

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**FITORREMEDIÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-
ORGANISMOS DE SOLO CONTAMINADO COM
HEXAZINONA**

Autora: Vanessa Silva Santos
Orientador: Adriano Jakelaitis
Coorientadora: Paula Fabiane Martins

RIO VERDE -GOIÁS
Fevereiro/2018

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**FITORREMEDIÇÃO DE SOLO CONTAMINADO COM
HEXAZINONA ASSISTIDA POR MICRO-ORGANISMOS**

Autora: Vanessa Silva Santos
Orientador: Adriano Jakelaitis
Coorientadora: Paula Fabiane Martins

Dissertação apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, na linha de pesquisa Agroquímica Ambiental.

RIO VERDE -GOIÁS
Fevereiro/2018

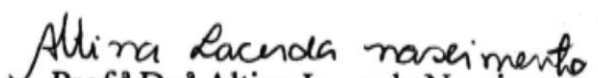
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

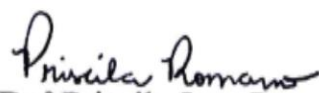
**FITORREMEDIAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-
ORGANISMOS DE SOLO CONTAMINADO COM
HEXAZINONA**


Autora: Vanessa Silva Santos
Orientador: Adriano Jakelaitis


TITULAÇÃO: Mestre em Agroquímica – Área de concentração
Agroquímica.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2018.


Prof.^a Dr.^a Altina Lacerda Nascimento
Avaliadora externa
IF Goiano/RV


Prof.^a Dr.^a Priscila Jane Romano de
Oliveira Gonçalves
Avaliadora externa
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Paulo Sérgio Pereira
Avaliador interno
IF Goiano/RV


Prof. Dr. Adriano Jakelaitis
Presidente da banca
IF Goiano/RV

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e por não me deixar esmorecer diante das dificuldades diárias.

Aos meus pais, Cairo e Irlanda, por me incentivarem, encorajarem, por terem me ensinado sobre integridade, responsabilidade e amor. Devo tudo a vocês.

Ao meu namorado, Wilker Urzeda, por ter colocado a mão na massa, pelos questionamentos levantados, e principalmente por me proporcionar ótimos momentos.

Ao Instituto Federal Goiano Campus Rio Verde, por me permitir aprender e crescer durante sete anos.

À Capes, pela concessão da bolsa.

Ao meu orientador Adriano Jakelaitis, pela confiança depositada em mim, por me nortear, motivar, ensinar sobre a ética na pesquisa, pela generosidade no tempo disponibilizado para sanar dúvidas e montar os experimentos. Exemplo de pessoa humilde e íntegra, que contribuiu acadêmica e pessoalmente.

À minha coorientadora Paula Fabiane, que mesmo distante se fez presente, com orientações via Skype e WhatsApp. Sempre, a cada vinda ao IF, quando tudo estava dando errado me motivava e fazia acreditar que daria certo.

À professora Priscila Romano, chegando depois, mas sempre com as portas abertas para auxiliar e tirar dúvidas.

Ao professor Paulo Sérgio, por possibilitar a realização de análises e por aceitar participar da banca.

À Altina Lacerda, pelas conversas de corredor breves e enriquecedoras, e por aceitar participar da banca.

À equipe do Laboratório de Plantas Daninhas: Leandro, Gustavo Silva, Gustavo Dorneles, Jeovane, Suzete e Simonny, que me auxiliaram com muita boa vontade e responsabilidade. Agradeço pela valorosa amizade, pelos momentos de descontração que fizeram com que a caminhada ficasse mais leve.

À equipe do Laboratório de Microbiologia Aplicada: Ana Cristina, Ana Flávia, Jannifer, Diego pelos auxílios, e em especial à Paula Sperotto, pela dedicação ao me ensinar e ajudar. Agradeço pela oportunidade de ter convivido e aprendido tanto com esse ser humano lindo. Amizade que levarei para a vida.

Ao laboratório de Microbiologia do Solo, em especial à Cintia Faria, pelo auxílio e amizade oferecida.

Ao laboratório de Genética Bioquímica de Plantas – Esalq/UsP, por permitir utilizar as dependências. Em especial à Lucélia Borgo, por todo auxílio prestado, pelas boas conversas e momentos de descontração.

Ao Laboratório de Sementes, e à Kelly, pelo auxílio nas análises.

À turma da orgânica: Zeca, Tainara, Carol, Mailon, Laura, Rafaela, Lorena, Romário, Valéria, pelos sufocos, auxílios e momentos divertidos.

À Valéria Ferreira, da qual admiro a bondade e humildade, pela amizade e disponibilidade em ajudar nas análises,

Ao laboratório de ecofisiologia vegetal.

À Luciana Minervina, pelo auxílio com análises, dados, ideias e discussões.

À minha tia Nilvânia, pelas contribuições e observações na parte escrita do trabalho.

Enfim, a todos os professores que contribuíram para minha formação, família e amigos que contribuíram para a realização deste trabalho.

DEDICATÓRIA

*Ao meu eterno Avôhai, Brás
Batista (in memoriam), cujos
ensinamentos permanecem
presentes na minha vida.*

BIOGRAFIA DA AUTORA

VANESSA SILVA SANTOS, filha de Irlanda Damas Silva Medeiros e Cairo dos Santos e Silva, nasceu em 14 de janeiro de 1994, na cidade de Rio Verde-GO. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Martins Borges, em 2010. Ingressou no curso de Engenharia Ambiental em 2011, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde. Foi aluna de Iniciação Científica e desenvolveu projetos de extensão ao longo do curso.

Concluiu a graduação em março de 2016. No mesmo mês, foi admitida no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, no Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Hexazinona	14
2. Alternativas para a descontaminação de solo através de organismos vivos	15
2.1 Biorremediação.....	15
2.2 Bioaugmentação	16
REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO I	25
Seleção de espécies vegetais tolerantes à hexazinona	25
1. INTRODUÇÃO	26
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
3. RESULTADOS	28
3.1 Fitointoxicação aos 30 DAE.....	29
3.2 Fitointoxicação 60 DAE	31
3.3 Altura aos 30 DAE	33
3.4 Altura aos 60 DAE	35
3.5 Produção de biomassa da parte aérea	37
3.6 Produção de biomassa da raiz.....	39
4. DISCUSSÃO.....	41
5. CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	42
CAPÍTULO II.....	45
Seleção de micro-organismos e preparo de inoculantes com potencial de aplicação na remediação de solos contaminados com hexazinona.....	45
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	47
2.1 Isolamento microbiano de solo contaminado com hexazinona.....	47
2.1 Extração de DNA e amplificação do gene 16S rDNA	48
2.2 Árvore de similaridade para identificação dos isolados bacterianos.....	48
2.5 Preparo de inoculantes bacterianos para aplicação em fitorremediação assistida por Micro-organismos (FAM).....	50
2.5.1 Curvas de crescimento de micro-organismos solubilizadores de fosfato	50
3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	50

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
4.1 Isolados microbianos tolerantes à hexazinona	50
4.2 Identificação molecular por gene 16S rDNA	52
4.3 Micro-organismos solubilizadores de fosfato de ferro	53
4.4 Micro-organismos solubilizadores de fosfato de cálcio	55
4.5 Curva de crescimento	56
5. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS.....	59
CAPÍTULO III.....	65
Cajanus cajan assistida por <i>B. pumillus</i> e <i>S. maltophilia</i> para fitorremediação de solo contaminado com hexazinona.....	65
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAIS E MÉTODOS	67
2.1 Inoculantes bacterianos de micro-organismos solubilizadores de fosfato	68
2.2 Inoculação em sementes	68
2.3 Avaliações biométricas.....	69
2.4 Amostragem de solo e planta	69
2.6 Peroxidação lipídica	70
2.7 Preparo das amostras para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ..	71
2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de solo e planta ..	71
3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	72
4.1 Inoculantes bacterianos de <i>B. pumillus</i> , <i>S. maltophilia</i> e consórcio.....	72
4.2 Avaliações biométricas.....	72
4.3 Determinação de trocas gasosas	73
4.4 Peroxidação lipídica	74
4.5 Quantificações cromatográficas do herbicida no solo e planta por CLAE	75
5 CONCLUSÕES.....	78
REFERÊNCIAS.....	79
CONCLUSÃO GERAL.....	82

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

- Figura 1** – Índice de massa seca de raiz aos 60 dias – As letras representam as diferenças significativas entre espécies..... 41
- Figura 2** – Índice de massa seca da raiz em função do aumento da dose 41

Capítulo II

- Figura 1** – Meio rico com herbicida (MRCH); Meio rico sem herbicida (MRSH); Meio mínimo com herbicida (MMCH) Meio mínimo sem herbicida (MMSH). Sendo a e b as diferenças significativas entre os tratamentos..... 51
- Figura 2** – Análise de similaridade baseado em sequências de rRNA 16S parciais, mostrando as relações entre sequências de isolados bacterianos de solo contaminado e alguns de seus parentes filogenéticos mais próximos (indicado pelo número de acesso). Burkholderia cepacia (AB3347661) foi utilizado como grupo externo..... 54
- Figura 3** – Curva de crescimento bacteriano de *Bacillus pumillus*. Absorbância por tempo. Unidades formadoras de colônias em cada tempo..... 58
- Figura 4** – Curva de crescimento bacteriano de *Stenotrophomonas maltophilia*. Absorbância por tempo. Unidades formadoras de colônias em cada tempo..... 59

Capítulo III

- Figura 1** – Cromatogramas referentes a padrão de hexazinona, solo e tecido vegetal. Relação de tempo e área observada..... 76

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

- Tabela 1** – Fitointoxicação 30 DAE – Doses ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$) aplicadas do herbicida. As letras representam as diferenças significativas dentro de cada dose. A equação, representa a regressão para cada espécie 31
- Tabela 2** – Fitointoxicação 60 DAE - Doses ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$) aplicadas do herbicida. As letras representam as diferenças significativas dentro de cada dose. A equação, representa a regressão para cada espécie..... 33
- Tabela 3** – Altura 0 DAE - Doses ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$) aplicadas do herbicida. As letras representam as diferenças significativas dentro de cada dose. A equação, representa a regressão para cada espécie..... 35
- Tabela 4** – Altura 60 DAE - Doses ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$) aplicadas do herbicida. As letras representam as diferenças significativas dentro de cada dose. A equação, representa a regressão para cada espécie..... 37
- Tabela 5** – Produção de biomassa da parte aérea (60 DAE) - Doses ($\text{g}\cdot\text{ha}^{-1}$) aplicadas do herbicida. As letras representam as diferenças significativas dentro de cada dose. A equação representa a regressão para cada espécie 39

Capítulo II

- Tabela 1** – Isolados bacterianos de meio rico e meio mínimo. Sendo, S: oriundos do solo, C: crescidos na presença de herbicida, R: meio rico, M: meio mínimo..... 52
- Tabela 2** – Isolados do solo identificados por análise de similaridade no banco de dados GenBank..... 53
- Tabela 3** – Concentração de Fe solubilizado por cepas bacterianas isoladas de solo contaminado e valores de pH. As letras a, b, c, d, e, f representam as diferenças significativas entre os tratamentos..... 55
- Tabela 4** – Concentração de Ca solubilizado por cepas bacterianas isoladas de solo contaminado e valores de pH. As letras a, b, c, d, e, f representam as diferenças significativas entre os tratamentos..... 56

Capítulo III

- Tabela 1** – SHSI – tratamento sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2. DAE – dias após aplicação. Letras minúsculas representam as diferenças estatísticas..... 73
- Tabela 2** – Determinação de trocas gasosas em *C. cajan*. As letras minúsculas representam as diferenças significativas. Tratamentos SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2, representado por F(A), sendo 30 e 60d os intervalos de avaliação de cada variável representado pelo F(B)..... 74

- Tabela 3** – Peroxidação lipídica em células vegetais de *C. cajan* na presença de hexazinona. Tratamentos: SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2..... 75
- Tabela 4** – Quantificação de hexazinona em tecido vegetal de *C. cajan* (mg.g¹) Tratamentos: SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2..... 77
- Tabela 5** – Quantificação de hexazinona em solo tratado com *C. cajan* e inoculantes (mg.g¹) Tratamentos: SHSI –sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 –com herbicida, inóculo 2; CH1+2 –com herbicida, inóculo 1 + 2..... 78

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES

DAE	Dias após a emergência
MSPA	Massa seca da parte aérea
MSR	Massa seca de raiz
PSII	Fotossistema II
Sw	Solubilidade
Kow	Coefficiente de partição em água
pKa	Constante de dissociação
CTC	Capacidade de troca de cátions
UFC	Unidade formadora de colônia
PCR	Reação em cadeia polimerase
DO	Densidade óptica
FePO ₄	Fosfato de ferro
Ca ₃ (PO ₄) ₂	Fosfato de cálcio
MDA	Malondialdeído
TCA	Ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tricloroacético
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência

RESUMO

SANTOS, VANESSA SIVA. Instituto Federal Goiano – Campus Rio Verde, Rio Verde-GO, fevereiro de 2018. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Agroquímica). **Fitorremediação assistida por micro-organismos de solo contaminado com hexazinona.** Orientador: Dr. Adriano Jakelaitis, Coorientadora: Dr^a Paula Fabiane Martins.

Agroquímicos, quando utilizados em demasia, podem causar riscos ao ambiente e à saúde humana. Com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para descontaminação de ambientes, como a fitorremediação assistida por micro-organismos, que se mostra eficiente na recuperação de ambientes com diversos xenobióticos. Sendo assim, foram investigadas ferramentas para fitorremediar o solo com hexazinona, herbicida largamente usado na cultura da cana-de-açúcar com potenciais riscos ao ambiente. Realizou-se uma pré-seleção de plantas tolerantes à molécula, através de avaliações biométricas, bem como micro-organismos tolerantes e com capacidade de solubilização de fosfato de cálcio. *Cajanus cajan* foi selecionada como a espécie mais tolerante ao herbicida e *Bacillus pumillus* e *Stenotrophomonas maltophilia* como as bactérias tolerantes e potenciais promotoras de crescimento vegetal. A espécie vegetal e inoculantes microbianos foram aplicadas como tratamento para remediar o solo com hexazinona. Em seguida, foram avaliadas altura, fitointoxicação, trocas gasosas, peroxidação lipídica dos tecidos vegetais e quantificação do herbicida na planta e solo por CLAE. Não foram observadas diferenças significativas para os tratamentos, porém, a planta não sofreu estresses fisiológicos, sendo que houve pequena acumulação do herbicida na parte aérea, a concentração de herbicida nas amostras de solo, foi menor aos 60 dias.

Palavras-chave: Agroquímicos, fitorremediação, micro-organismos, solo, hexazinona.

ABSTRACT

Agrochemicals, when overused, can cause risks to the environment and human health. Thus, it is necessary to develop new technologies for decontamination of environments decontamination, such as phytoremediation through microorganisms, which is efficient in the recovery of environments with various xenobiotics. So, it was investigated tools for the phytoremediation of soil with hexazinone, an herbicide widely used in sugarcane cultivation with potential risks to the environment. It was carried out a pre-selection of tolerant plant to the molecule was carried out through biometric evaluations as well as tolerant microorganisms and with calcium phosphate solubilizing capacity. *Cajanus cajan* was selected as the most tolerant to herbicide and *Bacillus pumillus* and *Stenotrophomonas maltophilia* as tolerant bacterias and potential plant growth promoters. The plant species and microbial inoculants were applied as a treatment to remedy soil contaminated by hexazinone. Following height, phytotoxification, gas exchange and lipid peroxidation of the plant tissues and herbicide quantification in the plant and soil by HPLC were evaluated. No significant differences were observed for treatments,

however, the plant did not undergo physiological stress, and there was a small accumulation of the herbicide in the aerial part, and also the soil samples decreased the concentration of herbicide after 60 days.

Key words: Agrochemicals, phytoremediation, microorganisms, soil, contamination.

1. INTRODUÇÃO

Com o crescimento exponencial da população humana, torna-se necessário o aumento da produtividade e o desenvolvimento na agricultura para otimizar a produção de alimentos e atender a demanda. Para maior produtividade, o uso de agrotóxicos é relevante no tratamento prévio das sementes, durante o cultivo e após a colheita (OLIVEIRA, 2016).

Conforme a legislação brasileira, nº 7.802/1989, agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas e também ambientes urbanos, hídricos e industriais. (BRASIL, 2016). O uso indiscriminado de agrotóxicos é um dos principais motivos a contribuir com a contaminação de solos e águas subterrâneas no mundo, além de influenciar o desaparecimento de insetos úteis e o surgimento de novas pragas (OLIVEIRA, 2016).

A agricultura consome cerca de 85% da produção mundial de agrotóxicos. Os herbicidas utilizados no controle de ervas daninhas são os mais aplicados na agricultura em todo o mundo. O Brasil, por possuir extensas áreas agricultáveis, é líder no consumo de agroquímicos (INCA, 2015). De acordo com o IEA – Instituto de Economia Agrícola (2014), a venda de agrotóxicos no Brasil, em 2013, chegou a 826,7 mil toneladas, somando o valor de US\$ 11,45 bilhões, que representa cerca de 18% a mais que no ano anterior. Herbicidas alcançaram a marca de 487.743 mil toneladas, representando 54% do total de agroquímicos vendidos, seguidos por inseticidas e fungicidas com 26,1% e 11,4%, respectivamente.

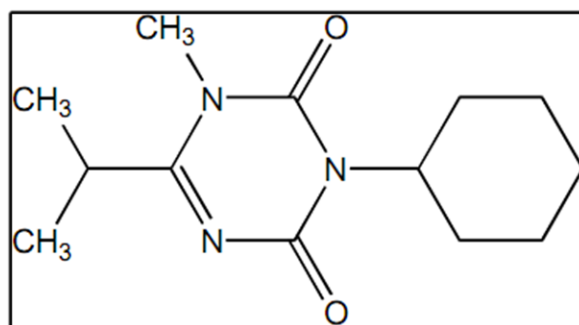
Alguns herbicidas apresentam longo efeito residual no solo, situação importante quando o período de interferência de plantas daninhas na cultura é maior, e, por isso, podem exercer controle efetivo sem a necessidade de repetir aplicações. Porém, após o término da cultura, o efeito passa a ser indesejado. Diante disso, aumenta-se a necessidade de impedir ou remediar o efeito negativo causado pela presença de herbicidas no solo. A remediação pode ocorrer

química, física ou biologicamente, através de micro-organismos e plantas (PROCÓPIO et al., 2009; DAN et al., 2011).

1.1 Hexazinona

Hexazinona é um herbicida da família das triazinas, cuja fórmula química condensada é $C_{12}H_{20}N_4O_2$ (Figura 1) com nome de acordo com a IUPAC [3-ciclohexil-6-dimetilamino-1-metil-1,3,5- triazina-2,4-(H1,3H)-diona].

Figura 1 – Estrutura da hexazinona (FAO, 2012).



Utilizado em várias culturas para o controle de ervas daninhas, folhas largas e gramíneas, na cana-de-açúcar, pode-se considerar significativa utilização (PRIVMAN; ZUMAN, 1998). Sua aplicação ocorre em pré e pós-emergência, sendo classificado quanto à toxicidade como classe III, de acordo com a ANVISA (2016).

Em relação às características físico-químicas da molécula, observa-se que sua solubilidade (S_w) em meio aquoso a 25 °C é de 33 $g.L^{-1}$ para a IUPAC (2017) e 29,8 $g.L^{-1}$ para a FAO (2017). Ambos favorecem a sua lixiviação. Com coeficiente de partição em água (K_{ow}) de 1,96, ou seja, são hidrofílicos e possuem baixa sorção no solo e meia-vida de um ano na temperatura ambiente. A constante de dissociação (pK_a) é de 1,8, sendo que, para solos alcalinos, apresenta alta disponibilidade na solução do solo (FAO, 2017). Foi relatado por Rodrigues e Almeida (2011), uma meia-vida de três a seis meses. E, de 79 dias, em campo para Yassur (1999).

O mecanismo de ação desse herbicida é a inibição da fotossíntese, através da inibição do fluxo de elétrons do fotossistema II (PSII), inibindo a fotossíntese (RODRIGUES, ALMEIDA, 2011). Sendo assim, os elétrons não são armazenados como energia química (ATP

e NADPH) e formam radicais livres que causam danos nos lipídeos das membranas celulares, chamado de peroxidação (MARCHI, et al. 2008).

Devido às suas características, a molécula é pouco suscetível à hidrólise e à fotólise (ZHU, 2002), portanto o residual pode permanecer por vários meses no ambiente (FERNANDEZ, 2001). Como citado por Wang (2009), o hexazinona já foi encontrado em água subterrânea e solos, provocando preocupações quanto à segurança para a saúde humana. A sua degradação se dá principalmente através do metabolismo microbiano nos solos e não é significativamente afetada por fotodegradação ou degradação química (WANG et al. 2006).

2. Alternativas para a descontaminação de solo através de organismos vivos

2.1 Biorremediação

A EPA (2017) define a biorremediação como sendo a utilização de organismos vivos como ferramenta para a limpeza de poluentes no solo, água ou águas residuais. Portanto, não apenas organismos vivos estão inseridos na estratégia de biorremediação, enzimas microbianas também podem ser envolvidas na degradação e transformação de diversos poluentes (GLAZER; NIKAIDO, 1995; DUA et al., 2002; SHARMA et al., 2018), sendo um método efetivo e de baixo custo (KARIGAR; RAO, 2011).

Essa técnica é considerada promissora pela eficiência, baixo custo e pouco impacto ecológico. Comparando organismos vivos que degradam poluentes orgânicos, métodos físicos e químicos de remoção, os micro-organismos apresentam melhores resultados (MEGHARAJ, 2011). A utilização de micro-organismos pode neutralizar ou eliminar poluentes de ambientes contaminados (GUPTA et al., 2016).

