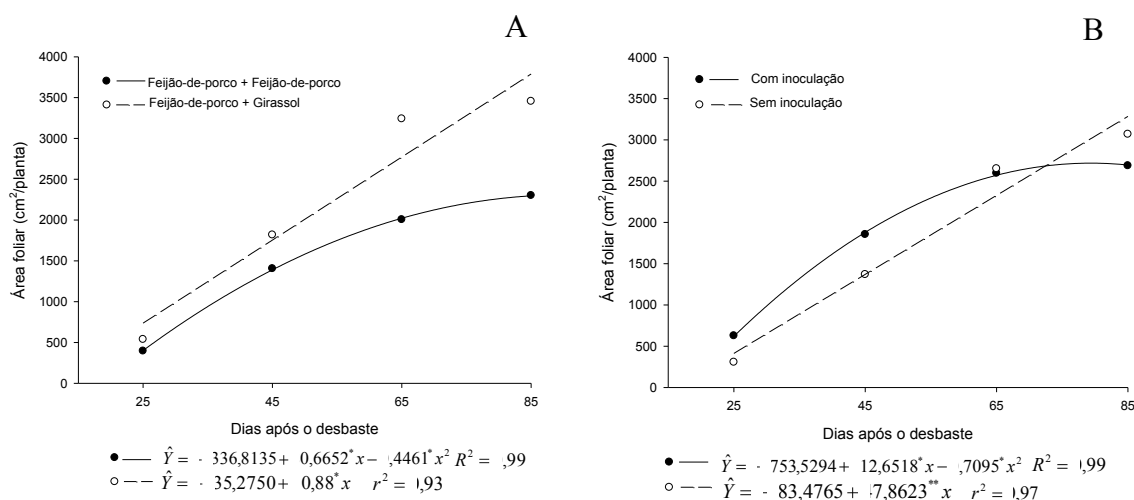


Figura 6: Área foliar acumulada por planta de feijão-de-porco em cultivo com a mesma espécie ou com girassol (A), por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano (B).

\*\* , \* , ° e ns significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

Menor volume de raiz foi verificado nos tratamentos feijão-de-porco + feijão-de-porco aos 25 DAD e 85 DAD, em solos com e sem inoculação, respectivamente (Tabela 7). Aos 25 DAD plantas de feijão-de-porco cultivadas juntamente com uma planta de girassol exibiram aumento de 50% no volume de raiz pela adição de inóculo ao solo. Tal efeito benéfico da inoculação também foi observado aos 45 DAD e 85 DAD em cultivos de feijão-de-porco com a mesma espécie, com incremento de 41 e 36% no volume de raiz, respectivamente (Tabela 7).

Tabela 7: Volume de raízes de feijão-de-porco, em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                           | Volume de raízes (cm <sup>3</sup> /planta) |                 |                |       |
|-----------------------------------|--|-----------------|----------------|-------|
|                                   | Com inoculação                             |                 | Sem inoculação |       |
|                                   | 25 DAD                                     |                 |                |       |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco | 4,67                                       | Ab <sup>1</sup> | 3,75           | Aa    |
| Feijão-de-porco + Girassol        | 10,00                                      | Aa              | 5,00           | Ba    |
| 45 DAD                            |  |                 |                |       |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco | 11,25                                      | Aa              | 6,67           | Ba    |
| Feijão-de-porco + Girassol        | 11,67                                      | Aa              | 7,50           | Aa    |
| 65 DAD                            |  |                 |                |       |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco | 11,67                                      | Aa              | 13,75          | Aa    |
| Feijão-de-porco + Girassol        | 16,67                                      | Aa              | 15,00          | Aa    |
| 85 DAD                            |  |                 |                |       |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco | 17,50                                      | Aa              | 11,25          | Bb    |
| Feijão-de-porco + Girassol        | 17,51                                      | Aa              | 17,50          | Aa    |
| CV (%)                            |  |                 |                | 24,28 |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada tempo, não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

No desdobramento dos fatores inoculação e cultivo dentro dos tempos de biorremediação, verificou-se igualdade entre os modelos de feijão-de-porco + girassol sem inoculação e feijão-de-porco + feijão-de-porco com inoculação, sendo os mesmos representados por uma curva em comum (Figura 7A). Estes, além de feijão-de-porco + girassol com inoculação, tiveram aumento linear do volume de raiz ao longo do tempo, com superioridade deste último. Na ausência de inoculação e cultivo com a mesma espécie, o volume de raiz máximo apresentado por planta de feijão-de-porco foi de 12 cm<sup>3</sup> aos 76,5 DAD (Figura 7A).

A única interação significativa encontrada para MSR foi inoculação x tempo. Observou-se maior MSR em plantas de feijão-de-porco cultivadas por 65 e 85 DAD em solo com inoculação (Tabela 8). Ao longo do tempo, a inoculação proporcionou maior incremento de matéria seca de raiz nessas plantas, em relação ao solo não inoculado com isolados bacterianos (Figura 7B).

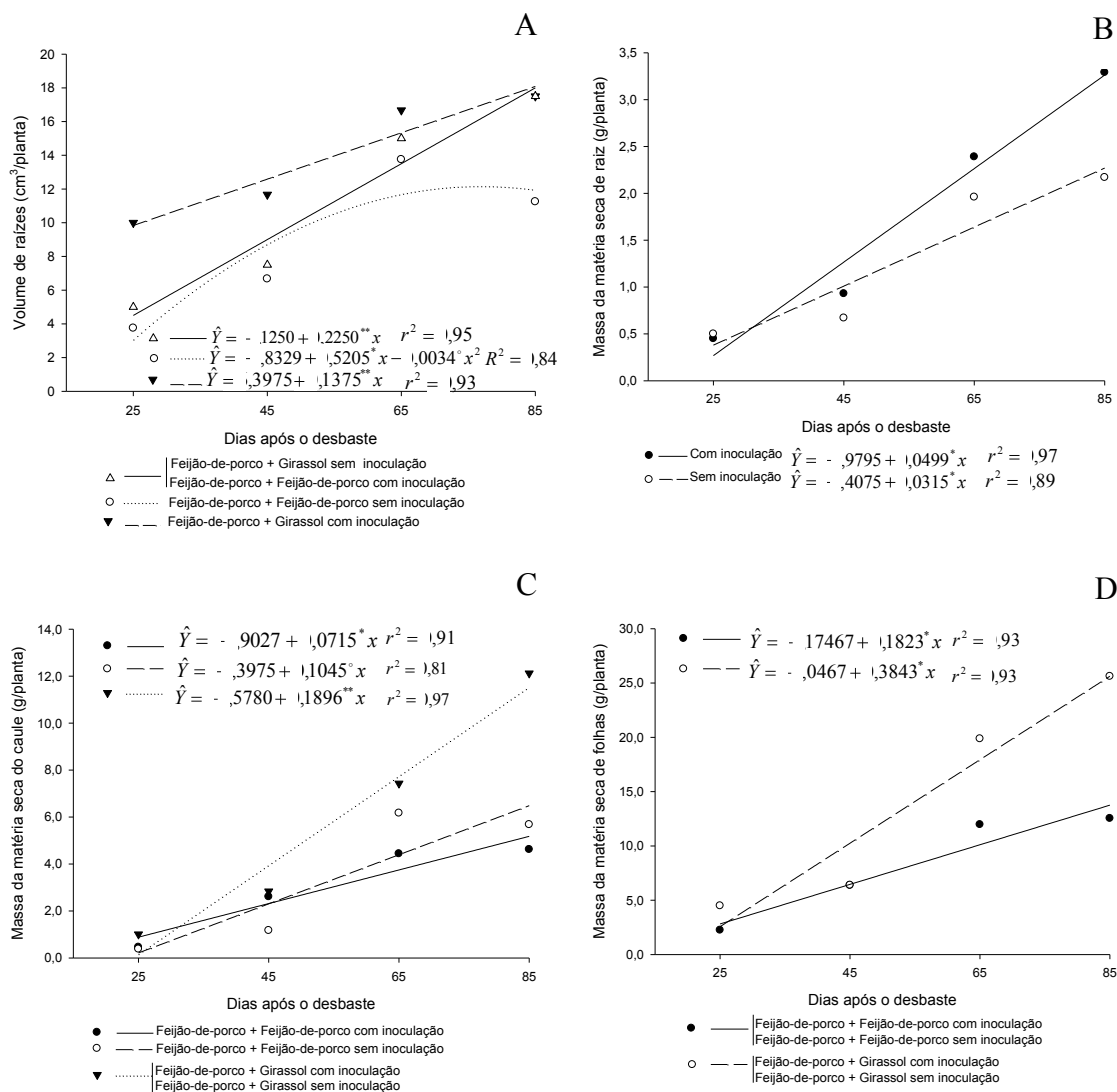


Figura 7: Volume de raiz (A), matéria seca de raiz (B), de caule (C) e de folhas (D) de feijão-de-porco em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, por diferentes tempos, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, <sup>o</sup> e <sup>ns</sup> significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente.

Tabela 8: Matéria seca de raiz acumulada por planta de feijão-de-porco, em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca de raiz (MSR – g/planta) |                     |        |        |        |
|---------------------------------------|---------------------|--------|--------|--------|
| Inoculação                            | Tempo (DAD)         |        |        |        |
|                                       | 25                  | 45     | 65     | 85     |
| Com                                   | 0,45 a <sup>1</sup> | 0,93 a | 2,39 a | 3,29 a |
| Sem                                   | 0,50 a              | 0,67 a | 1,96 b | 2,17 b |
| CV (%)                                | 19,82               |        |        |        |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

Independente da inoculação do solo com o consórcio bacteriano, plantas de feijão-de-porco crescidas na presença de outra planta da mesma espécie por 65 e 85 DAD acumulou menor MSC do que na presença de uma planta de girassol (Tabela 9). Como efeito da inoculação, houve aumento e redução da MSC aos 45 e 65 DAD, respectivamente, nos tratamentos de feijão-de-porco + feijão-de-porco. Aos 85 DAD plantas de feijão-de-porco cultivadas com girassol apresentaram aumento de 18% na MSC em solo inoculado (Tabela 9).

Tabela 9: Matéria seca do caule acumulada por planta de feijão-de-porco, em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca do caule (MSC – g/planta) |                |                 |                |    |  |
|--|----------------|-----------------|----------------|----|--|
| Cultivo                                | Com inoculação |                 | Sem inoculação |    |  |
|  | 25 DAD         |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco      | 0,46           | Aa <sup>1</sup> | 0,38           | Aa |  |
| Feijão-de-porco + Girassol             | 1,01           | Aa              | 0,74           | Aa |  |
| 45 DAD                                 |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco      | 2,61           | Aa              | 1,17           | Ba |  |
| Feijão-de-porco + Girassol             | 2,84           | Aa              | 1,57           | Aa |  |
| 65 DAD                                 |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco      | 4,44           | Bb              | 6,17           | Ab |  |
| Feijão-de-porco + Girassol             | 7,43           | Aa              | 7,78           | Aa |  |
| 85 DAD                                 |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco      | 4,62           | Ab              | 5,68           | Ab |  |
| Feijão-de-porco + Girassol             | 12,12          | Aa              | 9,96           | Ba |  |
| CV (%)                                 | 18,82          |                 |                |    |  |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada tempo, não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

O tratamento feijão-de-porco + girassol, independente da inoculação, apresentou maior MSC ao longo do tempo de biorremediação, seguido dos tratamentos de feijão-de-porco + feijão-de-porco sem e com inoculação, todos com comportamento linear positivo (Figura 7C).

Na ausência de inoculação do solo, plantas de feijão-de-porco cultivadas com uma planta de girassol, por 45 DAD, apresentaram maior MSF do que na presença de outra planta de feijão-de-porco. O mesmo comportamento foi observado aos 65 e 85 DAD, em solos inoculados e não inoculados (Tabela 10). A inoculação proporcionou redução da MSF de plantas de feijão-de-porco + feijão-de-porco, aos 65 DAD, enquanto que aos 85 DAD verificou-se aumento da MSF de feijão-de-porco + girassol (Tabela 10).

Tabela 10: Matéria seca de folhas acumulada por planta de feijão-de-porco, em cultivo com a mesma espécie ou com girassol, em solo com sulfentrazone, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca de folhas (MSF – g/planta) |                |                 |                |    |  |
|---|----------------|-----------------|----------------|----|--|
| Cultivo                                 | Com inoculação |                 | Sem inoculação |    |  |
|   |                |                 |                |    |  |
| 25 DAD                                  |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco       | 2,25           | Aa <sup>1</sup> | 2,34           | Aa |  |
| Feijão-de-porco + Girassol              | 4,49           | Aa              | 2,99           | Aa |  |
| 45 DAD                                  |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco       | 6,37           | Aa              | 3,56           | Ab |  |
| Feijão-de-porco + Girassol              | 6,39           | Aa              | 7,15           | Aa |  |
| 65 DAD                                  |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco       | 11,97          | Bb              | 15,78          | Ab |  |
| Feijão-de-porco + Girassol              | 19,87          | Aa              | 21,13          | Aa |  |
| 85 DAD                                  |                |                 |                |    |  |
| Feijão-de-porco + Feijão-de-porco       | 12,54          | Ab              | 13,75          | Ab |  |
| Feijão-de-porco + Girassol              | 25,62          | Aa              | 20,89          | Ba |  |
| CV (%)                                  | 16,58          |                 |                |    |  |

<sup>1/</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada tempo, não diferem entre si pelo Teste F (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

Ao longo do tempo de biorremediação os mesmos cultivos com e sem inoculação foram representados numa única curva, evidenciando maior acúmulo de matéria seca de folhas por plantas de feijão-de-porco cultivada com uma planta de girassol (Figura 7D).

## DISCUSSÃO

Ambas as fitorremediadoras apresentaram menor crescimento quando cultivadas juntamente com uma planta da própria espécie. O cultivo de duas plantas de girassol no mesmo vaso por 65 e 85 DAD ocasionou redução de todas as variáveis de crescimento. De modo geral, o mesmo comportamento foi constatado para plantas de feijão-de-porco. Possivelmente, nesse período, os recursos de crescimento já se encontravam limitantes no solo, estabelecendo-se mais fortemente a competição intraespecífica.

A utilização de duas plantas por vaso, equivalente a densidade de 31 plantas  $m^{-2}$ , também contribuiu para o estabelecimento da competição e efeito prejudicial ao crescimento das espécies. Em estudo sobre o efeito da densidade de semeadura (10, 20, 40, 80 e 160 plantas  $m^{-2}$ ) sobre o acúmulo de biomassa de espécies de adubo verde, Fernandes et al. (1999) verificaram que o feijão-de-porco foi a única espécie em que se observou redução da MSPA, em função do adensamento na semeadura. De acordo com os autores, a limitação imposta ao crescimento pode ser de natureza nutricional ou hídrica, bem como atribuída à competição por luz.

Espécies que possuem características morfofisiológicas semelhantes geralmente apresentam as mesmas exigências, tornando a competição mais intensa e as reduções de rendimento mais elevadas (SILVA; DURIGAN, 2006). Assim, no presente estudo, as duas plantas da mesma espécie concentraram suas demandas ao mesmo tempo, aumentando ainda mais a disputa pelos recursos do meio. O cultivo de duas espécies com hábitos de crescimento distintos como girassol e feijão-de-porco reduziu a intensidade da competição, permitindo melhor aproveitamento dos recursos e maior crescimento e desenvolvimento individual das espécies.

O cultivo misto, além de ser menos danoso no contexto da competição, pode ser boa alternativa para a biorremediação de solos contaminados com herbicidas, por explorar o potencial remediador de cada uma, contribuindo com benefícios múltiplos. Além da redução dos resíduos de herbicida no solo, que pode ser incrementada em cultivos mistos em relação aos cultivos puros (YANG et al., 2013), do aporte de nitrogênio ao solo por leguminosas, como o feijão-de-porco, e da possibilidade de uso do girassol como matéria prima para produção de biocumbustível, o cultivo de duas espécies propicia aumento da atividade microbiana e da diversidade de microorganismos no solo, pela diversidade de exsudatos lançados ao solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; MELO et al., 2014).

A inoculação proporcionou maior acúmulo de área foliar, matéria seca de folhas, caule e raiz e volume radicular de *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*. Os resultados encontrados comprovaram a capacidade de promoção de crescimento de plantas pelos isolados de *Pseudomonas spp.* degradadores do sulfentrazone no solo.

Vários estudos relatam a capacidade de diversos gêneros de bactérias em promover o crescimento vegetal. No entanto, o gênero *Pseudomonas* aparece frequentemente na literatura. *Pseudomonas spp.* são habitantes comuns e abundantes de diferentes regiões geográficas e produzem uma série de enzimas e metabólitos de importância biotecnológica envolvidos no crescimento das plantas (VASSILEV et al. 2006; MISHRA et al., 2010; ZUCARELI et al., 2011; DESHWAL; KUMAR, 2013).

As cepas de *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. cepacia* e *P. fluorescens*), inoculadas isoladamente em sementes de arroz, proporcionaram aumento no peso seco da parte aérea, da raiz e da planta de arroz, variando de 52,80 a 157,72, 172,04 a 408,06 e 93,15 a 233,84%, respectivamente, em relação ao controle (DESHWAL; KUMAR, 2013). Da mesma forma, Mishra et al. (2010) reportaram a promoção de crescimento por estirpes de *Pseudomonas* com aumento de 27,6% da produtividade em *Pelargonium graveolens* L. Herit. Em estudo realizado com *Mucuna pruriens*, *Pseudomonas* MR-18 aumentou a matéria seca e altura da planta em 84 e 24%, respectivamente (DESHWAL et al., 2011). Zucareli et al. (2011) verificaram aumento médio do diâmetro de espigas de milho em decorrência da inoculação das sementes a base de *P. fluorescens*. No presente estudo foram verificados aumentos de 31, 30, 53 e 24% no acúmulo de área foliar, volume de raiz, MSR e MSF, respectivamente, de girassol cultivado por 45 DAD. No caso do feijão-de-porco, a resposta positiva da inoculação foi evidenciada em todas as variáveis de crescimento e tanto na presença de outra planta da mesma espécie quanto na presença de uma planta de girassol.

