



UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI
Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal

Gabriela Madureira Barroso

**EFEITO DE HERBICIDAS SOBRE MICRORGANISMOS SIMBIONTES DE
ESPÉCIES ARBÓREAS**

Diamantina
2019
Gabriela Madureira Barroso

**EFEITO DE HERBICIDAS SOBRE MICRORGANISMOS SIMBIONTES DE
ESPÉCIES ARBÓREAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciência Florestal da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal, área de concentração Recursos Florestais, para obtenção do título de “Mestre”.

Orientador: Prof. Dr. José Barbosa dos Santos

**Diamantina
2019**

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

B277e

Barroso, Gabriela Madureira

Efeito de herbicidas sobre microrganismos simbiotes de espécies arbóreas / Gabriela Madureira Barroso, 2019.

55 p.: il.

Orientador: José Barbosa dos Santos

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciência Florestal) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

1. Agrotóxicos. 2. Fitorremediação. 3. Espécies arbóreas. 4. Microbioma. 5. Nitrogênio. I. Santos, José Barbosa dos. II. Título. III. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

CDD 632.95

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecária Nádia Santos Barbosa – CRB6/3468

GABRIELA MADUREIRA BARROSO

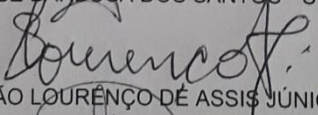
**Efeito de herbicidas sobre microrganismos simbiotes de espécies
arbóreas**

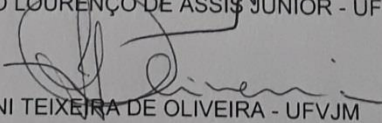
Dissertação apresentada ao
MESTRADO EM CIÊNCIA
FLORESTAL, nível de MESTRADO
como parte dos requisitos para
obtenção do título de MESTRA EM
CIÊNCIA FLORESTAL

Orientador (a): Prof. Dr. Jose Barbosa
Dos Santos

Data da aprovação : 02/08/2019


Prof.Dr. JOSE BARBOSA DOS SANTOS - UFVJM


Prof.Dr. SEBASTIÃO LOURENÇO DE ASSIS JÚNIOR - UFVJM


Prof.Dr.ª IVANI TEIXEIRA DE OLIVEIRA - UFVJM

DIAMANTINA

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me fortalecer em cada momento difícil, mostrando-me que no final sempre haverá uma luz, um novo começo. A Ele sou também grata, por ter me proporcionado nesta vida, conviver com tantas pessoas de luz e almas nobres.

À minha família, minha base e meu maior orgulho, sou grata pelo amor e apoio incondicionais. Aos meus pais, pelo exemplo de dedicação e humildade. Às minhas irmãs pelo laço tão forte de amor e cumplicidade. Aos meus sobrinhos, por tornarem meus dias mais leves e alegres. Às minhas avós pelos exemplos de força e coragem. Aos tios, primos e cunhados, por sempre me ajudarem. À tia Tuca, por também me ajudar tanto e pelo seu carinho.

Aos meus amigos, agradeço por tirarem de mim os sorrisos mais sinceros, pelas companhias nos estudos, nos trabalhos e nos momentos de lazer e por me mostrarem que a amizade é uma das mais belas formas de amor.

À Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, da qual tenho orgulho em fazer parte, agradeço pela formação e por me proporcionar momentos tão felizes, além de me mostrar o quão bonita é a diversidade e as tantas formas de “ser”.

Aos meus professores, sou grata por todos os ensinamentos e experiência compartilhados. Agradeço especialmente ao meu orientador professor José Barbosa, pela sua dedicação, paciência, pelo exemplo não só de profissional, mas também de ser humano sábio. Ao professor Edson, por me mostrar o caminho da pesquisa científica e da carreira acadêmica e pela parceria neste trabalho.