Estudos mostram que solos contaminados com pesticidas podem ser remediados por inoculação com micro-organismos especificamente adaptados (MASSIHA et al., 2011). Além da biodegradação por bactérias, linhagens de fungos de diferentes gêneros já foram caracterizados como potenciais degradadores de pesticidas (MAGBOOL et al., 2016). Diversos métodos para a remoção de poluentes no solo são estudados. Estes compreendem abordagens físico-químicas e biológicas. Embora tratamentos físico-químicos sejam mais eficazes, o processo é oneroso por causa da demanda de energia e reagentes químicos. Portanto,

o tratamento biológico torna-se uma tecnologia atrativa pela viabilidade em relação ao custo e eficácia, além das vantagens ecológicas (WU et al., 2016). Nele, pode ocorrer a degradação de poluentes orgânicos por organismos vivos (CRISTHI, 2013), transformando-os em compostos menos tóxicos, que, posteriormente, são mineralizados, ou seja, ocorre a modificação da molécula em água e CO₂, óxidos e sais minerais (GOMEZ; SARTAJ, 2014).

Com isso, técnicas de biorremediação têm sido utilizadas como mecanismo de descontaminação de solos infectados com pesticidas (WOJCIESZYŃSKA, 2013), produtos derivados de petróleo (SMULEK, 2015), compostos farmacêuticos (WOJCIESZYŃSKA, 2014), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (RODGERS-VIERA, 2015), corantes orgânicos (MOHAMED, 2016) e metais pesados (WASILKOWSKI, 2014).

Já foram citadas na literatura, diversas formas de biorremediação, como a bioestimulação, que depende da adição de nutrientes como nitrogênio e fósforo para favorecer o metabolismo de micro-organismos auxiliares na biodegradação de xenobióticos (MORILLO; VILLAVERDE, 2017), constatada como eficiente para pesticidas organoclorados (ISLAS-GARCIA et al., 2015), DDT (ORTÍZ et al., 2013), e diuron (RUBIO-BELLIDO et al., 2015).

A bioaumentação, que consiste no aumento da população microbiana do solo também foi constatada como eficiente na degradação do herbicida molinato, por consórcio bacteriano de *Stenotrophomonas* e *Bacillus* (LOPES et al., 2012), sendo *Bacillus*, responsável pela degradação de inseticidas (SALUNKHE et al., 2015) clorpirifós (FARHAN, 2014) e atrazina (SINGH; CAMEOTRA, 2014).

2.2 Bioaumentação

A bioaumentação é o aumento do potencial catabólico de micro-organismos do solo para a degradação de poluentes, através da inoculação com linhagens individuais ou consórcio de bactérias e fungos, além de micro-organismos geneticamente modificados.

Dentre as características desejáveis para um potencial de biodegradação, salienta-se rápido crescimento, facilidade no cultivo, tolerância a altas concentrações de poluentes, além de condições ambientais (MROZIK; PITROWASKA-SEGET, 2010), sendo que os micro-organismos são isolados de ambientes contaminados, utilizando meio de cultura rico (SEMRARY, 2012).

Para Fang (2010), a habilidade na bioaugmentação depende de fatores ambientais como temperatura, pH, teor de matéria orgânica e concentração do pesticida. Estudos que elucidam a degradação de pesticidas não estão ligados somente à capacidade microbiológica de degradação, mas também possuem correlação com o tipo de solo, como teor de argila e matéria orgânica, que favorecem a degradação (CYCÓN, 2017).

Além dos fatores abióticos, a eficiência da bioaugmentação está ligada à capacidade do inoculante em sobreviver em meio contaminado, sendo que o número de micro-organismos tende a diminuir durante os primeiros dias, depois a população é estabelecida (HONG et al., 2007). Ramadan et.al., (1990) sugerem inóculos com densidades superiores a 10^4 células por grama de solo, pois abaixo dessa concentração, apenas pequena parte das bactérias consegue sobreviver à competição e participar da degradação.

Lima et al. (2009) mostram a efetiva utilização da bioaugmentação para solos contaminados com pesticidas derivados de triazina. Morganete et al. (2010) observaram a remoção de simazina em solo, com auxílio de micro-organismos.

Existe uma diversidade microbiana nos compartimentos ambientais solo e água, com ampla capacidade natural de degradar e transformar poluentes. Essa capacidade é atribuída à diversidade do metabolismo e à capacidade para incorporação de mudanças genéticas, que podem favorecer e aprimorar estes processos (DAS; CHANDRAN, 2011). Os agentes biológicos que atuam como ferramentas na biorremediação utilizam os contaminantes como fonte de nutrientes ou energia (NITI et al., 2013).

2.4 Fitorremediação

A fitorremediação consiste na utilização de plantas para detoxificar ambientes contaminados (SALT et al., 1998). Pode ser utilizada para remover contaminantes orgânicos do solo através de mecanismos da planta ou da interação planta e micro-organismo (GERHARDT et al., 2009). A habilidade da planta de estimular a microbiota associada a ela para promover a degradação rizosférica, bem como a tolerância que exibem ao herbicida, possibilita que o contaminante seja extraído e metabolizado pela própria planta (CUNNINGHAM et al., 1998).

O crescimento das plantas altera as propriedades do solo, pois há a estimulação das comunidades microbianas na rizosfera, devido ao crescimento das raízes, que descompactam o

solo e permitem a movimentação de oxigênio e água (GERHARDT et al., 2009). Esse processo libera, através das raízes, ácidos orgânicos capazes de alterar as propriedades químicas do solo, podendo auxiliar a biodisponibilidade e a degradação de contaminantes do solo (STEPHENSON et al., 2014).

As plantas possuem enzimas no seu metabolismo secundário, como enzimas hidrolíticas, transferases, oxidades e redutases, que possuem mecanismos capazes de detoxificar diversas toxinas orgânicas sintéticas, como os xenobióticos. Essas habilidades favorecem a fitorremediação (MADELBAUM et al., 1995), sendo que a capacidade de captura dessas moléculas depende das características do contaminante, das condições do compartimento ambiental, como pH, teor de matéria orgânica, temperatura, salinidade e umidade, bem como o perfil das espécies vegetais utilizadas, como robustez do sistema radicular, adaptação à diferentes condições, tipos de enzimas, mecanismos específicos e taxa fotossintética da planta (SUSARLA, 2002; TURGUT, 2005).

Portanto, o destino dos xenobióticos no solo, como os herbicidas, estão intimamente relacionados à presença da vegetação, pois faz com que, geralmente, aqueles sejam removidos mais rapidamente, se comparado com solo sem cobertura (SINGH et al., 2004). Porém, a eficiência do desenvolvimento da planta também está correlacionada à atividade microbiana do solo, sendo que na região da rizosfera são liberados ácidos orgânicos, carboidratos e aminoácidos presentes nos exsudatos radiculares, estimuladores da atividade microbiológica (CURL; TRUELOVE, 1986).

A desintoxicação dos ambientes pelas plantas se dá por vários mecanismos. Por exemplo, fitoextração, que se ocorre pela absorção do contaminante pelas raízes e sua acumulação na biomassa (RAFATI, 2011); fitoestabilização, que consiste na utilização de plantas para estabilizar contaminantes no solo (SING, 2012); fitoestimulação e fitovolatilização, que absorve o poluente do solo e o converte em uma forma volátil, podendo ser liberado para a atmosfera (PADMAVATHIAMMA; LI, 2007); fitodegradação, em que há a degradação de poluentes orgânicos com o auxílio de enzimas, rizodegradação, que ocorre na rizosfera através de micro-organismos e enzimas que são liberadas pelas espécies vegetais e são capazes de degradar o contaminante (YADAV et al., 2017). A eficiência desses fatores, porém, está relacionada com a produção de biomassa da espécie vegetal, que deve apresentar bom crescimento na presença de pesticidas (PEREZ et al., 2009).

Madalão (2012) selecionou *Helianthus annuus* e *Canavalia ensiformis* como espécies

eficientes na fitorremediação de solos contaminados com sulfentrazone. *Stizobium aterrimum* (mucuna-preta) e *Canavalia ensiformis* também foram estudadas por Procópio et al. (2007). Esses pesquisadores observaram a capacidade de reduzir concentrações de trifloxysulfuron sodium no solo, em condições controladas e no campo. Carmo et al. (2008) selecionaram *Eleusine coracana* (capim-pé-de-galinha-gigante) e *Panicum maximum* como espécies potencialmente remediadoras de picloram. Sánchez et al. (2017) investigaram a capacidade de milho, azevém e cevada na remediação de herbicida do grupo químico das triazinas e todas apresentaram resultados de bioacumulação. Com isso, torna-se necessário o avanço de estudos para desvendar potencialidades provenientes de diversas espécies vegetais, para distintos xenobióticos.

REFERÊNCIAS

Agency Environmental Protection (EPA). Bioremediation. Disponível em: <https://www.epa.gov/> <acesso em: janeiro de 2018>.

Brasil. Lei nº 7.802, de julho de 1989. Dispõe sobre a utilização de agrotóxicos. In: Legislação federal de agrotóxicos e afins. **DOU Diário Oficial da União**. Brasília (DF): Ministério da agricultura e do abastecimento. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm. <acesso em janeiro de 2018>.

Carmo, M. L.; Procópio, S. O.; Pires, F. R.; et al. Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram. **Planta daninha**, v. 26, p. 301-313, 2008.

Chishti, Z.; Hussain, S.; Arshad, K.R.; Khalid, A.; Arshad, M. microbiological degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. **Journal of Environmental Management**, v.114, p. 372-380, 2013.

CUNNINGHAM, S. D. Lead Phytoextraction: Species Variation in Lead Uptake and Translocation. **New Phytologist**, v. 134, p. 75-84, 1996.

Curl, E.A.; Truelove, B. The rhizosphere. **Advances Series in Agricultural Sciences**. v. 15, 1986.

Cycón, M.; Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: A review. **Chemosphere**. v. 172, p.52-71, 2017.

Das, N.; Chandran, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**.v. 2011, 2011.

Dua, M.; Singh, A.; Sethunathan, N.; Johri, A. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 59, p. 143-152, 2002.

Fang, H.; Dong, B.; Yan, H.; Tang, F.; Yu, Y. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, p. 281-289, 2010.

Farhan, M.; Ali-Butt, Z.; Khan, A.U.; Wahid, A.; Ahmad, M.; Ahmad, F.; Kanwall, A.; Enhanced biodegradation of chlorpyrifos by agricultural soil isolate. **Asian Journal of Chemistry**, v. 26, p. 3013-3017, 2014.

Gerhardt, K.E.; Huang, X.D.; Glick, B.R.; Greenberg, B.M. Phytoremediation and re-measurement of soil organic contaminants: potential and challenges. **Plant Science**, v. 176, p. 20-30, 2009.

Glazer, A.N.; Nikaido, H. Insecticidas Microbianos, Microbial Biotechnology Fundamentals of Applied Microbiology, **WH Freeman and Company**, Nova Iorque, pp.209-229, 1995.

Gomez, F.; Sartaj, M. Optimization of field scale biopiles for bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil at low temperature conditions by response surface methodology (RSM). **International Biodeterioration and Biodegradation** v. 89, p. 103-109, 2014.

Grupta, D.; Chatterjee, S.; Datta, S. Radionuclides: accumulation and transport in plants. **Reviews of Environmental Contamination and toxicology**, v. 241, p.139-160, 2016.

Hong, X.; Ping, M.A. Improvement of coking plant wastewater treatment effect by bioaugmentation technology. **China Water & Wastewater**, v. 15, 2007.

INCA – Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. 2015. Brasil lidera ranking no consumo de agrotóxicos. Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/comunicacaoinformacao/site/home/namidia/brasil_lidera_ranking_consumo_agrotoxicos.<acesso em: dezembro de 2017>.

Islas-garcia, A.; Veja-loyo, L.; López-Aguilar, R.; Cázares-Xoconostle, B.; Rodríguez-Vázquez, R. Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility. **Journal of Environmental Science and Health**, p. 1532-4109, 2015.

Karigar, C.S; Rao, S. Role of microbial enzymes in the bioremediation of pollutants: A review. **Enzyme Res**, 2011.

Lima, D.; Viana, P.; Chelinho, S.; Costa, C.; Ribeiro, R.; Sousa, J.P.; Fialho, A.M.; Viegas, C.A. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: the effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. **Chemosphere**, v. 74, p.187-192, 2009.

Lopes, A.R.; Danko, A.S.; Manaja, C.M.; Nunes, O.C. Molinate biodegradation in soils: natural

attenuation versus bioaugmentation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012.

Madalão, J.C; Pires, F.R.; Filho, A.C.; Nascimento, A.F.; Chagas, K.; Procópio, S.O.; Araújo, R.S.; Bonomo, R.; Taufner, G.A. Selection of species tolerant to the herbicide sulfentrazone with potential for phytoremediation of contaminated soil. **Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p.2199-2214, 2012.

Marchi, G. Herbicidas: mecanismos de ação e uso. V. 36, p. Documentos. **Embrapa Cerrados**. Planaltina, 2008.

Maqbool, Z.; Hussain, S.; Imran, M.; Mahmood, F.; Shahzad, T.; Ahmed, Z.; Azeem, F.; Muzam, S. Perspectives of using fungi as bioresource of bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v.23, p. 16.094-16.925, 2016.

Mandelbaum, R.T.; Allan, D.L.; Wackett, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* spp. That mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Appl. Environmental Microbiology**. v. 61, p. 1421-1457, 1995.

Massiha, A.; Majid, M.R.; Pahlaviani, K.; Issazadeh, K. Microbial degradation of pesticides on surface soil using native strains in Iran. **International Conference Biotechnol. Environmental**, v. 18, p. 76-81, 2011.

Meghraj, B.; Ramakrishnan, B.; Venkateswarlu, K.; Sethuanathan, N.; Naidu, R. Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. **Environment International**, v. 37, p.1362-1375, 2011.

Mohamed, A.; El-Sayed, R.; Osman, T.A.; Toprak, M.S.; Muhammed, M.; Uheuda, A. Nanofibers for highly efficient photocatalytic degradation of organic dyes from contaminated water. **Environmental Research**, v. 145, p.18-25, 2016.

Morganete, V.; López-López, A.; Flores, C.; Gonzáles, M.; Gonzáles, B. Vásquez, M.; Rosselló-Mora, R.; Seeger, M. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. Strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, p. 114-126, 2010.

Morillo, E.; Villaverde, J. Advanced Technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, v. 586, p. 576-597, 2017.

Mrozik, A.; Piotrowska-Seget, Z. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up pf soils contaminated with aromatic compounds. **Microbiological Research**, v. 165, p. 363-375, 2010.

Niti, C.; Sunita, S.; Kamlesh, K.; Rakesh, K. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 17, n. 4, 2013.

Oliveira, R. C. D. Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide contamination. **Chemosphere**, p. 525-534, 2016.

Ortíz, I.; Velasco, A.; Le Borgne, S.; Revah, S. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. **Biodegradation**, v. 24, p. 215-225, 2013.

Padmavathiamma, P.K.; Li, L.Y. Phytoremediation technology: hyperaccumulation metals in plants. **Water Air Soil Pollut.** v. 184, p. 105–126, 2007.

Privman, M.; Zuman, P. The role of protonation, hydration, elimination, and ring opening in the electroreduction of hexazinone. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, New York, 19 June 1998. 235-246.

Procópio, S.O.; Santos J.B.; Piresm F.R.; Silva, A.A.; Santos, E.A.; Cargnelutti. A. Development of bean plants in soil contaminated with trifloxysulfuron-sodium after *Stizolobium aterrimum* and *Canavalia ensiformis* cultivation. **Planta Daninha**, v.25, 2007.

Rodgers-Vieira, E.A.; Zhang, Z.; Adrion, A.C.; Gold, A.; Aitken, M.D. Identification of anthraquinone-degrading bacteria in soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p.3775-3781, 2015.

Rodrigues, B.N; Almeida, F.S. Guia de herbicidas. 6^a. ed. Londrina: **Grafmarke**, p.697, 2011.

Rubio-Bellido, M.; Madrid, F.; Morillo, E.; Villaverde, J. Assisted attenuation of a soil contaminated by diuron using hydroxypropyl- β – cyclodextrin and organic amendments. **Science of the Total Environment**, v. 502, p. 699-705, 2015.

Salt, D.; Smith, R.D.; Raskin, I. Phytoremediation. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 49, p. 643-668, 1998.

Salunkhe, V.P.; Sawant, I.S.; Benerjee, K.; Wadkar, P.N.; Sawant, S.D. Enhanced dissipation of triazole and multiclass pesticide residues on grapes after foliar application of grapevine-associated bacillus species, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.63, p. 10736-10746, 2015.

Sánchez, V.; López, F.J.; Rodríguez, L. Assessing the phytoremediation potential of crop and grass plants for atrazine-spiked soils. **Chemosphere**. v. 185, p. 119-126, 2017.

Semrany, S.; Favier, L.; Djelal; Taha, S.; Amrane, A. Bioaugmentation: possible solution in the treatment of bio-refractory organic compounds. **Biochemical Engineering Journal**., v. 69, p. 75-86, 2012.

Sharma, B.; Dangi, A.K.; Shukla, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**. v. 15, p. 10-22, 2018.

Singh, D.; Tiwari, A.; Gupta, R. Phytoremediation of lead from wastewater using aquatic plants. **Journal of Agricultural Technology**, v. 8, p. 1-11, 2012.

Singh, A. K.; Cameotra, S.S. Influence of microbial and synthetic surfactante on the biodegradation of atrazine. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p. 2088-2097, 2014.

Smulek, W.; Zdarta, A.; Guzik, U.; Dudzinska-Bajorek, B.; Kaczorek, E. Rahnella sp. estipe EK12: Properties, cell surface and biodegradation of diesel oil after prolonged contact with natural surfactants and diesel oil. **Microbiology Research**, v. 176, p.38-47, 2015.

Stephenson, C.; Black, C.R. One step forward, two steps back: the evolution of phytoremediation into commercial Technologies, v.7, p. 1-15, 2014.

Susarla, S.; Medina, V.F.; Mccutcheon, S.C. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. **Ecological Engineering**. v.18, p. 647-658, 2002.

Turtug, C. Uptake and modeling of pesticides by roots and shoots of parrotfeather (*Myriophyllum aquaticum*). **Environmental Science and Pollution**. p. 342-346, 2005.

Wang, X.; Zhou, S.; Wang, H; Yang, S.; biodegradation of hexazinone by two isolated bacterial strains (wxi-1 and wfx- 2). **Biodegradation**, v. 17, p. 331–339, 2006.

Wojcieszynska, D.; Domaradzka, D.; Hupert-Kocurek, K.; Guzik, U. degradation of naproxen - undisclosed pollutant into the environment. **Journal of Environmental Economics and Management**, v. 145, p. 157-161, 2014.

Wojcieszynska, D.; Hupert-Kocurek, K.; Guzik, U. Factors affecting catechol 2,3-dioxygenase activity between the KB2 strain of *Stenotrophomonas maltophilia* which degrades chlorophenol. **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 31, p. 141 – 147, 2013.

Wu, M. Dick, W.A.; Li, W.; Wang, X.; Yang, Q.; Wang, T.; Xu, L.; Zhang, M.; Chen, L. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 107, p.158-164, 2016.

Yadav, H.; Fátima, R.; Sharma, A.; Mathur, S. Improving the applicability of rock phosphate to alkaline soils by organic compost. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 80-85, 2017.

OBJETIVOS

Investigar o potencial da fitorremediação assistida por micro-organismos na descontaminação de solo com hexazinona.

Objetivos específicos

- 1) Avaliar a tolerância de 10 espécies vegetais em diferentes níveis de hexazinona;
- 2) Selecionar plantas mais tolerantes à molécula, entre as avaliadas;
- 3) Selecionar micro-organismos tolerantes ao herbicida;
- 4) Avaliar a degradação do herbicida no solo com a presença de plantas e micro-organismos pré-selecionados;
- 5) Definir o processo mais eficiente na degradação de hexazinona.

CAPÍTULO I

Seleção de espécies vegetais tolerantes à hexazinona

RESUMO

Hexazinona é o herbicida mais utilizado para a cultura da cana-de-açúcar, e apresenta persistência no ambiente. Para destoxificar ambientes contaminados com este herbicida, foi investigada a tolerância de plantas na presença da molécula, testando 10 espécies: *Urochloa brizantha*, *Urochloa ruziziensis*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis*, *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, *Mucuna pruriensis*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna aterrima* em diferentes doses do herbicida: (0; 125,0; 187,5 e 375,0 g.ha⁻¹). Através de avaliações biométricas aos 30 e 60 dias e massa seca aos 60 dias, *C. cajan* foi selecionada como mais tolerante, com isso, torna-se boa candidata para fitorremediar solo contaminado com hexazinona.

Palavras-chave: Fitorremediação, tolerância, solo, hexazinona.

ABSTRACT

Hexazinone is the herbicide most used for sugarcane cultivation, and presents persistence in the environment. To detoxify environments contaminated with this herbicide, the tolerance of plants in the presence of the molecule was investigated, testing 10 species: *Urochloa brizantha*, *Urochloa ruziziensis*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis*, *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, *Mucuna pruriensis*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna aterrima* at different doses of the herbicide: (0, 125.0, 187.5 and 375.0 g ha⁻¹). Through biometric evaluations at 30 and 60 days and dry mass at 60 days, *C. cajan* was selected as more tolerant, thus becoming a good candidate for phytoremediation of soil contaminated with hexazinone.

Key words: Phytoremediation, tolerance, soil, hexazinone.