Para o girassol, efeito expressivo da inoculação somente aos 45 DAD (Tabelas 1, 2, 3 e 5) pode ser reflexo do estágio de desenvolvimento da planta, que se apresentava no início do estágio reprodutivo com desenvolvimento do broto floral. Nessa fase, pode ter ocorrido maior interação planta-micro-organismos do solo, possibilitando a promoção de crescimento. Na promoção de crescimento vegetal estão envolvidos diversos mecanismos que podem ser ativados pelas bactérias como resposta à estímulos advindos das plantas (BAIS et al., 2006). Assim, é possível que ocorra, em determinada época, um sinergismo entre a produção e liberação de substâncias químicas

promotoras de crescimento no solo pelas bactérias e a capacidade de absorção e utilização pelas plantas.

Efeito da inoculação do consórcio bacteriano em plantas de feijão-de-porco foi constatada já nas plantas cultivadas por 25 DAD com aumento de 51% no acúmulo de área foliar (Tabela 6) e de 50% no volume de raiz (Tabela 7) no cultivo feijão-de-porco + girassol, sendo evidenciada em todas as épocas de estudo, a depender da variável de crescimento analisada. Tal comportamento pode estar relacionado à maior dependência dos micro-organismos pela planta ou à grande capacidade dessa espécie em estimular a microbiota associada em solos contaminados com herbicidas (PIRES et al., 2005; Capítulo 4 da tese).

Estudos de isolamento e seleção de isolados em diferentes espécies vegetais demonstraram que a habilidade de algumas bactérias em produzir substâncias promotoras de crescimento de plantas pode ser altamente específica a certas espécies de plantas, ou até mesmo de cultivares, como também a diferentes ambientes onde estão inseridas, ou ainda afetada em decorrência do estresse imposto à comunidade microbiana devido a alterações ambientais e antropogênicas (MENDES et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009; JHA et al., 2009b; PRAKAMHANG et al., 2009). Neste trabalho verificou-se ainda que tal habilidade pode estar relacionada ao tempo de cultivo e à combinação de plantas. Tais evidências reforçam a complexidade das interações entre plantas e micro-organismos do solo.

Bactérias simbióticas (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*) e não simbióticas (*Pseudomonas*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Azomonas*) estão sendo usadas em todo o mundo como bioinoculantes para promover o crescimento e o desenvolvimento das plantas sob várias condições de estresse causadas pela presença de metais pesados (WANI; KHAN, 2010; MA et al., 2011; OVES et al., 2013), salinidade (ALI et al., 2014) e também de herbicidas (AHEMAD; KHAN, 2010; 2011). Alguns isolados bacterianos dotados de múltiplas propriedades, dentre elas tolerância ao herbicida em questão e capacidade de promover o crescimento vegetal, foram utilizados para permitir o crescimento de *Vigna radiata* e *Lens esculenta*, espécies sensíveis, em solos contaminados com quizalafop-p-ethyl e clodinafop na Índia (AHEMAD; KHAN, 2010; 2011). Contudo, a capacidade de degradação dos herbicidas pelos isolados nesses trabalhos não foi estudada.

Bano e Mussarat (2004) isolaram e selecionaram uma bactéria identificada como *Pseudomonas sp.*, a qual possui a capacidade de realizar múltiplas atividades biológicas.

No referido estudo *Pseudomonas sp.* exibiu eficiência na degradação de carbofuran, além de ação antagônica a fitopatógenos pela produção de ácido cianídrico e sideróforos, além de potencial para promover o crescimento vegetal pela produção de ácido indolacético e solubilização de fosfatos inorgânicos. A possibilidade de isolar e selecionar bactérias capazes de degradar herbicidas no solo e ainda exercer algum efeito sobre o crescimento e desenvolvimento de espécies remediadoras representa uma nova perspectiva a ser explorada em programas de biorremediação.

## CONCLUSÕES

A adição de consórcio formado por *Pseudomonas spp.* ao solo contaminado com sulfentrazone promove o crescimento das espécies remediadoras girassol e feijão-de-porco, sendo a resposta do feijão-de-porco à inoculação mais efetiva e duradoura. A promoção de crescimento está relacionada ao tempo de cultivo e à combinação das espécies vegetais. Tal habilidade apresentada pelo consórcio bacteriano e pelas plantas pode contribuir para o processo de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa e apoio concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, S.; CHARLES, T. C.; GLICK, B. R. Amelioration of high salinity stress damage by plant growth-promoting bacterial endophytes that contain ACC deaminase. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 80, p. 160 - 167, 2014.

ALMAGHRABI, O. A.; MASSOUD, S. I.; ABDELMONEIM, T. S. Influence of inoculation with plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on tomato plant growth and nematode reproduction under greenhouse conditions. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 20, p. 57 - 61, 2013.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Growth promotion and protection of lentil (*Lens esculenta*) against herbicide stress by *Rhizobium* species. **Annals of Microbiology**, v. 60, p. 735 - 745, 2010.

AHEMAD, M.; KHAN, M. S. Response of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] grown in herbicide-amended soil to quizalate-fop-p-ethyl and clodinafop tolerant plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (vigna) MRM6. **Journal of Agricultural Science Technology**, v. 13, p. 1209 - 1222, 2011.

AHEMAD, M., KHAN, M. S. Evaluation of plant growth promoting activities of rhizobacterium *Pseudomonas putida* under herbicide-stress. **Annals of Microbiology**, v. 62, p. 1531 - 1540. 2012.

ANGULO, V. C.; SANFENTES, E. A.; RODRÍGUEZ, F.; SOSSA, K. E. Caracterización de rizobacterias promotoras de crecimiento en plántulas de *Eucalyptus nitens*. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 46, n. 4, p. 338 - 347, 2014.

BAIS, H. P.; WEIR, T. L.; PERRY, L. G.; GILROY, S.; VIVANCO, J. M. The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. **Annual Review of Plant Biology**, v. 57, p. 233 - 266, 2006.

BANO, N.; MUSARRAT, J. Characterization of a novel carbofuran degrading *Pseudomonas* sp. with collateral biocontrol and plant growth promoting potential. **FEMS Microbiology Letters**, v. 231, p. 13 - 17, 2004.

BELO, F. A.; COELHO, A. T. C. P.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B. Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 821 - 828, 2011.

BRUNETTA, J. M. F.; ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G.; GOMES, J. M.; BINOTI, D. B.; FONSECA, N. A. N. Isolamento e seleção de rizobactérias promotoras do crescimento de *Pinus taeda*. **Revista Árvore**, v. 34, n. 3, p. 399 - 406, 2010.

CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F.; MARTINEZ, H. E. P.; NOVAIS, R. F. Avaliação da Fertilidade do solo e Recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (eds) **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 769 – 850.

CARRIGAN, L.; FREY, K. J. Root volumes of *Avena* species. **Crop Science**, v. 20, p. 407 - 408, 1980.

DESHWAL, V. K.; VIG, K.; SINGH, S. B.; GUPTA, N.; AGARWAL, S.; PATIL, S.; ANKITA. Influence of the co-inoculation *Rhizobium* SR-9 and *Pseudomonas* SP-8 on growth of soybean crop. **Developmental Microbiology and Molecular Biology**, v. 2, n. 1, p. 67 - 74. 2011.

DESHWAL, V. K.; KUMAR, P. Plant growth promoting activity of Pseudomonads in rice crop. **International Journal of Current Microbiology Applied Science**, v. 2, n. 11, p. 152 - 157, 2013.

FERNANDES, M. F.; BARRETO, A. C.; EMÍDIO FILHO, J. Fitomassa de adubos verdes e controle de plantas daninhas em diferentes densidades populacionais de leguminosas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v. 34, n. 9, p. 1593 - 1600, 1999.

GHOLAMI, A.; SHAHSAVANI, S.; NEZARAT, S. The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination, seedling growth and yield of maize. **International Scholarly and Scientific Research & Innovation**, v. 3, n. 1, p. 9 - 14, 2009.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R.; ROJAS-SOLÍS, D.; CONTRERAS-PÉREZ, M.; OROZCO-MOSQUEDA, M. del C.; MACÍAS-RODRÍGUEZ, L. I.; CRUZ, H. R.; VALENCIA-CANTERO, E.; SANTOYO, G. Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. **Biological Control**, v. 81, p. 83 - 92, 2015.

JAHANIAN, A.; CHAICHI, M. R.; REZAEI, K.; REZAYAZDI, K.; KHAVAZI, K., The effect of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on germination and primary growth of artichoke (*Cynara scolymus*). **International Journal of Agriculture and Crop Sciences**, v. 4, p. 923 - 929, 2012.

JHA, B. K.; PRAGASH, M. G.; CLETUS, J.; RAMAN, G.; SAKTHIVEL, N. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent *Pseudomonad* strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.25, p. 573 - 581, 2009a.

JHA, B.; THAKUR, M.C.; GONTIA, I.; ALBRECHT, V.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; HARTMANN, A. Isolation, partial identification and application of diazotrophic rhizobacteria from traditional Indian rice cultivars. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 62 - 72, 2009b.

MA, Y.; RAJKUMAR, M.; VICENTE, J. A.; FREITAS, H. Inoculation of Ni-resistant plant growth promoting bacterium *Psychrobacter sp.* strain SRS8 for the improvement of nickel phytoextraction by energy crops. **International Journal of Phytoremediation**, v. 13, p. 126 - 139, 2011.

MADALÃO, J. C.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; CHAGAS, K.; NASCIMENTO, A.F.; GARCIA, G. O. Fitorremediação de solos contaminados com o herbicida sulfentrazone por espécies de adubos verdes. **Revista Ciências Agrárias**, v. 55, p. 288 - 296, 2012.

MELO, C.; FIALHO, C.; FARIA, A.; NETO, M.; SARAIVA, D.; COSTA, M.; FERREIRA, L.; FERREIRA, F. A. Microbial activity of soil cultivated with corn in association with weeds under different fertility management systems. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 4, p. 477 - 484, 2014.

MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A.; ARAUJO, W. L.; RAAIJMAKERS, J. M. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: Genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 7259 - 7267, 2007.

MISHRA, R. K.; PRAKASH, O.; ALAM, M.; DIKSHIT, A. Influence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) on the productivity of *Pelargonium graveolens* L. Herit. **Recent Research in Science and Technology**, v. 2, n. 5, p. 53 - 57, 2010.

MONQUERO, P. A.; CÔRREA, M. C.; BARBOSA, L. N.; GUTIERREZ, A.; ORZARI, I.; HIRATA, A. C. S. Seleção de espécies de adubos verdes visando à fitorremediação de diclosulam. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 127 - 135, 2013.

MOREIRA, F. S. M.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In: MOREIRA, F. S. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. Editora: UFLA, Universidade Federal de Lavras, 2006. p. 407 - 447.

OLIVEIRA, A. L. M.; STOFFELS, M.; SCHMID, M.; REIS, V.M.; BALDANI, J. I.; HARTMANN, A. Colonization of sugarcane plantlets by mixed inoculations with diazotrophic bacteria. **European Journal of Soil Biology**, v. 45, p. 106 - 113, 2009.

OVES, M.; KHAN, M. S.; ZAIDI, A. Chromium reducing and plant growth promoting novel strain *Pseudomonas aeruginosa* OSG41 enhance chickpea growth in chromium amended soils. **European Journal of Soil Biology**, v. 56, p. 72 - 83, 2013.

PRAKAMHANG, J.; MINAMISAW, K.; TEAMTAISON, K.; BOONKERD, N.; TEAUMROONG, N. The communities of endophytic diazotrophic bacteria in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). **Applied Soil Ecology**, v. 42, p. 141 - 149, 2009.

PIMENTEL, M. S.; RICCI, M. S. F.; COSTA, J. R.; REIS, V. M.; SANTOS, V. L. S.; SILVA, M. F. Desenvolvimento e nutrição de mudas de cafeeiro inoculadas com bactérias promotoras de crescimento. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 14, n. 2, p. 221 - 230, 2008.

PIRES, F. R. SOUZA, C. M.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade

rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p. 627 - 634, 2005.

PIRES, F. R.; PROCÓPIO, S. O.; SOUZA, C. M.; SANTOS, J. B.; SILVA, G. P. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Caatinga**, v. 19, n. 1, p. 92 - 97, 2006.

PROCÓPIO, S. O.; CARMO, M. L.; PIRES, F. R.; FILHO, A. C.; BRAZ, G. B. P.; SILVA, W. F. P.; BARROSO, A. L. L.; SILVA, G. P.; CARMO, E. L.; BRAZ, A. J. B. P.; PACHECO, L. P. 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.

PROCÓPIO, S. O.; SANTOS, J. B.; PIRES, F. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A.; CARGNELUTTI FILHO, A. Development of bean plants in soil contaminated with trifloxysulfuron-sodium after *Stizolobium aterrimum* and *Canavalia ensiformis* cultivation. **Planta Daninha**, v. 25, n. 1, p. 87 - 96, 2007.

SANTOS, J. B.; PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A. Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuron-sodium por diferentes densidades populacionais de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis* (L). DC.). **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 3, p. 444 - 449, 2006.

SHARMA, S. K.; JOHRI, B. N.; RAMESH, A.; JOSHI, O. P.; PRASAD, S. V. S. Selection of plant growth-promoting *Pseudomonas spp.* that enhanced productivity of soybean-wheat cropping system in central India. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 11, p. 1127 - 1142, 2011.

SILVA, M. R. M.; DURIGAN, J. C. Períodos de interferência das plantas daninhas na cultura do arroz de terras altas. I – Cultivar IAC 202. **Planta Daninha**, v. 24, n. 4, p. 685 - 694, 2006.

VALVERDE, A.; BURGOS, A.; FISCELLA, T.; RIVAS, R.; VELAZQUEZ, E.; RODRIGUEZ-BARRUECO, C.; CERVANTES, E.; CHAMBER, M.; IGUAL, J. M. Differential effects of coinoculations with *Pseudomonas jessenii* PS06 (a phosphate-

solubilizing bacterium) and *Mesorhizobium ciceri* C-2/2 strains on the growth and seed yield of chickpea under greenhouse and field conditions. **Plant and Soil**, v. 287, p. 43 - 50, 2006.

VASSILEV, N.; VASSILEVA, M.; NIKOLAEVA, I. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 71, p. 137 – 144, 2006.

WANI, P. A.; KHAN, M. S. Bacillus species enhance growth parameters of chickpea (*Cicer arietinum* L.) in chromium stressed soils. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 48, p. 3262 - 3267, 2010.

YANG, C.; YULAI, W.; WANG, M.; CHEN, H. Plant species influence microbial metabolic activity and butachlor biodegradation in a riparian soil from Chongming Island, China. **Geoderma**, v. 193 - 194, p. 165 - 171, 2013.

ZUCARELI, C.; CIL, I. R.; PRETE, C. E. C.; PRANDO, A. M. Eficiência agronômica da inoculação à base de *Pseudomonas fluorescens* na cultura do milho. **Revista Agrarian**, v. 4, n. 13, p. 152 - 157, 2011.

## **CAPÍTULO 4**

## ATIVIDADE MICROBIANA DE SOLO COM SULFENTRAZONE ASSOCIADA A ESPÉCIES FITORREMEIADORAS E INOCULAÇÃO COM CONSÓRCIO BACTERIANO

**RESUMO:** A fitoestimulação assume papel fundamental no processo de rizodegradação de herbicidas no solo. Além disso, a bioaugmentação associada à fitorremediação pode aumentar a eficiência do processo de descontaminação de solos com herbicidas. Diante do exposto, objetivou-se avaliar a biomassa e a atividade microbiana de solo contaminado com sulfentrazone e cultivado com plantas fitorremediadoras mais consórcio bacteriano. O ensaio foi conduzido em ambiente protegido, realizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pela presença ou ausência de bioaugmentação com consórcio bacteriano previamente selecionado, composto por bactérias do gênero *Pseudomonas*, o segundo fator pelo monocultivo ou cultivo misto de duas espécies fitorremediadoras feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e girassol (*Helianthus annuus*), além da ausência de cultivo e o terceiro pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste). Ao final de cada tempo foram coletadas amostras de solo para estimativa da taxa respiratória, do carbono da biomassa microbiana, do quociente metabólico e do quociente microbiano. Solos sem cultivo apresentaram baixos valores de carbono da biomassa microbiana e quociente microbiano e altos quocientes metabólicos ao longo do tempo de biorremediação, evidenciando a importância do cultivo das espécies fitorremediadoras para a estimulação da microbiota do solo. A bioaugmentação com consórcio bacteriano, de modo geral, proporcionou aumento da biomassa e atividade microbiana de solos contaminados com sulfentrazone. *Canavalia ensiformis*, na presença de consórcio bacteriano, foi capaz de estimular maior atividade da microbiota associada e sustentar maior biomassa microbiana. A fitorremediação associada à bioaugmentação é técnica promissora de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone. Esta técnica aumenta a biomassa e atividade dos micro-organismos do solo.

**Palavras-chave:** bioaugmentação, fitoestimulação, herbicida, quociente metabólico, quociente microbiano

## MICROBIAL ACTIVITY ASSOCIATED WITH PHYTOREMEDIATOR SPECIES OF SULFENTRAZONE IN SOIL INOCULATED WITH BACTERIA CONSORTIUM

**ABSTRACT:** Phytostimulation plays a critical role in the process of rhizodegradation of herbicides in soil. Additionally, the bioaugmentation associated with phytoremediation may increase the efficiency of herbicides in soil decontamination processes. Given the above, we aimed to evaluate the biomass and microbial activity of soil contaminated with sulfentrazone and cultivated with phytoremediator plants plus bacterial consortium. The trial was conducted in a greenhouse with a factorial of 2x4x4, in a completely randomized design with four replications. The first factor was composed of the presence or absence of bioaugmentation with the *Pseudomonas* consortium previously selected; the second factor of monoculture or mixed cultivation of two phytoremediator species *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus*; and the third factor of the time of bioremediation (25, 45, 65 and 85 days after thinning). At the end of each time period, soil samples were collected for measuring the respiratory rate, microbial biomass carbon, metabolic quotient and microbial quotient. Uncultivated soils had low microbial biomass carbon values and microbial quotient, and a high metabolic quotient over bioremediation time, indicating the importance of cultivating phytoremediator species for the stimulation of soil microbes. Bioaugmentation with a bacterial consortium, in general, provided increased microbial biomass and activity of soil contaminated with sulfentrazone. *Canavalia ensiformis*, in the presence of the bacterial consortium, was able to stimulate greater microbiota activity and sustain higher microbial biomass. Phytoremediation associated with bioaugmentation is a promising technique of soil bioremediation contaminated with sulfentrazone. This technique increases the biomass and activity of soil micro-organisms.