À banca, por contribuírem com suas experiências para o enriquecimento das discussões científicas e aperfeiçoamento de minha dissertação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro.

“Sozinhos vamos mais rápido. Juntos vamos mais longe”

Autor desconhecido.

Gratidão à vida, ao universo e suas tão belas formas, a todos que me ajudaram e sempre me ajudarão!

RESUMO

BARROSO, M. G. **Efeito de herbicidas sobre microrganismos simbiotes de espécies arbóreas.** 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Os herbicidas são produtos eficazes e economicamente viáveis para o controle de plantas daninhas em culturas agronômicas, sistemas agroflorestais e na recuperação de áreas degradadas. Resíduos desses agrotóxicos podem contaminar áreas não alvos, sendo necessária a descontaminação, que pode ser feita por espécies arbóreas e seu microbioma associado. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito de herbicidas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos, simbiotes de espécies arbóreas. Os experimentos foram realizados em laboratório e casa de vegetação. No primeiro estudo foram avaliados os efeitos dos herbicidas 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, glufosinato de amônio, atrazine, ametrin e diuron sobre *Bradyrhizobium* sp. e o potencial de degradação dos herbicidas pela bactéria, *in vitro*. No segundo estudo foi avaliada a atividade de fungos micorrízicos da rizosfera de *Inga edulis*, *Myrsine gardneriana*, *Schizolobium parahyba*, *Toona ciliata*, *Trichilia hirta* e *Triplaris americana* submetidas aos tratamentos com atrazine e sulfentrazone. O efeito de doses comerciais dos herbicidas testados na bactéria *Bradyrhizobium* sp. variou entre os mesmos. O glyphosate, sulfentrazone e diuron foram os mais tóxicos e diminuíram o crescimento das bactérias. Os herbicidas sulfentrazone, glyphosate e diuron diminuíram a densidade celular máxima e o tempo de máximo crescimento celular. *Bradyrhizobium* sp. degradou os herbicidas 2,4-D, atrazine, sulfentrazone e diuron e os utilizou como fonte de carbono para seu crescimento. Algumas atividades dos fungos micorrízicos arbusculares das árvores submetidas aos herbicidas atrazine e sulfentrazone foram comprometidas. As espécies *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. ciliata* foram as que tiveram comportamento semelhante às espécies no tratamento sem herbicida a partir do escalonamento multidimensional não-métrico feito com as variáveis analisadas.

Palavras-chave: agrotóxicos, fitorremediação, espécies arbóreas, microbioma.

ABSTRACT

BARROSO, M. G. **Effect of herbicides on symbiotic microorganisms of tree species.** 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Herbicides are effective and economically viable products for the control of weeds in agronomic crops, agroforestry systems and in the recovery of degraded areas. Residues of these pesticides can contaminate non-target areas, requiring decontamination, which can be done by tree species and its associated microbiome. The objective of this research was to evaluate the effect of herbicides on nitrogen - fixing bacteria and mycorrhizal fungi, symbionts of arboreal species. The experiments were carried out in laboratory and greenhouse. In the first study the effects of the herbicides 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, glufosinate ammonium, atrazine, ametrin and diuron on *Bradyrhizobium* sp. and the potential degradation of the herbicides by the bacterium, in vitro. In the second study the activity of mycorrhizal fungi of *Inga edulis*, *Myrsine gardneriana*, *Schizolobium parahyba*, *Toona ciliata*, *Trichilia hirta* and *Triplaris americana* submitted to treatments with atrazine and sulfentrazone were evaluated. The effect of commercial doses of the tested herbicides on *Bradyrhizobium* sp. varied between them. Glyphosate, sulfentrazone and diuron were the most toxic and decreased the growth of bacteria. The herbicides sulfentrazone, glyphosate and diuron decreased the maximum cell density and time of maximum cell growth. *Bradyrhizobium* sp. degraded the herbicides 2,4-D, atrazine, sulfentrazone and diuron and used them as a source of carbon for their growth. Some activities of the arboric mycorrhizal fungi of the trees submitted to the herbicides atrazine and sulfentrazone were compromised. The species *M. gardneriana*, *S. parahyba* and *T. ciliata* were those that had similar behavior to the species in the treatment without herbicide from the non-metric multidimensional scaling done with the analyzed variables.