1. INTRODUÇÃO

A agricultura no Brasil é praticada em larga escala devido a extensas áreas agricultáveis, com quase 300 milhões de hectares ocupados com culturas anuais, além de florestas plantadas e pastagens. Com isso, o país se torna alto consumidor de produtos fitossanitários, cujas vendas correspondem a 18,5% em relação ao total mundial (SINDIVEG, 2016), sendo que os herbicidas representam 32,5% desse percentual (SINDIVEG, 2017).

Segundo estimativas da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), as áreas plantadas de cana-de-açúcar destinada a atividades sucroalcooleiras na safra 2017/2018 deverão atingir 8.838,5 mil hectares no país, sendo Goiás o segundo produtor nacional. Isso se deve ao clima, relevo e topografia, que favorecem a produtividade nos 158,0 mil hectares plantados (CONAB, 2017).

Hexazinona, dentre as 43 moléculas presentes no mercado para a cultura da cana-de-açúcar, é o herbicida mais utilizado para o controle de ervas daninhas (TONIETO; REGINATO, 2014) e atua na inibição do fluxo de elétrons em PSII (fotossistema II) (Rodrigues e Almeida, 2011). De acordo com Martins (2015), o fato dessa molécula apresentar solubilidade moderada em meio aquoso, torna relevante o estudo e a avaliação dos riscos que esse composto pode gerar ao meio ambiente. A contaminação pode ocorrer em meios variados, como água, solo e ar, o que resulta em um risco potencial para a humanidade.

A fitorremediação é uma tecnologia que utiliza plantas para detoxificar ambientes contaminados por contaminantes orgânicos e inorgânicos em diversos compartimentos do ambiente. Sendo que a planta atua na degradação, adsorção, volatilização, acumulação de poluentes bem como na estimulação da atividade microbiana no solo (NEWMAN; REYNOLDS, 2004). Essa técnica apresenta vantagens como o baixo custo, simplicidade no método e não gera impactos negativos secundários, sendo uma técnica promissora (IBRAHIM et al., 2013). Portanto, as espécies vegetais devem apresentar características como tolerância e capacidade de reduzir resíduos tóxicos de agrotóxicos, além da facilidade de cultivo (SANTOS et al., 2007). Essas características podem ser avaliadas através de testes preliminares de desenvolvimento da planta, como avaliações biométricas ou avaliação do residual no solo.

Sandermann (1994) descreve a capacidade das plantas de se adaptarem às tensões induzidas por contaminantes orgânicos. Elas podem, dentro das células, estabelecer sistemas de desintoxicação nos quais os poluentes orgânicos são reduzidos, convertidos ou eliminados,

minimizando os efeitos deletérios causados pelos xenobióticos. Porém, conhecimentos acerca dos processos envolvidos no metabolismo dos contaminantes orgânicos pelas plantas ainda são limitados (FENG, 2017).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi selecionar espécies vegetais tolerantes ao herbicida hexazinona para fins de aplicação em fitorremediação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, no período de março a maio de 2017. Cada unidade experimental corresponde a vasos de 6 dm³, preenchidos com 6 kg de Latossolo Vermelho Escuro de textura média (70% de areia, 4% de silte, 26% de argila), com as seguintes características químicas: pH 5,3; matéria orgânica e carbono orgânico: 13 e 7,5g dm⁻³; P e K: 0,98 e 15mg dm⁻³; K⁺, Ca⁺², Mg⁺², Al⁺³, H + Al e CTC, foram de, respectivamente: 0,04; 1,18; 0,45; 0,02; 1,67; 3,34 cmol_c dm⁻³.

As espécies vegetais foram escolhidas a partir de dados levantados na literatura, com base na tolerância das plantas apresentada para o grupo químico do herbicida.

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso com cinco repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial (10x4), sendo o primeiro fator representado pelas espécies *Urochloa brizantha*, *Urochloa ruziziensis*, *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea*, *Crotalaria spectabilis*, *Canavalia ensiformis*, *Dolichos lablab*, *Mucuna pruriensis*, *Pennisetum glaucum*, *Mucuna aterrima*, e o segundo fator pelas doses do herbicida (0; 125,0; 187,5 e 375,0 g ha⁻¹), sendo respectivamente: 0, 1/3 da dose comercial, 1/2 da dose comercial e dose comercial, para solo de textura pesada.

O herbicida foi aplicado nos vasos com o auxílio de pulverizador costal com pressão à CO₂ constante de 2 bar, volume de calda de 260 L ha⁻¹ equipado com barra de 2,0 m, bico tipo leque AXI 110 02. As aplicações foram realizadas no período matutino com temperatura de 27°C; velocidade do vento de 1m s⁻¹, e umidade relativa do ar a 72,3%.

Transcorridas 48 horas da aplicação do herbicida, realizou-se a semeadura das espécies vegetais. Após a germinação, foi realizado um desbaste, deixando três plantas por unidade experimental. A umidade dos vasos foi mantida com irrigação manual uma ou duas vezes por dia ou de acordo com a necessidade. Foram realizadas três adubações com 20 g L⁻¹ Forth Jardim

da marca Tecnutri do Brasil, contendo N: 13; P₂O₅: 5; K₂O: 13; B: 0,04; Ca: 1; Cu: 0,05; S: 5; Fe: 0,2; Mg: 1; Mn: 0,08; Mo: 0,005 e Zn: 0,15%, aplicando 50mL em cada vaso, em intervalos quinzenais.

Conduziram-se as avaliações de altura (cm), aos 30 e 60 DAE – dias após a emergência, com o auxílio de régua graduada, tomando-se como base o meristema apical para dicotiledôneas e a borda da folha superior para as demais espécies. Simultaneamente, avaliou-se a fitointoxicação (%) aos 30 e 60 dias, atribuindo notas variando de 0 a 100% de acordo com os sintomas apresentados pelas plantas, sendo 0 representando a ausência de sintomas e 100 a morte da planta. Aos 60 dias, parte aérea e raízes foram separadas para avaliação da produção de biomassa seca. As amostras foram acondicionadas em estufa a 65 °C por 72 horas e posteriormente pesadas em balança analítica.

As médias referentes à altura de plantas e as massas secas da parte aérea obtidas pela testemunha de cada espécie (dose zero) foram transformadas, atribuindo-se índice igual a 1. Os resultados foram submetidos à análise de variância e, quando significativos, as médias entre espécies foram comparadas pelo teste Scott-Knott ($p < 0,05$) e as médias entre doses foram submetidas à análise de regressão com auxílio do programa Sigmaplot (SISTAT SOFTWARE, versão 12.0).

Para fitointoxicação, os dados foram ajustados à equação do tipo sigmoide de três parâmetros. Para as avaliações de altura e biomassa, a maioria dos tratamentos também foram explicadas por esta equação:

Equação sigmoideal:

$$y = \frac{a}{1 + \exp\left(-\frac{x - x_0}{b}\right)}$$

Em que: y = variável resposta; x = dose do herbicida; e a = diferença entre os pontos máximo e mínimo da curva, x_0 é a dose que expressa 50% de resposta da variável e b a declividade da curva.

3. RESULTADOS

As avaliações de altura e fitointoxicação foram realizadas aos 30 e 60 dias após a emergência da maioria das espécies. As médias observadas para altura e fitointoxicação, além dos modelos sigmoidais ajustados em função das subdoses, são apresentadas nas tabelas

subsequentes.

3.1 Fitointoxicação aos 30 DAE

Aos 30 DAE, observou-se interação entre os fatores espécie e dose. Para a dose 125,0 g ha⁻¹, as espécies que apresentaram maior sensibilidade foram *C. juncea* e *D. lablab*, com 100 e 98% de fitointoxicação, respectivamente. As espécies que apresentaram sintomas de fitointoxicação intermediários foram: *U. brizanta*, *P. glaucum*, *M. pruriensis* e *M. aterrima*. Uma maior tolerância foi observada para as espécies *C. cajan* (34,17%), *U. ruziziensis* (30,83%), *C. ensiformis* (15,83%), e *C. spectabilis* (15,00%). Na dose 187,5 g ha⁻¹, observou-se maior tolerância apenas para *C. cajan* (47,5%), e para *C. juncea*, *D. lablab* e *M. aterrima* constatou-se morte da planta. Na maior dose, 375,0 g ha⁻¹, nenhuma espécie apresentou tolerância ao herbicida (Tabela 1).

Tabela 1 – Fitointoxicação, promovidas por doses de hexazinona, nas espécies testadas avaliada aos 30 dias após a emergência (DAE)

Espécies	Doses de hexazinona (g ha ⁻¹)				Equação da regressão	R ²
	0	125,0	187,5	375,0		
<i>Urochloa brizantha</i>	0,00 a ^{1/}	59,17 b	88,33 a	100,00 a	Y= 98,8553/(1+exp (-(x - 113,5094) / 31,7230))	0,99
<i>Urochloa ruziziensis</i>	0,00 a	30,83 c	93,33 a	100,00 a	Y= 99,9997/(1+exp (-(x - 139,6486) / 18,1310))	1,00
<i>Cajanus cajan</i>	0,00 a	34,17 c	47,50 b	100,00 a	Y=107,2950 / (1+exp (-(x - 195,5354) / 69,9310))	0,98
<i>Crotalaria juncea</i>	0,00 a	100,00 a	100,00 a	100,00 a	Y= 100 (1 - exp (-0,1757x))	1,00
<i>Crotalaria spectabilis</i>	0,00 a	15,00 c	78,33 a	98,00 a	Y= 98,0022/(1+exp (-(x - 159,5732) / 20,2083))	1,00
<i>Canavalia ensiformis</i>	0,00 a	15,83 c	98,00 a	100,00 a	Y=100,0000 / (1+exp (-(x - 143,7717) / 11,2360))	1,00
<i>Dolichos lablab</i>	0,00 a	98,00 a	100,00 a	100,00 a	Y=100,1341(1 - exp (- 0,0309x))	1,00
<i>Pennisetum glaucum</i>	0,00 a	64,17 b	90,00 a	100,00 a	Y= 98,4276/(1+exp (-(x - 107,5034) / 29,6756))	0,99
<i>Mucuna pruriensis</i>	0,00 a	69,67 b	81,67 a	100,00 a	Y=94,6941 / (1+exp (-(x - 96,9079) / 32,3119))	0,97
<i>Mucuna aterrima</i>	0,00 a	58,33b	100,00 a	100,00 a	Y=100,0000/ (1+exp(-(x-124,0364)/2,8637))	1,00
F (A)		3,71**				
F (B)		329,35**				
F (A x B)		2,62*				
CV (%)		19,9				

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Para cada espécie, a partir da análise de regressão para as doses, com base na equação sigmoidal, observa-se altos valores para o coeficiente a . Sendo assim, houve alta diferença entre o ponto máximo e mínimo de porcentagem de fitointoxicação, provocada pela aplicação de subdoses nos tratamentos, ou seja, apresentou baixos valores para doses menores e valores mais altos para doses subsequentes. As espécies com maiores valores para a variável x_0 apresentam-se mais tolerantes em relação ao aumento da dose, sendo que o maior valor encontrado foi para *C. cajan* com $x_0 = 195,5354 \text{ g ha}^{-1}$ é a dose que expressa 50% de fitointoxicação. *M. pruriensis* apresentou baixa tolerância nas crescentes doses, com $x_0 = 96,9079 \text{ g ha}^{-1}$. Valores expressos para a variável b , que demonstram a declividade da curva, foram baixos para *U. ruziziensis*, *M. aterrima*, *C. ensiformis* e *P. glaucum*, sugerem o baixo desenvolvimento da planta e rápidos sintomas de fitointoxicação. Para uma curva mais pronunciada como *C. cajan*, que apresentou maior declividade, denota maior tolerância com o aumento da dose aplicada. As espécies *C. juncea* e *D. lablab* foram explicadas através de um modelo exponencial expressando elevado aumento de fitointoxicação mesmo em baixas concentrações de herbicida aplicado. Para todas as espécies, os coeficientes de regressão (R^2) observados variaram de 0,97 a 1.

3.2 Fitointoxicação 60 DAE

Observou-se que aos 60 dias (Tabela 2) houve interação entre os fatores espécies e doses e, para a dose $125,0 \text{ g ha}^{-1}$, as espécies que apresentaram maior sensibilidade foram *C. juncea*, *D. lablab*, *M. pruriensis* e *M. aterrima*. As demais espécies apresentaram maior tolerância, sendo o menor valor observado, para *C. cajan*, com 6,67%. Na dose $187,5 \text{ g ha}^{-1}$, apenas *C. cajan* apresentou baixo índice de fitointoxicação. Para a dose subsequente, todas as espécies apresentaram altos valores de fitointoxicação, indicando baixa tolerância.

Tabela 2 – Fitointoxicação, promovidas por doses de hexazinona, nas espécies testadas avaliada aos 60 dias após a emergência (DAE)

Espécies	Doses de hexazinona (g ha ⁻¹)				Equação da regressão	R ²
	0	125,0	187,5	375,0		
<i>Urochloa brizantha</i>	0,00 a ^{1/}	9,17 b	85,00 a	100,00 a	Y= 100,0001 / (1+exp(- (x – 160,5857) / 15,5162))	1,00
<i>Urochloa ruziziensis</i>	0,00 a	33,33 b	100,00 a	100,00 a	Y= 100,0000 / (1+exp(- (x – 126,8958) / 2,7350))	1,00
<i>Cajanus cajan</i>	0,00 a	6,67 b	17,50 b	100,00 a	Y= 120,8121 / (1+exp(- (x – 286,8910) / 56,1361))	0,99
<i>Crotalaria juncea</i>	0,00 a	97,50 a	100,00 a	100,00 a	Y= 100,0000 / (1+exp(- (x – 112,4877) / 3,4153))	1,00
<i>Crotalaria spectabilis</i>	0,00 a	15,83 b	70,00 a	97,50 a	Y= 97,5154 / (1+exp(- (x – 164,8330) / 24,2746))	1,00
<i>Canavalia ensiformis</i>	0,00 a	14,17 b	100,00 a	100,00 a	Y= 100,0000 / (1+exp(- (x – 129,7311) / 2,6262))	1,00
<i>Dolichos lablab</i>	0,00 a	94,17 a	100,00 a	100,00 a	Y= 100,0000 / (1+exp(- (x – 116,0608) / 3,2138))	1,00
<i>Pennisetum glaucum</i>	0,00 a	41,67 b	73,33 a	85,00 a	Y= 84,7286 / (1+exp(- (x – 126,5601) / 31,8329))	0,99
<i>Mucuna pruriensis</i>	0,00 a	59,17 a	93,33 a	100,00 a	Y= 99,6320 / (1+exp(- (x – 115,3185) / 25,9534))	0,99
<i>Mucuna aterrima</i>	0,00 a	80,00 a	100,00 a	100,00 a	Y= 100,0000 / (1+exp(- (x – 120,8035) / 3,0272))	1,00
F (A)		5,67**				
F (B)		215,07**				
F (A x B)		3,07**				
CV (%)		24,40				

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Os resultados referentes as doses dentro de cada espécie se ajustaram ao modelo sigmoidal com altos valores para o coeficiente a (Tabela 2), sendo apresentada maior tolerância em doses baixas. Em relação ao coeficiente x_0 , o maior valor observado foi para a espécie *C. cajan*, sugerindo maior tolerância em função do aumento da dose.

3.3 Altura aos 30 DAE

Para altura das plantas avaliadas aos 30 dias (Tabela 3) observou-se interação entre os fatores testados e maior índice foi verificado para os tratamentos sem aplicação do herbicida, sugerindo atraso no crescimento das plantas nas demais doses aplicadas. Tal fato também pode ser constatado, observando os sintomas de fitointoxicação. Na dose de 125 g ha⁻¹ de hexazinona, as espécies que apresentaram maior índice de altura foram: *U. brizantha*, *U. ruziziensis*, *C. cajan*, *C. spectabilis* e *C. ensiformis*, porém houve diminuição do crescimento comparado com a testemunha de 33%, 43%, 17%, 27% e 23% respectivamente. Um crescimento menor pronunciado foi observado para *P. glaucum*, *M. pruriensis* e *M. aterrima*. Não se observou crescimento para *C. juncea* e *D. lablab*, indicando menor tolerância. Para as doses de 187g ha⁻¹ de herbicida aplicado, apenas *C. cajan* apresentou crescimento de 54% em relação ao controle, sendo que as demais espécies apresentaram alta sensibilidade e não se desenvolveram. Para a dose maior, já constatado pelos sintomas de fitonitoxicação, todas as espécies foram sensíveis e não apresentaram crescimento.

Tabela 3 – Altura das espécies testadas avaliada aos 30 dias após a emergência (DAE) em função das doses do herbicida hexazinona.

Espécies	Doses de hexazinona (g ha ⁻¹)				Equação da regressão	R ²
	0	125,0	187,5	375,0		
<i>Urochloa brizantha</i>	1,00 a ^{1/}	0,67 a	0,06 b	0,00 a	Y= 1,0003/ (1+exp (- (x- 137,6695) / -17,8004))	1,0
<i>Urochloa ruziziensis</i>	1,00 a	0,57 a	0,00 b	0,00 a	Y= 0,8583 – 0,0027x	0,75
<i>Cajanus cajan</i>	1,00 a	0,83 a	0,54 a	0,00 a	Y= 1,0088 / (1+exp (- (x- 193,2287) / -426272))	0,99
<i>Crotalaria juncea</i>	1,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 a	Y= 0,9733 – 0,0090x + (1,7067.10 ⁻⁵)x ²	0,96
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1,00 a	0,73 a	0,14 b	0,05 a	Y = 1,0016 / (1+exp (- (x – 146,9942) / -22,2882))	0,99
<i>Canavalia ensiformis</i>	1,00 a	0,77 a	0,00 b	0,00 a	Y= 1,0654 – 0,0056x + (7,231. 10 ⁻⁶)x ²	0,80
<i>Dolichos lablab</i>	1,00 a	0,06 c	0,00 b	0,00 a	Y=1,0240exp (-0,0237x)	0,99
<i>Pennisetum glaucum</i>	1,00 a	0,23 b	0,10 b	0,00 a	Y = 1,0126exp (-0,0121x)	0,99
<i>Mucuna pruriensis</i>	1,00 a	0,33 b	0,09 b	0,00 a	Y= 1,1061 / (1+exp (- (x – 91,1976) / - 40,2044))	1,00
<i>Mucuna aterrima</i>	1,00 a	0,25 b	0,00 b	0,00 a	Y =1,0171 exp (- 0,0132x))	0,98
F (A)		4,81**				
F (B)		198,69**				
F (A x B)		2,78**				
CV (%)		9,89				

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

As respostas em relação às doses para *U. brizantha*, *C. cajan*, *C. spectabilis* e *M. pruriens* foram explicadas pelo modelo sigmoidal, os quais apresentaram x_0 , a dose que expressa 50% da resposta, de 137, 193, 146 e 91 g ha⁻¹, sendo a *C. cajan* que apresentou maior tolerância entre estas espécies em relação a testemunha (Tabela 3). Foi observado também maior crescimento para *C. cajan*, que também apresentou valor mais alto para b , com declividade da curva maior. Crescimento menos pronunciado foi observado para *M. pruriensis*. Todos os valores de a foram altos, pois, na dose de 375 g ha⁻¹ não houve crescimento, fazendo a curva decair para zero para todas as espécies. O comportamento de *U. ruziziensis* na presença das subdoses foi explicada por uma equação linear ($y = a + bx$), em que o crescimento decaiu linearmente com o aumento da dose na proporção de 0,27% para cada aumento nas doses do herbicida (Tabela 3). O crescimento de *D. lablab*, *M. aterrima* e *P. glaucum* foram explicados pela equação $y = \alpha \exp(-bx)$, sendo que a altura aos 30 DAE diminuiu exponencialmente com o aumento da dose do herbicida, com maior declividade da curva para *D. lablab*.

3.4 Altura aos 60 DAE

Na avaliação de altura, aos 60 DAE nota-se que houve interação entre os fatores testados (Tabela 4) e para a dose de 125 g ha⁻¹ nota-se que crescimento mais pronunciado ocorreu para *C. cajan*, *U. brizantha*, *C. spectabilis* e *C. ensiformis*, indicando maior tolerância ao herbicida. Menor crescimento foi constatado para *U. ruziziensis*, *P. glaucum* e *M. pruriensis*, sendo que para *C. juncea*, *D. lablab* e *M. aterrima* não se observou crescimento, indicando menor tolerância. *C. cajan* foi a única espécie que apresentou maior crescimento (52% em relação ao controle) para a dose de 187,5 g ha⁻¹. Já constatado na avaliação anterior, para 375,0 g ha⁻¹, todas as espécies apresentaram alta sensibilidade, sendo controladas.

Tabela 4 - Altura das espécies testadas avaliada aos 60 dias após a emergência (DAE) em função das doses do herbicida hexazinona.