**Keywords:** bioaugmentation, phytostimulation, herbicide, metabolic quotient, microbial quotient

### INTRODUÇÃO

O solo é um ecossistema complexo e dinâmico, no qual a atividade biológica é governada, principalmente, por micro-organismos (ZHOU et al., 2011). Estes

desempenham papel importante na ciclagem de nutrientes, no controle de pragas, na manutenção da estrutura e qualidade do solo e, conseqüentemente, na produtividade das culturas (LUPWAYI et al., 2012; GIL et al., 2011). Ademais, os micro-organismos influenciam no comportamento dos herbicidas no solo, uma vez que apresentam capacidade de obter energia e nutrientes para a sua sobrevivência a partir da transformação desses compostos em substâncias menos tóxicas ao ambiente.

Muitos estudos demonstraram o impacto de herbicidas sobre a comunidade microbiana do solo. Os resultados são variados, com efeitos diretos ou indiretos, nulos (ZILLI et al., 2008; PEREIRA et al., 2008; NAKATANI et al., 2014) ou negativos (SANTOS et al., 2006; REIS et al., 2008; LANE et al., 2012), dependendo dos produtos e suas propriedades físico-químicas, da dose, do tipo de aplicação e do tempo decorrido da aplicação. No entanto, existem poucos relatos sobre a atividade microbiana de solos contaminados com herbicidas, e, em especial, com o sulfentrazone, submetidos à biorremediação.

A aplicação do sulfentrazone pode gerar efeitos maléficos na comunidade biótica do solo, principalmente sobre micro-organismos benéficos como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos (VIEIRA et al., 2007; SILVA et al., 2014). Impactos negativos causados pelo sulfentrazone sobre a atividade e biomassa microbiana de solo cultivado com soja e eucalipto também foram constatados (VIVIAN et al., 2006; SILVA et al., 2014). Por outro lado, após a aplicação de herbicidas, tende a ocorrer processo de adaptação natural da microbiota nativa existente no solo, selecionando aqueles micro-organismos com capacidade de tolerar e, ou degradar a molécula, ocorrendo, assim, a redução das concentrações dessas substâncias ao longo do tempo.

O sulfentrazone apresenta elevada atividade residual, podendo persistir por anos no solo (IUPAC, 2014). Em decorrência dessa característica pode causar intoxicação de culturas sensíveis cultivadas em sucessão (ARTUZI; CONTIERO, 2006), bem como aumentar os riscos de lixiviação e contaminação ambiental. Como forma de descontaminação de solos com histórico de aplicação desse herbicida, técnicas de biorremediação associando plantas fitorremediadoras e micro-organismos selecionados com potencial remediador podem ser utilizadas.

As plantas contribuem de forma significativa no processo de biorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*, por meio do processo de fitorremediação, são capazes de reduzir os níveis tóxicos de

sulfentrazone no solo (MADALÃO et al., 2012; BELO et al., 2011). A fitorremediação pode ocorrer por extração, estabilização, volatilização, acumulação ou degradação do herbicida em algum tecido vegetal ou com a estimulação da microbiota indígena associada, conhecida como fitoestimulação. As plantas são capazes de sustentar grandes populações microbianas na rizosfera através da exsudação de substâncias pelas raízes, como carboidratos e aminoácidos (TURPAULT et al., 2007), que fornecem importantes fontes de nutrientes para os micro-organismos na interface solo-raiz com o consequente estímulo à rizodegradação.

A fitorremediação associada à bioaugmentação, ou seja, à introdução de micro-organismos ou consórcios para acelerar e aumentar a eficiência de remoção dos compostos tóxicos *in situ* (MARTIN-HERNANDEZ et al., 2012), pode promover a descontaminação do solo mais rapidamente, tornando a área apta a receber culturas sensíveis em menos tempo. Estudos confirmam que o aumento do nível de biomassa inicial pode melhorar a taxa de biodegradação de poluentes e aumentar a eficiência do tratamento (MUKHERJEE; BORDOLOI, 2011; PIMMATA et al., 2013; SZULC et al., 2014).

A respiração do solo, bem como a atividade enzimática, o carbono da biomassa microbiana e a transformação do nitrogênio são processos biológicos e bioquímicos do solo considerados indicadores úteis da qualidade e saúde desse ecossistema (XIONG et al., 2013; ČERNOHLÁVKOVÁ et al., 2009). Além desses, o quociente metabólico e quociente microbiano, são amplamente estudados por refletir a eficiência da microbiota na utilização do carbono e a qualidade da matéria orgânica do solo (THIRUKKUMARAN; PARKINSON, 2000; SANTOS et al., 2006). Esses indicadores estão diretamente relacionados à atividade metabólica da microbiota do solo e podem, conseqüentemente, relacionar-se com a taxa de degradação do herbicida no solo. O estudo de tais parâmetros em solos contaminados com sulfentrazone pode ajudar na compreensão do processo de biorremediação desse herbicida pelos micro-organismos edáficos e plantas fitorremediadoras.

Diante do exposto, objetivou-se com este trabalho avaliar a biomassa e atividade microbiana de solo contaminado com sulfentrazone e cultivado com plantas fitorremediadoras mais consórcio bacteriano.

## MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em ambiente protegido, realizado em esquema fatorial 2 x 4 x 4, no delineamento inteiramente casualizado, com quatro repetições. O primeiro fator foi composto pela presença ou ausência de inoculação com consórcio bacteriano previamente selecionado, o segundo fator pelo monocultivo ou cultivo misto de duas espécies fitorremediadoras, além da ausência de cultivo e o terceiro pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste (DAD)).

Vasos com capacidade de 12,0 dm<sup>3</sup> foram revestidos com saco plástico e preenchidos com 10,0 dm<sup>3</sup> de solo (Tabela 1), sem histórico de aplicação de herbicida, previamente adubado com sulfato de amônio (0,20 g dm<sup>-3</sup> de N) e superfosfato simples (1,80 g dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) (CANTARUTTI et al., 2007). Posteriormente, realizou-se a aplicação do sulfentrazone, em todos os vasos, utilizando pulverizador costal, com pressão constante mantida por CO<sub>2</sub>, acoplado de barra com duas pontas tipo leque TT110 02, espaçadas de 0,5 m, trabalhando a pressão de 250 kPa, com volume de calda de aproximadamente 140 L ha<sup>-1</sup>, na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup> i.a.. As condições ambientais no momento da aplicação foram T = 27 °C, UR = 72% e velocidade do vento de 1,9 km h<sup>-1</sup>.

Tabela 1: Resultados das análises química e granulométrica do solo.

| pH               | P                   | K <sup>+</sup> | Ca <sup>2+</sup>                              | Mg <sup>2+</sup> | Al <sup>3+</sup> | H+Al                   | SB   | t    | T             | V         | m | MO                   |
|------------------|---------------------|----------------|---|------------------|------------------|------------------------|------|------|---------------|-----------|---|----------------------|
| H <sub>2</sub> O | mg dm <sup>-3</sup> |                | -----cmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> ----- |                  |                  |                        |      |      |               | ----%---- |   | dag kg <sup>-1</sup> |
| 6,1              | 6,9                 | 200            | 3,7   | 1,0              | 0,0              | 1,15                   | 5,21 | 5,21 | 6,36          | 82        | 0 | 4,12                 |
| Argila           |                     | Silte          |   | Areia            |                  | Classificação Textural |      |      | Tipo de solo  |           |   |                      |
| -----%-----      |                     |                |   |                  |                  | Franco-argilo-arenosa  |      |      | Textura média |           |   |                      |
| 25               |                     | 12             |   | 63               |                  |                        |      |      |               |           |   |                      |

pH em água; P - K<sup>+</sup>: Extrator Mehlich 1; Ca<sup>2+</sup> - Mg<sup>2+</sup> - Al<sup>3+</sup>: Extrator: KCl - 1 mol/L; H + Al - Extrator Acetato de Cálcio 0,5 mol/L - pH 7,0; SB - Soma de Bases Trocáveis; t - Capacidade de Troca Catiônica Efetiva; T - Capacidade de Troca Catiônica a pH 7,0; V - Saturação por Bases; m - Saturação por alumínio; MO - matéria orgânica

Um dia após a aplicação do herbicida, realizou-se a semeadura das espécies remediadoras *Canavalia ensiformis* (MADALÃO et al., 2012) e *Helianthus annuus* (cultivar Tera 860 HO) (BELO et al., 2011). A semeadura foi realizada a 5 cm de profundidade utilizando-se 6 sementes por vaso. Decorridos 15 dias da semeadura foi realizado o desbaste, restando duas plantas da mesma espécie ou uma de cada (cultivo misto), em cada unidade experimental.

O consórcio bacteriano utilizado foi selecionado com base no potencial de degradação apresentado pelos isolados em estudo prévio. O consórcio foi formado por

seis isolados identificados como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* e três isolados de *Pseudomonas sp.*. Estes foram cultivados separadamente em meio caldo nutriente (1,0 L água; 2,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0 g NaCl; 3,0 g extrato de carne; 5,0 g peptona; pH 6,8) por aproximadamente 10 h a 30 °C e 150 rpm até densidade óptica de 0,6. O meio foi submetido à centrifugação (5000 rpm, 5,0 min, 4 °C) e as células bacterianas suspensas em solução salina (NaCl 0,85%). O consórcio foi estabelecido pipetando-se volumes de solução de cada um dos seis isolados de modo a garantir igual quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC mL<sup>-1</sup>) de cada espécie, totalizando 12,0 mL de solução e inoculação de 4,5 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo nos tratamentos correspondentes, logo após o desbaste.

As espécies fitorremediadoras foram cultivadas por 25, 45, 65 e 85 DAD, sendo, ao final de cada época, cortadas rente ao solo. Nos referidos tempos de biorremediação, as plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) encontravam-se nos estádios vegetativos V2 a V3, V4 a V5, V6 a V7 e V8 a V9, e as plantas de girassol (*Helianthus annuus*) nos estádios V16 a V18, R1 a R3, R5.1 a R5.8 e R 5.10 a R6, respectivamente. O sistema radicular das plantas foi removido e todo o solo homogeneizado para retirada de amostras de cada vaso. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos e mantidas sob refrigeração por 24 h até determinação da umidade. Foram estimadas a taxa respiratória, o carbono da biomassa microbiana, o quociente metabólico do solo e o quociente microbiano.

Na avaliação da taxa respiratória, utilizou-se o método respirométrico de avaliação do C-CO<sub>2</sub> evoluído do solo proposto por Curl e Rodriguez-Kabana (1972) com adaptações, no qual amostras de 100,0 g de solo peneirado (malha 2 mm) e com umidade equivalente a 60% da capacidade de campo, em duplicata, foram incubadas durante 15 dias em frascos hermeticamente fechados, à temperatura ambiente. O C-CO<sub>2</sub> liberado do solo foi carregado por fluxo contínuo de ar isento de CO<sub>2</sub> até outro frasco contendo 100,0 mL de solução de NaOH 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Decorridos 15 dias de incubação, estimou-se o C-CO<sub>2</sub> evoluído a partir da titulação de 10,0 mL da solução de NaOH, acrescido de 5,0 mL de BaCl<sub>2</sub>, com solução de HCl 0,5 mol L<sup>-1</sup> e 3 gotas de fenolftaleína (1%).

Após o período de incubação, pesou-se 18,0 g de solo de cada frasco para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM), segundo metodologia descrita por Vance et al., (1987) e modificada por Islam e Weil (1998), no qual as amostras foram tratadas com radiação de micro-ondas por 60 + 60 segundos. O CBM

foi extraído das amostras (irradiadas e não irradiadas) de solo com 80,0 mL da solução de  $K_2SO_4$  0,5 mol L<sup>-1</sup>, em seguida submetidas à agitação em mesa agitadora horizontal (150 rpm, 30 min) e mantidas em repouso durante mais 30 minutos. Após o repouso, as amostras foram filtradas em filtros de papel Whatman n° 42. Em tubo digestor, adicionou-se 10,0 mL do filtrado, 2,0 mL de solução de  $K_2Cr_2O_7$  0,0667 mol L<sup>-1</sup> e 10,0 mL de  $H_2SO_4$  concentrado. Posteriormente, o volume da solução foi completado para 100,0 mL em proveta, transferido para frascos erlenmeyers de 250,0 mL, adicionadas oito gotas do indicador ferroim e titulado com solução de  $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$  0,033 mol L<sup>-1</sup>.

A partir dos valores obtidos da evolução do C-CO<sub>2</sub> e CBM, calculou-se o quociente metabólico ( $qCO_2$  -  $\mu g$  C-CO<sub>2</sub>  $\mu g^{-1}$  CBM d<sup>-1</sup>), dividindo-se a média diária do C-CO<sub>2</sub> evoluído do solo pelo CBM determinado no solo, segundo Anderson e Domsch (1985). O quociente microbiano (qMIC - %) foi calculado pela razão entre o CBM e o carbono orgânico (CO) (ANDERSON; DOMSCH, 1989) de cada unidade experimental obtido através do teor de matéria orgânica do solo (MO= CO x 1,724) estimado pelo método Walkley-Black.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% de probabilidade. Efetuou-se o desdobramento da interação significativa, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Para os tempos de biorremediação ajustaram-se modelos lineares simples de primeiro grau,  $Y = \alpha + \beta_1.X + \epsilon$  e, também, de segundo grau,  $Y = \alpha + \beta_1.X + \beta_2.X^2 + \epsilon$ . Os modelos foram ajustados e comparados quanto à igualdade dos parâmetros  $\alpha$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (LITTELL et al., 2006).

## RESULTADOS

A interação tripla entre os fatores: cultivo, inoculação e tempo de biorremediação foi significativa para todas as variáveis estudadas, efetuando-se os desdobramentos possíveis.

A taxa respiratória encontrada nos solos cultivados com as duas espécies fitorremediadoras simultaneamente foi 42% superior àquela de solos cultivados com o feijão-de-porco, na ausência de inoculação, aos 25 DAD. Aos 65 DAD, nos tratamentos com inoculação do consórcio bacteriano, o solo cultivado com girassol destacou-se frente aos demais solos cultivados com maior taxa respiratória (Tabela 2).

A inoculação do solo com consórcio bacteriano promoveu efeitos pontuais a depender da espécie cultivada e do tempo de biorremediação. Aos 25 DAD a inoculação proporcionou aumento de 44% da taxa respiratória do solo cultivado com feijão-de-porco. O mesmo comportamento foi verificado para os solos com girassol e cultivo misto aos 85 DAD. Por outro lado, verificou-se menor taxa respiratória em solo cultivado com feijão-de-porco, na presença de inoculação, aos 65 DAD (Tabela 2).

Tabela 2: Taxa respiratória de solo com sulfentrazone cultivado com espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                    | Taxa respiratória (TR) $\mu\text{g g}^{-1}\text{d}^{-1}$ |                 |        |     |            |    |        |    |
|----------------------------|--|-----------------|--------|-----|------------|----|--------|----|
|                            | Inoculação   |                 |        |     | Inoculação |    |        |    |
|                            | Com  |                 | Sem    |     | Com        |    | Sem    |    |
|                            | 25 DAD   |                 |        |     | 45 DAD     |    |        |    |
| Feijão-de-porco            | 88,98  | Aa <sup>1</sup> | 49,87  | Bb  | 90,44      | Aa | 87,39  | Aa |
| Girassol                   | 71,12  | Aa              | 68,93  | Aab | 92,89      | Aa | 100,22 | Aa |
| Feijão-de-porco + Girassol | 75,53  | Aa              | 86,53  | Aa  | 100,83     | Aa | 97,78  | Aa |
| Sem cultivo                | 63,03  | Aa              | 54,27  | Aab | 122,83     | Aa | 78,83  | Aa |
|                            | 65 DAD   |                 |        |     | 85 DAD     |    |        |    |
| Feijão-de-porco            | 95,33  | Bb              | 121,00 | Aa  | 150,33     | Aa | 129,56 | Aa |
| Girassol                   | 134,44   | Aa              | 115,50 | Aa  | 163,78     | Aa | 129,56 | Ba |
| Feijão-de-porco + Girassol | 95,33  | Ab              | 107,56 | Aa  | 151,56     | Aa | 124,06 | Ba |
| Sem cultivo                | 114,89   | Aab             | 125,89 | Aa  | 140,56     | Aa | 138,72 | Aa |
| CV (%)                     | 16,85  |                 |        |     |            |    |        |    |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

Ao longo do tempo de biorremediação a taxa respiratória do solo cultivado com girassol e inoculação, assim como o solo sem cultivo, independente da presença de consórcio bacteriano, aumentou linearmente, sendo os tratamentos que apresentaram maior evolução de C-CO<sub>2</sub> (Figura 1A).

Solos cultivados com girassol e cultivo misto, ambos sem inoculação, também apresentaram comportamento linear ao longo do tempo, porém, menor atividade microbiana foi observada (Figura 1A). Os tratamentos de feijão-de-porco e cultivo misto, ambos na presença de inoculação, não diferiram entre si e foram ajustados em uma curva comum, com efeito quadrático e aumento da respiração microbiana a partir de 40 DAD. O mesmo modelo foi ajustado para a taxa respiratória de solo cultivado com feijão-de-porco sem inoculação (Figura 1A), apresentando máxima evolução de C-CO<sub>2</sub> aos 85 DAD.