Key words: agrochemicals, phytoremediation, tree species, microbiome.

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO CIENTÍFICO I.		Pág.
Figura 1	Crescimento bacteriano de <i>Bradyrhizobium</i> (Log UFC mL ⁻¹) em função do tempo em horas.....	25
Figura 2	Tempo de máximo crescimento e densidade celular de <i>Bradyrhizobium</i> sp. no controle e com os herbicidas 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, glufosinato, atrazine, ametrin e diuron.....	26
CAPITULO CIENTÍFICO II.		
Figura 1	Gráfico da massa seca total de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle.....	45
Figura 2	Gráfico da colonização rizosférica por micorrizas de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle.....	46
Figura 3	Gráfico da contagem de esporos de fungos micorrízico da rizosfera de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle.....	47
Figura 4	Gráfico da respiração basal do solo onde foram cultivadas espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle.....	48
Figura 5	Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) de espécies arbóreas tratadas com herbicidas e controle.....	49

LISTA DE TABELAS

CAPITULO CIENTÍFICO I.		Pág.
Tabela 1	Nome, marca, dose em g ha ⁻¹ , dose em µg L ⁻¹ e modo de ação dos herbicidas avaliados.....	21
Tabela 2	Composição dos tratamentos para teste de degradação. “P” para presente e “A” para ausente no meio de cultura YMA (manitol, K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , MgSO ₄ , NaCl, extrato de levedura, azul de bromotimol).....	23
Tabela 3	Caracterização das enzimas catalase, esterase, oxidase e urease da bactéria <i>Bradyrhizobium</i> sp.....	27
Tabela 4	Valores do crescimento (média ± desvio padrão) de <i>Bradyrhizobium</i> sp. com diferentes composições do meio YMA com ou sem herbicidas.....	28
CAPITULO CIENTÍFICO II.		
Tabela 1	Caracterização das espécies arbóreas estudadas quanto à tolerância a atrazine e sulfentrazone e potencial remediador do solo.....	42
Tabela 2	Análise química e física da amostra de solo utilizada para cultivo das mudas em amostragem realizada no momento do transplântio.....	43

SUMÁRIO

	Pág.
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	ix
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	3
CAPITULO CIENTIFICO I	5
1 Resumo.....	6
2 Abstract.....	7
3 Introdução.....	8
4 Material e métodos.....	9
5 Resultados	12
6 Discussão	16
7 Conclusões	20
8 Referências.....	21
CAPITULO CIENTIFICO II.....	26
1 Resumo.....	27
2 Abstract.....	28
3 Introdução.....	29
4 Material e métodos.....	30
5 Resultados	33
6 Discussão	37
7 Conclusões	40
8 Referências.....	41
9 Considerações finais.....	43

INTRODUÇÃO GERAL

A restauração ecológica é definida como uma atividade que inicia ou acelera a recuperação de um ecossistema com respeito à sua saúde, integridade e sustentabilidade, que requer restauração por ter sido degradado, danificado, transformado ou totalmente destruído como resultado direto ou indireto das atividades humanas (Society for Ecological Restoration, 2004). No Brasil, existem registros de iniciativas de restauração florestal desde o século XIX, estas ações foram motivadas pela tentativa de garantir a quantidade e qualidade da água em áreas ciliares e de mananciais, contenção de processos erosivos e de perda de solo e também pela necessidade de cumprimento de passivos ambientais (Durigan e Engel, 2013).