Espécies	Doses de hexazinona (g ha ⁻¹)				Equação da regressão	R ²
	0	125,0	187,5	375,0		
<i>Urochloa brizantha</i>	1,00 a ^{1/}	0,76 a	0,06 b	0,00 a	Y= 1,0002/ (1+exp(- (x – 143,0060) / -15,8927))	1,00
<i>Urochloa ruziziensis</i>	1,00 a	0,38 b	0,00 b	0,00 a	Y= 1,0212 exp (- 0,0107x)	0,95
<i>Cajanus cajan</i>	1,00 a	0,91 a	0,52 a	0,00 a	Y= 1,0012/ (1+exp(- (x – 189,4806) / -28,0659))	1,00
<i>Crotalaria juncea</i>	1,00 a	0,00 c	0,00 b	0,00 a	Y=0,9733 – 0,0090x + (1,7067.10 ⁻⁵)x ²	0,96
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1,00 a	0,65 a	0,20 b	0,03 a	Y=1,0108 / (1+exp (- (x-143,6830) / -31,3431))	0,99
<i>Canavalia ensiformis</i>	1,00 a	0,56 a	0,00 b	0,00 a	Y= 1,0409 – 0,0065x + (9,8462.10 ⁻⁶)x ²	0,91
<i>Dolichos lablab</i>	1,00 a	0,05 c	0,00 b	0,00 a	Y= 1,0246 exp (-0,0244x)	0,99
<i>Pennisetum glaucum</i>	1,00 a	0,26 b	0,09 b	0,00 a	Y=1,0132 exp (-0,0116x)	0,99
<i>Mucuna pruriensis</i>	1,00 a	0,30 b	0,07 b	0,00 a	Y=1,0152 exp (-0,0110x)	0,99
<i>Mucuna aterrima</i>	1,00 a	0,16 c	0,00 b	0,00 a	Y=1,0175 exp (-0,0161x)	0,99
F (A)		5,39**				
F (B)		201,78**				
F (A x B)		2,68**				
CV (%)		9,82				

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade.

Semelhantemente ao que foi observado para a altura de plantas aos 30DAE o modelo sigmoidal se ajustou para explicar o comportamento de *U. ruziziensis*, *C. cajan* e *C. spectabilis* aos 60 DAE e os valores de x_0 foram, respectivamente de 143, 189 e 143 g ha⁻¹, demonstrando que *C. cajan* que apresentou maior crescimento em relação as demais. *U. brizantha*, *D. lablab*, *P. glaucum*, *M. pruriensis*, e *M. aterrima* foram explicadas pela equação exponencial, cujo efeito das doses foram mais evidenciados para *Dolichos lablab* (Tabela 4).

3.5 Produção de biomassa da parte aérea

Para MSPA – Massa seca da parte aérea, verificou-se interação entre os fatores (espécie e dose), sendo que, para dose 125 g ha⁻¹ observou-se maior produção de biomassa da parte aérea para as seguintes espécies: *C. ensiformis*, *C. cajan*, *U. ruziziensis*, *C. spectabilis* e *U. brizantha*. Para as demais espécies: *C. juncea*, *D. lablab*, *P. glaucum*, *M. pruriensis*, *M. aterrima* houve menor produção de biomassa, indicando alta sensibilidade.

Na dose de 187,5 g ha⁻¹, apenas *C. cajan* apresentou maior produção de biomassa, com 57% em relação ao controle, indicando pouca tolerância das demais espécies. De acordo com as avaliações precedentes e na avaliação de produção de biomassa para a dose de 375,0 g ha⁻¹, todas as espécies apresentaram alta sensibilidade e produção de massa inexpressiva.

Tabela 5 - Produção de biomassa da parte aérea das espécies testadas avaliada aos 60 dias após a emergência (DAE) em função das doses do herbicida hexazinona.

Espécies	Doses de hexazinona (g ha ⁻¹)				Equação da regressão	R ²
	0	125,0	187,5	375,0		
<i>Urochloa brizantha</i>	1,00 a	0,47 a	0,02 b	0,00 a	Y= 1,0005 / (1+exp (- (x-123,1394) / -16,1189))	1,00
<i>Urochloa ruziziensis</i>	1,00 a	0,62 a	0,00 b	0,00 a	Y= 1,0317 exp ((-0,0079) x)	0,84
<i>Cajanus cajan</i>	1,00 a	0,80 a	0,57 a	0,03 a	Y=1,0223/ (1+exp (- (x - 198,5644) / -54,6506))	0,99
<i>Crotalaria juncea</i>	1,00 a	0,03 b	0,02 b	0,01 a	Y=1,0000exp (-0,0277x)	0,99
<i>Crotalaria spectabilis</i>	1,00 a	0,53 a	0,18 b	0,00 a	Y=1,0415 / (1+exp (- (x-126,3066) / -39,9191))	1,00
<i>Canavalia ensiformis</i>	1,00 a	0,87 a	0,15 b	0,15 a	Y= 0,9211 / (1+exp (- (x -164,4164) / -14,0813))	0,95
<i>Dolichos lablab</i>	1,00 a	0,06 b	0,03 b	0,01 a	Y= 1,0002 exp (-0,0216x)	0,99
<i>Pennisetum glaucum</i>	1,00 a	0,29 b	0,13 b	0,00 a	Y= 1,0018 exp (-0,0103x)	0,99
<i>Mucuna pruriensis</i>	1,00 a	0,28 b	0,08 b	0,06 a	Y= 1,0015 exp (-0,0110x)	0,99
<i>Mucuna aterrima</i>	1,00 a	0,33 b	0,07 b	0,04 a	Y= 1,0498 / (1+exp (- (x-99,2643) / -32,9997))	0,99
F (A)		3,72**				
F (B)		136,40**				
F (A x B)		1,79*				
CV (%)		11,21				

^{1/} Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Scott Knott a 5% de probabilidade

Em função das doses foi ajustado o modelo sigmoidal, para *U. brizantha*, *C. cajan*, *C. spectabilis*, *C. ensiformis* e *M. aterrima* e foram observados valores altos para o coeficiente a , que demonstra alta diferença entre o ponto máximo e mínimo de índice de biomassa pelo aumento das subdoses aplicadas, que resulta em maior produção de biomassa nas menores doses e menor produção de biomassa nas doses mais altas.

Ao analisar o coeficiente x_0 , nota-se que a espécie que apresentou maior produção de biomassa foi *C. cajan*, sendo de 198g ha⁻¹, seguido de *C. ensiformis* (164 g ha⁻¹), *C. spectabilis* (126 g ha⁻¹), *U. brizantha* (123 g ha⁻¹) e *M. aterrima* (99 g ha⁻¹). As demais espécies apresentaram baixa tolerância com o aumento das doses.

Para as espécies *U. ruziziensis*, *C. juncea*, *D. lablab*, *P. glaucum* e *M. pruriensis*, a produção de biomassa dentro das doses foram explicadas pela equação, sendo a espécie menos tolerante a *D. lablab*.

3.6 Produção de biomassa da raiz

Para esta variável não foi observado interação entre os fatores testados, apenas efeito isolado entre doses (Figuras 1 e 2). Entre as espécies não foi observado diferenças significativas de produção de biomassa da raiz (Figura 1). Ao observar os índices de massa seca de raiz em relação às doses (Figura 2), nota-se diminuição da produção de biomassa à medida que a dose é aumentada, atingindo 50% da variável resposta na dose de 123,13 g ha⁻¹. Na maior dose, nenhuma produção de biomassa foi observada.

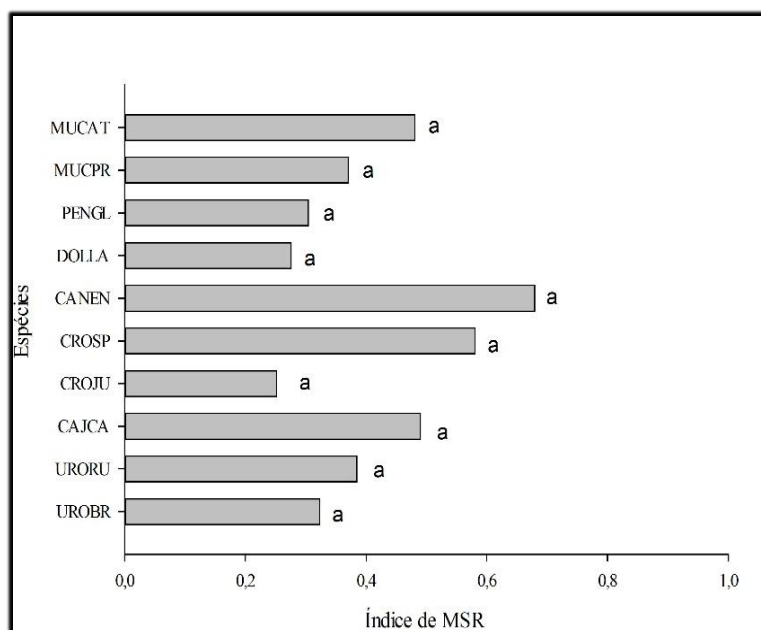


Figura 1: Índice de massa seca de raiz (MSR) das espécies testadas avaliadas aos 60 dias após a emergência (DAE). Histogramas seguidos das mesmas letras são estatisticamente iguais pelo teste de Kcott Knott a 5% de probabilidade. (MUCAT – *M. aterrima*; MUCPR – *M. pruriensis*; PENGL – *P. glaucum*; DOLLA – *D. lablab*; CANEN – *C. ensiformis*; CROSP – *C. spectabilis*; CROJU – *C. juncea*; CAJCA – *C. cajan*; URORU – *U. ruziziensis* e UROBR – *U. brizantha*).

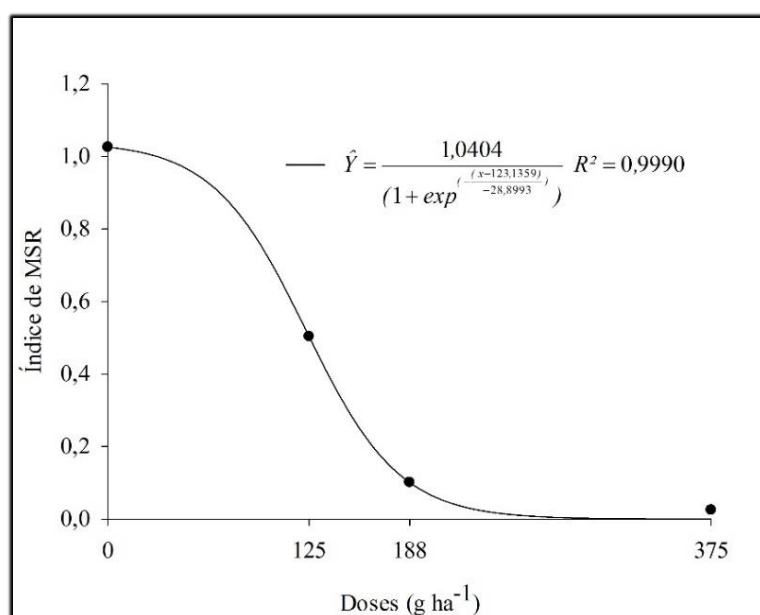


Figura 2: Índice de massa seca de raiz (MSR) avaliadas aos 60 dias após a emergência (DAE) em função das doses testadas.

4. DISCUSSÃO

A espécie *Cajanus cajan* foi a única a apresentar maior tolerância nas doses estudadas, no entanto, aos 30 DAE houve diminuição no crescimento para a dose 125 g ha⁻¹ e 187,5 g ha⁻¹ de 17 e 46%; e aos 60 DAE diminuição de 9 e 48%, respectivamente, demonstrando aumento na tolerância em período maior, que pode ser confirmado com os sintomas de fitotoxicidade aos 30 DAE de 34,17 e 47,50% e aos 60 DAE 6,67 e 17,50%, verificando potencial de recuperação contra a ação do herbicida hexazinona. Tal condição pode ser atribuída à adaptação contra o estresse abiótico, ou a diminuição da molécula no solo por condições naturais, como lixiviação ou biodegradação.

Kumar et al. (2015) mostram que *C. cajan* apresentou alta habilidade em acumular os metais cromo e níquel, além dos altos fatores de bioconcentração e translocação, que tornam uma planta com habilidade na remoção de metais e com potencial fitotecnológico. Jerez e Romero (2016) também descrevem a capacidade da espécie na remoção de cromo, chegando a 49%. Yadu et al (2017) mostraram a aptidão da espécie em tolerar o flúor, quando combinada com glicina betaína, um composto de amônio com capacidade de eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas sob estresse e melhorar o rendimento. A sensibilidade ao herbicida imazaquim foi observada por Florido et al. (2014). Entretanto, não há investigações sobre o estresse causado em *C. cajan* por hexazinona e seu potencial de tolerância ou biodegradabilidade.

Aos 60 dias, *U. brizantha* apresentou para a primeira dose decréscimo no crescimento de 24% comparada à testemunha, a biomassa diminuiu 53% na primeira dose aplicada, observando fitointoxicação de 9,17%, esses dados sugerem que o herbicida causou uma inibição de crescimento. Para as demais doses, não apresentou crescimento significativo. Braga et al. (2016) constataram a potencialidade da espécie em fitodegradar e fitoestimar picloram em camadas superficiais do solo com pH 4,5 pela capacidade de acumulação em seus vacúolos.

C. spectabilis e *C. ensiformis* também se apresentaram mais tolerantes em relação às demais espécies, com diminuição de crescimento aos 60 dias de 35 e 44%, respectivamente, comparadas com a testemunha para a dose 125 g ha⁻¹. Em condições controladas, Madalão et al. (2017) identificou *C. ensiformis* como tolerante à sulfentrazone. Conforme apresentado por Monquero et al. (2013), *C. ensiformis* e *C. cajan* apresentaram tolerância ao herbicida diclosulam, que pertence ao grupo químico sulfonanilidas, sendo que, em testes posteriores, *C.*

cajan apresentou melhores resultados nas maiores doses aplicadas, tendo maior índice de produção de biomassa, menor índice de fitointoxicação. Além dessas espécies, *M. aterrima* apresentou baixo acúmulo de biomassa e sensibilidade à molécula.

Foi relatado por Florido et al. (2014) tolerância das espécies *C. ensiformis*, *M. aterrima* e *C. cajan* ao herbicida imazaquim nas doses mais altas avaliadas, sendo que *C. ensiformes* apresentou maior acúmulo nas raízes.

As espécies mais sensíveis ao hexazinona ($125,0 \text{ g ha}^{-1}$) foram *U. ruziziensis*, *M. pruriensis* e *P. glaucumi*, com índice de altura menor que a testemunha de 62%, 70% e 74%; seguidas de *C. juncea*, *D. lablab* e *M. aterrima*, nas quais observou-se morte da planta. Isso pôde ser confirmado após avaliação de produção de biomassa, sendo que os menores índices foram observados para *C. juncea*, *D. lablab*. Sendo assim, na planta que apresenta baixa tolerância, o crescimento é prejudicado, pois a fitointoxicação causada pelos poluentes orgânicos inibe a capacidade vegetal de absorção de água e nutrientes (KHAM et al., 2013).

Na dose $187,5 \text{ g ha}^{-1}$ observou-se tolerância apenas para *C. cajan*, sendo que as demais espécies apresentaram baixo crescimento e altos índices de fitointoxicação. Para a maior dose ($375,0 \text{ g ha}^{-1}$), constatou-se a morte para todas as espécies.

5. CONCLUSÕES

Até a dose de $187,5 \text{ g ha}^{-1}$ de hexazinona no solo a espécie *C. cajan* foi a mais tolerante, sendo com isso considerada uma espécie potencial a ser empregada em pesquisas com remediação de solos contaminados com hexazinona.

REFERÊNCIAS

Braga, R.R.; Santos, J.B.; Zanuncio, J.C.; Bibiano, C.S.; Ferreira, E.A.; Oliveira, M.C.; Silva, D.V.; Serrão, J.E. Effect of growing *Brachiaria brizantha* on phytoremediation of picloram under different pH environments. **Ecological Engineering**. V. 94, p. 102-106, 2016.

Companhia nacional de abastecimento. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar 2017/2018. **CONAB**. v.4 p. 157, Brasília, 2017.

Feng, N.X.; Yu, J.; Zhao, H.M.; Cheng, Y.T.; Mo, C.H.; Cai, Q.Y.; Li, Y.W.; Wong, M.H. Efficient phytoremediation of organic contaminants in soil using plant-endophyte partnerships.

Science of The Total Environment. v. 583, p. 352-368, 2017.

Florido, F.G.; Monquero, P.A.; Dias, A.C.R.; Tornisielo, V.L. The absorption and translocation of imazaquim in green manures. **Acta Scientiarum**. v.36, n.3, p. 291-300. 2014.

Ibrahim, S.I.; Adbel, M.F.; Khalifa, H.M.S.; Adbel, A.E. Phytoremediation of atrazine – contaminated soil using *Zea mays* (maize). **Annals of Agricultural Sciences**. v. 58, p.69-75, 2013.

Jerez, J.A.; Romero, R.M. Evaluation of *Cajanus cajan* (pigeon pea), for phytoremediation of landfill leachate containing chromium and lead. **International Journal of Phytoremediation**. v. 18, p. 1122-1127, 2016.

Khan, S.; Afzal, M.; Iqbal, S.; Khan, Q.M. Plant-bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. **Chemosphere**. v. 90, p. 1317-1332, 2013.

Kumar, A.; Mait, S. K.; Tripti; Prasad, M. N. V.; Singh, R. S. Grasses and legumes facilitate phytoremediation of metalliferous soils in the vicinity of an abandoned chromite – asbestos mine. **Journal of Soils and Sediments**. V. 17, p. 1358-1368, 2017.

Madalão, J.C.; Souza, M.F.; Silva, A.A.; Silva, D.V.; Jakelaitis, A.; Pereira, G.A.M. Action of *Canavalia ensiformis* in remediation of contaminated soil with sulfentrazone. **Bragantia**. V. 76. Issn 1678-4499, 2017.

Martins, A. S.; Vasconcelos, V. M.; Pereira-Filho, E. R.; Lanza, M. R. V. . Simultaneous Degradation of Diuron and Hexazinone Herbicides by Photo-Fenton: Assessment of Concentrations of H₂O₂ and Fe²⁺ by the Response Surface Methodology. **Journal of Advanced Oxidation Technologies**, v. 18, p. 9-14, 2015.

Monquero, P. A.; Côrrea, M.C.; Barbosa, L.N.; Gutierrez, A; Orzari, I.; Hitara, A.C.S. Selection of green manure species aiming at diclosulam phytoremediation. **Planta Daninha**. v.31, ISSN: 0100-8358, 2013.

Newman, L. A.; Reynolds, C.M. Phytodegradation of organic compounds. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 15, p. 225-230, 2004.

Rodrigues, B.N; Almeida, F.S. Guia de herbicidas. 6^a. ed. Londrina: **Grafmarke**, p.697, 2011.

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, 2007.

Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa vegetal – SINDIVEG. Banco de dados. São Paulo: **SINDIVEG**. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/consumo-de-produtos-fitossanitarios-no-brasil/>. Acesso em Janeiro de 2017.

Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa vegetal – SINDIVEG. Banco de dados. São Paulo: **SINDIVEG**. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/sindiveg-setor-de-defensivos-agricolas-registra-queda-nas-vendas-em-2016/>. Acesso em Janeiro de 2017.

Tonieto, T.; Reginato, J. Effects of straw decomposition degree on leaching and weed control efficacy of tebuthiuron and hexazinone in green sugarcane harvesting. **Planta Daninha**, Piracicaba, v. 32, n. 4, Dezembro 2014.

Yadu, B.; Chandrakar, V.; Meena, R.K.; Keshaykant, S. Glicinebetaine reduces oxidative injury and enhances fluoride stress tolerance via improving antioxidant enzymes, proline and genomic template stability in *Cajanus cajan* L. **South African Journal of Botany**. v. 111, p. 68-75, 2017.

CAPÍTULO II

Seleção de micro-organismos e preparo de inoculantes com potencial de aplicação na remediação de solos contaminados com hexazinona

RESUMO

O uso excessivo de agroquímicos resulta em impactos ambientais, com isso, torna-se necessário o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a diminuição de contaminantes no solo. O hexazinona é o herbicida mais utilizado para a cultura da cana-de-açúcar, e apresenta persistência no ambiente. E sua principal via de degradação no solo é através de micro-organismos. Com isso, selecionou-se 6 micro-organismos que apresentaram crescimento na presença do herbicida: SCR1 – *M. arborescens*; SCR2 – *B. pumillus*; SCM3 – *S. maltophilia*; SCM4 – *B. cereus*; SCM5A – *M. arborescens*; SCM5B – *B. safensis*. Foi realizado um teste para avaliar a habilidade de cada linhagem na solubilização de fosfatos. E para o teste de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, as linhagens que apresentaram melhores resultados foram *B. pumillus* e *S. maltophilia*. Posteriormente os inoculantes foram preparados e a concentração após plaqueamento de $2,71 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para *B. pumillus*, $1,02 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para *S. maltophilia* e consórcio com as duas linhagens $1,14 \times 10^{10}$ UFC.mL⁻¹. Sendo estes, valores satisfatórios para utilização como inoculantes.

Palavras-chave: *B. pumillus*, *S. maltophilia*, inoculante, biorremediação, hexazinona.

ABSTRACT

The excessive use of agrochemicals results in environmental impacts, which makes necessary to develop sustainable technologies for the reduction of contaminants in the soil. The hexazinone is the herbicide most used for the sugarcane crop, and presents persistence in the environment. And its main route of degradation in the soil is through microorganisms. Thus,

six microorganisms were selected which presented growth in the presence of the herbicide: SCR1 - *M. arborescens*; SCR2 - *B. pumillus*; SCM3 - *S. maltophilia*; SCM4 - *B. cereus*; SCM5A - *M. arborescens*; SCM5B - *B. safensis*. A test was performed to evaluate the ability of each lineage in phosphate solubilization. And for the $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ solubilization test, the strains that showed the best results were *B. pumillus* and *S. maltophilia*. Subsequently the inoculants were prepared and the concentration after plating 2.71×10^9 CFU.mL⁻¹ for *B. pumillus*, 1.02×10^9 UFC.mL⁻¹ for *S. maltophilia* and consortium with the two strains 1.14×10^{10} UFC.mL⁻¹. These being satisfactory values for use as inoculants.

Key words: *B. pumillus*, *S. matophilia*, inoculant, bioremediation, hexazinone.