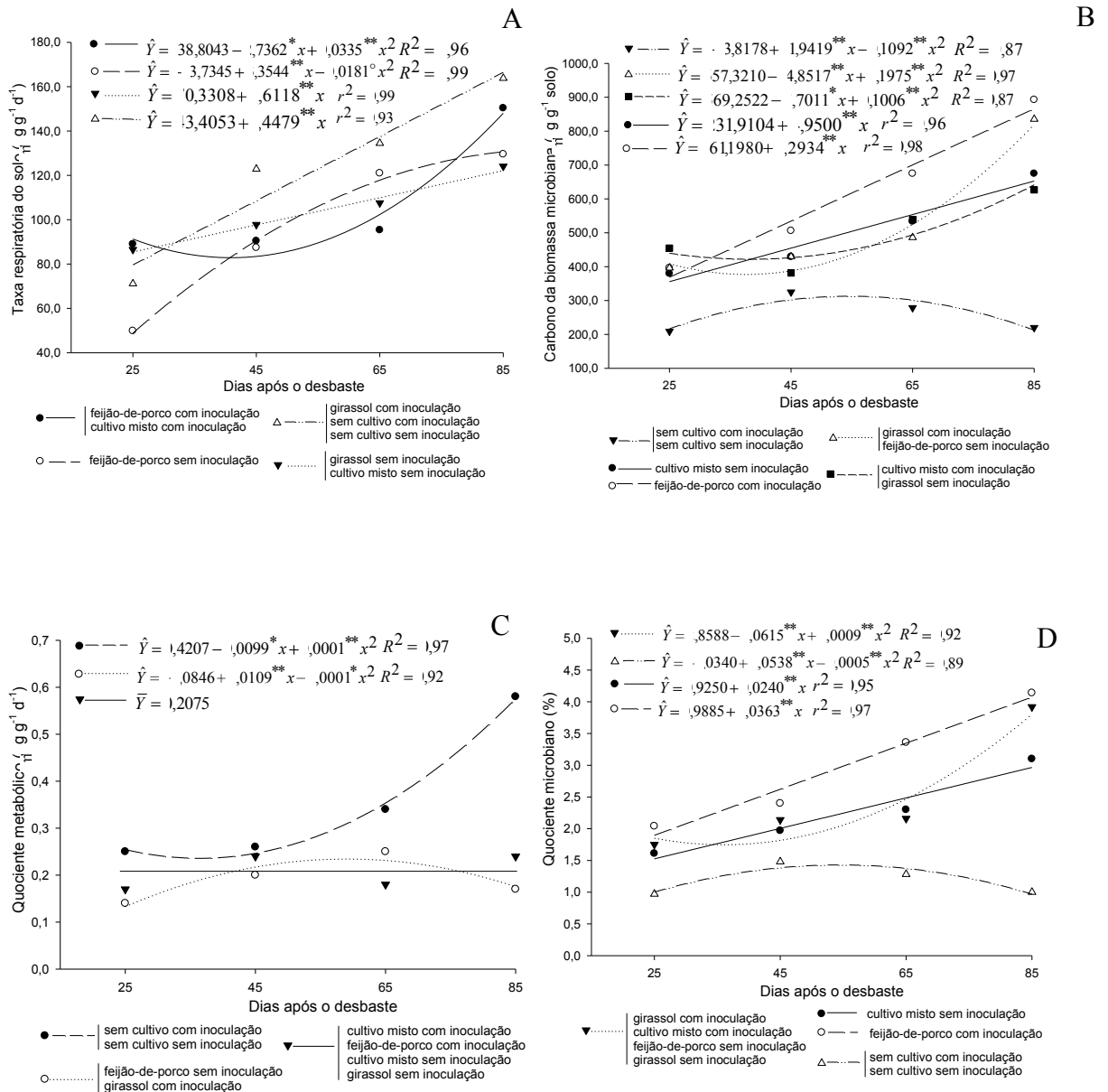


Figura 1: Taxa respiratória (A), carbono da biomassa microbiana (B), quociente metabólico (C) e quociente microbiano (D) de solo contaminado com sulfentrazone e cultivado com espécies fitorremediadoras, isoladas ou em cultivo misto, por diferentes tempos, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*,  $^{\circ}$  e  $^{ns}$  significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente, pelo Teste t.

Solos sem cultivo, independente da inoculação e do tempo de biorremediação, apresentaram menor carbono da biomassa microbiana do que solos cultivados (Tabela 3). Quanto à presença de cultivo, a espécie fitorremediadora feijão-de-porco, aos 65 e

85 DAD na presença e ausência de consórcio microbiano, respectivamente, foi capaz de sustentar maior biomassa microbiana comparada ao girassol e ao cultivo misto. Aos 45 e 85 DAD, solos inoculados e cultivados com feijão-de-porco e girassol isoladamente exibiram maior CBM (Tabela 3).

Tabela 3: Carbono da biomassa microbiana de solo com sulfentrazone cultivado com espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Carbono da biomassa microbiana (CBM) $\mu\text{g g}^{-1}$ solo |            |                 |        |    |            |     |        |    |
|--|------------|-----------------|--------|----|------------|-----|--------|----|
| Cultivo  | Inoculação |                 |        |    | Inoculação |     |        |    |
|  | Com        |                 | Sem    |    | Com        |     | Sem    |    |
|  | 25 DAD     |                 | 45 DAD |    | 65 DAD     |     | 85 DAD |    |
| Feijão-de-porco  | 396,00     | Aa <sup>1</sup> | 369,33 | Aa | 506,00     | Aa  | 434,50 | Aa |
| Girassol   | 396,00     | Aa              | 440,00 | Aa | 429,33     | Aab | 432,67 | Aa |
| Feijão-de-porco + Girassol                                     | 454,00     | Aa              | 379,50 | Ba | 381,33     | Ab  | 429,00 | Aa |
| Sem cultivo  | 262,50     | Ab              | 209,00 | Ab | 385,33     | Ab  | 325,00 | Ab |
|  |            |                 |        |    |            |     |        |    |
|  |            |                 |        |    |            |     |        |    |
| Feijão-de-porco  | 674,67     | Aa              | 495,00 | Ba | 892,67     | Aa  | 795,00 | Ba |
| Girassol   | 486,00     | Ab              | 473,50 | Aa | 835,33     | Aa  | 645,33 | Bb |
| Feijão-de-porco + Girassol                                     | 539,00     | Ab              | 533,00 | Aa | 626,67     | Ab  | 674,67 | Ab |
| Sem cultivo  | 341,50     | Ac              | 278,67 | Ab | 245,00     | Ac  | 220,00 | Ac |
| CV (%)   | 10,99      |                 |        |    |            |     |        |    |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p>0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

A inoculação propiciou aumento do CBM em solos cultivados pelas duas espécies em conjunto aos 25 DAD, pelo feijão-de-porco aos 65 e 85 DAD e pelo girassol aos 85 DAD (Tabela 3).

Solos sem cultivo, inoculados e não inoculados, apresentaram decréscimo no CBM a partir de 63 DAD e, em geral, baixa biomassa microbiana em relação aos solos cultivados. Para os demais tratamentos observou-se aumento do CBM com o decorrer do tempo de biorremediação (Figura 1B). Com exceção do CBM associado ao cultivo misto e ao feijão-de-porco, sem e com inoculação, respectivamente, o CBM associado aos demais tratamentos ajustaram-se em equações de segundo grau (Figura 1B). Feijão-de-porco na presença de consórcio bacteriano propiciou estabelecimento de elevada biomassa microbiana no solo ao longo dos 85 dias de cultivo (Figura 1B).

O quociente metabólico do solo sem cultivo foi o mais elevado, independente da inoculação aos 65 e 85 DAD (Tabela 4). Aos 85 DAD a diferença média entre solos cultivados e solo sem cultivo chegou a 66% na presença inoculação e 71% na ausência de consórcio bacteriano (Tabela 4).

Tabela 4: Quociente metabólico de solo com sulfentrazone cultivado com espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                    | Quociente metabólico ( $qCO_2$ ) $\mu g \mu g^{-1} d^{-1}$ |                 |      |     |            |     |      |       |
|----------------------------|--|-----------------|------|-----|------------|-----|------|-------|
|                            | Inoculação   |                 |      |     | Inoculação |     |      |       |
|                            | Com  |                 | Sem  |     | Com        |     | Sem  |       |
|                            | 25 DAD   |                 |      |     | 45 DAD     |     |      |       |
| Feijão-de-porco            | 0,25   | Aa <sup>1</sup> | 0,14 | Bb  | 0,18       | Ab  | 0,20 | Aa    |
| Girassol                   | 0,18   | Aa              | 0,16 | Ab  | 0,30       | Aab | 0,24 | Aa    |
| Feijão-de-porco + Girassol | 0,17   | Aa              | 0,23 | Aab | 0,25       | Aab | 0,23 | Aa    |
| Sem cultivo                | 0,25   | Aa              | 0,28 | Aa  | 0,26       | Aa  | 0,24 | Aa    |
|                            | 65 DAD   |                 |      |     | 85 DAD     |     |      |       |
| Feijão-de-porco            | 0,14   | Bc              | 0,25 | Ab  | 0,17       | Ab  | 0,17 | Ab    |
| Girassol                   | 0,28   | Aab             | 0,25 | Ab  | 0,20       | Ab  | 0,19 | Ab    |
| Feijão-de-porco + Girassol | 0,18   | Abc             | 0,20 | Ab  | 0,24       | Ab  | 0,20 | Ab    |
| Sem cultivo                | 0,34   | Ba              | 0,45 | Aa  | 0,58       | Aa  | 0,65 | Aa    |
| CV (%)                     |  |                 |      |     |            |     |      | 22,70 |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

Aos 25 DAD, solo sem inoculação cultivado com feijão-de-porco apresentou menor  $qCO_2$  (Tabela 4) de modo inverso e na mesma proporção que aos 65 DAD. Diferença significativa causada pela presença de inóculo bacteriano também foi verificada aos 65 DAD em solo sem cultivo (Tabela 4).

Ao longo do tempo de biorremediação os solos sem cultivo exibiram valores crescentes de quociente metabólico a partir de 50 DAD (Figura 1C). Solos cultivados com feijão-de-porco sem inoculação e girassol com inoculação foram ajustados em uma única curva e apresentaram redução média do  $qCO_2$  a partir de 55 DAD (Figura 1C). O cultivo misto, independente da inoculação, assim como feijão-de-porco com inoculação e girassol sem inoculação não sofreram alteração do quociente metabólico ao longo das épocas de cultivo, destacando-se com baixos valores, próximos a  $0,20 \mu g \mu g^{-1} d^{-1}$  (Figura 1C).

O quociente microbiano foi influenciado por todos os fatores estudados, sendo menor em solos sem cultivo, independente da época e da inoculação (Tabela 5). Os monocultivos de feijão-de-porco e girassol, na presença de inoculação, destacaram-se com valores mais elevados de  $qMIC$  aos 45 e 85 DAD. O  $qMIC$  associado à espécie feijão-de-porco foi superior aos 65 e 85 DAD, na presença e ausência de inoculação, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5: Quociente microbiano de solo com sulfentrazone cultivado com espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                    | Quociente microbiano (qMIC) % |                 |      |    |            |     |      |    |
|----------------------------|-------------------------------|-----------------|------|----|------------|-----|------|----|
|                            | Inoculação                    |                 |      |    | Inoculação |     |      |    |
|                            | Com                           |                 | Sem  |    | Com        |     | Sem  |    |
|                            | 25 DAD                        |                 |      |    | 45 DAD     |     |      |    |
| Feijão-de-porco            | 2,04                          | Aa <sup>1</sup> | 1,76 | Aa | 2,40       | Aa  | 2,04 | Aa |
| Girassol                   | 1,75                          | Aa              | 1,89 | Aa | 2,14       | Aab | 2,05 | Aa |
| Feijão-de-porco + Girassol | 2,08                          | Aa              | 1,62 | Ba | 1,79       | Abc | 1,97 | Aa |
| Sem cultivo                | 1,23                          | Ab              | 0,97 | Ab | 1,61       | Ac  | 1,48 | Ab |
|                            | 65 DAD                        |                 |      |    | 85 DAD     |     |      |    |
| Feijão-de-porco            | 3,36                          | Aa              | 2,22 | Ba | 4,14       | Aa  | 3,69 | Ba |
| Girassol                   | 2,16                          | Ab              | 2,13 | Aa | 3,92       | Aa  | 3,03 | Bb |
| Feijão-de-porco + Girassol | 2,45                          | Ab              | 2,30 | Aa | 2,84       | Ab  | 3,10 | Ab |
| Sem cultivo                | 1,66                          | Ac              | 1,28 | Bb | 1,08       | Ac  | 1,00 | Ac |
| CV (%)                     | 12,20                         |                 |      |    |            |     |      |    |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

A inoculação provocou efeitos benéficos com aumento do qMIC em solos cultivados simultaneamente com girassol e feijão-de-porco aos 25 DAD, com feijão-de-porco e sem cultivo aos 65 DAD e com feijão-de-porco e girassol isoladamente aos 85 DAD (Tabela 5).

O cultivo de feijão-de-porco acrescido da inoculação de consórcio microbiano propiciou aumento do qMIC ao longo do tempo de biorremediação, destacando-se frente aos demais tratamentos (Figura 1D). O qMIC de solo cultivado com as duas espécies fitorremediadoras simultaneamente, sem inoculação, também aumentou linearmente com o tempo. Em solos sem cultivo, independente da inoculação, o qMIC ajustou-se num modelo de segundo grau com queda de valores a partir de 54 DAD (Figura 1D).

## DISCUSSÃO

A degradação microbiana de herbicidas no solo depende da presença e atividade de micro-organismos capazes de (co)metabolizá-los. A presença de herbicida no solo, e, principalmente, o cultivo de plantas fitorremediadoras pode suportar o crescimento microbiano e induzir a liberação de C-CO<sub>2</sub> crescente ao longo do tempo de biorremediação, como observado (Figura 1A). A taxa respiratória do solo tem sido bastante utilizada em estudos de decomposição de resíduos e de biorremediação, associada à quantificação dos níveis do poluente no solo (THIRUKKUMARAN;

PARKINSON, 2000; DILLY et al., 2011; LAMY et al., 2013). Isoladamente a evolução de CO<sub>2</sub> do solo não permite interpretações consistentes, já que uma taxa respiratória elevada pode indicar tanto uma população ativa e degradadora em um ecossistema com alto nível de produtividade, quanto um distúrbio ou perturbação ecológica. Este último pode explicar as altas taxas respiratórias verificadas ao longo do tempo nos solos sem cultivo (Figura 1A).

O CBM mostrou-se muito sensível à presença das espécies fitorremediadoras, sendo drasticamente reduzido na ausência de cultivo (Tabela 3, Figura 1B). Em solos sem cultivo é comum encontrar menor quantidade de micro-organismos e menor atividade metabólica em relação aos cultivados, pelo fato de não haver fornecimento de carbono e energia via exsudação radicular das plantas (SANDMANN; LOOS, 1984). Solos cultivados são capazes de sustentar maior biomassa microbiana por meio dos exsudatos radiculares, que influenciam o crescimento de bactérias e fungos que colonizam a rizosfera pela alteração do ambiente do solo circundante, servindo como substrato para o crescimento seletivo de micro-organismos (CARDOSO; NOGUEIRA, 2007). Maior atividade e biomassa microbiana em solos rizosféricos tratados com herbicidas, em relação a solos não vegetados, também foram constatadas em outros trabalhos (PIRES et al. 2005; SANTOS et al., 2007; SANTOS et al., 2010), sendo este efeito atribuído à fitoestimulação da microbiota associada.

No presente trabalho, não foi possível tirar conclusões sobre a redução da concentração de sulfentrazone no solo mediante atuação dos micro-organismos. Contudo, existe relação entre o tamanho da biomassa microbiana do solo e a capacidade de degradação de herbicidas e contaminantes neste ecossistema (VOOS; GROFFMAN, 1997; JONES; ANANYEVA, 2001; LAMY et al., 2013). No contexto da biorremediação, alta e ativa biomassa microbiana associada às espécies fitorremediadoras feijão-de-porco e girassol é de grande interesse, pois pode potencializar o processo de descontaminação de solos com sulfentrazone.

Diante da complexidade do ecossistema solo, da variedade de compostos exsudados pelas raízes e das inúmeras interações estabelecidas entre plantas e micro-organismos, muitas são as possibilidades de transformação de compostos xenobióticos, bem como de degradação de compostos endógenos do solo, como materiais húmicos e compostos orgânicos, por meio da rizodegradação, mecanismo que contribui, de maneira integrada, à fitoestimulação (SANTOS et al., 2007). Ademais, a variedade de compostos exsudados, bem como o estágio fenológico e a idade das plantas, podem

influenciar no maior ou menor sucesso dessas no processo de biorremediação (SANTOS et al., 2010). As espécies *Helianthus annuus* (girassol) e *Canavalia ensiformis* (feijão-de-porco), ambas selecionadas como fitorremediadoras do sulfentrazone, apresentam características morfofisiológicas e de crescimento bem diferentes, o que pode resultar em capacidades distintas de fitoestimulação, como verificado neste estudo e, conseqüentemente, de rizodegradação do herbicida no solo.

A diversidade da cobertura vegetal do solo pode favorecer a composição e a biomassa microbiana, pela maior diversidade de compostos orgânicos secretados, os quais, por sua vez, favorecerão o crescimento de micro-organismos com requerimentos nutricionais mais diversos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Assim, esperava-se que o cultivo misto de feijão-de-porco e girassol proporcionasse maior atividade e biomassa microbiana no solo com relação aos monocultivos das espécies. Contudo, tal superioridade nem sempre foi evidenciada. Em resposta ao estresse gerado pela competição interespecífica pode haver liberação de substâncias alelopáticas pelos vegetais, inibindo de certa forma a atividade dos micro-organismos edáficos (MELO et al., 2014).

De modo geral, a bioaugmentação proporcionou resultados positivos, melhorando a atividade e a biomassa microbiana associada à determinada espécie fitorremediadora, em determinada época. Os efeitos observados ao longo do tempo sugerem a existência de tolerância e possível degradação do sulfentrazone pela microbiota mais adaptada e selecionada após a aplicação do herbicida. De acordo com Wang et al. (2014) uma das limitações da bioaugmentação é que, muitas das vezes, os sítios contaminados podem ser deficientes em nutrientes e não suportar o rápido crescimento das bactérias adicionadas. Entretanto, no presente ensaio, embora não tenha sido avaliada a sobrevivência do consórcio bacteriano, acredita-se que a presença de cultivo tenha sido fundamental para garantir condições favoráveis ao crescimento e viabilidade desses micro-organismos inoculados. É carente a quantidade de informações na literatura a respeito da bioaugmentação na biorremediação de solos contaminados com herbicidas.

O tratamento formado por feijão-de-porco mais o consórcio bacteriano se destacou frente aos demais cultivos com relação ao CBM e qMIC ao longo do tempo de biorremediação. Tais evidências reforçam que *Canavalia ensiformis* é uma espécie eficaz na estimulação da microbiota e muito promissora para remediação de solos contaminados com o sulfentrazone. Pires et al. (2005) avaliando a atividade rizosférica de espécies com potencial de fitorremediação do herbicida tebuthiuron, verificaram que

a comunidade microbiana associada às raízes de feijão-de-porco foi a maior e mais ativa dentre os tratamentos estudados. Não obstante, esses autores ressaltam ainda que as raízes do feijão-de-porco, talvez, possam liberar mais exsudatos, o que aumentaria os compostos orgânicos na rizosfera e, conseqüentemente, a liberação de C-CO<sub>2</sub>, podendo não exercer, dessa forma, a fitoextração do herbicida do solo. Por outro lado, maior estímulo à respiração microbiana, aumentam as chances de ocorrência do cometabolismo.