A busca por alternativas ao modelo tradicional de restauração florestal (que utiliza apenas espécies nativas do bioma) começou a ganhar força a partir da instituição da lei 12.651/2012 (Brasil, 2012), que delibera sobre o Programa de Regularização Ambiental (PRA). Os sistemas agroflorestais (SAF's), que são formas de uso e manejo dos recursos naturais nas quais espécies arbóreas são utilizadas em associação deliberada com cultivos agrícolas ou com animais no mesmo terreno, passaram a serem utilizados como uma ferramenta de restauração florestal (Martins et al. 2019). O uso do solo feito desta forma pode contribuir para uma relação mais harmônica entre agricultura e meio ambiente.

O Brasil é um dos maiores produtores de alimentos do mundo (Oliveira Bordonal et al. 2015), com destaque para a produção de grãos, cana-de-açúcar, café, pecuária (pastagens), dentre outros (MAPA, 2019). Para garantir o sucesso da produção agrícola brasileira, o uso de agrotóxicos tem sido cada vez maior (Bombardi 2012), o mercado de pesticidas cresceu de 312,8 mil para 914,2 mil toneladas entre os anos 2000 e 2014 (SINDIVEG, 2017). Dentre os agroquímicos, os herbicidas são os de maior representatividade na agricultura atual, correspondem cerca de 60% dos produtos comercializados nacionalmente (MMA, 2019). Mesmo que utilizados de forma correta, resíduos desses produtos podem causar prejuízos a organismos não alvos, como vegetações ripárias, à fauna e ao microbioma do solo (Gonzales et al. 1996; Boutin et al. 2014), pois essas moléculas podem ser transportadas por escoamento superficial, deriva ou lixiviação e contaminar o solo e a água (Bicalho et al. 2010).

Uma alternativa para diminuir os efeitos danosos dos herbicidas em áreas adjacentes às lavouras é a fitorremediação que utiliza plantas e seu microbioma associado para remoção, diminuição ou imobilização dos herbicidas no solo ou na água (Rainbird et al. 2018; Cao et al. 2018). O uso de árvores para fitorremediação de áreas com resíduos de herbicidas tornou-se

interessante para a agricultura brasileira (Aguiar et al. 2017; Cabral et al. 2017; Santos et al. 2018), pois podem atuar como filtros naturais diminuindo o transporte dos herbicidas no subsolo (Chellaiah e Yule, 2018).

O papel da comunidade de microrganismos do solo é importante no processo de fitorremediação, já que o principal meio de degradação de herbicidas no solo é pela atividade microbiana (Peterson et al. 2016), por meio de processos biológicos denominados fitoestimulação ou rizodegradação (Rainbird et al. 2017). Nestes processos os exsudados liberados por plantas podem estimular a atividade microbiana que degradam os herbicidas (Ma et al. 2017).

Alguns microrganismos simbiotes de espécies arbóreas merecem destaque neste processo, como as bactérias fixadoras de nitrogênio e os fungos micorrízicos. A maior contribuição do processo de fixação biológica se deve à associação simbiótica de plantas da família Leguminosae com bactérias diazotróficas de diversos gêneros, especialmente as do gênero como *Bradyrhizobium* e *Burkholderia* (Yao et al. 2014). Estes gêneros se associam a plantas importantes para a recuperação de áreas degradadas, como *Vicia sativa*, *Calopogonium mucunoides* (Hernández et al. 2017), *Inga laurina* (Lu et al. 2014) e *Melanoxylon brauna* (Laste et al. 2008). As espécies leguminosas podem ter seus estabelecimentos e desenvolvimentos favorecidos pela simbiose com bactérias diazotróficas (Chaer et al. 2011). Já os fungos micorrízicos têm efeito estimulante de crescimento vegetal (Pereira et al. 2018). Nesta associação, as plantas fornecem compostos de carbono aos fungos, enquanto os fungos beneficiam as plantas, causando maior absorção de nutrientes e água, além de promover a retenção de umidade, agregação e estabilidade do solo (Smith e Smith, 2012).