1. INTRODUÇÃO

Os solos agrícolas possuem uma diversidade microbiana que pode exibir propriedades de degradação por permanecerem em condições de estresse. Por isso, torna-se viável o isolamento de micro-organismos nessas condições para utilizar como inoculantes e aumentar a degradação de contaminantes (VILLAVERDE et al., 2018).

A bioaumentação no solo, introdução de cepas e consórcio microbiano com capacidades catalíticas desejadas permitem o aumento da capacidade de degradação de xenobióticos (PIOTROWSKA et al., 2010). Sendo que a fitorremediação associadas a micro-organismos compreende uma tecnologia promissora para a descontaminação de ambientes (SALT et al., 1998). As bactérias podem interagir no ambiente contaminado de diversas formas, seja na promoção de crescimento vegetal, que favorece a planta em condições de estresse, na degradação de compostos tóxicos e disponibilidade de nutrientes.

Hexazinona é um herbicida utilizado para a cultura da cana-de-açúcar (TONIETO E REGINATO, 2014), pertencente ao grupo químico das triazinas, é utilizado para o controle de ervas daninhas. De acordo com Martins (2015), o fato desta molécula apresentar solubilidade moderada em meio aquoso, torna-se relevante o estudo e avaliação dos riscos que esse composto pode gerar ao meio ambiente. A contaminação pode ocorrer em meios variados, como água, solo e ar, que resulta em um risco potencial. Sua principal via de degradação no solo, é atribuída a micro-organismos. Porém, a taxa de degradação é lenta e a atividade residual pode se prolongar por vários meses. Para Wang et al. (2012), a degradação da molécula está associada ao teor de carbono orgânico e da atividade microbiana no solo.

Com isso, o objetivo deste trabalho, foi selecionar micro-organismos tolerantes à

hexazinona que apresente capacidade de solubilização de fosfato bem como o preparo de inoculantes para aplicação associado a planta na remediação de solo contaminado com hexazinona.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Isolamento microbiano de solo contaminado com hexazinona

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Aplicada do IF Goiano Campus Rio Verde. As amostras de solo foram coletadas de local com histórico de aplicação recente do herbicida hexazinona, na profundidade de 10 centímetros em 20 pontos diferentes, e foram homogeneizadas para obtenção de uma amostra composta. Os microrganismos foram isolados a partir de diluição seriada e o espalhamento em placa, a partir de 1g do solo diluídos em 9 ml de solução salina (0,85%). Foram utilizadas três repetições e realizada diluição seriada até 10^9 .

Para plaqueamento, 0,1ml de cada amostra foi espalhado em placas de petri, com auxílio de alca de Drigalski, contendo meio rico (ágar nutriente) com e sem herbicida e meio mínimo ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1g; NaCl 1g; KH_2SO_4 1,5g; MgSO_4 0,2g; ágar 15g) com e sem herbicida. Os tratamentos sem herbicida serviram como controle. As placas foram incubadas a 28°C por 24 horas e 48 horas para meio rico e mínimo, respectivamente, e foram realizadas as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC). A dose utilizada do herbicida foi de $4,86 \text{ mL.L}^{-1}$, representando a dose comercial de aplicação, considerando volume de calda de 200 L. ha^{-1} .

O isolamento de bactérias tolerantes ao herbicida hexazinona foi realizado por análise de UFCs que apresentaram halo de degradação e com base nas diferenças morfológicas das placas que continham o herbicida.

O experimento foi executado em delineamento inteiramente ao acaso em arranjo fatorial 4×9 , sendo quatro tratamentos com meio rico com e sem herbicida e meio mínimo com e sem herbicida e nove diluições, com três repetições.

2.1 Extração de DNA e amplificação do gene 16S rDNA

Os isolados foram selecionados por apresentar mecanismos de resistência ou tolerância ao herbicida. O procedimento de extração de DNA bacteriano foi realizado no Laboratório de Genética de Microrganismos Prof. João Lúcio de Azevedo, na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ – São Paulo. Antes da extração, as amostras bacterianas foram inoculadas em meio líquido e colocadas em agitador a 110rpm 28° “overnight”. Todo o conteúdo das amostras foi centrifugado nas seguintes condições: 2 ml a 1200 rpm por 2 min, para aumentar a massa de células.

Utilizou-se o DNeasy Blood & Tissue Kits para a extração. O gene 16S rDNA foi amplificado pela reação em cadeia polimerase (PCR) utilizando os primers R1387 – (CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG) e POF27F – (GAG AGT TTG ATC CTG GCT), em reações com volume final de 25µl contendo 2,5µl de solução tampão; 2,0µl de MgCl₂; 0,5µl de DNTp; 0,2µl de Taq DNA polimerase; 0,5µl de cada primer; e 1µl da amostra. A reação de PCR foi conduzida em termociclador nas seguintes condições: (95 °C 2:00 min. 1x; 95 °C 0:30 min.; 62,5 °C 0:30 min.; 72 °C 1 min.; 72°C 10 min. 35x) e 6 °C ∞ 1x). A quantificação do DNA foi realizada com 1µL do produto por eletroforese em gel de agarose (0,8%).

O produto de PCR foi utilizado para a purificação com kit Illustra GFX PCR DNA e Gel Band Purification. O produto da purificação foi sequenciado utilizando o método Sanger no Laboratório de Biotecnologia Animal - ESALQ/SP. As sequências do 16S foram comparadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), com sequências conhecidas por busca de similaridade via Blastn.

2.2 Árvore de similaridade para identificação dos isolados bacterianos

A construção da árvore foi realizada com o software MEGA 7 (TAMURA et al., 2013), utilizando o algoritmo Neighbour-Joining, pela opção de distância de acordo com o modelo Jukes e Cantor (1969), no qual as sequências das bactérias, foram comparadas às sequências tipo, com base nos resultados observados no Basic Local Alignment Search Tool – BLASTn e Ribosomal Database Project – RDP. A robustez da árvore de similaridade foi confirmada pela análise de 5.000 bootstrap e *Burkholderia sp.* (AB334766-1) foi utilizado como *out group*.

2.3 Teste de micro-organismos para a solubilização de fosfatos

Os isolados foram caracterizados e selecionados por promoverem o crescimento da planta, considerando o traço funcional de solubilização de fosfato de cálcio inorgânico, que pode auxiliar na disponibilidade de nutrientes.

As culturas puras de bactérias isoladas do solo foram inoculadas em meio de cultura GL: 10 g glicose e 2 g extrato de levedura em 1 L de água destilada, em tubos de ensaio contendo 10 mL cada (SYLVESTER-BRADLEY, 1982) e foram mantidas por 24 horas sob agitação orbital – Shaker (110rpm 28°C) para obtenção do pré-inóculo. Retirou-se uma alíquota de 1mL para leitura da densidade óptica (DO_{600}) em espectrofotômetro.

Todas as bactérias tiveram suas DO_{600} (0,5) equiparadas por meio de diluição salina (0,85%). Foram adicionadas separadamente as fontes insolúveis de fosfato em cada meio (5 g L^{-1} de fosfato de cálcio - $Ca_3(PO_4)_2$; 1 g L^{-1} de fosfato de ferro - $FePO_4$; 2 g L^{-1} de fosfato de alumínio - $AlPO_4$. Inoculou-se 1mL de cada cultura em 8mL de meio, em triplicata (Gadagi e Sá, 2002). Mantidos sob agitação constante com auxílio de mesa agitadora pendular (TE-240/1 Tecnal[®]) a 100rpm, por 72h e 28°C.

Após o período de crescimento, o pH das amostras foi aferido e a solubilização de fosfato foi avaliada por meio do método colorimétrico descrito por Braga e DeFelipo (1974), em que 2 ml da cultura foram centrifugadas a 8.000 rpm, por 10 min e a 10 °C. Em seguida, 1mL do sobrenadante foi adicionado a 9mL do reagente de trabalho [900mL de água destilada, 0,4 g de ácido ascórbico e 100mL da solução 725 (0,1 g de subcarbonato de bismuto, 6,8mL de ácido sulfúrico, 30mL de água destilada, 2,0 g de molibdato de amônio, 6,8mL de ácido sulfúrico/completar para 100mL em balão volumétrico)]. Transcorridos 20 minutos, foi realizada a leitura a 725nm em espectrofotômetro. A solubilização de fosfato foi determinada utilizando a equação da curva padrão de ácido fosfórico ($160mg.L^{-1}$) e as médias comparadas pelo teste Tukey(5%).

2.5 Preparo de inoculantes bacterianos para aplicação em fitorremediação assistida por Micro-organismos (FAM)

2.5.1 Curvas de crescimento de micro-organismos solubilizadores de fosfato

Foi realizada a curva de crescimento dos micro-organismos selecionados a partir do teste de solubilização de fosfatos. Foi inoculada uma colônia de cada bactéria em tubos de ensaio mantidos sob agitação orbital – Shaker (110rpm 28°C) – por 24h. A DO₆₀₀ medida foi de 0,6. Em erlenmeyers com 40 mL de caldo nutriente (5g peptona, 3g extrato de levedura em 1L de água destilada), foi inoculado 400µl em três repetições (1% do volume total). A DO₆₀₀ foi medida com intervalo de 2h em 2h até atingir a fase estacionária.

A contagem de UFCs foi realizada pela inoculação das amostras a partir de plaqueamento em meio rico em três diferentes tempos: início da fase log de crescimento e fi

3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre os tratamentos foram observadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), através do software Sisvar®. Para os ensaios de solubilização de fosfatos, analisou-se o coeficiente de correlação de Pearson entre solúvel liberado por bactérias e pH do meio, através do software SigmaPlot®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolados microbianos tolerantes à hexazinona

Os micro-organismos foram inoculados nas placas com os seguintes tratamentos: ágar nutriente com e sem herbicida, e placas de meio mínimo com e sem herbicida. A diluição que possibilitou a contagem de UFCs nas placas foi a de 10^{-2} .

Observou-se que apenas um tratamento se diferiu dos demais (Figura 1), sendo ele de meio mínimo sem herbicida. Visualmente, constataram-se diferenças morfológicas no crescimento dos micro-organismos, sendo que, nos tratamentos com meio rico, o crescimento foi mais acelerado, formando colônias maiores e em menor quantidade. Nos tratamentos com meio mínimo, houve maior formação de UFCs, resultando em colônias de menor diâmetro, se

comparadas com o tratamento anterior.

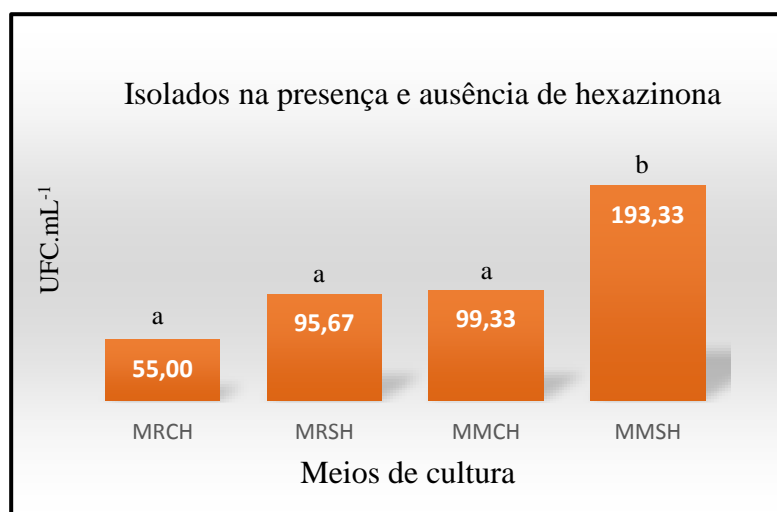


Figura 1 - Meio rico com herbicida (MRCH); Meio rico sem herbicida (MRSH); Meio mínimo com herbicida (MMCH) Meio mínimo sem herbicida (MMSH). Histogramas contendo as mesmas letras são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Houve uma inibição no crescimento de UFCs na presença do herbicida para meio rico e mínimo. Este comportamento de crescimento pode estar relacionado com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) na célula, cujo aumento está relacionado com exposição a agentes químicos, como metais pesados e outros tipos herbicidas, responsáveis por gerar danos oxidativos no tecido celular (ZHANG et al., 2012; CRAY et al., 2013).

Enzimas antioxidantes presentes nos micro-organismos podem atuar como defesa contra o excesso de ROS (GRATA et al., 2005). Porém, as UFCs que foram formadas na presença do herbicida indicam tolerância no meio rico e, no meio mínimo, as cepas foram capazes de utilizar o herbicida como fonte de nutriente ou carbono.

A partir dos tratamentos com herbicida, foram selecionados 6 UFCs, sendo 2 de meio rico (potencialmente tolerantes) e 4 de meio mínimo (potencialmente degradantes). O parâmetro para seleção, foi através da observação de diferenças morfológicas entre as UFCs crescidas na placa. A identificação primária dos isolados levou em consideração a origem e o meio de crescimento do micro-organismo conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Isolados bacterianos de meio rico e meio mínimo. Sendo, S: oriundos do solo, C: crescidos na presença de herbicida, R: meio rico, M: meio mínimo.

Isolados na presença de hexazinona	
Meio rico	SCR-1
	SCR-2
Meio mínimo	SCM-3
	SCM-4
	SCM-5A
	SCM- 5B

4.2 Identificação molecular por gene 16S rDNA

A identificação da sequência rDNA 16S por análise de similaridade comparadas no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) possibilitou a identificação prévia das seis cepas isoladas (Tabela 2). A construção da relação filogenética possibilitou a identificação de cinco espécies (Figura 2). Porém, não foi possível inserir a espécie e SCM-5B na relação pela menor qualidade da sequência de pares de bases. Entretanto, em análise de similaridade comparadas no banco de dados do GenBank, acredita-se que seja *Bacillus safensis*.

Tabela 2 – Isolados do solo identificados por análise de similaridade no banco de dados GenBank.

Isolados do solo	Identificação de rDNA por dados GenBank	Similaridade (%)
SCR-1	<i>Microbacterium arborescens</i>	100%
SCR-2	<i>Bacillus pumillus</i>	100%
SCM-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100%
SCM-4	<i>Bacillus cereus</i>	100%
SCM-5A	<i>Microbacterium arborescens</i>	100%
SCM-5B	<i>Bacillus safensis</i>	100%

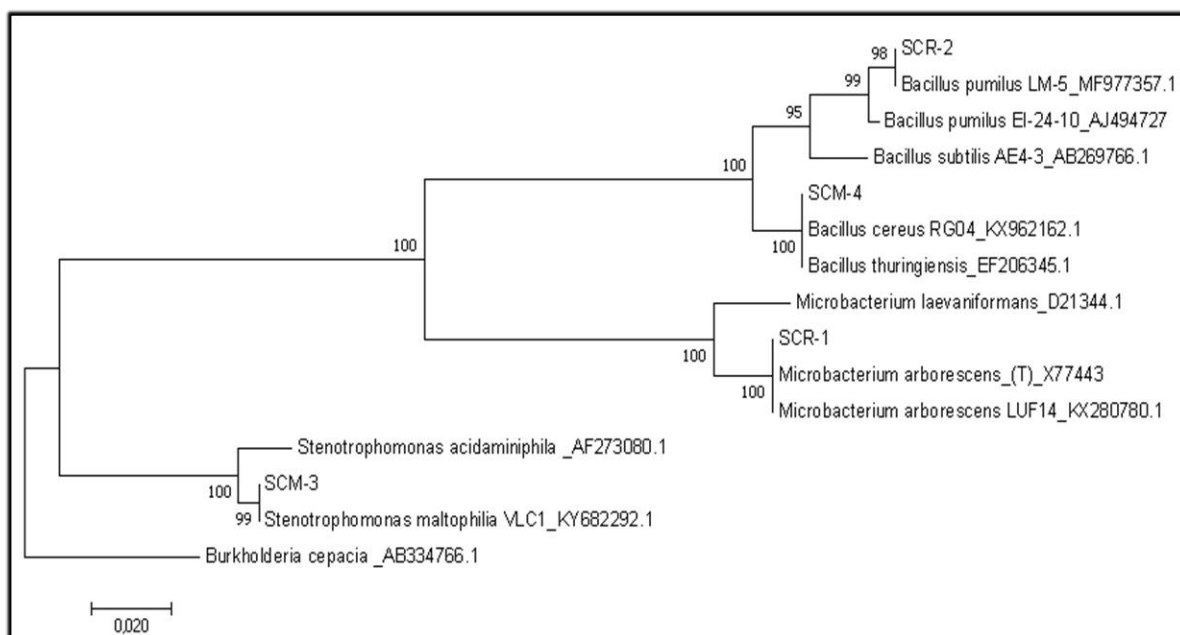


Figura 2 - Análise de similaridade baseado em sequências de rRNA 16S parciais, mostrando as relações entre sequências de isolados bacterianos de solo contaminado e alguns de seus parentes filogenéticos mais próximos (indicado pelo número de acesso). *Burkholderia cepacia* (AB3347661) foi utilizado como grupo externo.

Bactérias do gênero *Bacillus* são conhecidas por suas habilidades em degradar grande variedade de xenobióticos (PINTO et al., 2012). Quando isoladas de solos contaminados com herbicida, observou-se tolerância e habilidades de degradação em testes na presença de diversas moléculas (BARDOT et al., 2015; ZHANG et al., 2018; CUI et al., 2018). *Bacillus sp.* apresentou alta eficiência na remoção de atrazina (90%) em meio líquido (GEED et al., 2017), além da promoção de crescimento vegetal.

Para o gênero *Microbacterium*, foi investigada e constatada a potencialidade de degradação e desintoxicação de contaminantes ambientais, pelas características genômicas (AVRAMOV et al., 2016).

4.3 Micro-organismos solubilizadores de fosfato de ferro

No teste de solubilização de fosfato de ferro (Tabela 3), observou-se interação entre concentração de fosfato de ferro solubilizado e faixa de pH. Na concentração de ferro solúvel no meio, as menores concentrações de FePO_4 foram para *M. arborescens* (SCM-5A); *B.*

safensis (SCM-5B) e *S. maltophilia* (SCM-3). Nota-se maior concentração de fosfato de ferro solubilizado para a cepa *B. pumillus* (SCR-2) com 271,33 mg mL⁻¹, seguido da *B. cereus* (SCM-4), com 258,57 mg mL⁻¹.

Considerando o valor inicial de pH (6,5), observou-se que houve acidificação do pH para os tratamentos controle *M. arborescens*, *B. pumillus* e *B. cereus*. Já para os tratamentos *S. maltophilia*, *M. arborescens* (SCM-5A) e *B. safensis* ocorreu uma basicidade do meio.

Correlacionando as variáveis de concentração de fosfato de ferro insolúvel e faixa de pH, obteve-se coeficiente de correlação de Pearson negativo (R= - 0,97). Portanto, à medida que o pH do meio é acidificado, há maior solubilização de fosfato de ferro. Para confirmar, foram observadas as cepas *B. pumillus* com pH de 4,53 e *B. cereus* com pH de 4,83, em que foi observado os maiores valores de fosfato solubilizado.

Tabela 3 – Concentração de Fe solubilizado por cepas bacterianas isoladas de solo contaminado e valores de pH.

Isolados	Linhagens identificadas Gene 16S rDNA	FePO ₄ mg mL ⁻¹	pH
	Controle	241,04 b	4,86 b
SCR-1	<i>Microbacterium arborescens</i>	251,54 bc	5,02 c
SCR-2	<i>Bacillus pumillus</i>	271,33 c	4,53 a
SCM-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	200,67 a	6,90 f
SCM-4	<i>Bacillus cereus</i>	258,57 bc	4,83 b
SCM-5A	<i>Microbacterium arborescens2</i>	197,70 a	6,57 d
SCM-5B	<i>Bacillus safensis</i>	196,54 a	6,71 e
	F	58,59*	2393,1*
	CV(%)	3,13	0,65

Médias seguidas pelas mesmas letras são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey (p<0,05).

Conforme apresentado por Anzuay et al. (2017), as bactérias solubilizadoras de FePO₄ também foram acompanhadas de decréscimo do pH, sendo que a solubilização de P foi associada a diminuição do pH, sendo que as bactérias do gênero *Bacillus* apresentaram aumento de biomassa para as leguminosas amendoim e milho.

4.4 Micro-organismos solubilizadores de fosfato de cálcio

Para os valores obtidos no teste de solubilização de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), observou-se que houve interação entre os fatores concentração de cálcio solubilizado e pH (Tabela 4). As menores concentrações de solubilização de $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ foram para *M. arborescens* (SCM-5A) e *B. safensis*, sugerindo baixa capacidade de solubilizar. As linhagens que apresentaram maior solubilização foram *B. pumillus* e *S. maltophilia*, com 334,44 g mL⁻¹ e 334,30 g mL⁻¹, respectivamente, indicando o traço funcional de solubilização mais eficiente, sendo que houve acidificação do pH para ambas as linhagens, apontando para mecanismo das linhagens para favorecer a solubilização.

Ao correlacionar as duas variáveis analisadas, concentração de fosfato de cálcio solubilizado e pH, também foi observado forte correlação negativa ($R = -0,95$), sendo que, à medida que o pH se torna mais ácido, mais ocorre a solubilização de fosfato de cálcio inorgânico. Como observado por Merbach et al. (2009), a solubilização de fosfato de cálcio aumenta à medida que o pH diminui. Os ácidos orgânicos produzidos por micro-organismos podem facilitar a solubilização de P, através da mudança de pH do meio (YADAV ET AL., 2017).

Tabela 4 – Concentração de Ca solubilizado por cepas bacterianas isoladas de solo contaminado e valores de pH.