Os baixos valores de  $qCO_2$  durante as épocas de biorremediação observados em solos cultivados com feijão-de-porco mais consórcio bacteriano, girassol sem inoculação, e cultivo misto, indicam economia na utilização de energia pelos micro-organismos e, supostamente reflete ambiente mais estável ou mais próximo do seu estado de equilíbrio. Ao contrário, os valores elevados verificados nos solos sem cultivo, são indicativos de ecossistemas submetidos à condição de estresse ou de distúrbio (TÓTOLA; CHAER, 2002), o qual pode estar relacionado à presença do herbicida e à exaustão de nutrientes nesses solos. Assim, ressalta-se o prejuízo com relação às perdas de carbono a longo prazo que podem ocorrer se solos contaminados com sulfentrazone não forem submetidos a nenhuma técnica de biorremediação, bem como a importância do cultivo para estimular os micro-organismos a promover a rizodegradação e melhorar a eficiência de descontaminação do solo com herbicida.

O comportamento similar das curvas ajustadas para CBM e  $qMIC$  evidenciam a grande influência do CBM sobre os resultados de  $qMIC$  e a pequena influência do carbono orgânico do solo, que sofreu baixa variação entre os tratamentos. A capacidade de utilização do carbono foi aumentada ( $>qMIC$ ) ao longo do tempo no solo inoculado e cultivado com feijão-de-porco, no entanto, em solos sem cultivo, independente da inoculação, os micro-organismos apresentaram metabolismo menos econômico ( $<qMIC$ ). Em solos cultivados, de modo geral, menos carbono (C) orgânico foi canalizado para o metabolismo energético e mais C foi fixado nas células microbianas. Tais resultados evidenciam uma microbiota eficiente na utilização e incorporação do carbono à biomassa e uma população ativa no solo, características desejáveis e que podem refletir na biodegradação do herbicida.

## CONCLUSÕES

Por meio de indicadores microbiológicos pode-se constatar que solos sem cultivo apresentam menor biomassa e atividade microbiana do que solos cultivados. As espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, têm capacidades distintas de estimular os micro-organismos rizosféricos. *Canavalia ensiformis* na presença de consórcio bacteriano é capaz de proporcionar maior atividade da microbiota associada e sustentar maior biomassa microbiana. A fitorremediação associada à bioaugmentação é técnica promissora para a biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa e apoio concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, T. H.; DOMSCH, K. H. Ratios of microbial biomass carbon to total organic carbon in arable soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 21, p. 471 - 479, 1989.

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, p. 81 - 89, 1985.

ARTUZI, J. P.; CONTIERO, R. L. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1119 - 1123, 2006.

BELO, F. A.; COELHO, A. T. C. P.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B. Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 821 - 828, 2011.

CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F.; MARTINEZ, H. E. P.; NOVAIS, R. F. Avaliação da Fertilidade do solo e Recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (eds) **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 769 - 850.

CARDOSO, E. J. B. N; NOGUEIRA, M. A. A rizosfera e seus efeitos na comunidade microbiana e na nutrição de plantas. In: SILVEIRA, A. P. D; FREITAS, S. S. **Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental**, Campinas: Instituto Agrônômico, 2007. p 79 - 96.

ČERNOHLÁVKOVÁ, J.; JARKOVSKÝ, J.; HOFMAN, J. Effects of fungicides mancozeb and dinocap on carbon and nitrogen mineralization in soils. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p. 80 - 85, 2009.

CURL, E. A.; RODRIGUEZ-KABANA, R. Microbial interactions. In: Wilkinson, R. E. ed. **Research methods in weed science**. Atlanta, Southern Weed Science Society, 1972. p. 162 - 194.

DILLY, O.; NII-ANNANG, S.; FRANKE, G.; FISCHER, T.; BUEGGER, F.; ZYAKUN, A. Resilience of microbial respiration, respiratory quotient and stable isotope characteristics to soil hydrocarbon addition. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 43, p. 1808 - 1811, 2011.

GIL, S. V.; MERILES, J.; CONFORTO, C.; BASANTA, M.; RADL, V.; HAGN, A.; SCHLOTTER, M.; MARCH, G. J. Response of soil microbial communities to different management practices in surface soils of a soybean agroecosystem in Argentina. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 55 - 60, 2011.

ISLAM, K. R.; WEIL, R. R. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. **Biology and Fertility of Soils**, v. 27, p. 408 - 416, 1998.

IUPAC - **International Union of Pure and Applied Chemistry**. 2014. Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/Reports/601.htm>. Acesso em: 02 de agosto de 2014.

JONES, W. J.; ANANYEVA, N. D. Correlations between pesticide transformation rate and microbial respiration activity in soil of different ecosystems. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 477 - 483, 2001.

LANE, M.; LORENZ, N.; SAXENA, J.; RAMSIER, C.; DICK, R. P. Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizosphere soil of soybean plants treated with glyphosate. **Pedobiologia - International Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 153 - 159, 2012.

LAMY, E.; TRAN, T. C.; MOTTELET, S.; PAUSS, A.; SCHOEFS, O. Relationships of respiratory quotient to microbial biomass and hydrocarbon contaminant degradation during soil bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 83, p. 85 - 91, 2013.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. **SAS<sup>®</sup> for Mixed Models, Second Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA, 2006. 828p.

LUPWAYI, N. E.; LAFOND, G. P.; ZIADI, N.; GRANT, C. A. Soil microbial response to nitrogen fertilizer and tillage in barley and corn. **Soil Tillage Research**, v. 118, p. 139 - 146, 2012.

MADALÃO, J. C.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; CHAGAS, K.; NASCIMENTO, A.F.; GARCIA, G. O. Fitorremediação de solos contaminados com o herbicida sulfentrazone por espécies de adubos verdes. **Revista Ciências Agrárias**, v. 55, p. 288 - 296, 2012.

MARTIN-HERNANDEZ, M.; SUAREZ-OJEDA, M. E.; CARRERA, J. Bioaugmentation for treating transient or continuous p-nitrophenol shock loads in an aerobic sequencing batch reactor. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 150 - 156, 2012.

MELO, C.; FIALHO, C.; FARIA, A.; NETO, M.; SARAIVA, D.; COSTA, M.; FERREIRA, L.; FERREIRA, F. A. Microbial activity of soil cultivated with corn in

association with weeds under different fertility management systems. **Chilean Journal of Agricultural Research**, v. 74, n. 4, p. 477 - 484, 2014.

MOREIRA, F. S. M.; SIQUEIRA, J. O. Rizosfera. In: MOREIRA, F. S. M.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Editora: UFLA, Universidade Federal de Lavras, 2006. p. 407 - 447.

MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Bioremediation and reclamation of soil contaminated with petroleum oil hydrocarbons by exogenously seeded bacterial consortium: a pilot-scale study. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, p. 471 - 478, 2011.

NAKATANIA, A. S.; FERNANDES, M. F.; SOUZA, R. A.; SILVA, A. P.; REIS-JÚNIOR, F. B.; MENDES, I. C.; HUNGRIA, M. Effects of the glyphosate-resistance gene and of herbicides applied to the soybean crop on soil microbial biomass and enzymes. **Field Crops Research**, v. 162, p. 20 - 29, 2014.

PEREIRA, J. L.; PICANCO, M. C.; SILVA, A. A.; SANTOS, E. A.; TOME, H. V. V.; OLARTE, J. B. Effects of glyphosate and endosulfan on soil microorganisms in soybean crop. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 825 - 830, 2008.

PIMMATA, P.; REUNGSANG, A.; PLANGKLANG, P. Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 85, p.196 - 204, 2013.

PIRES, F. R. SOUZA, C. M.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p. 627 - 634, 2005.

REIS, M. R.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; GUIMARÃES, A. A.; FERREIRA, E. A.; SANTOS, J. B.; CECON, P. R. Atividade microbiana em solo cultivado com cana-de-açúcar após aplicação de herbicidas. **Planta Daninha**, v. 26, n. 2, p. 323 - 331, 2008.

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, p. 1073 - 1084, 1984.

SANTOS, J. B.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. A.; COSTA, M. D.; MANABE, A.; SILVA, M. C. S. Action of two herbicides on the microbial activity of soil cultivated with common bean (*Phaseolus vulgaris*) in conventional-till and no-till systems. **Weed Research**, v. 46, n. 4, p. 284 - 289, 2006.

SANTOS, E. A.; SANTOS, J. B.; FERREIRA, L. R.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. 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.; COSTA, M. D.; FERREIRA, L. R.; REIS, M. R.; FRANÇA, A. C.; SANTOS, J. B. 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, G. S.; MELO, C. A. D.; FIALHO, C. M. T.; TUFFI SANTOS, L. D.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. Impact of sulfentrazone, isoxaflutole and oxyfluorfen on the microorganisms of two forest soils. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 292 - 299, 2014.

SZULC A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAK, Q.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121 - 128, 2014.

THIRUKKUMARAN, C. M.; PARKINSON, D. Microbial respiration, biomass, metabolic quotient and litter decomposition in a lodgepole pine forest floor amended

with nitrogen and phosphorous fertilizers. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 59 - 66, 2000.

TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos como indicadores da qualidade dos solos. In: ALVAREZ V., V. H.; SCHAEFER, C. E. G. R.; BARROS, N. F.; MELLO, J. W. V.; COSTA, L. M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. v. 2. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2002. p. 195 - 276.

TURPAULT, M. P.; GOBRAN, G. R.; BONNAUD, P. Temporal variations of rhizosphere and bulk soil chemistry in a Douglas fir stand. **Geoderma**, v. 137, p. 490 - 496, 2007.

VANCE, E. D.; BROOKES, P. C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 19, n. 6, p. 703 - 707, 1987.

VIEIRA, R. F.; SILVA, C. M. M. S.; SILVEIRA, A. P. D. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant Soil**, v. 300, p. 95 - 103, 2007.

VIVIAN, R.; REIS, M. R.; JAKELAITIS, A.; SILVA, A. F.; GUIMARÃES, A. A.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. Persistência de sulfentrazone em Argissolo Vermelho-Amarelo cultivado com cana-de-açúcar. **Planta Daninha**, v. 24, p. 741 - 750, 2006.

VOOS, G.; GROFFMAN, P. M. Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. **Biology and Fertility of Soils**, v. 24, p. 106 - 110, 1997.

XIONG, D.; GAO, Z.; FU, B.; SUN, H.; TIAN, S.; XIAO, Y.; QIN, Z. Effect of pyrimorph on soil enzymatic activities and respiration. **European Journal of Soil Biology**, v. 56, p. 44 - 48, 2013.

WANG, T.; SUN, H.; JIANG, C.; MAO, H.; ZHANG, Y. Immobilization of Cd in soil and changes of soil microbial community by bioaugmentation of UV-mutated *Bacillus*

*subtilis* 38 assisted by biostimulation. **European Journal of Soil Biology**, v. 65, p. 62 - 69, 2014.

ZHOU, X. G.; YU, G. B.; WU, F. Z. Effects of intercropping cucumber with onion or garlic on soil enzyme activities, microbial communities and cucumber yield. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 279 - 287, 2011.

ZILLI, J. E.; BOTELHO, G. R.; NEVES, M. C. P.; RUMJANEK, N. G. Efeito de glyphosate e imazaquin na comunidade bacteriana do rizoplano de soja (*Glycine max* (L.) Merrill) e em características microbiológicas do solo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 633 - 642, 2008.

## **CAPÍTULO 5**

## BACTÉRIAS E PLANTAS NA BIORREMEDIAÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM SULFENTRAZONE

**RESUMO:** A associação entre plantas remediadoras e a bioaugmentação com consórcio bacteriano pode melhorar a eficiência e acelerar o processo de descontaminação de solos com herbicidas. Diante disso, objetivou-se avaliar o potencial de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone por consórcio bacteriano previamente selecionado, por plantas fitorremediadoras e pela associação desses. Os tratamentos constaram do monocultivo ou cultivo misto de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) e girassol (*Helianthus annuus*), além de solo sem cultivo, associado à presença ou ausência de inoculação com consórcio bacteriano e de tempos de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste (DAD)). Ao final de cada época foi realizado um bioensaio com a espécie bioindicadora *Sorghum bicolor* e quantificado os resíduos de sulfentrazone no solo por cromatografia líquida de alta eficiência. O monocultivo de girassol e o cultivo misto reduziram em 64% o tempo de meia-vida do sulfentrazone comparado ao solo cultivado com feijão-de-porco sem inoculação e em 43% em relação aos tratamentos compostos pelos solos sem cultivo e monocultivo de feijão-de-porco na presença de inoculação, respectivamente. Apesar da redução da meia-vida do sulfentrazone no solo, os níveis de resíduos presentes ainda intoxicaram e reduziram o acúmulo de matéria seca da planta indicadora. O cultivo misto de feijão-de-porco e girassol e o monocultivo de girassol, independente da inoculação do solo com consórcio bacteriano, são as técnicas mais eficientes de biorremediação do sulfentrazone no solo. O monocultivo ou cultivo misto dessas espécies fitorremediadoras por 85 DAD proporciona reduções consideráveis na concentração do sulfentrazone no solo, porém, esse tempo não é suficiente para possibilitar o crescimento da planta indicadora sem a ocorrência de toxicidade.

**Palavras-chave:** bioaugmentação, fitorremediação, herbicida, tempo de meia-vida

## BACTERIA AND PLANTS IN THE BIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH SULFENTRAZONE

**ABSTRACT:** The association between remediating plants and bioaugmentation with a bacterial consortium can improve efficiency and speed up the process of decontaminating soil with herbicides. This work aimed to evaluate the potential for

bioremediation of soils contaminated with sulfentrazone by the bacterial consortium previously selected, phytoremediator plants, and a combination of these. The treatments consisted of a monoculture or mixed cultivation of *Canavalia ensiformis* and *Helianthus annuus* and bare soil, associated with the presence or absence of inoculation with the bacterial consortium, and times of bioremediation (25, 45 65 and 85 days after thinning (DAT)). At the end of each time period, we conducted a bioassay with bioindicator *Sorghum bicolor* and quantified the sulfentrazone residues in the soil by liquid chromatography high efficiency. *H. annuus* monoculture and mixed cropping reduced the half-life time of sulfentrazone by 64% compared to the soil cultivated with *C. ensiformis* without inoculation, and reduced it by 43% compared to treatment composed of uncultivated and *C. ensiformis* monoculture with inoculation, respectively. Despite the reduction of the half-life of sulfentrazone in the soil, residue levels still caused intoxication of the indicator plant and dry matter reduction. The mixed culture and *H. annuus*, regardless of soil inoculation with the bacterial consortium, are the most efficient techniques for bioremediation of sulfentrazone in the soil. The isolated or mixed cultivation of these phytoremediator species for 85 DAT provides considerable reduction in the concentration of sulfentrazone in the soil; however, the time is not sufficient to enable the growth of the indicator plant without the occurrence of toxicity.

**Keywords:** bioaugmentation, phytoremediation, herbicide, half-life time

## INTRODUÇÃO

Alguns herbicidas têm atividade residual no solo e tal comportamento é importante em situações onde o período total de prevenção da interferência (PTPI) das plantas daninhas sobre as culturas é longo. Assim, o controle efetivo exercido por esses herbicidas durante maior tempo reduz o número de aplicações necessárias (PROCÓPIO et al., 2009). No entanto, após o término do PTPI, que normalmente coincide com a cobertura do solo pela cultura, a presença do herbicida nesse ecossistema passa a ser indesejável, pois pode resultar em *carryover* (DAN et al., 2010; MANCUSO et al., 2011), contaminação de águas subterrânea pela lixiviação (SANTOS et al., 2015 [no prelo]) e, ou superficiais via *runoff* (MARCHESAN et al., 2010; OTTO et al., 2012), além de toxicidade a organismos não alvos (LANE et al., 2012; SILVA et al., 2014).

Nesse sentido, tem aumentado o interesse por técnicas que visem impedir ou remediar os efeitos negativos da presença desses herbicidas no solo. Dentre as inúmeras

tecnologias para destoxificação do solo, destaca-se a biorremediação que consiste na utilização de micro-organismos e, ou plantas, capazes de degradar ou imobilizar determinados poluentes, transformando-os em substâncias menos tóxicas ou inertes (JACQUES et al., 2010). Diversas pesquisas destacaram o potencial de plantas na remediação de solos com herbicidas como trifloxysulfuron-sodium (SANTOS et al., 2010), diclosulam (MONQUERO et al., 2013), tebuthiuron (PIRES et al., 2006), picloram (SILVA et al., 2012) e sulfentrazone (MADALÃO et al., 2012; BELO et al., 2011).

A fitorremediação consiste no uso de plantas e de sua microbiota associada, além de práticas agronômicas que, se aplicadas em conjunto, removem, imobilizam ou tornam os contaminantes inofensivos ao ecossistema (ACCIOLY; SIQUEIRA, 2000). Dentro desta técnica, destaca-se como principal mecanismo atuante na descontaminação de solos com resíduos de herbicidas a fitoestimulação, a rizodegradação e a fitodegradação (PIRES et al., 2005).

O sulfentrazone N-[2,4-dichloro-5-[4-(difluoromethyl)-4,5-dihydro-3-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]phenyl] methanesulfonamide é recomendado no Brasil para uso em pré-emergência das plantas daninhas nas culturas da soja, cana-de-açúcar, café, eucalipto, citros, fumo e abacaxi (AGROFIT, 2014). A baixa sorção (PASSOS et al., 2012; FREITAS et al., 2014) e a longa persistência (BLANCO et al., 2010), tornam o sulfentrazone passível de movimentação no perfil do solo (MONQUERO et al., 2010; MELO et al., 2010), aumentando, conseqüentemente, os riscos de contaminação ambiental.

A decomposição microbiana é a via mais importante de degradação do sulfentrazone no solo (MARTINEZ et al., 2010). Contudo, a bioaugmentação, ou seja, a introdução de micro-organismos selecionados ao solo, como bactérias e fungos, para biorremediar áreas contaminadas com herbicidas é ainda pouco estudada no Brasil.