As hipóteses deste trabalho são de que herbicidas aplicados no solo podem causar efeitos danosos a alguns microrganismos simbiotes de espécies arbóreas, como bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos e que alguns destes microrganismos podem atuar na descontaminação de resíduos de herbicidas. Diante disso, o objetivo foi avaliar o efeito de herbicidas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio e fungos micorrízicos simbiotes de espécies arbóreas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, L. M; SANTOS, J. B; COSTA, V. A; BRITO, L. A; FERREIRA, E. A; PEREIRA, I. M; ASPIAZU, I. Tolerancia a herbicidas y eficiencia del uso del agua en especies forestales utilizadas en programas de recuperación de zonas degradadas. **Bosque**. v. 37, n.3, p. 493-500. 2017.
- BICALHO, S. T. T; LANGENBACH, T; RODRIGUES, R. R; CORREIA, F. V; HAGLER, A. N; MATALLO, M. B; LUCHINI, L. C. Herbicide distribution in soils of a riparian forest and neighboring sugar cane field. **Geoderma**. v. 158, n. 3, p. 392-397. 2010.
- BOUTIN, C; STRANDBERG, B; CARPENTER, D; MATHIASSEN, S. K; THOMAS, P. J. Herbicide impact on non-target plant reproduction: What are the toxicological and ecological implications?. **Environmental Pollution**. v. 185, p. 295-306. 2014.
- CABRAL, C. M; SANTOS, J. B; FERREIRA, E. A; MACHADO, V. M; PEREIRA, I. M; SILVA, D. V. Tolerance to the herbicide clomazone and potential for changes of forest species. **Bioscience Journal**. v. 33, n. 4, p. 897-904. 2017.
- CAO, B; ZHANG, Y; WANG, Z; LI, M; YANG, F; JIANG, D; JIANG, Z. Insight into the variation of bacterial structure in atrazine-contaminated soil regulating by potential phytoremediator: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 864. 2018.
- CHAER, G. M; RESENDE, A. S; CAMPELLO, E. F C; FARIA, S. M; BODDEY, R. M; SCHIMIDT S. Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. **Tree Physiology**. v. 31, p. 139-149. 2011.
- CHELLAIAH, D; YULE, C. M. Effect of riparian management on stream morphometry and water quality in oil palm plantations in Borneo. **Limnologica**. v.69, n. 2, p.72-80. 2018.
- DUROGAN, G; ENGEL, V. L. Restauração de ecossistemas no Brasil: onde estamos e para onde podemos ir? In: MARTINS, S. V. Restauração ecológica de ecossistemas degradados. Viçosa: Editora UFV, p. 41-68. 2013.
- GONZALEZ, A; GONZALEZ-MURUA, C; Royuela, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Science**. v. 44, p. 31-37. 1996.
- HERNÁNDEZ, A. G; DE MOURA, G. D; BINATI, R. L; NASCIMENTO, F. X. I; LONDOÑO, D. M; MAMEDE, A. C. P, ... & SOARES, C. R. F. S. Selection and characterization of coal mine autochthonous rhizobia for the inoculation of herbaceous legumes. **Archives of microbiology**. v. 199, n. 7, p. 991-1001. 2017.
- LASTE, K; GONÇALVES, F; DE FARIA, S. M. Estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas. **Embrapa Agrobiologia**. Comunicado Técnico. 2008.
- LU, J. K; DOU, Y. J; ZHU, Y. J; WANG, S. K; SUI, X. H; KANG, L. H. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R.

Br. nodules. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**. v. 64, n. 6, p. 1900-1905. 2014.

Ma L, Chen S, Yuan J, Yang P, Liu Y, Stewart K. 2017. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. *International Biodeterioration & Biodegradation* 116 (1): 133-140.

MAPA – Ministério da agricultura pecuária e abastecimento. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/politica-agricola/agropecuaria-brasileira-em-numeros>. Acesso em: 04 de julho de 2019.