Isolados	Linhagens identificadas Gene 16S rDNA	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ g.mL ⁻¹	pH
	Controle	39,36 a	6,51 bcd
SCR-1	<i>Microbacterium arborescens</i>	206,18 c	5,93 bc
SCR-2	<i>Bacillus pumillus</i>	334,44 d	4,82 a
SCM-3	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	334,30 d	4,88 a
SCM-4	<i>Bacillus cereus</i>	176,97 bc	5,49 b
SCM-5A	<i>Microbacterium arborescens</i> 2	53,87 ab	6,92 cd
SCM-5B	<i>Bacillus safensis</i>	49,93 a	7,05 d
	F	26,406*	19,488*
	CV(%)	25,53	6,08

Médias seguidas pelas mesmas letras são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Para o gênero *Bacillus*, a solubilização de fosfato foi aumentada na presença de herbicidas (RAMANI, 2011). *Stenotrophomonas maltophilia* isolada de rizosfera de cana-de-açúcar foi considerada como boa candidata para a solubilização de fosfatos de cálcio (AWAIS et al., 2017). O incremento de pesticidas não altera a quantidade de bactérias solubilizadoras de fosfato (GIRVAN et al., 2004; ANZUAY et al., 2015), visto que, após a adição de herbicidas e inseticidas, notou-se aumento nas bactérias com esse traço funcional. Segundo esses autores, isso é, pela utilização pelo micro-organismo das moléculas como fonte de energia, carbono e outros nutrientes aproveitados no metabolismo celular (DAS; DABNATH, 2006).

Bacillus pumillus e *Stenotrophomonas maltophilia* se mostraram tolerantes à hexazinona e com traço funcional de solubilização de fosfato de cálcio, característica importante para os solos com alto teor de cálcio. Para Kwon et al. (2017). *Stenotrophomonas* possui potencial biotecnológico devido ao seu metabolismo. *B. pumillus* foi citado por possuir capacidade de degradação de molécula orgânica (COSTA et al., 2014), bem como características de promoção de crescimento vegetal para o gênero *Bacillus* (MEDINA et al., 2003).

4.5 Curva de crescimento

Foi realizada a curva de crescimento de ambas as cepas utilizadas, que foram analisadas espectrofotometricamente (DO_{600}), a fim de encontrar a fase de aumento exponencial de crescimento bacteriano, ou seja, o momento em que há maior produção de células bacterianas com metabolismo ativo. Nas medições realizadas em intervalos diferentes, observou-se para a linhagem *B. pumillus*, que a fase log se iniciou após 5 horas de crescimento, a fase estacionária atingida após 15 horas e ocorre decréscimo após as 18 horas, como pode ser observada na figura 3.

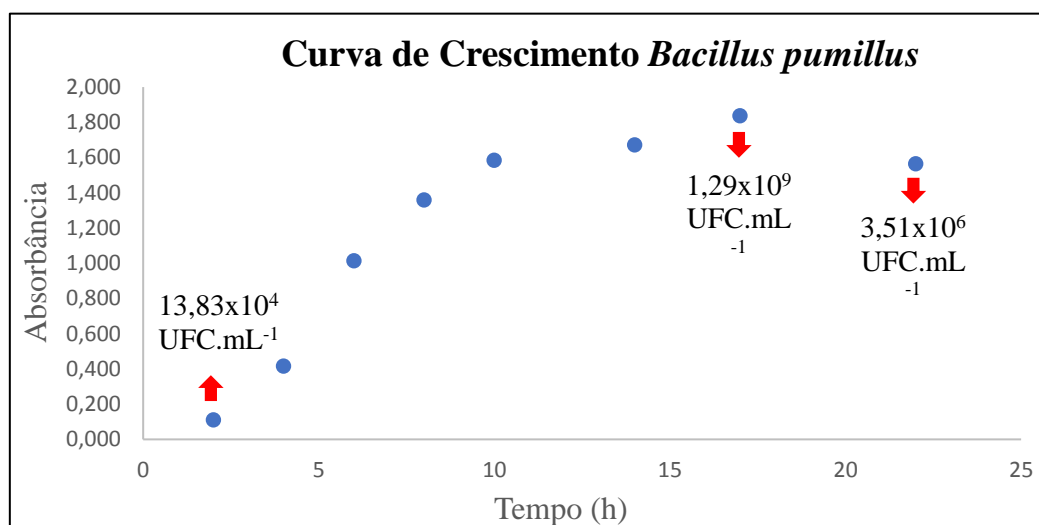


Figura 3 – Curva de crescimento bacteriano de *Bacillus pumillus*. Absorbância por tempo. Unidades formadoras de colônias em cada tempo.

Conforme apresentado por Anwar et al. (2009), *B. pumillus* apresentou rápida degradação do inseticida clorpirifós, em alta densidade celular (10^9 UFC.mL⁻¹). Em densidades menores, porém, a degradação foi mais lenta, tendo como condição pH próximo da neutralidade. Foi observada a sobrevivência de *B. pumillus* na rizosfera de azevém após inoculação, tendo área de raiz aumentada (AHMAD et al., 2012).

Para a cepa bacteriana *S. maltophilia*, a fase logarítmica foi observada após 5 horas de crescimento, a fase estacionária foi observada as 14 horas, com decréscimo no crescimento após as 21 h.

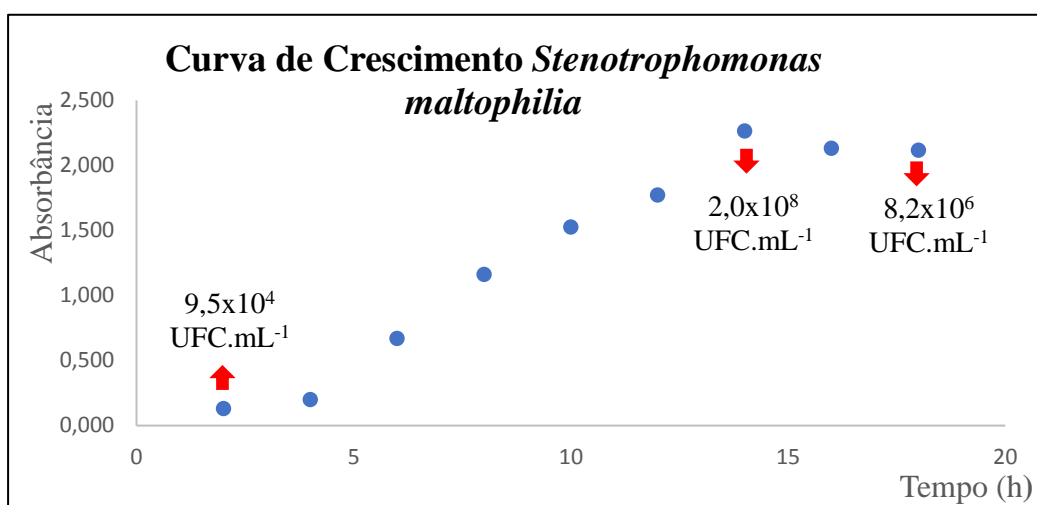


Figura 4 – Curva de crescimento bacteriano de *Stenotrophomonas maltophilia*. Absorbância por tempo. Unidades formadoras de colônias em cada tempo.

O gênero *Stenotrophomonas* foi relatado como promotor de crescimento vegetal de plantas e agente de controle biológico pela alta produção de metabólitos e enzimas antifúngicas (ELHALAG et al., 2015; SÓLIS et al., 2018). Para Dubey et al. (2012), *S. maltophilia* tem aplicações promissoras na utilização de biorremediação e fitorremediação, devido aos genes que metabolizam grande variedades de compostos orgânicos presentes na rizosfera de plantas, apresentando eficiência da degradação de xenobióticos (ZHANG et al., 2007), chorpyrifos (DUBEY et al., 2012), metal pesado (SHOUANA et al., 2017) e hidrocarbonetos poliaromáticos (TIWARI et al., 2016; SHUONA et al., 2017).

S. maltophilia tem o potencial de reduzir concentrações de MTBE (produto adicionado à gasolina) em água, sendo que o crescimento celular aumentou até 18 horas após a incubação. Devido aos genes característicos da bactéria, capazes de utilizar o contaminante com única fonte de carbono, pode ter favorecido o crescimento, tendo uma eficiência de degradação de 48%. (ALFONSO-GORDILLO et al., 2016).

5. CONCLUSÕES

Seis isolados bacterianos foram selecionados a partir de meio mineral e meio rico com herbicida, levando em consideração tamanho das unidades formadoras de colônias e diferenças morfológicas. Foram identificados a partir da extração de DNA e amplificação do gene rDNA

16S como: SCR1 – *M. arborescens*; SCR2 – *B. pumillus*; SCM3 – *S. maltophilia*; SCM4 – *B. cereus*; SCM5A – *M. arborescens*; SCM5B – *B. safensis*.

Dentre essas linhagens, a partir do teste de solubilização de fosfato de cálcio, selecionou-se SCR2 – *B. pumillus* e SCM3 – *S. maltophilia* como melhores candidatos à promoção de crescimento vegetal. A partir disso, foram preparados inoculantes microbianos, em concentrações de 10^9 UFC.mL⁻¹ com base nas curvas de crescimento estudadas.

REFERÊNCIAS

Acevedo, E.; Galindo-Castañeda, T.; Prada, F.; Navia, M.; Romero, H.M. Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineenses* Jacq.). **Appl Soil Ecological**, v. 80, p.26-33, 2014.

Agency Environmental Protection (EPA). What is a pesticide? Whashington, 2012. Disponível em: <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.

Ahmad, F.; Iqbal, S.; Anwar, S.; Afzal, M.; Islam, E.; Mustafa, T.; Khan, Q.M. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumillus* C2A1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 238, p. 110-115, 2012.

Alfonso-Gordillo, G.; Urbina, E.C.; Ortiz, C. M. F.; Peralta, H.; Díaz, C. C. J.; Maya, J. A. C.; Roblero, J. J. *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from gasoline contaminated soil is capable of degrading methyl terc-butyl ether. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 23, p. 12-20, 2016.

Anwar, S.; Liaquat, F.; Khan, Q.M.; Khalid, Z.M.; Iqbal, S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumillus* strain C2A1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, p. 400-405, 2009.

Anzuay, M.S.; Ciancio, G.R.; Luduena, M.L.; Angelini, J.G.; Barros, G.; Pastor, N.; Taurian, T. Growth promotion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and maize (*Zea mays* L.) plants by single and mixed cultures of eficiente phosphate solubilizing bacteria that are tolerant to abiotic stress and pesticides. **Microbiological Research**, v.199, p. 98-109, 2017.

Anzuay, M.S.; Frola, O.; Angelini, J.G.; Ludueña, L.M.; Ibañez, F.; Fabra, A.; Taurian, T. Effect of pesticides application on peanut (*Arachis hypogaea*L.) associated phosphate solubilizing soil bacteria. **Applied Soil Ecology**, v.95, p.31-37 2015.

Avramov, P.; Couger, M.B.; Hartley, E.L.; Land, C.; Wellendorf, R.; Hanafy, R.A.; Budd, C.; French, D.P.; Hoff, W.D.; Youssef, N. **Genomics Data**, v. 10, p. 54-60, 2016.

Awais, M.; Tariq, M.; Ali, A.; Ali, Q.; Khan, A.; Tabassum, B.; Nasir, A.; Husnain, T. Isolation, characterization and inter-relationship of phosphate solubilizing bacteria from the rhizosphere of sugarcane and rice. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.11, p. 312-321, 2017.

Bardot, C.; Besse-Hoggan, P.; Carles, L.; Le Gall, M.; Clary, G.; Chafey, F.; Federic, C.; Broussard, C.; Batisson, I. How the edaphic *Bacillus megaterium* strain Mes11 adapts its metabolism to the herbicide mesotrione pressure. **Environmental Pollution**, v. 199, p. 198-208, 2015.

Bashan, A.A; Kamnev, L.E.; Tricalcium phosphate is inappropriate as a universal selection factor for isolating and testing phosphate-solubilizing bacteria that enhance plant growth: a proposal for an alternative procedure. **Biol. Fertil. Soils**, v. 49, p. 465-479, 2013.

Blaylock, M.J.; Salt, D.E.; Dushenkov, S. Enhanced accumulation of Pb in Indian mustard by soil-applied chelating agents. **Environmental Science Technology**, v.31, p.860-867, 1997.

Braga, J. M.; Defelipo, B. V., 1974. Determinação espectrofotométrica de fósforo em extratos de solos e plantas. **Revista Ceres**, n. 113, v. 21, p. 73-85.

Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM. Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. **Biol Fertil Soils**. v. 46, p.727–738, 2010.

Costa, S.P.; Angelim, A.L.; Souza, M.F.Q.S.; Melo, V.M.M. Vegetative cells of *Bacillus pumilus* entrapped in chitosan beads as a product for hydrocarbon biodegradation. **Int. Biodeterioration e Biodegradation**, v. 87, p. 122-127, 2014.

Cray, J.A., Bell, A.N.W., Bhaganna, P., Mswaka, A.Y., Timson, D.J. and Hallsworth, J.E. The biology of habitat dominance; can microbes behave as weeds? **Microb Biotechnol.** , 2003.

Cui, N.; Wang, S.; Khorram, M.S.; Fang, H.; Yu, Y. Microbial degradation of fomesafen and detoxification of fomesafen-contaminated soil by the newly isolated strain *Bacillus* sp. FE-1 via a proposed biochemical degradation pathway. **Science of The Total Environment**, v. 616, p. 1612-1619, 2018.

Curtis, T.P.; Sloan, W.T.; Scannell, J.W. Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci*, v.99, p.10494-10499, 2002.

Damalas, C.A.; Eleftherohorinos, I.G. Exposure of pesticides, safety issues and risk assessment indicator. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v. 8, p. 1402-1419, 2011.

Das, A.C.; Debnath, A. Effect of systemic herbicides on N₂-fixing and phosphate solubilizing microorganisms in relation to availability of nitrogen and phosphorus in paddy soils of West Bengal. **Chemosphere**, v. 65, p. 1082-1086, 2006.

Dietz, A.C.; Schnoor J.L. Advances in phytoremediation. **Environ Health Perspect.** v.109, p. 163–168, 2001.

Dubey, K.K.; Fulekar, M.H. Chlorpyrifos bioremediation in Pennisetum rhizosphere by a novel potential degrader *Stenotrophomonas maltophilia* MHF ENV20. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 28, p.1715-1725, 2012.

Elhalag, K. M.; Emara, H.M.; Messiha, N.A.; Elhadad, S.A.; Abdallah, S.A. The relation of different crop roots exudates to the survival and suppressive effect of *Stenotrophomonas maltophilia* (PD4560), biocontrol agente of bacterial wilt of potato. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p. 829-840, 2015.

Fibach-Paldi, S.; Burdman, S.; Okon, Y. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. **FEMS Microbiology**, v. 326, p. 99-108, 2012.

Gadagi, R. S., & Sa, T. (2002). New isolation method for microorganisms solubilizing iron and aluminum phosphates using dyes. **Soil science and plant nutrition**, 48(4), 615-618.

Ghazali, F.M.; Rahman, R.N.Z.A.; Salleh, A.B.; Basri, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. *Int Biodeterior Biodegrad*, v. 54, p. 61-67, 2004.

Geed, S.R. Shrirame, B.S.; Singh, R.S.; Raj, N. Assessment of pesticides removal using two-stage Integrated Aerobic Treatment Plant (IATP) by *Bacillus sp.* Isolated from agricultural field. **Bioresource Technology**, v. 242, p. 45-54, 2017.

Giaccomazzi, N.; Cochet, N. Environmental impact of diuronic transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, p. 1021-1032, 2004.

Girvan, M.S.; Bullimore, J.; Ball, A.S.; Pretty, J.N.; Osborn, A.M. Responses of active bacterial and fungal communities in soil under winter wheat to different fertilizer and pesticide regimens. *Applied and Environmental Microbiology*, v.70, p. 2692-2701, 2004.

Glazer, A.N.; Nikaido, H. *Microbial biotechnology: fundamentals of applied microbiology*. **Freeman**, 1995.

Grata PL, Polle A, Lea PJ, Azevedo RA. Making the life of heavy metalstressed plants a little easier. **Funct Plant Biol** v, 32, p. 481–494, 2005.

Hamdi, H.; Benzarti, S.; Manusadzianas, L.; Aoyama, I.; Jedidi, N. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. **Soil Biol Biochemical**, v.39, p. 1926-1935, 2007.

Hoben, H.J.; Somasegaran, P. Comparison of the pour spread, and drop plate methods for enumeration of *Rhizobium spp.* in inoculants made from presterilized peat. *Applied and Environmental Microbiology*, v.44, p. 1246-1247, 1982.

Illmer PA, Schinner F. Solubilization of inorganic calcium phosphates solubilization mechanisms. **Soil Biol Biochem**. v.27, p. 257–263, 1995.

Khan MS, Zaidi A, Wani PA, Oves M. Role of plant growth promoting rhizobacteria in the

remediation of metal contaminated soils. **Environ chem let**, v. 7, p.1–19, 2009.

Maliha, R.; Samina, K.; Najma, A.; Sadia, A.; Farooq, L. Organic acids production and phosphate solubilization by phosphate solubilizing microorganisms under in vitro conditions. **Pak J Biol Sci**, v.7, p. 187-196, 2004.

Medina, A.; Probanza, A.; Gutierrez, J.; Razaón, R. Interactions of arbuscular-mycorrhizal fungi and *Bacillus* strains and their effects on plant growth microbial rhizosphere activity (thymidine and leucine incorporation) and fungal biomass (ergosterol and chitin). **Applied Soil Ecology**, v. 22, p.15-28, 2003.

Megharaj, M.; Ramakrishnan, B.; Venkateswarlu, K.; Sethunathan, N.; Naidu, R. Bioremediation approaches of organic pollutants: A critical perspective. **Environment International**, v. 37, p. 1362-1275, 2011.

Molla, M.A.Z.; Chowdary, A.A. Microbial mineralization of organic phosphate in soil. **Plant soil**, v. 78, p. 393-399, 1984.

Pinto, A.; Serrano C.; Pires, T.; Mestrinho, E.; Dias, L.; Teixeira, D.M. Degradation of terbuthylazine difenoconazole and pendimethalin pesticides by select fungi cultures. **Sci Total Environ**, v. 435, p. 402-410, 2012.

Ramani, V. Effect of pesticides on phosphate solubilization by *Bacillus sphaericus* and *Pseudomonas cepacia*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 99, p. 232-236, 2011.

Salt, D.E.; Smith, R.D.; Raskin, I. Phytoremediation. **Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v.49, p. 643-668, 1998.

Sánchez, M.G.; Kosnar, Z.; Aranda, E.; Tlustos, P. A comparative study to evaluate natural attenuation, mycoaugmentation, phytoremediation, and microbial-assisted phytoremediation strategies for the bioremediation of na aged PAH- polluted soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 147, p. 165-174, 2018.

Schindler DW, Hecky RE, Findlay DL, Stainton MP, Parker BR, Paterson MJ, Beaty KG, Lyng M, Kasian SEM. Eutrophication of lakes cannot be controlled by reducing nitrogen input: results of a 37-year whole-ecosystem experiment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.5, p. 11254–11258, 2008.

Sharma, B.; Dangi, A.K.; Shukla, P. Contemporary enzyme based Technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**. V. 210, p. 10-22, 2018.

Shuona, C.; Hua, Y.; Jिंगing, C.; Hui, P.; Zhi, D. Physiology and bioprocess of single cell of *Stenotrophomonas maltophilia* in bioremediation of co-existed benzo[a]pyrene and copper. **Journal of Hazardous Materials**, v. 321, p. 9-17, 2017.

Singh, B.; Singh, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v.42, p. 245-261, 2016.

Solís, D.R.; Salmón, E. Z.; Pérez, M.C.; Granados, M.C.R.; Rodríguez, L.M.; Santovo, G. *Pseudomonas stutzeri* E25 and *Stenotrophomonas maltophilia* CR71 endophytes produce antifungal volatile organic compounds and exhibit additive plant growth-promoting effects. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 13, p. 48-52, 2018.

Sorensen, S.J.; Schyberg, T.; Ronn, R. Predation by protozoa on *Escherichia coli* K12 in soil and transfer of resistance plasmid RP4 to indigenous bacteria in soil. ***App Soil Ecology***, v. 11, p. 79-90, 1999.

Suman, A.; Yadav, A. N.; Verma, P. Endophytic microbes in crops: diversity and beneficial impact for sustainable agriculture. In: SINGH, D. P.; SINGH, H. B.; PRABHA, R. ***Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity***. v.16. p. 117-143, 2016.

Sylvester-Bradley, R.; Asakawa, N.; La Torraca, S.; Magalhães, F.M.M.; Oliveira, L.A.; Pereira, R.M. (1982). Levantamento quantitativo de microrganismos solubilizadores de fosfatos na rizosfera de gramíneas e leguminosas forrageiras na Amazônia. 12(1): 15-22.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*,30(12), 2725-2729.

Tiwari, B.; Manickam, N.; Kumari, S.; Tiwari, A. Biodegradation and dissolution of polyaromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas* sp. ***Bioresource Technology***, v. 216, p. 1102-1105, 2016.

Villaverde, M.; Rubio-Bellido, M.; Moreno, L.; Merchan, F.; Morillo, E. Combined use of isolated microbial consortia of different agricultural soils and cyclodextrin as a bioremediation technique for soils contaminated with herbicides. ***Chemosphere***, v.193, p.118-125, 2018.

Voltan, Paulo Eduardo Nogueira. Remoção de diuron e hexazinona por meio de adsorção em carvão ativado, oxidação e tratamento em ciclo completo. Escola de engenharia de São Carlos. Departamento de hidráulica e saneamento. USP, São Carlos – SP, 2014.