Embora a fitorremediação de herbicidas tenha despertado o interesse da comunidade científica, são escassas as pesquisas associando esta técnica com a introdução de micro-organismos comprovadamente degradadores de herbicidas em campos agrícolas. Diante do exposto, objetivou-se avaliar o potencial de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone por consórcio bacteriano previamente selecionado, por plantas fitorremediadoras e pela associação desses.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em ambiente protegido. Cada unidade experimental correspondeu a vasos com capacidade de 12 dm<sup>3</sup> (28,5 cm de diâmetro e 30 cm de altura) preenchidos com 10 kg de um Argissolo Vermelho Amarelo distrófico de textura franco-argilo-arenosa (25% de argila, 12% de silte e 63% de areia) com as seguintes características químicas: pH (água) 6,1; matéria orgânica 4,12 dag kg<sup>-1</sup>; P e K 6,9 e 200 mg dm<sup>-3</sup>, respectivamente; Ca, Mg, Al, H + Al e CTC efetiva 3,7; 1,0; 0,0 e 1,15 e 5,21 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>, respectivamente. Antes do preenchimento dos vasos o solo foi previamente adubado com sulfato de amônio (0,20 g dm<sup>-3</sup> de N) e superfosfato simples (1,80 g dm<sup>-3</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>), segundo Cantarutti et al. (2007).

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado, com quatro repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial 2x4x4. O primeiro fator foi composto pela presença ou ausência de inoculação com consórcio bacteriano selecionado, o segundo fator pelo monocultivo ou cultivo misto de duas espécies fitorremediadoras, além da ausência de cultivo e o terceiro pelo tempo de biorremediação (25, 45, 65 e 85 dias após o desbaste (DAD)). Adicionalmente, foram mantidos vasos cultivados sem a aplicação de herbicida para coleta de solo e obtenção da testemunha do bioensaio.

A aplicação do sulfentrazone foi realizada com um pulverizador costal, com pressão constante mantida à CO<sub>2</sub>, acoplado de barra com duas pontas tipo leque TT110 02, espaçadas de 0,5 m, trabalhando a pressão de 250 kPa, com volume de calda de aproximadamente 140 L ha<sup>-1</sup>, na dose de 1000 g ha<sup>-1</sup> i.a. As condições climáticas no momento da aplicação foram T = 27 °C, UR = 72% e velocidade do vento de 1,9 km h<sup>-1</sup>.

Após a aplicação do herbicida, realizou-se a semeadura das espécies fitorremediadoras *Canavalia ensiformis* (MADALÃO et al., 2012) e *Helianthus annuus* cultivar Tera 860 HO (BELO et al., 2011). A semeadura foi realizada a 5 cm de profundidade utilizando-se 6 sementes por vaso. Decorridos 15 dias da semeadura realizou-se o desbaste deixando duas plantas da mesma espécie ou uma de cada (cultivo misto) em cada unidade experimental.

O consórcio bacteriano utilizado foi selecionado com base no potencial de degradação dos isolados realizados em estudo prévio. O consórcio foi formado por seis isolados identificados como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida* e três isolados de *Pseudomonas sp.*. Estes foram cultivados separadamente em meio caldo nutriente (1,0 L água; 2,0 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 3,0 g NaCl; 3,0 g

extrato de carne; 5,0 g peptona; pH 6,8) por aproximadamente 10 h a 30°C e 150 rpm até densidade óptica de 0,6. O meio foi submetido à centrifugação (5000 rpm, 5 min, 4°C) e as células bacterianas suspendidas em solução salina ((NaCl 0,85%). O consórcio foi estabelecido pipetando-se volumes de solução de cada um dos seis isolados de modo a garantir igual quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC mL<sup>-1</sup>) de cada espécie, totalizando 12 mL de solução e inoculação de 4,5 x 10<sup>4</sup> UFC g<sup>-1</sup> de solo nos tratamentos correspondentes, após o desbaste.

As espécies fitorremediadoras foram cultivadas por 25, 45, 65 e 85 DAD, sendo ao final de cada época cortadas rente ao solo. O sistema radicular das plantas foi removido, o solo homogeneizado e retiradas amostras para realização do bioensaio e quantificação dos resíduos de herbicida no solo. Nos referidos tempos de biorremediação, as plantas de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) encontravam-se nos estádios vegetativos V2 a V3, V4 a V5, V6 a V7 e V8 a V9, e as plantas de girassol (*Helianthus annuus*) nos estádios V16 a V18, R1 a R3, R5.1 a R5.8 e R 5.10 a R6, respectivamente.

### ***Bioensaio***

Amostras homogeneizadas de solo de cada unidade experimental foram transferidas para potes plásticos, com fundos vedados, com capacidade de 300 cm<sup>3</sup>. Posteriormente foram semeadas dez sementes da espécie bioindicadora *Sorghum bicolor*, deixando-se, após desbaste, seis plântulas por pote.

Aos 21 dias após a semeadura foram avaliados os sintomas de intoxicação (%), atribuindo-se notas de 0 a 100, para ausência de sintomas na parte aérea e morte da planta, respectivamente (ALAM, 1974). Neste mesmo dia, foi coletada a parte aérea das plantas para determinação da percentagem de massa da matéria seca da parte aérea em relação à testemunha após secagem em estufa (65°C ± 2° C) até atingir massa constante.

### ***Quantificação dos resíduos de sulfentrazone em solo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)***

A quantificação do herbicida nas amostras do solo coletadas em cada unidade experimental após retirada da espécie fitorremediadora foi realizada utilizando-se a técnica de extração sólido-líquido com partição em baixa temperatura (ESL-PBT), de acordo com a metodologia proposta por Vieira et al. (2007) e Goulart et al. (2008), com modificações.

Para confirmação dos resultados obtidos por estes autores, foram realizados testes de extração e em seguida a quantificação dos extratos por CLAE. Pesaram-se dois gramas de solo seco, previamente homogeneizado, em tubos de polipropileno com 50,0 mL de capacidade e adicionou-se 12,0 mL da mistura extratora, composta por 4,0 mL de água e 8,0 mL de acetonitrila. Os frascos foram submetidos à agitação vertical (140 rpm) durante 30 minutos. Posteriormente, as amostras foram deixadas em freezer por cerca de 12 horas à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Após este período, as frações contendo solo e água congelada foram descartadas e a fração não congelada, composta de extrato orgânico contendo o herbicida, foi transferida para um balão de fundo redondo com 50,0 mL de capacidade, para evaporação do solvente em evaporador rotatório ( $80 \pm 5$  rpm) à temperatura de  $50 \pm 1$   $^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, o balão foi lavado com duas alíquotas de 0,75 mL de acetonitrila, sendo o extrato final filtrado em membrana de 0,45  $\mu\text{m}$  e armazenado em vials de 1,5 mL para análise por CLAE.

As determinações do sulfentrazone foram realizadas utilizando-se um sistema de CLAE, modelo Shimadzu LC 20AT, detector de arranjo de fotodiodo (Shimadzu SPD - M20A) e coluna  $\text{C}_{18}$  de aço inox (Shimadzu VP- ODS Shim-pack 250 mm x 4,6 mm d.i.). A solução estoque do herbicida foi preparada a partir do padrão com 92,01% de pureza, na concentração de  $1000\ \mu\text{g mL}^{-1}$  em acetonitrila e as soluções de trabalho preparadas a partir desta.

As condições cromatográficas para a análise foram: fase móvel composta de água (acidificada com 0,1% de ácido fosfórico) e acetonitrila na proporção 60:40 (v/v); fluxo de  $1,0\ \text{mL min}^{-1}$ ; volume de injeção de 20,0  $\mu\text{L}$ ; temperatura da coluna de  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , comprimento de onda de 207 nm e tempo de corrida de 16 minutos. A identificação do sinal do sulfentrazone foi feita por comparação do tempo de retenção e a quantificação realizada pelo método de calibração externa.

#### ***Validação do método de extração do herbicida no solo***

O método de extração do sulfentrazone foi validado considerando os parâmetros de desempenho analítico: seletividade, linearidade, limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão e exatidão de acordo com as recomendações do INMETRO (2010) e ANVISA (2003).

A seletividade foi avaliada comparando-se uma amostra extraída de solo isento de herbicida (branco) com uma amostra obtida de mesmo solo fortificado com 1,0 mg

kg<sup>-1</sup> do sulfentrazone (padrão técnico 92,01% pureza). A linearidade do equipamento foi testada injetando-se soluções padrões de sulfentrazone nas concentrações de 5,0 a 1330,0 µg L<sup>-1</sup> e posterior construção da curva analítica. Para avaliar a linearidade do método, amostras de solo foram fortificadas com concentrações crescentes de sulfentrazone (50,0 a 1000,0 µg kg<sup>-1</sup>) e submetidas ao mesmo processo de extração descrito acima. Os extratos obtidos foram injetados e a partir das áreas proporcionais obtidas foi construída a curva analítica.

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados utilizando-se as equações  $LD = 3,3 \times \frac{s}{S}$  e  $LQ = 10 \times \frac{s}{S}$  onde, *s* é a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão e *S* é a inclinação ou coeficiente angular da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Após determinação do LQ, a concentração correspondente foi acrescentada na curva analítica, injetando-se novamente os extratos.

A precisão foi avaliada quanto aos níveis repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações. Sete amostras (repetições) de solo foram fortificadas com 133,0 µg kg<sup>-1</sup> (2 x LQ) de sulfentrazone e injetadas para determinação da percentagem de recuperação e do coeficiente de variação (INMETRO, 2010). Para a precisão intermediária o mesmo analista preparou amostras em três dias (1º, 7º e 14º), em triplicata, fortificadas com 133,0 µg kg<sup>-1</sup> de sulfentrazone, injetou os extratos em cada um deles e calculou a percentagem de recuperação do herbicida e o coeficiente de variação.

A exatidão foi testada utilizando o método adição padrão. Para isso foram fortificadas amostras de solo, em triplicata, com as concentrações correspondentes a 1, 2 e 10 x LQ. O sulfentrazone foi extraído do solo e os extratos injetados para obtenção da percentagem de recuperação do herbicida e do coeficiente de variação (RIBANI et al., 2004).

#### ***Análise estatística dos dados obtidos***

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância pelo Teste F a 5% de probabilidade de erro. Efetuou-se o desdobramento da interação tripla significativa, sendo as médias comparadas pelo Teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ). Os efeitos dos tempos de biorremediação foram avaliados por análise de regressão e a escolha dos modelos baseada na significância dos coeficientes, no fenômeno biológico e no coeficiente de

determinação. Utilizou-se o teste de identidade de modelos da regressão descrito por Littell et al. (2006).

## RESULTADOS

Observou-se ausência de interferente no tempo de retenção ( $t_R$ ) do sulfentrazone ( $t_R = 12,88$  min.), evidenciando, no referido tempo, o pico de detecção do composto bem separado dos demais picos presentes na amostra (Figura 1).

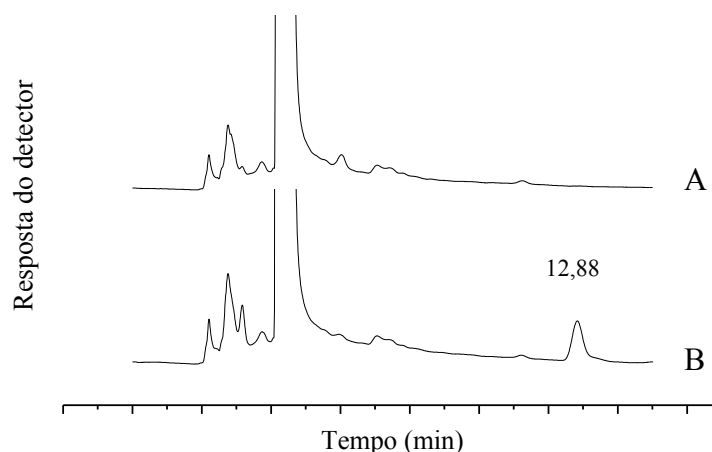


Figura 1: Cromatograma do extrato obtido de solo isento de herbicida (A) e do mesmo solo fortificado com  $1,0 \text{ mg kg}^{-1}$  do sulfentrazone (B), onde  $t_{R\text{sulfentrazone}} = 12,88$  min.

Tanto o equipamento quanto o método forneceram resultados de área diretamente proporcionais à concentração do sulfentrazone utilizada. Ambas as curvas analíticas foram ajustadas ao modelo linear com  $r^2 > 0,99$  (Figura 2).

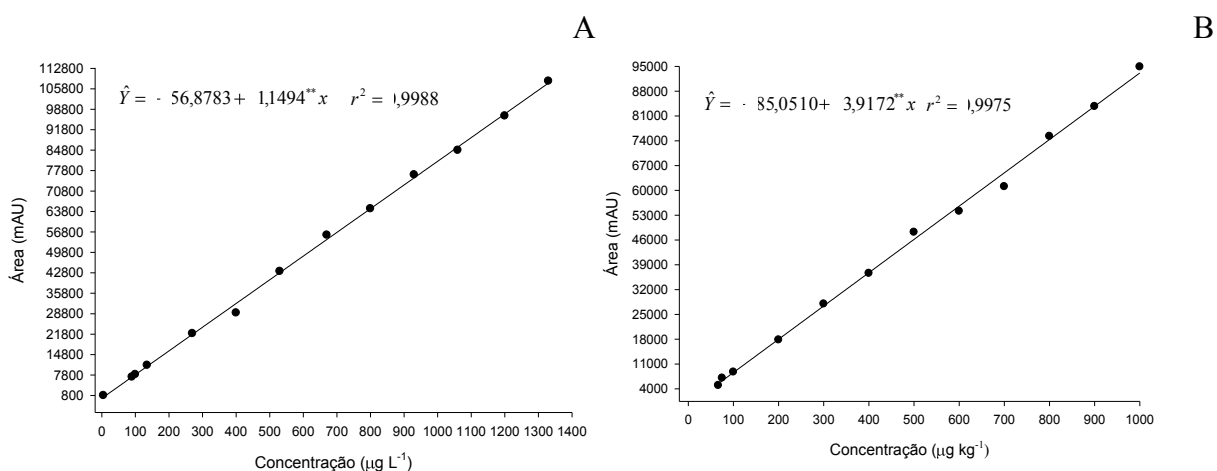


Figura 2: Linearidade do equipamento para detecção do sulfentrazone em acetonitrila (A) e linearidade do método para extração do sulfentrazone em amostras de solo (B).

O limite de detecção e quantificação do sulfentrazone em amostras de solo foi de 21,98  $\mu\text{g kg}^{-1}$  e 66,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Limites de detecção e de quantificação do método proposto para o sulfentrazone no solo estudado em  $\mu\text{g kg}^{-1}$

| Limite de detecção (LD)          | Limite de quantificação (LQ)     |
|----------------------------------|----------------------------------|
| LD = 21,98 $\mu\text{g kg}^{-1}$ | LQ = 66,60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ |

Em um curto período de tempo houve concordância entre os resultados no teste da repetitividade, bem como para precisão intermediária entre os dias de preparação das amostras pelo mesmo analista e equipamento. Foram verificados alta percentagem de recuperação do herbicida e baixos coeficientes de variação (Tabela 2).

Tabela 2: Percentagem de recuperação (% R) e coeficientes de variação (CV) obtidos pela repetitividade, precisão intermediária e exatidão.

| Precisão                                   |               | % R    | CV (%) |
|--|---------------|--------|--------|
| Repetitividade                             |               | 99,72  | 6,67   |
| Precisão intermediária                     | 1º dia        | 95,89  | 4,17   |
|  | 7º dia        | 103,19 |        |
|  | 14º dia       | 98,78  |        |
| Exatidão                                   |               | % R    | CV (%) |
| Concentrações<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | 66,6 (LQ)     | 108,99 | 6,80   |
|  | 133,0 (2 LQ)  | 95,88  |        |
|  | 666,0 (10 LQ) | 98,56  |        |

A percentagem de recuperação do herbicida encontrada na validação pelo parâmetro exatidão foi em média de 102,14%, com coeficiente de variação dentro dos padrões estabelecidos (Tabela 2).

Decorridos 25 DAD não houve diferença de intoxicação do sorgo entre os cultivos prévios, independente da inoculação (Tabela 3). Aos 45 DAD, notou-se menor intoxicação do bioindicador em solos previamente cultivados com feijão-de-porco e cultivo misto, com inoculação, em relação ao solo sem cultivo prévio. Comportamento similar foi evidenciado nas plântulas de sorgo crescidas em solo previamente cultivado com girassol por 65 DAD na presença de inoculação (Tabela 3). Aos 65 e 85 DAD, na ausência de inoculação, em solo pré-cultivado com girassol e cultivo misto, a intoxicação do sorgo foi a menor, em média de 56,6 e 57,7%, respectivamente.

Tabela 3: Intoxicação de plantas de *Sorghum bicolor*, 21 dias após a emergência, cultivadas em solo contaminado com sulfentrazone e pré-cultivado com espécies fitorremediadoras, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Cultivo                    | Intoxicação de <i>Sorghum bicolor</i> (%) |                 |       |    |            |     |       |      |
|----------------------------|---|-----------------|-------|----|------------|-----|-------|------|
|                            | Inoculação                                |                 |       |    | Inoculação |     |       |      |
|                            | Com                                       |                 | Sem   |    | Com        |     | Sem   |      |
|                            | 25 DAD                                    |                 |       |    | 45 DAD     |     |       |      |
| Feijão-de-porco            | 79,69                                     | Aa <sup>1</sup> | 83,88 | Aa | 68,54      | Ab  | 67,71 | Aa   |
| Girassol                   | 75,63                                     | Ba              | 85,50 | Aa | 72,50      | Aab | 72,50 | Aa   |
| Feijão-de-porco + Girassol | 72,92                                     | Aa              | 80,83 | Aa | 69,38      | Ab  | 75,83 | Aa   |
| Sem cultivo                | 82,50                                     | Aa              | 82,50 | Aa | 81,25      | Aa  | 78,33 | Aa   |
|                            | 65 DAD                                    |                 |       |    | 85 DAD     |     |       |      |
| Feijão-de-porco            | 66,98                                     | Bab             | 77,19 | Aa | 57,50      | Ba  | 76,25 | Aa   |
| Girassol                   | 60,00                                     | Ab              | 57,19 | Ab | 55,63      | Aa  | 57,81 | Ab   |
| Feijão-de-porco + Girassol | 66,56                                     | Aab             | 61,56 | Ab | 57,50      | Aa  | 57,50 | Ab   |
| Sem cultivo                | 74,84                                     | Aa              | 82,50 | Aa | 59,06      | Ba  | 81,67 | Aa   |
| CV (%)                     |   |                 |       |    |            |     |       | 8,87 |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p>0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

Verificou-se redução da intoxicação do sorgo cultivado em solo remediado por 25 DAD com girassol e inoculado com consórcio bacteriano (Tabela 3). Decorridos 65 DAD, em solo inoculado e cultivado com feijão-de-porco, o sorgo apresentou menor intoxicação comparado ao solo não inoculado. A intoxicação do sorgo observada após o cultivo de feijão-de-porco e ausência de cultivo por 85 DAD também foi reduzida em 25% e 28%, respectivamente, em relação aos mesmos tratamentos sem inoculação (Tabela 3).