MARTINS, E. M; DA SILVA, E. R; CAMPELLO, E. F. C; DE RESENDE, A. S; DE LIMA S. S; NOBRE, C. P; CORREIA, M. E. F. O uso de sistemas agroflorestais diversificados na restauração florestal na Mata Atlântica. **Ciência Florestal**. v. 29, n. 2, p. 632-648. 2019.

MMA – Ministério do meio ambiente – IBAMA- Disponível em: <http://ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em 04 de julho de 2019.

PEREIRA, J. E. S; BARRETO, P. A. B; SCORIZA, R. N; JÚNIOR, O. J. S; DE SOUZA GOMES, V. Fungos micorrízicos arbusculares em solo sob Caatinga arbórea submetida a manejo florestal. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. v. 13, n. 1, p. 5497. 2018.

PETERSON, M. A; MCMASTER, S. A; RIECHERS, D. E; SKELTON, J; STAHLMAN, P. W. 2, 4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**. v. 30, n. 2, p. 303-345. 2016.

RAINBIRD, B; BENTHAM, R. H; SOOLE, K. L. Rhizoremediation of residual sulfonylurea herbicides in agricultural soils using *Lens culinaris* and a commercial supplement. **International Journal of Phytoremediation**. v. 20, n. 2, p. 104-113. 2018.

SANTOS, N. M. C; COSTA, V. A. M; ARAÚJO, F. V; ALENCAR, T. B; RIBEIRO, V. H; Okumura F, Simeone M L F, Santos J B. 2018. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. *Environmental Science and Pollution Research* 25(27): 27561-27568.

SINDIVEG – Sindicato nacional da indústria de produtos para defesa vegetal. Disponível em: <http://sindiveg.org.br/wpcontent/uploads/2018/08/oquevoceprecisasabersobredefensivosagricolas.pdf>. Acesso em 04 de julho de 2019.

SMITH, S. E; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**. v. 104, n. 1, p. 1-13. 2012.

Society for ecological restoration – SER, 2004. The SER international primer on ecological restoration. Disponível em: <http://www.ser.org>. Acesso em: 04 de julho de 2019.

YAO, Y; WANG, R; LU, J. K; SUI, X. H; WANG, E. T; CHEN, W. X. Genetic diversity and evolution of *Bradyrhizobium* populations nodulating *Erythrophleum fordii*, an evergreen tree indigenous to the southern subtropical region of China. **Appl Environ Microbiol**. v. 80, p. 6184–6194. 2014.

CAPITULO CIENTÍFICO I

CAPACIDADE DEGRADADORA DE HERBICIDAS PELO *BRADYRHIZOBIUM* sp., SIMBIONTE DE ESPÉCIES ARBÓREAS

1 RESUMO

BARROSO, M. G. **Capacidade degradadora de herbicidas pelo *Bradyrhizobium* sp., simbiote de espécies arbóreas**. 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Vários grupos de microrganismos degradam resíduos de contaminantes, incluindo a classe dos herbicidas. O objetivo do trabalho foi avaliar, in vitro, a capacidade degradadora de herbicidas pelo *Bradyrhizobium* sp., simbiote de espécies arbóreas. O experimento foi realizado em laboratório em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições. A bactéria foi submetida aos tratamentos controle e com os herbicidas 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, glufosinato de amônio, atrazine, ametrin e diuron nas doses comerciais (respectivas concentrações em μL^{-1}) de 1612 (128,2), 480 (128,2), 500 (64,1), 720 (128,2), 960 (128,2), 400 (128,2), 3000 (192,3), 3500 (320,5) e 1600 (128,2) g ha^{-1} , respectivamente. As soluções dos herbicidas foram adicionadas ao meio de cultura YMA líquido contendo a bactéria em placa de ELISA. O crescimento da bactéria foi avaliado por leitura da absorbância em comprimento de onda de 560 nm em espectrofotômetro durante o tempo necessário para observar o crescimento e decaimento celular da espécie. Os valores de densidade óptica obtidos foram correlacionados com os de Log do número das unidades formadoras de colônia (UFC) por tratamento e transformados em Log de UFC. Foi feita a caracterização bioquímica da atividade das enzimas catalase, esterase, oxidase e urease da bactéria por meio de testes bioquímicos. O crescimento da bactéria, tempo de máximo crescimento, densidade celular máxima e capacidade degradadora dos herbicidas foram avaliados. Os herbicidas glyphosate, sulfentrazone e diuron diminuíram o crescimento, tempo de máximo crescimento e densidade celular máxima de *Bradyrhizobium* sp.. A atividade das enzimas catalase, esterase e urease foram positivas para a bactéria. *Bradyrhizobium* sp. degradou os herbicidas 2,4-D, atrazine, sulfentrazone e diuron e os utilizou como fonte de carbono para seu crescimento.