Queiroz, S. C. N.; Ferracini, V. L.; Gomes, M. A. F.; Rosa, M. A. Comportamento do herbicida hexazinona em área de recarga do aquífero guarani cultivada com cana-de-açúcar. ***Química Nova***, v. 32, p. 378-381, seção1, p. 28, 2009.

Wang, H.; Wang, C.; Chen, F.; Ma, M.; Lin, Z.; Wang, W.; Xu, Zhengti.; Wang, X. Modification to degradation of hexazinone in forest soils amended with sewage sludge. ***Journal of Hazardous Materials***, v.200, p. 96-104, 2015.

Wasilkowski, D.; Mroziak, A.; Piotrowska-Seget, Z.Changes in enzyme activity and microbial community structure in heavy metal soil contaminated under in situ assisted by phytostabilization. ***Clean Soil Air Water***, v. 42, p. 1618 – 1625, 2014.

Wolski, E.A.; Murialdo, S.E.; Gonzales, J.F. Effect of pH and inoculum size on pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas* sp. ***Water SA***, v. 32, p. 1-5, 2006.

Xing Huang, Jian He, Xin Yan, Qing, Kai Chen, Qin He, Long Zhang, Xiaowei Liu, Shaochuang Chuang, Shunpeng Li, Jiandong Jiang. Microbial catabolism of chemical herbicides: Microbial resources, metabolic pathways and catabolic genes. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 2016.

Yadav, H.; Fátima, R.; Sharma, A.; Mathur, S. Improving the applicability of rock phosphate to alkaline soils by organic compost. **Applied Soil Ecology**, v. 113, p. 80-85, 2017.

Zhang Y, Meng D, Wang Z, Guo H, Wang Y, et al. (2012) Oxidative stress response in atrazine-degrading bacteria exposed to atrazine. **J Haz Mater** 229– 230: 434–438.

Zhang, J.; Lu, L.; Chen, F.; Chen, L.; Yin, J.; Huang, X. Detoxification of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. Za and enantioselective characteristics of na esterase gene LacE. **Journal of Hazardous Materials**, v. 341, p. 336-345, 2018.

Zhang, J.F.; Zheng, Y.G.; Liu, Z.Q.; Shen, Y.C. Preparation of 3-ketovalidoxylamine A C-N lyase substrate: N-p-nitrophenyl-3-ketovalidamine by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 1275-1281, 2007.

Zhou, P.; Zhang, N.; Zhang, C.; Huang, L.; Niu, Y. Molecular mechanism of enantioselective inhibition of acetolactate synthase by enantiomers of imazethapyr. **J. Agric Food Chem**, v. 58, p.4202-4206, 2010.

CAPÍTULO III

Cajanus cajan assistida por *B. pumillus* e *S. maltophilia* para fitorremediação de solo contaminado com hexazinona

RESUMO

A fitorremediação através do estímulo com micro-organismos tem sido considerada vantajosa para descontaminação de solos. Hexazinona é o herbicida mais utilizado para a cultura da cana-de-açúcar, e apresenta persistência no ambiente. Com isso, avaliou-se a eficiência de *C. cajan* inoculada com *B. pumillus*, *S. maltophilia* e consórcio microbiano em destoxificar solo com hexazinona. Foram realizadas avaliações biométricas e trocas gasosas aos 30 e 60 dias. As amostras de solo foram coletadas no tempo inicial e aos 60 dias para a quantificação via CLAE. As amostras de plantas foram coletadas aos 30 e 60 dias para análise fisiológica de peroxidação de lipídeos, e aos 60 dias para quantificação cromatográfica. Para todas as avaliações, não foram observadas diferenças significativas para nenhum tratamento. Houve efeito da época para peroxidação lipídica e trocas gasosas. A planta apresentou baixa capacidade de bioacumular e as amostras de solo diminuíram a concentração de hexazinona ao longo do tempo.

Palavras-chave: *C. cajan*, fitorremediação, *Bacillus pumillus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, hexazinona.

ABSTRACT

Phytoremediation through the stimulus with microorganisms has been considered advantageous for decontamination of soils. Hexazinone is the herbicide most used for the sugarcane crop, and presents persistence in the environment. Thus, the efficiency of *C. cajan* inoculated with *B. pumillus*, *S. maltophilia* and microbial consortium in detoxifying soil with hexazinone was evaluated. Biometric evaluations and gas exchanges were performed at 30 and 60 days. Soil samples were collected at the initial time and at 60 days for quantification via HPLC. Plant samples were collected at 30 and 60 days for physiological analysis of lipid peroxidation, and at 60 days for chromatographic quantification. For all evaluations, no significant differences were observed for any treatment. There was time effect for lipid peroxidation and gas exchange. The plant presented low capacity to bioaccumulate and the soil samples decreased the

concentration of hexazinone over time.

Key words: *C. cajan*, phytoremediation, *Bacillus pumillus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, hexazinone

1. INTRODUÇÃO

Os herbicidas são utilizados para o controle de plantas daninhas, apresentam persistência após aplicação (Seefeldt et. al., 2014), que representa uma série de impactos para o ambiente e saúde humana (Kang et. al., 2014). A fitorremediação tem sido considerada uma tecnologia promissora e eficiente para a descontaminação de solo e água (Salt et. al., 1998; Meagher et. al., 2000; Arslan et. al., 2015), pois aumenta a quantidade de carbono orgânico do solo, que pode estimular a atividade microbiana e aumentar a degradação próximo à região da rizosfera, além de auxiliar na estabilidade do solo e sequestro de carbono (Dietz et. al., 2005; Eapen et. al., 2005). A inoculação de micro-organismos para a remediação de xenobióticos e a aplicação de nutrientes, são importantes para garantir boas condições para remediação em períodos mais longos (Eapen et. al., 2007). A atividade microbiana das plantas, são de importância significativa para a fitorremediação (Hassan et. al., 2014).

A fitorremediação assistida por micro-organismos, com população edáfica e com estímulos através da inoculação em sementes, apresentam bons resultados (Greenberg et. al., 2006). Enzimas degradantes encontradas em plantas e micro-organismos também auxiliam no processo de destoxificação (Singer et. al., 2004). Plantas devem apresentar características que favoreçam a sua utilização, como tolerância e alta produção de biomassa. Os micro-organismos selecionados também devem apresentar tolerância, capacidade de degradação, ou traços funcionais que auxiliam na degradação.

Hexazinona é um herbicida da família das triazinas ($C_{12}H_{20}N_4O_2$) utilizado na cana-de-açúcar para o controle de ervas largas e gramíneas (Privman e Zuman, 1998), possui alta solubilidade ($33g.L^{-1}$) (FAO, 2017). Citado por Wang (2009), o hexazinona já foi encontrado em água subterrânea e solos, que provoca preocupações quanto à segurança para a saúde humana. A sua degradação se dá principalmente através do metabolismo microbiano nos solos e não é significativamente afetada por fotodegradação ou degradação química (Wang et. al., 2006).

Bacillus pumillus e *Stenotrophomonas maltophilia* foram apresentadas no Capítulo II como tolerantes a hexazinona e com capacidade de solubilizar fosfato de cálcio, podendo promover o crescimento da espécie vegetal. Com base nos ensaios posteriores, foram testadas a habilidade da *Cajanus cajan* e inoculantes microbianos na degradação da molécula em solo contaminado.

Cajanus cajan, conhecida popularmente como “feijão-guandu”, “feijão-andu”, “ervilha-de-pombo”, é uma leguminosa considerada de importância agrônômica pela produção de grãos de alto valor nutritivo, pois contém, segundo Hernandez e Foch (1985) e a Embrapa (1995), entre 18 a 28% de proteína; elevada concentração de nutrientes nos tecidos foliares (SILVEIRA et al., 2007), maior produção de N₂ por biomassa vegetal comparada com outras leguminosas (SAXENA; NADARAJAN, 2010) e alta fixação de nitrogênio (MACEDO et al., 2008), chegando 350 kg.ha⁻¹.ano⁻¹ (FORMENTINI et al., 2008). Além disso, possui alta resistência à seca em elevadas temperaturas (HANCOCK, 2007). Sendo a adubação verde a sua principal função, favorecida pela alta produção de biomassa (SALMI et al., 2007). Também é muito utilizada na rotação de culturas, como forma de recuperação de áreas degradadas, bem como para a fitorremediação, devido ao seu sistema radicular robusto (AZEVEDO et al., 2007).

Com esse trabalho, objetivou-se avaliar a fitorremediação assistida por microorganismos de solo contaminado com hexazinona, através de *C. cajan* inoculada com *B. pumillus*, *S. maltophilia*, consórcio microbiano, e através de bioaumentação.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O ensaio foi conduzido em casa de vegetação, no período de setembro a dezembro de 2017. Cada unidade experimental corresponde a vasos de 6 dm³, preenchidos com 6 kg de Latossolo Vermelho Escuro de textura média (70% de areia, 4% de silte, 26% de argila), com as seguintes características químicas: pH 5,3; matéria orgânica e carbono orgânico: 13 e 7,5g dm⁻³; P e K: 0,98 e 15mg dm⁻³; K⁺, Ca⁺², Mg⁺², Al⁺³, H + Al e CTC, foram de, respectivamente: 0,04; 1,18; 0,45; 0,02; 1,67; 3,34 cmol_c dm⁻³.

Elevou-se saturação por base do solo para 70% com auxílio da calagem. Então, procedeu-se a adubação, a partir da análise de solo, utilizando-se 40 kg ha⁻¹ de potássio (K₂O), 110 kg ha⁻¹ de fósforo (P₂O₅) e 40 kg ha⁻¹ de nitrogênio. E, após 30 dias, foi realizada adubação de cobertura, com 50 kg ha⁻¹ de nitrogênio.

A espécie vegetal utilizada – *Cajanus cajan* – foi escolhida com base na produção de biomassa determinada em teste preliminar (conforme descrito no Capítulo I). Os micro-organismos inoculados foram selecionados de acordo com a tolerância ao hexazinona e a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio inorgânico, sendo eles o *Bacillus pumillus* e a *Stenotrophomonas maltophilia*, como abordado no Capítulo II.

Foi utilizado o delineamento experimental em blocos ao acaso com cinco repetições. Os tratamentos foram arrançados em esquema fatorial (2x4) em duplicata, sendo o primeiro fator representado pela presença e ausência de *C. cajan* e o segundo, os inoculantes utilizados (testemunha, *B. pumillus*, *S. maltophilia* e consórcio (*B. pumillus* + *S. maltophilia*)).

O herbicida foi aplicado nos vasos com o auxílio de pulverizador costal com pressão à CO₂ constante de 2 bar, volume de calda de aproximadamente 260 L ha⁻¹. A dose de herbicida utilizada foi de 83,25 g ha⁻¹, que representa um terço da dose recomendada para solo de textura média. As aplicações foram realizadas no período matutino com temperatura de 31,1°C; velocidade do vento de 1 m s⁻¹, e umidade relativa do ar a 72,2%. A umidade dos vasos foi mantida com irrigação manual uma ou duas vezes por dia ou de acordo com a necessidade.

2.1 Inoculantes bacterianos de micro-organismos solubilizadores de fosfato

Os isolados bacterianos foram cultivados em meio caldo nutriente e coletados após 24 horas para preparo do inoculante a ser utilizado no experimento em casa de vegetação. Após atingirem a fase log de crescimento, na qual o metabolismo se apresenta ativo, as células foram centrifugadas a 4.000rpm, 10min e 4°C e o processo de lavagem e centrifugação para retirar resíduos do meio de cultura foi realizado 2x com H₂O_d. As células foram, então, adicionadas a H₂O_d, para ajustar a densidade óptica a 1 e atingirem 10⁸ células/mL, que foram utilizados para inoculação em sementes. A quantificação celular foi realizada a partir de plaqueamento em meio rico (HOBEN; SOMASEGARAM, 1982).

2.2 Inoculação em sementes

Depois de 48 horas da aplicação do herbicida, realizou-se a inoculação dos micro-organismos (testemunha, *B. pumillus*, *S. maltophilia* e consórcio (*B. pumillus* + *S. maltophilia*))

nas sementes.

Antes da inoculação, as sementes foram esterilizadas superficialmente com etanol (70%) durante 30s, NaClO (0,01%) por 2 minutos e, posteriormente, lavadas 4 vezes com água destilada e autoclavada (ABDUL-BAKI, 1974). As sementes foram agrupadas em sacos plásticos, sendo que cada tratamento continha 85 unidades, divididas para cinco parcelas.

Foram utilizados 5mL de inoculante em cada tratamento, sendo que cada semente recebeu 58,82 μ L de inóculo, mantidos em contato com a semente por 10 minutos, nas seguintes concentrações: 2,71x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *B. pumillus* (I1); 1,02x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *S. maltophilia*(I2); e 1,14x10¹⁰ UFC.mL⁻¹ *B. pumillus* + *S. maltophilia* (1+2).

Nos tratamentos sem espécie vegetal, a inoculação foi realizada em sulcos no solo, com 1mL de cada inoculante por parcela. Após a germinação, foi realizado um desbaste, deixando três plantas por unidade experimental.

Aos 30 dias, foi realizada uma segunda inoculação via drenching, em solos com e sem planta, utilizando 2mL de cada inóculo aplicados com auxílio da pipeta. As concentrações quantificadas no Capítulo II foram: 3,25x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *B. pumillus*; 1,23x10⁹ UFC.mL⁻¹ de *S. maltophilia*; e 2,08x10¹⁰ UFC.mL⁻¹ de *B. pumillus* + *S. maltophilia*.

2.3 Avaliações biométricas

Conduziram-se as avaliações de altura (cm), aos 30 e 60 DAE, com o auxílio de régua graduada, tomando-se como base o meristema apical (MADALÃO et al., 2017). Também foram avaliados os sintomas de fitointoxicação (%) aos 30 e 60 dias, atribuindo notas no intervalo de 0 a 100%, de acordo com os sintomas apresentados pelas plantas, sendo 0 a ausência de sintomas e 100 a morte da planta.

Aos 60 dias, parte aérea e raízes foram separadas para avaliação da produção de biomassa seca. As amostras foram acondicionadas em estufa a 65°C por 72 horas e, posteriormente, pesadas em balança analítica.

2.4 Amostragem de solo e planta

Devido às análises destrutivas, o experimento foi realizado em duplicata, sendo uma

delas destinada para coleta de folhas da planta aos 30 e 60 DAE para análise de peroxidação lipídica.

Também foram coletadas amostras de solo no tempo inicial (antes da inoculação) e aos 60 dias, e folhas da planta aos 60 dias, para quantificação cromatográfica. Em cada período, dez folhas foram coletadas por parcela, acondicionadas em sacos de alumínio e mantidas a -80°C até o momento da análise. Do solo, com auxílio de trado, coletaram-se 50g de cada parcela, que foram armazenadas em tubos falcon e mantidas em freezer a -20°C , até a realização da análise. A outra duplicata foi realizada para avaliação da altura e produção de biomassa seca.

2.5 Determinação de trocas gasosas

As medições de trocas gasosas das plantas, aos 30 e 60 dias, foram realizadas para estimar as variáveis de taxa fotossintética (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), condutância estomática (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), taxa transpiratória (E , $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e a relação entre a concentração interna e externa de CO_2 (C_i/C_a), em folhas completamente expandidas no terço médio da planta (MACHADO et al., 2005).

As medições foram realizadas utilizando analisador de gases ao infravermelho (LI-6400XTR, Licor®, Lincoln, Nebraska, EUA) e aconteceram entre 8 e 12 horas, utilizando-se radiação fotossinteticamente ativa (PAR) constante ($1000 \mu\text{mol f\u00f3tons m m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), concentração atmosf\u00e9rica de CO_2 (C_a) ($\sim 409 \mu\text{mol mol}^{-1}$), temperatura ($\sim 25^{\circ}\text{C}$) e umidade (46 – 67 %) ambientes.

2.6 Peroxidação lip\u00eddica

Os danos celulares foram avaliados por meio da quantifica\u00e7\u00e3o do produto de peroxida\u00e7\u00e3o de lip\u00eddeos (MDA), conforme descrito por Cakmak e Horst (1991). Amostras de 50 mg de tecido foliar foram maceradas em N_2 l\u00edquido em almofariz at\u00e9 a obten\u00e7\u00e3o de um p\u00f3 fino. Esse p\u00f3 foi homogeneizado em 1 mL, constitu\u00eddo de \u00e1cido tricloroac\u00e9tico (TCA) 1% (m/v). O homogeneizado foi centrifugado a $12000 \times g$, durante 15 min, a 4°C . Ap\u00f3s centrifuga\u00e7\u00e3o, 0,5 mL do sobrenadante foi adicionado a 1,5 mL da solu\u00e7\u00e3o de \u00e1cido tiobarbit\u00farico (TBA) 0,5% (m/v) (preparado em 10% (m/v) de TCA) e incubado em banho-maria a 95°C , por 30 min.

Após esse período, a reação foi parada em banho de gelo. As amostras foram centrifugadas a $9000 \times g$, por 10 min, e a absorvância específica do sobrenadante foi determinada a 532 nm. A absorvância inespecífica foi mensurada a 600 nm e subtraída do valor da absorvância específica. A concentração de MDA foi calculada usando o coeficiente de extinção de $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ e foi expressa em $\mu\text{mol kg}^{-1}$ de massa fresca (HEATH; PACKER, 1968).

2.7 Preparo das amostras para Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Conforme proposto por Mendes et al. (2016), utilizaram 30g de massa seca do solo com 30mL de metanol, mantidos sob agitação orbital a 200rpm por 30 minutos. Uma segunda extração foi realizada utilizando as mesmas condições. Essas amostras foram centrifugadas a 4000rpm por 10 minutos e a 4°C . O sobrenadante foi removido e evaporado em capela de exaustão durante 48 horas. Na sequência, as amostras foram filtradas em membranas de $0,45\mu\text{m}$ e armazenadas em frascos para análise.

Para tecido vegetal, como apresentado por Amadori et al. (2013), 2g de tecido vegetal previamente macerados em N líquido foram pesados e suspensos em 3mL de acetonitrila. Mantidos com agitação orbital a 150rpm por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3500rpm e os sobrenadantes foram reservados. O procedimento foi realizado três vezes, os sobrenadantes agrupados e filtrados em membrana de $0,45\mu\text{m}$ e armazenadas em frascos para análise.

2.8 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em amostras de solo e planta

A análise foi executada em CLAE-DAD/UV-VIS (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Detector de Arranjo de Diodo com sistema de detecção Ultravioleta/Visível) (Shimadzu®), em coluna C18 de aço inoxidável ($250 \times 4,6 \times 5\text{mm}$).

As condições cromatográficas para análise foram as seguintes: água (com ácido ortofosfórico adicionado para correção de pH para 2,2) e acetonitrila, como fase móvel a uma proporção de 35:65 (v v⁻¹); uma taxa de fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, um volume de injeção de 10 μL , uma temperatura da coluna de 35°C ; e um comprimento de onda de 242 e 235 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), e quando significativos, realizou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$). As variáveis analisadas aos 30 e 60 dias foram arranjadas em parcela subdivididas, através do software SISVAR®.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Inoculantes bacterianos de *B. pumillus*, *S. maltophilia* e consórcio

O inóculo foi quantificado através de plaqueamento e foi observado uma concentração de $2,71 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para *B. pumillus*, $1,02 \times 10^9$ UFC.mL⁻¹ para *S. maltophilia* e consórcio com as duas linhagens $1,14 \times 10^{10}$ UFC mL⁻¹. Sendo estes valores satisfatórios para utilização como inoculantes.

4.2 Avaliações biométricas

Na tabela 1, são apresentados os valores de índice de altura das plantas, fitointoxicação aos 30 e 60 DAE e as massas secas da parte aérea e de raiz de *C. cajan*. Não foram observadas diferenças significativas para altura, fitointoxicação, massa seca da parte aérea (MSPA) e massa seca da raiz (MSR). Isso sugere que uma vez que a dose aplicada do herbicida não apresentou dano para a espécie e os micro-organismos inoculados não apresentaram benefícios, em termos de crescimento da planta.

O tratamento com *B. pumillus* não apresentou efeito, porém, para Gupta et al. (2012), a inoculação de *Bacillus megaterium* em *C. cajan* aumentou o crescimento em 37% em relação ao controle e estímulo no comprimento de raiz de 21% em relação ao controle, sendo que em estudos posteriores, constataram maior estímulo da microbiota após a aplicação do inoculante (GRUPTA et al., 2016).

Tabela 1 – Índice de altura, fitointoxicação avaliados aos 30 a 60 DAE e índice de massa seca da parte aérea (MSPA) e de raiz (MSR) de *C. cajan* em função dos tratamentos: SHSI – tratamento sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2. DAE – dias após aplicação.

Tratamentos	Índice de altura		Índice de fitointoxicação		MSPA	MSR
	30 DAE	60 DAE	30 DAE	60 DAE		
SHSI	18,78	41,04	0	0	6,87	4,77
CHSI	18,70	41,97	1	0	6,85	3,70
CHI1	17,99	44,82	0	0	8,10	3,40
CHI2	18,73	44,15	2	0	7,85	3,83
CH1+2	20,44	45,34	1	0	7,87	4,47
Média	18,928a	43,464a	0,8a	0a	7,50a	4,03a
CV (%)	13,18	7,90	233,85	0	12,60	29,05
F(x)	0,672 ^{ns}	1,464 ^{ns}	1 ^{ns}	0 ^{ns}	2,014 ^{ns}	1,167 ^{ns}

Médias seguidas pelas mesmas letras nas colunas são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O gênero *Stenotrophomonas* foi relatado como agente de controle biológico e promotor de crescimento vegetal, pela alta produção de metabólitos e enzimas antifúngicas (Elhalag et al., 2015). Porém a inoculação com a linhagem *S. maltophilia* não apresentou sinais de aumento de crescimento para *C. cajan*.