Elevada intoxicação do sorgo (81%) foi evidenciada durante todo o tempo de biorremediação em solo contaminado com sulfentrazone, sem cultivo de espécie fitorremediadora e sem bioaumentação (Figura 3A). Com a adição do consórcio bacteriano, a intoxicação do sorgo em solo sem cultivo prévio foi reduzida com o passar do tempo. Da mesma forma, os demais tratamentos cultivados propiciaram redução dos sintomas de intoxicação do sorgo até cerca de 58% no bioensaio realizado após 85 DAD (Figura 3A).

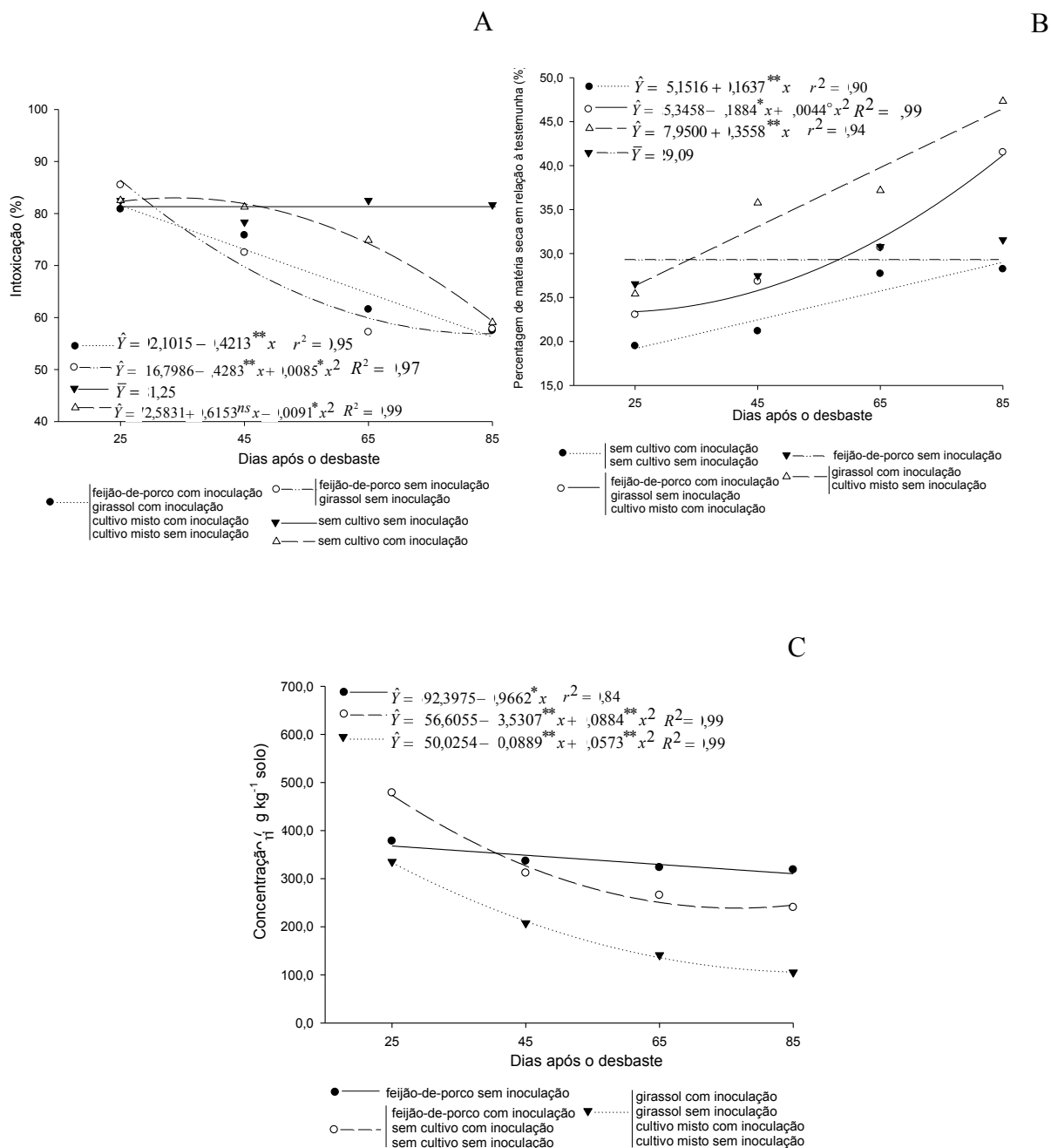


Figura 3: Intoxicação (A) e percentagem de matéria seca (B) de plantas de *Sorghum bicolor* cultivadas em solo contaminado com sulfentrazone e pré-cultivado com espécies fitorremediadoras por diferentes tempos, na ausência e presença de consórcio bacteriano. Concentração de sulfentrazone (C) em amostras de solo cultivado ao longo do tempo com espécies fitorremediadoras em monocultivo ou cultivo misto.

Modelos que não diferiram entre si foram apresentados em uma curva comum pelo Teste de Identidade de Modelos ( $p \leq 0,05$ ). \*\*, \*, <sup>o</sup> e <sup>ns</sup> significativo a 1, 5, 10% e não significativo, respectivamente, pelo Teste t.

O pré-cultivo simultâneo das duas espécies fitorremediadoras por 25 DAD, e inoculação com consórcio bacteriano, resultou em maior acúmulo de matéria seca da

espécie bioindicadora comparado ao pré-cultivo de girassol e do solo sem cultivo (Tabela 4). Na ausência de inoculação, aos 45 e 85 DAD, verificou-se melhor desempenho do sorgo nos solos pré-cultivados com girassol e cultivo misto e menor acúmulo de matéria seca em solos que não foram previamente cultivados. Para os demais tratamentos e épocas, solos pré-cultivados possibilitaram maior acúmulo de matéria seca de sorgo em relação à testemunha do que solos não cultivados (Tabela 4).

Tabela 4: Percentagem de matéria seca da parte aérea de *Sorghum bicolor*, em relação à testemunha, cultivadas em solo contaminado com sulfentrazone e pré-cultivado com espécies fitorremediadoras, na ausência e presença de consórcio bacteriano.

| Matéria seca da parte aérea de <i>Sorghum bicolor</i> (% em relação à testemunha) |            |                  |        |    |            |     |        |     |
|---|------------|------------------|--------|----|------------|-----|--------|-----|
| Cultivo   | Inoculação |                  |        |    | Inoculação |     |        |     |
|   | Com        |                  | Sem    |    | Com        |     | Sem    |     |
|   | 25 DAD     |                  | 45 DAD |    | 65 DAD     |     | 85 DAD |     |
| Feijão-de-porco   | 23,04      | Aab <sup>1</sup> | 26,55  | Aa | 26,83      | Aab | 27,47  | Ab  |
| Girassol  | 22,75      | Ab               | 25,12  | Aa | 28,91      | Aa  | 29,28  | Aab |
| Feijão-de-porco + Girassol  | 29,65      | Aa               | 25,41  | Aa | 31,25      | Aa  | 35,76  | Aa  |
| Sem cultivo   | 19,49      | Ab               | 16,22  | Ab | 21,18      | Ab  | 21,06  | Ac  |
|   | 65 DAD     |                  |        |    | 85 DAD     |     |        |     |
| Feijão-de-porco   | 30,67      | Aab              | 30,78  | Aa | 41,52      | Aa  | 31,55  | Bb  |
| Girassol  | 32,55      | Aab              | 33,68  | Aa | 42,58      | Aa  | 44,11  | Aa  |
| Feijão-de-porco + Girassol  | 37,01      | Aa               | 37,17  | Aa | 46,59      | Aa  | 47,33  | Aa  |
| Sem cultivo   | 27,71      | Ab               | 21,79  | Bb | 28,23      | Ab  | 25,44  | Ab  |
| CV (%)  | 12,41      |                  |        |    |            |     |        |     |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey (p>0,05). DAD: dias após o desbaste.

A inoculação de bactérias no solo contaminado com sulfentrazone causou alteração no crescimento de *Sorghum bicolor*, sendo a sua presença significativamente positiva no solo que não recebeu cultivo por 65 DAD e no solo cultivado com feijão-de-porco por 85 DAD (Tabela 4). Nesses solos a presença de consórcio bacteriano proporcionou aumento da matéria seca do sorgo em 21 e 24%, respectivamente (Tabela 4).

A matéria seca do sorgo crescido em solo pré-cultivado com feijão-de-porco sem inoculação não foi influenciada pelo tempo de biorremediação (Figura 3B). Plantas de sorgo apresentaram, ao longo do tempo de biorremediação, matéria seca reduzida em solos não cultivados previamente e maior acúmulo em solos pré-cultivados. Contudo, independente do tratamento, a espécie bioindicadora teve acúmulo de matéria seca inferior a 50% em relação à testemunha sem herbicida (Figura 3B).

A concentração de sulfentrazone aos 25 DAD em solos com cultivo misto e inoculados foi menor do que o solo cultivado com feijão-de-porco. Nesta mesma época,

na ausência de inoculação, solos cultivados foram igualmente superiores ao solo sem cultivo (Tabela 5). Os cultivos de girassol e misto, para as demais condições de época, cultivo e inoculação, foram mais eficientes na degradação e redução da concentração do herbicida no solo (Tabela 5).

Tabela 5: Concentração de sulfentrazone em amostras de solo cultivado com espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, na presença e ausência de inoculação com consórcio bacteriano.

| Concentração de sulfentrazone ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ solo) |            |                 |        |    |            |    |        |       |
|---|------------|-----------------|--------|----|------------|----|--------|-------|
| Cultivo   | Inoculação |                 |        |    | Inoculação |    |        |       |
|   | Com        |                 | Sem    |    | Com        |    | Sem    |       |
|   | 25 DAD     |                 | 45 DAD |    | 65 DAD     |    | 85 DAD |       |
| Feijão-de-porco   | 478,57     | Aa <sup>1</sup> | 378,60 | Bb | 311,81     | Aa | 336,47 | Aa    |
| Girassol  | 416,45     | Aab             | 335,19 | Bb | 211,07     | Ab | 207,46 | Ac    |
| Feijão-de-porco + Girassol                                  | 374,27     | Ab              | 318,78 | Bb | 214,34     | Ab | 234,99 | Abc   |
| Sem cultivo   | 435,43     | Bab             | 511,21 | Aa | 297,49     | Aa | 284,78 | Aab   |
|   |            |                 |        |    |            |    |        |       |
|   |            |                 |        |    |            |    |        |       |
| Feijão-de-porco   | 265,55     | Ba              | 323,41 | Aa | 240,25     | Ba | 318,54 | Aa    |
| Girassol  | 177,15     | Ab              | 141,16 | Ab | 94,24      | Ab | 105,16 | Ab    |
| Feijão-de-porco + Girassol                                  | 160,41     | Ab              | 146,33 | Ab | 119,17     | Ab | 129,58 | Ab    |
| Sem cultivo   | 268,70     | Aa              | 278,05 | Aa | 225,82     | Aa | 256,66 | Aa    |
| CV (%)  |            |                 |        |    |            |    |        | 13,67 |

<sup>1</sup>Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, para cada época, não diferem entre si pelo Teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). DAD: dias após o desbaste.

A bioaugmentação com consórcio bacteriano provocou, aos 25 DAD, efeito negativo, sendo verificada, em solos cultivados na ausência de inoculação, menor concentração do sulfentrazone (Tabela 5). Por outro lado, em solos sem cultivo, a adição de bactérias do gênero *Pseudomonas* contribuiu para a redução de 15% dos níveis de resíduo de sulfentrazone no solo (Tabela 5). Nas duas últimas épocas, 65 e 85 DAD, efeito positivo da inoculação foi observado em solo cultivado com feijão-de-porco (Tabela 5).

A redução da concentração de sulfentrazone ao longo do tempo de biorremediação foi maior e mais eficiente nos solos cultivados com feijão-de-porco e girassol simultaneamente e com monocultivo de girassol, independente da bioaugmentação. Solos sem cultivo e cultivado com feijão-de-porco tiveram, ao final do tempo de biorremediação, em média, o dobro ou mais que a concentração verificada em solo sob cultivo misto e de girassol (Figura 3C).

Considerando que foi aplicada uma dose de  $1000 \text{ g ha}^{-1}$  de sulfentrazone numa área de  $0,0638 \text{ m}^2$ , correspondente à área circular do vaso, tem-se que a concentração inicial de sulfentrazone no solo é de  $637,9 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Assim, observou-se que logo após

25 DAD, a cerca de 27 DAD, em solos cultivados com girassol e cultivo misto, independe da inoculação, o herbicida já tinha atingido o tempo de meia-vida ( $t_{1/2}$ ) no solo (Figura 3C). Em solos sem cultivo, independe da inoculação, e naqueles cultivados com feijão-de-porco na presença de inoculação, o  $t_{1/2}$  do herbicida foi verificado próximo aos 47 DAD, enquanto que para feijão-de-porco na ausência de consórcio bacteriano o  $t_{1/2}$  só foi alcançado aos 76 DAD (Figura 3C).

É importante ressaltar que o solo não foi esterilizado e apresentava, portanto, uma população nativa de micro-organismos. A atuação desses, atribuída ao franco crescimento vegetativo das plantas e à bioaugmentação, nos tratamentos cultivados e, ou inoculados, é que fizeram com que aos 25 DAD a concentração de herbicida no solo já estivesse abaixo da inicial, variando entre 474,0 e 334,0  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Figura 3C).

## DISCUSSÃO

A ausência de picos coextrativos no mesmo tempo de retenção do sulfentrazone na matriz isenta de herbicida caracterizou o método como seletivo. A seletividade avalia o grau de interferência de espécies como outro ingrediente ativo, excipientes, impurezas e produtos de degradação que possam estar, porventura, presentes, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse. Se a seletividade não for assegurada, a linearidade, a exatidão e a precisão podem ser comprometidas (RIBANI et al., 2004).

Os valores de coeficiente de correlação encontrados na linearidade do método e do equipamento estão dentro dos padrões estipulados pela ANVISA (2003) e INMETRO (2010), que recomendam que o mesmo seja igual a 0,99 e um valor acima de 0,90, respectivamente.

Os limites de detecção e quantificação do sulfentrazone no solo indicam que no presente trabalho foi possível a detecção da concentração mínima de 21,98  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , porém esta não pode ser quantificada com exatidão. Já concentrações maiores ou iguais a 66,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$  podem ser quantificadas com exatidão (INMETRO, 2010).

A taxa de recuperação pode variar de 70 a 120% e o coeficiente de variação até 20% (BRITO et al., 2003) para ser aceitável. Os valores encontrados no presente estudo estão de acordo com a literatura, visto que as percentagens de recuperação do sulfentrazone encontraram-se entre 95,88 e 108,99% e os coeficientes de variação entre 4,17 e 6,80%.

A bioaumentação com consórcio bacteriano apresentou resultados favoráveis em determinadas épocas e cultivos, reduzindo a intoxicação de *Sorghum bicolor* e, especialmente ao longo do tempo foi importante para o solo sem cultivo, contribuindo para diminuição da intoxicação a valor semelhante aos solos cultivados após 85 DAD. Contudo, até o final dos 85 DAD valores acima de 50% de intoxicação ainda foram observados (Figura 3A). Resíduos do sulfentrazone causaram clorose em plantas de sorgo aos 7 dias após a emergência (DAE), com evolução dos sintomas para necrose nas folhas jovens aos 15 DAE (DAN et al., 2010), injúrias, observadas neste trabalho, tipicamente provocadas pelos herbicidas inibidores da PROTOX.

Os resultados encontrados para a intoxicação e acúmulo de matéria seca do sorgo reforçam a sensibilidade exibida por *Sorghum bicolor* aos resíduos de sulfentrazone no solo. O bioensaio é uma ferramenta muito útil na investigação da atividade residual de herbicidas no solo, porque é capaz de detectar concentrações pequenas, muita das vezes não quantificadas por métodos cromatográficos, mas que são capazes de causar toxicidade nas plantas. Em estudo comparando a sensibilidade da cromatografia com a sensibilidade de *P. glaucum* como bioindicadora, Oliveira et al. (2014) concluíram que a espécie vegetal teve maior sensibilidade do que a técnica de CLAE para o sulfentrazone, uma vez que as mudanças na concentração do herbicida, causada pelo efeito prévio da fitorremediação de *Canavalia ensiformis* ou *Crotalaria juncea*, foram melhor identificadas pelo bioindicador.

A presença de resíduos de sulfentrazone a níveis tóxicos para espécies sensíveis pode inviabilizar o cultivo e, ou provocar perdas de produtividade (ARTUZI; CONTIERO, 2006; DAN et al., 2010). Elevada redução no acúmulo de matéria seca da parte aérea em relação à testemunha (52,3%), em consequência do efeito residual de sulfentrazone, foi verificada até mesmo quando o sorgo foi semeado 115 dias após a aplicação do herbicida, no cultivo anterior de soja (DAN et al., 2010). Além disso, os efeitos negativos causados pelo sulfentrazone no acúmulo de fotoassimilados refletiram na produtividade da cultura do sorgo, proporcionando uma redução de aproximadamente 1.000 kg ha<sup>-1</sup> (DAN et al., 2010).

Os tratamentos foram capazes de reduzir a concentração do sulfentrazone no solo, porém, os resíduos remanescentes ainda causaram alta intoxicação e redução no acúmulo de matéria seca da espécie bioindicadora. O aumento do tempo de biorremediação e, ou o aumento da carga de células bacterianas inoculadas pode ser

uma possibilidade para aumentar o potencial da técnica e a eficiência da biorremediação.