A ausência de sintomas de fitointoxicação aos 30 e 60 dias sugere que o herbicida não causou efeito no metabolismo de *C. cajan*. O hexazinona quando metabolizado pela planta é convertido em diversos metabólitos hidroxilados e demetilados que não causam fitotoxicidade (Rodrigues e Almeida, 2011). *C. cajan* apresentou tolerância sob aplicações de imazethapyr e imazamox (Chouhan, 2017) e imazaquim, com 31,67% de fitointoxicação após 30 dias (Florido et al., 2014).

4.3 Determinação de trocas gasosas

Em plantas sob condições de estresse, a eficiência fotossintética pode diminuir pela menor dissipação de energia, que reduz a eficiência do fotossistema II (PSII) e taxa de transporte de elétrons (HAVAUX; NIYOGI, 1999). Não foram observadas diferenças

significativas entre os tratamentos para as variáveis avaliadas: taxa fotossintética, condutância estomática, taxa de transpiração e relação entre a concentração interna e externa de CO₂ (Tabela 2). Porém, quando se compara com épocas diferentes de avaliação, aos 30 e 60 dias houve diminuição de todas as variáveis, sendo consequência natural da diminuição de defesas da planta devido à idade (KUK et al., 2006).

Tabela 2 – Taxa fotossintética (A), condutância estomática (gs), taxa de transpiração (E) e concentração interna e externa de CO₂ (Ci/ca) avaliadas aos 30 e 60 dias em plantas de *C. cajan* em função dos tratamentos: SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CHI+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2, representado por F(A) e os intervalos entre as avaliações de cada variável representado por F(B).

Tratamentos	A ($\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		gs ($\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)		E ($\text{mmolH}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$)		Ci/Ca	
	30 DAE	60 DAE	30 DAE	60 DAE	30 DAE	60 DAE	30 DAE	60 DAE
SHSI	21,91	18,59	0,47	0,27	5,04	3,08	0,79	0,64
CHSI	20,41	22,14	0,52	0,34	6,03	3,66	0,83	0,69
CHI1	22,87	18,60	0,58	0,27	6,33	3,13	0,82	0,69
CHI2	21,15	19,42	0,56	0,30	6,20	3,54	0,83	0,66
CHI+2	24,89	15,47	0,61	0,20	6,40	2,57	0,81	0,65
Média	22,25 a	18,84 b	0,55 a	0,28 b	6,00 a	3,19 b	0,82 a	0,67 b
F(A)	0,103 ^{ns}		0,491 ^{ns}		0,674 ^{ns}		0,456 ^{ns}	
F(B)	7,017*		69,097*		58,362*		45,617*	
F(A*B)	2,005 ^{ns}		1,527 ^{ns}		0,788 ^{ns}		0,136 ^{ns}	
CV(%)	22,11		27,86		28,25		10,64	

Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

4.4 Peroxidação lipídica

O produto da peroxidação dos lipídeos foi medido como marcador de dano oxidativo, com valores expressos na Tabela 3. Para os tratamentos, não foram observadas diferenças significativas para as concentrações de malondialdeído (MDA), sendo que se notou um aumento na segunda avaliação, aos 60 dias. Kuk et al. (2006) credita essas diferenças nos níveis de peroxidação entre plantas jovens e velhas ao desenvolvimento de defesas antioxidantes, nas quais em plantas mais velhas as defesas tendem a diminuir.

Tabela 3 – Peroxidação lipídica em células vegetais de *C. cajan* na presença de hexazinona. Tratamentos: SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2 representado por F(A) e os intervalos entre as avaliações de cada variável representado por F(B).

Tratamentos	MDA ($\mu\text{mol g}^{-1}$ Massa Fresca)		Média
	30 DAE	60 DAE	
SHSI	17,53	30,49	24,01
CHSI	17,08	29,42	23,25
CHI1	14,86	33,38	24,12
CHI2	17,35	34,75	26,05
CH1+2	18,87	33,11	25,99
Média	17,14 b	32,23 a	
F (A)		0,309 ^{ns}	
F (B)		55,105*	
F (AxB)		0,362	
CV (%)		29,12	

Médias seguidas pelas mesmas letras nas linhas são estatisticamente iguais pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

O hexazinona ocasiona o bloqueio do transporte de elétrons e impede a produção de ATP e NADPH. Conjuntamente, uma série de reações é desencadeada e promove a peroxidação dos lipídeos de membranas celulares e leva a planta à morte (PEREZ-JONES et al., 2009). Portanto, não se pode afirmar que a quantidade de MDA medido está ligada à exposição ao herbicida, mas com o tempo decorrido e a diminuição de defesas antioxidantes de *C. cajan*.

4.5 Quantificações cromatográficas do herbicida no solo e planta por CLAE

A partir das análises dos cromatogramas, realizou-se a regressão de dados observados de concentração e área, para realizar a quantificação de hexazinona no solo e planta, resultando na equação linear ($y = 8.028.631,78x + 18.755,14$). Nessa equação tem-se que o valor que acompanha a variável independente representa o aumento da variável dependente quando se aumenta 1 unidade na concentração do herbicida e a variável que acompanha x representa o valor de y, quando a concentração é zero.

Observa-se nos cromatogramas (Figura 1), o tempo (em minutos) em que a molécula foi identificada.

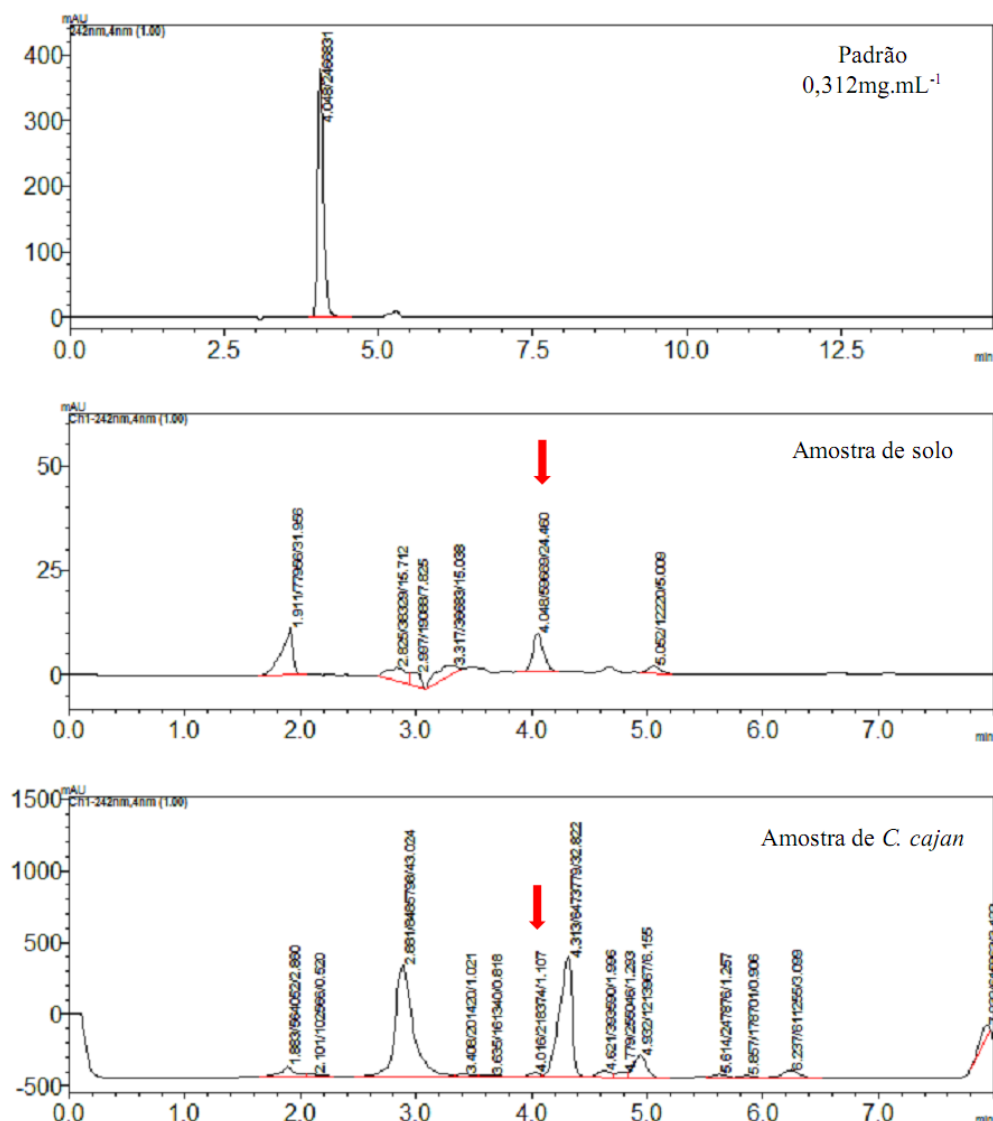


Figura 1 – Padrão de hexazinona, solo e tecido vegetal.

A raiz da planta é o primeiro tecido em contato com o herbicida, sendo que a habilidade em translocação para o caule e a parte aérea depende das propriedades físicas e químicas do poluente, bem como das características biológicas da espécie vegetal e do ambiente (CHENG et al., 2017). Solubilidade e concentração do composto no solo têm efeitos sobre a absorção e translocação nas plantas, sendo que moléculas disponíveis na solução do solo são absorvidas mais facilmente pelas raízes (INUI et al., 2008).

Através dos dados de quantificação do herbicida em peso fresco de *C. cajan*, não foi

observada diferença significativa entre os tratamentos. Porém, notaram concentrações de hexazinona em todos os outros tratamentos, exceto para o controle.

Tabela 4 – Quantificação de hexazinona em tecido vegetal de *C. cajan* (mg g¹) Tratamentos: SHSI – sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 – com herbicida, inóculo 2; CH1+2 – com herbicida, inóculo 1 + 2.

Tratamentos	Concentração de Hx por peso fresco (µg g ¹)
SHSI	0,0000
CHSI	26,30
CHI1	10,40
CHI2	14,40
CH1+2	9,60
Média	12,10
F(x)	0,7193 ^{ms}
CV (%)	207,69

Para as amostras de solo, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 5). Porém, no tempo final, aos 60 dias, não foi possível quantificar concentrações do herbicida para a maioria dos tratamentos, sugerindo que o herbicida foi dissipado, ou sofreu degradação natural. Acredita-se, então, que as plantas e micro-organismos podem ter auxiliado nessa dinâmica.

Tabela 5 – Quantificação de hexazinona em solo tratado com *C. cajan* e inoculantes (mg.g⁻¹)
 Tratamentos: SHSI –sem herbicida e sem inóculo; CHSI – com herbicida, sem inóculo; CHI1 – com herbicida, inóculo 1; CHI2 –com herbicida, inóculo 2; CH1+2 –com herbicida, inóculo 1 + 2.

Tratamentos	Concentração de Hx por peso seco de solo ($\mu\text{g g}^{-1}$) Ti		Concentração de Hx por peso seco de solo ($\mu\text{g g}^{-1}$) após 60 dias	
	Com planta	Sem planta	Com planta	Sem planta
SHSI	0	0	0	0
CHSI	0,0462	0,00626	0,0220	0
CHI1	0,130	0,00416	0	0,0120
CHI2	0,0381	0,0175	0	0
CH1+2	0,175	0,152	0	0
Média	0,0573 a		0,0034 a	
F(A)			0,0271 ^{ns}	
F(B)			0,0036 ^{ns}	
CV (%)			295,44	

Para Mendes et al. (2013), em solos com 15% de argila, o hexazinona apresentou alta mobilidade, sendo encontrado em camadas com 30cm de profundidade. Porém, o processo de lixiviação é afetado pela textura do solo, quantidade de carbono orgânico e composição mineralógica. As características do solo utilizado: 70% de areia e baixo teor de matéria orgânica (13g.dm³), além da alta solubilidade em água (33 g L⁻¹), favorecem a lixiviação. Em solo argiloso, as porcentagens de lixiviação detectadas foram menores, comparadas com solo arenoso. De acordo com Reis et al. (2017), a baixa capacidade de troca de cátions (CTC) de solo arenoso, comparada com solo argiloso, acarreta em um alto potencial de lixiviação, sendo que, no vaso, pode ocorrer a dissipação do herbicida no perfil do vaso. Portanto, a diminuição das concentrações de herbicida não atribuídas à planta e inoculante pode ser explicada pelo alto teor de areia, baixa quantidade de matéria orgânica e capacidade de troca de cátions do solo utilizado.

5 CONCLUSÕES

Apesar de *C. cajan* e inoculantes microbianos de *B. pumillus* e *S. maltophilia* terem se mostrado como bons candidatos à fitorremediação, não foi possível atribuir a diminuição da concentração de herbicida no solo aos tratamentos empregados, pois não se observaram

diferenças significativas para avaliações biométricas, fisiológicas e da quantificação do herbicida nas matrizes. Sendo que as características do solo aumentaram a disponibilidade do herbicida, e com isso o aumento da percolação no perfil do vaso.

REFERÊNCIAS

Abul-Baki, A.A. Pitfalls in using sodium hypochlorite as a seed disinfectant in C₁₄ incorporation studies. **Plant Physiology**, v. 53, p.768-771, 1974.

Arslan, M.; Imran, A.; Khan, Q.M.; Afzal, M. Plant-bacteria partnerships for the remediation of persistent organic pollutants. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, p. 1-15, 2015.

Benedetti, E. Leguminosas na produção de ruminantes nos trópicos. **EDUFU**, p. 118, 2005.

Cakmak L.; Horst W.J. Effect of aluminum on lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and peroxide activity in root tip of soybean (*Glycine max*). **Plant Physiol**, v. 83, p. 463–468, 1991.

Chouhan, M. Evaluation of pre and post emergence herbicides for weed control in soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) + Pigeonpea (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.) (4:2) Intercropping System in rainfed situation. **Department of Agronomy**, Sehore, 2017.

Eapen, S.; Singh, S.; D'Souza, S.F. Advances in development of transgenic plants for remediation of xenobiotic pollutants. **Biotechnol Adv**, v. 25, p. 442-451, 2007.

Elhalag, K.M.; Emara, H.M.; Messiha, N.A.; Elhadad, S.A.; Abdallah, S.A. The relation of different crop roots exudates to the survival and suppressive effect of *Stenotrophomonas maltophilia* (PD4560), biocontrol agent bacterial wilt of potato. **Journal of Phytopathology**, v. 163, p.829-840 2015.

Salmi, G.P.; Salmi, A.P.; Abboud, A.C.S. Dinâmica de decomposição e liberação de nutrientes de genótipos de guandu sob cultivo em aléias. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. V. 411 p. 673-678, 2007.

Florido, G.F.; Monquero, P.A.; Dias, A.C.R.; Tornisielo, V. L. The absorption and translocation of imazaquin in green manures. **Acta Sci Agron**. v.36, 2014.

Greenberg, B.M. Development and field tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of soils. **Can. Reclam**, v.1, p. 27-29, 2006.

Grupta, R.; Bisaria, V.S.; Sharma, S. Response of rhizospheric bacterial communities of *Cajanus cajan* to application of bioinoculants and chemical fertilizers: A comparative study. **European Journal of Soil Biology**, v. 75, p. 107-114, 2016.

Grupta, R.; Bru, D.; Bisaria, V.S.; Philippot, L.; Sharma, S. Responses of *Cajanus cajan* and

rhizospheric N-cycling communities to bioinoculants. **Plant and Soil**, v. 358, p.143-154, 2012.

Hancock, J.F. Plant evolution and the Origin of crop species. Massachusetts, CABI publishing, p. 313,2004.

Hassan, S.E.D.; Bell, T.H.; Stefani, F.O.; Denis, D.; Hijri, M.; St-Arnaud, M. Contrasting the community structure of arbuscular mycorrhizal fungi from hydrocarbon-contaminated and uncontaminated soil following willow (*Salix* spp.L.) planting. **Plos One**, v.9, 2014. e102838

Havaux, M.; Niyogi, K.K. The violaxanthin cycle protects plantas from photooxidative damage by more than one mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.8762-8767, 1999.

Heath, R.L.; Packer, L. Photoperoxidation in isolated chloroplast. I. Kinetics and stoichometry of fatty acid peroxidation. **Arch. Biochem. Biophys**, v.125, p.189–198, 1968.

Inui, H; Wakai, T.; Gion. K.; Kim, Y.S. Differential uptake for dioxin-like compounds by Zucchini subspecies. **Chemosphere**, v. 73, p.1602–1607, 2008.

Kang, J.W. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. **Biotechnol. Lett**, v. 36, p. 1129-1139, 2014.

Machado, E.C., Schmidt P.T., Medina, C.L., Ribeiro, R.V. Respostas da fotossíntese de três espécies de citros a fatores ambientais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.40, p.161-1170, 2005.

Meagher, R.B. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. **Curr Opin Plant Biol**, v.3, p.153-162, 2000.

Mendes, K.F.; Inoue, M.H.; Goulart, M.O.; Pimpinato, R.F.; Tornisielo, V.L. Leaching of a mixture of hexazinone, sulfometuron-methyl and diuron applied to soils of contrasting textures. **Water, Air and Soil Pollution**, p. 227-268, 2016.

Perez-Jones, A.; Intanon, S.; Mallory-Smith, C. Molecular analysis of hexazinona-resistant shepherd's-purse (*Capsella bursapastoris*) reveals a novel psbA mutation. **Weed Science**, v. 57, n. 6, p. 574-578, 2009.

Provanzi, M.; Camargo, L.H.G.; Santos, P.M.; Godoy, R. Descrição botânica de linhagens puras selecionadas de guandu. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 36 p. 328-334, 2007.

Qi, X.L.; Li, T.T.; Wei, Z.F.; Guo, N.; Luo, M.; Wang, W.; Zu, Y.G.; Fu, Y.J.; Peng, X. Solvent-free microwave extraction of essential oil from pigeon pea leaves [*Cajanus cajan* (L.) Millsp.] and evaluation of its antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v.58, p.322-328, 2014.

Amabile, R.F.; Fernandes, F.D.; Pimentel, A.P.M. Avaliação da resposta de genótipos de guandu (*Cajanus cajan* (L.) Millsp) na região do Cerrado. **Revista Ceres**, v.55, p. 231-235,

2008.

Reis, C.F.; Tornisielo, V.L.; Pimpanato, R.F.; Martins, B.A.B.; Filho, R.V. Leaching of Diuron, Hexazinone, and Sulfometuron-methyl Applied Alone and in Mixture in Soils with Contrasting Textures. **J Agric. Food Chem.**, v.65, 2645–2650, 2017.

Rodrigues, B.N.; Almeida, F.S. Guia de herbicidas. 6.ed. Londrina: Grafmarke, 2011. 697p.

Sandermann, H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the ‘green liver’ concept. **Pharmacogenetics**, v. 4, p.225-241, 1994.

Salt, D.E.; Smith, R.D.; Raskin, I. Phytoremediation. **Annu. Rev Plant Physiol Plant Mol Biol**, v.49, p.643-668, 1998.

Saxena, K.B.; Nadarajan, N. Prospects of pigeonpea hybrids in Indian agriculture. **Electronic J. Plant Breed**, v.1, p.1107-1117, 2010.

Seefeldt, S.S.; Boydston, R.A.; Kaspari, P.N. Clorpyralid and dicamba residue impacts on potatoes and weeds. **Am. J. Potato Res**, v. 91, p.625-631, 2014, [10.1007/s12230-014-9391-y](https://doi.org/10.1007/s12230-014-9391-y).

Silveira, P.M.; Braz, A.J.B.P.; Kliemann, H.J.; Zimmermann, F.J.P. Acumulação de nutrientes no limbo foliar de guandu e estilosantes. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35 p.133-138, 2005.

Singer, A.C.; Thompson, I.P.; Bailey, M.J. The tritrophic trinity: a source of pollutant-degrading enzymes and its implications for phytoremediation. **Curr. Opin. Microbiol.** v. 7, p. 239-244, 2004.

Vale-Silva L.; Silva, M.J.; Oliveira, D.; Gonçalves, M.J.; Cavaleiro, C. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *Virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. **J. med. Microbiol.**, v. 61 p. 252-260, 2012.

Zhang, C.; Feng, Y.; Liu, Y.W.; Chang, H.Q.; Li, Z; Xue, J.M. Uptake and translocation of organic pollutants in plants: A review. **Journal of Integrative Agriculture**, v.16, p. 1659–1668, 2017.

Kuk, Y.I.; Shin, J.S.; Jung, H.I.; Guh, J.O.; Jung, S.; Burgos, N.R. Mechanism of tolerance to paraquat in cucumber leaves of various ages. **Weed Sci**, v.54, p.6-15, 2006.

CONCLUSÃO GERAL

Dentre 10 espécies, *C. cajan* foi selecionada como a mais tolerante à hexazinona, na dose de 125 g ha⁻¹ de acordo com avaliações biométricas.

Selecionou-se 6 micro-organismos tolerantes ao herbicida: SCR1 – *M. arborescens*; SCR2 – *B. pumillus*; SCM3 – *S. maltophilia*; SCM4 – *B. cereus*; SCM5A – *M. arborescens*; SCM5B – *B. safensis* tolerante à hexazinona, sendo que *B. pumillus* e *S. maltophilia* apresentaram habilidades em solubilizar Ca₃(PO₄)₂.

A espécie vegetal selecionada e os micro-organismos com capacidade de solubilização fosfato foram testados em conjunto e não foram observados efeitos em *C. cajan*, sendo que apresentou pequena capacidade de acumular a molécula em seus tecidos. Houve diminuição na concentração do hexazinona no solo, porém não pode ser atribuída aos tratamentos testados.