O efeito negativo da bioaumentação após 25 DAD nos solos cultivados (Tabela 5) pode estar relacionado à incapacidade ou ineficiência, nos estádios iniciais de crescimento das plantas, de estimular a microbiota, podendo ocorrer gastos energéticos na tentativa de sustentar a população microbiana aumentada em detrimento do crescimento vegetal e da capacidade de extração do sulfentrazone do solo pelas plantas. Por outro lado, a adição de consórcio bacteriano pode ter provocado mudanças na comunidade microbiana indígena do solo, requerendo tempo para que um novo equilíbrio fosse estabelecido, comprometendo assim, o processo de degradação. Pesquisadores relataram que a adição de micro-organismos exógenos pode afetar tanto a abundância quanto a estrutura da comunidade microbiana no solo (XIE et al., 2011; WANG et al., 2014). Wang et al. (2014) sugeriram que a inoculação da estirpe *Pseudomonas sp.* WBC-3 no solo afetou principalmente a estrutura da comunidade indígena bacteriana durante o processo de degradação do metil paration. Esses autores relataram que a abundância total de bactérias apresentada pelos perfis de DGGE demonstraram que uma redução da complexidade microbiana foi causada pela predominância numérica das estirpes inoculadas no tratamento com bioaumentação.

Na ausência de plantas a bioaumentação pode assumir papel de maior importância do que em solos cultivados. Resultados de estudos de campo mostraram que o bioaumento foi método eficiente para remoção de óleo diesel de solo contaminado. Após um ano de tratamento e concentração inicial  $10.000 \text{ mg kg}^{-1}$ , chegou-se ao valor final de  $937 \text{ mg kg}^{-1}$  nos solos com consórcio bacteriano, enquanto as parcelas sujeitas à atenuação natural apresentaram residual de óleo diesel de  $4230 \text{ mg kg}^{-1}$  (SZULC et al., 2014).

Apesar do baixo potencial para degradar o herbicida no solo apresentado nas duas últimas épocas, a inoculação mostrou-se importante para *Canavalia ensiformis*, uma vez que solos cultivados com essa espécie e não inoculados apresentaram pequena redução na concentração do herbicida durante as épocas de avaliação (Figura 3C). Os resultados favoráveis advindos da inoculação nos solos com feijão-de-porco, indicam, possivelmente, maior contribuição e dependência desta espécie do consórcio bacteriano. O fato do feijão-de-porco permanecer em estágio vegetativo até o final do experimento, sugere que, se o ensaio fosse conduzido por mais tempo, essa espécie poderia sobressair-se pela grande capacidade de fitoestimulação (PIRES, et al., 2005) e,

consequentemente, estímulo à rizodegradação. Por outro lado, o potencial máximo de biorremediação de solos cultivados com girassol pode ter sido alcançado, já que ao final do experimento este já se encontrava em estágio R6, caracterizado pela fase final de floração.

No presente trabalho, o monocultivo de girassol e o cultivo misto, tratamentos mais eficientes, reduziram em 64% o tempo de meia-vida do sulfentrazone comparado ao solo cultivado com feijão-de-porco sem inoculação e em 43% em relação aos tratamentos compostos pelos solos sem cultivo e monocultivo de feijão-de-porco na presença de inoculação (Figura 3C). Comparando os solos da rizosfera de três comunidades vegetais puras de *Phragmites australis*, *Acorus calamus* e *Zizania aquatica*, a comunidade mista formada de *P. australis* e *A. calamus* exibiu maior percentagem de biodegradação do butachlor (YANG et al., 2013). De acordo com esses autores, a meia-vida do herbicida em solos rizosféricos da comunidade mista foi 33, 51 e 57% mais curta, em comparação com as três comunidades vegetais puras, respectivamente. O cultivo misto de espécies fitorremediadoras de herbicidas ainda é prática pouco estudada e, como demonstrado neste trabalho, tem grande potencial para uso em programas de biorremediação.

O tempo de meia-vida é o tempo necessário para que 50% da quantidade de herbicida aplicada seja dissipada. Neste trabalho, a meia-vida do sulfentrazone variou entre 43, 62 e 82 dias, de acordo com a combinação entre plantas e inoculação com bactérias. Para o sulfentrazone, a meia-vida no solo foi reportada em experimentos de campo e de laboratório variando entre 24 e 302 dias, dependendo das condições experimentais e edafoclimáticas locais (OHMES et al. 2000; CHEN, 2003; MARTINEZ et al. 2008ab; BRUM et al., 2013). A meia-vida do sulfentrazone foi estimada em 146,5 e 172,4 dias em um Latossolo Vermelho e Argissolo Vermelho, respectivamente, mantidos a 27°C, 70% de umidade e fortificados com 0,7 µg g<sup>-1</sup> (MARTINEZ et al., 2008a; 2008b). Sob diferentes condições de umidade, temperatura e profundidades avaliadas, a meia-vida do sulfentrazone variou de 34 a 116 dias (BRUM et al., 2013).

Um dos subprodutos da degradação do sulfentrazone por plantas e animais é o metabólito 3-hidroxi metil sulfentrazone (HMS). Outros metabólitos do sulfentrazone incluem o ácido sulfentrazone carboxílico (ASC) e o 3-desmetilsulfentrazone (DMS) (EPA, 2014). Considerando a indisponibilidade comercial do HMS, Martinez et al. (2008b) isolaram esse composto a partir de urina de ratos. Assim, o metabólito HMS pode ser identificado, porém não quantificado, evidenciando a capacidade de bactérias e

fungos em metabolizar o sulfentrazone no solo. Esses autores relatam que o desaparecimento do composto de origem coincidiu com o aparecimento do metabólito no final do período experimental. Pela ausência e dificuldade de adquirir os padrões analíticos de metabólitos do sulfentrazone, neste estudo não foi analisado o aparecimento de possíveis picos correspondentes.

## CONCLUSÕES

O cultivo misto de feijão-de-porco e girassol e o monocultivo de girassol, independente da inoculação do solo com consórcio bacteriano, são as técnicas mais eficientes no processo de biorremediação do sulfentrazone no solo. O cultivo dessas espécies remediadoras por 85 DAD proporciona reduções na concentração do sulfentrazone no solo, porém, esse tempo não é suficiente para possibilitar o crescimento da planta indicadora sem a ocorrência de toxicidade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela bolsa e apoio concedido.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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-MG: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, v. 1. 2000. p. 299 - 352.

AGROFIT - **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. 2014. Disponível em: [http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons). Acesso em: 10 de novembro de 2014.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29/05/2003.

ALAM - ASOCIATION LATINOAMERICANA DE MALEZAS. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación em ensayos de control de malezas. **ALAM**, v. 1, n. 1, p. 35 - 38, 1974.

ARTUZI, J. P.; CONTIERO, R. L. Herbicidas aplicados na soja e produtividade do milho em sucessão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 7, p. 1119 - 1123, 2006.

BELO, F. A.; COELHO, A. T. C. P.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; SANTOS, J. B. Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta Daninha**, v. 29, n. 4, p. 821 - 828, 2011.

BLANCO, F.M.G.; VELINI, E.D.; BATISTA FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 69, p. 71 - 75, 2010.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e Discussão. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129 - 146, 2003.

BRUM, C. S.; FRANCO, A. A.; JÚNIOR, R. P. S. Degradação do herbicida sulfentrazone em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, n. 5, p. 558 - 564, 2013.

CANTARUTTI, R. B.; BARROS, N. F.; MARTINEZ, H. E. P.; NOVAIS, R. F. Avaliação da Fertilidade do solo e Recomendação de fertilizantes. In: NOVAIS, R. F.; ALVAREZ V., V. H.; BARROS, N. F.; FONTES, R. L. F.; CANTARUTTI, R. B.; NEVES, J. C. L. (eds) **Fertilidade do solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2007. p. 769 – 850.

CHEN, A. Sulfentrazone. In: LEE, P.W. (ed). **Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals**, v. 1. John Wiley, Chichester, 2003. p. 564 - 577.

DAN, H. A.; DAN, L. G. M.; BARROSO, A. L. L.; PROCÓPIO, S. O.; OLIVEIRA JR., R. S.; SILVA, A. G.; LIMA, M. D. B.; FELDKIRCHER, C. Residual activity of

herbicides used in soybean on grain sorghum crop succession. **PlantaDaninha**, v. 28, n. spe., p. 1087 - 1095, 2010.

EPA – United States Environmental Protection Agency. Federal register: Sulfentrazone; pesticide tolerances. 2003. Disponível em:

<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm> Acesso em: 20 setembro de 2013.

FREITAS, M. A. M.; PASSOS, A. B. R. J.; TORRES, L. G.; MORAES, H. M. F.; FAUSTINO, L. A.; ROCHA, P. R. R.; SILVA, A. A. Sorção do sulfentrazone em diferentes tipos de solo determinada por bioensaios. **PlantaDaninha**, v. 32, n. 2, p. 385 - 392, 2014.

GOULART, S. M., QUEIROZ, M. E. L. R., NEVES, A. A., QUEIROZ, J. H. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, p. 1320 - 1323, 2008.

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008, rev. 3, p. 1 - 20, 2010.

JACQUES, R.J.S.; SILVA, K. J. da; BENTO, F. M.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 280 - 287, 2010.

LANE, M.; LORENZ, N.; SAXENA, J.; RAMSIER, C.; DICK, R. P. Microbial activity, community structure and potassium dynamics in rhizospheresoil of soybean plants treated with glyphosate. **Pedobiologia - International Journal of Soil Biology**, v. 55, p. 153 - 159, 2012.

LITTELL, R. C.; MILLIKEN, G. A.; STROUP, W. W.; WOLFINGER, R. D.; SCHABENBERGER, O. **SAS<sup>®</sup> for Mixed Models, Second Edition**. Cary, NC: SAS Institute Inc. USA, 2006. 828p.

MADALÃO, J. C.; PIRES, F. R.; CARGNELUTTI FILHO, A.; CHAGAS, K.; NASCIMENTO, A.F.; GARCIA, G. O. Fitorremediação de solos contaminados com o herbicida sulfentrazone por espécies de adubos verdes. **Revista Ciências Agrárias.**, v. 55, p. 288 - 296, 2012.

MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“*Carryover*”). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, n. 2, p. 151 - 164, 2011.

MARCHESAN, E.; SARTORI, G. M. S.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O.; ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; MACEDO, V. R. M.; MARCHEZAN, M. G. Resíduos de agrotóxicos na água de rios da Depressão Central do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v. 40, n. 5, p. 1053 - 1059, 2010.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L.R. Microbial degradation of sulfentrazone in a brazilian Rhodic Hapludox soil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 209 - 217, 2010.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 40, p. 879 - 886, 2008a.

MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. **Geoderma**, v. 147, p. 56 - 62, 2008b.

MELO, C. A. D.; MEDEIROS, W. N.; TUFFI SANTOS, L. D.; FERREIRA, F. A.; TIBURCIO, R. A. S.; FERREIRA, L. R. Lixiviação de sulfentrazone, isoxaflutole e oxyfluorfen no perfil de três solos. **Planta Daninha**, v. 28, n. 2, p. 385 - 392, 2010.

MONQUERO, P. A.; SILVA, P. V.; SILVA HIRATA, A. C.; TABLAS, D. C.; ORZARI, I. Lixiviação e persistência dos herbicidas sulfentrazone e imazapic. **Planta Daninha**, v. 28, n. 1, p. 185 - 195, 2010.

MONQUERO, P. A.; CÔRREA, M. C.; BARBOSA, L. N.; GUTIERREZ, A.; ORZARI, I.; HIRATA, A. C. S. Seleção de espécies de adubos verdes visando à fitorremediação de diclosulam. **Planta Daninha**, v. 31, n. 1, p. 127-135, 2013.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technology**, v. 14, p. 100 - 105, 2000.

OLIVEIRA, M. A.; PIRES, F. R.; FERRAÇO, M.; BELO, A. F. The Validation of an Analytical method for sulfentrazone residue determination in soil using liquid chromatography and a comparison of chromatographic sensitivity to Millet as a bioindicator species. **Molecules**, v. 19, p. 10982 - 10997, 2014.

OTTO S.; CARDINALI, A.; MAROTTA, E.; PARADISI, C.; ZANIN, G. Effect of vegetative filter strips on herbicide runoff under various types of rainfall. **Chemosphere**, v. 88, p. 113 - 119, 2012.

PASSOS, A. B. R. J.; FREITAS, M. A. M.; TORRES, L. G.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F. Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 48, n. 8, p. 646 - 650, 2013.

PIRES, F. R. SOUZA, C. M.; CECON, P. R.; SANTOS, J. B.; TÓTOLA, M. R.; PROCÓPIO, S. O.; SILVA, A. A.; SILVA, C. S. W. Inferências sobre atividade rizosférica de espécies com potencial para fitorremediação do herbicida tebuthiuron. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 4, p. 627 - 634, 2005.

PIRES, F. R.; PROCÓPIO, S. O.; SOUZA, C. M.; SANTOS, J. B.; SILVA, G. P. Adubos verdes na fitorremediação de solos contaminados com o herbicida tebuthiuron. **Caatinga**, v. 19, p. 92 - 97, 2006.

PROCÓPIO, S. O.; PIRES, F. P.; SANTOS, J. B.; SILVA, A. A. **Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas**. Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2009. 32p. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953; 53).

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771 - 780, 2004.

SANTOS, E. A.; COSTA, M. D.; FERREIRA, L. R.; REIS, M. R.; FRANÇA, A. C.; SANTOS, J. B. 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.

SANTOS, E. A. ; CORREIA, N. M. ; SILVA, J. R. M. ; VELINI, E. D. ; PASSOS, A.B.R.J. ; DURIGAN, J. C. Detecção de herbicidas em água subterrânea na microbacia do Córrego Rico (SP). **Planta Daninha**, no prelo, 2015.

SILVA, L. O. C.; SILVA, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; LIMA, C. F.; ROCHA, P. R. R.; D'ANTONINO, L. Ação de *Eleusine coracana* na remediação de solos contaminados com picloram. **Planta Daninha**, v. 30, n. 3, p. 627 - 632, 2012.

SILVA, G. S.; MELO, C. A. D.; FIALHO, C. M. T.; TUFFI SANTOS, L. D.; COSTA, M. D.; SILVA, A. A. Impacto of sulfentrazone, isoxaflutole and oxyfluorfen on the microorganisms of two forest soils. **Bragantia**, v. 73, n. 3, p. 292 - 299, 2014.

SZULC A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAK, Q.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121 - 128, 2014.

VIEIRA, H. P., NEVES, A. A., QUEIROZ, M. E. L. R. Otimização e validação da técnica de extração líquido-líquido com partição em baixa temperatura (ELL-PBT) para piretróides em água e análise por CG. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 535 - 540, 2007.

XIE, J. P.; HE, Z. L.; LIU, X. X.; LIU, X. D.; VAN NOSTRAND, J. D.; DENG, Y.; WU, L. Y.; ZHOU, J. Z.; QIU, G. Z. GeoChip-based analysis of the functional gene diversity and metabolic potential of microbial communities in acid mine drainage. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, p. 991 - 999, 2011.

WANG, L.; CHI, X. Q.; ZHANG, J. J.; SUN, D. L.; ZHOU, N. Y. Bioaugmentation of a methyl parathion contaminated soil with *Pseudomonas* sp. strain WBC-3. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 87, p. 116 - 121, 2014.

YANG, C.; YULAI, W.; WANG, M.; CHEN, H. Plant species influence microbial metabolic activity and butachlor biodegradation in a riparian soil from Chongming Island, China. **Geoderma**, v. 193 - 194, p. 165 - 171, 2013.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho avaliou-se a eficiência da associação entre o consórcio microbiano e plantas remediadoras na biorremediação de solo contaminado com o sulfentrazone. Por meio dos resultados obtidos conclui-se que:

É possível isolar bactérias degradadoras do sulfentrazone a partir de solo com histórico de aplicação do herbicida. *Pseudomonas* é o gênero predominante entre os isolados obtidos. Os isolados bacterianos variam quanto à capacidade de degradar o ingrediente ativo na formulação comercial ou no padrão técnico. Os isolados obtidos apresentam potencial de uso em programas de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

A adição de consórcio formado por *Pseudomonas spp.* ao solo contaminado com sulfentrazone promove o crescimento das espécies remediadoras girassol e feijão-de-porco, sendo a resposta do feijão-de-porco à inoculação mais efetiva e duradoura. A promoção de crescimento está relacionada ao tempo de cultivo e à combinação das espécies vegetais. Tal habilidade apresentada pelo consórcio bacteriano e pelas plantas pode contribuir para o processo de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

Por meio de indicadores microbiológicos pode-se constatar que solos sem cultivo apresentam menor biomassa e atividade microbiana do que solos cultivados. As espécies fitorremediadoras, em monocultivo ou cultivo misto, têm capacidades distintas de estimular os micro-organismos rizosféricos. *Canavalia ensiformis* na presença de consórcio bacteriano é capaz de proporcionar maior atividade da microbiota associada e sustentar maior biomassa microbiana.

O cultivo misto de feijão-de-porco e girassol e o monocultivo de girassol, independente da inoculação do solo com consórcio bacteriano, são as técnicas mais eficientes no processo de biorremediação do sulfentrazone no solo. O cultivo dessas espécies remediadoras por 85 dias após o desbaste proporciona reduções na concentração do sulfentrazone no solo, porém, esse tempo não é suficiente para possibilitar o crescimento da planta indicadora *Sorghum bicolor* sem a ocorrência de toxicidade. A fitorremediação associada à bioaugmentação é técnica promissora para a biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

Os resultados obtidos contribuem para o avanço nos conhecimentos sobre a biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone, de modo a integrar plantas e bactérias degradadoras ao processo. Como comprovado neste trabalho, a inoculação com micro-organismos selecionados, dotados de múltiplas habilidades, pode promover o crescimento das espécies fitorremediadoras, potencializando o seu papel na fitoestimulação e rizodegradação de herbicidas no solo.

O cultivo de duas espécies vegetais distintas, associadas à bioaugmentação abre novas perspectivas para o estudo da biorremediação de solos contaminados com herbicidas no Brasil. O potencial fitorremediador, bem como a fitoestimulação da microbiota do solo podem ser incrementados quando duas espécies são implantadas ao mesmo tempo numa mesma área. Contudo, considerando que tanto a complexidade do sistema, quanto as chances de interações entre plantas e micro-organismos são também elevadas, a adoção dessa prática deve ser estudada para cada situação.

Assim, conhecendo-se melhor os efeitos da associação entre plantas fitorremediadoras e micro-organismos na biorremediação de solos contaminados com o herbicida sulfentrazone, pode-se acelerar e otimizar o processo de descontaminação, disponibilizando a área para o cultivo de espécies sensíveis mais rapidamente, além de reduzir os potenciais riscos de contaminação ambiental.