Palavras-chave: clomazone, diuron, glyphosate, glufosinato de amônio, inibidores da síntese de PPO, triazinas.

2 ABSTRACT

BARROSO, M. G. **Degradation capacity of herbicides by *Bradyrhizobium* sp., symbiote of tree species.** 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Several groups of microorganisms degrade contaminant residues, including the herbicide class. The objective of this work was to evaluate, *in vitro*, the degrading capacity of herbicides by *Bradyrhizobium* sp., Symbiote of tree species. The experiment was carried out in a completely randomized design with eight replications. The bacteria were submitted to control treatments and with the herbicides 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, ammonium glufosinate, atrazine, ametrin and diuron at commercial doses (respective concentrations in μL^{-1}) of 1612 (128, 2), 480 (128.2), 500 (64.1), 720 (128.2), 960 (128.2), 400 (128.2), 3000 (192.3), 3500 (320, 5) and 1600 (128.2) g ha^{-1} , respectively. Herbicide solutions were added to the liquid YMA culture medium containing the bacteria in ELISA plate. Bacterial growth was evaluated by reading the absorbance at a wavelength of 560 nm in a spectrophotometer for the time necessary to observe the growth and cell decay of the species. The obtained optical density values were correlated with the log of the number of colony forming units (CFU) per treatment and transformed into CFU log. Biochemical characterization of bacterial catalase, esterase, oxidase and urease enzymes was performed by biochemical tests. Bacterial growth, maximum growth time, maximum cell density and herbicide degrading capacity were evaluated. The herbicides glyphosate, sulfentrazone and diuron decreased the growth, maximum growth time and maximum cell density of *Bradyrhizobium* sp. The activity of catalase, esterase and urease enzymes were positive for the bacterium. *Bradyrhizobium* sp. degraded the herbicides 2,4-D, atrazine, sulfentrazone and diuron and used them as a carbon source for their growth.

Key words: ammonium glufosinate, clomazone, diuron, glyphosate, ppo inhibitors, triazinas.

3 INTRODUÇÃO

O uso de herbicidas é prática comum na agricultura atual, permitindo o cultivo de grandes áreas devido à facilidade de aplicação, redução de custos e controle eficiente de plantas daninhas (Melo et al. 2017). Eles são usados em culturas agronômicas, sistemas agroflorestais ou em programas de recuperação de áreas degradadas (Agrofit, 2019). Porém, resíduos dos herbicidas modificam o microbioma do solo, podendo comprometer relações simbióticas entre planta e bactéria (Gonzalez et al.1996), além de causar problemas de toxicidade de espécies suscetíveis em plantios sequenciais (carryover), impedindo o cultivo dessas espécies na área (Melo et al. 2017).

Alternativa para diminuir os efeitos danosos dos herbicidas em áreas adjacentes às lavouras e diminuir os resíduos no solo, é a fitorremediação, que utiliza plantas e seu microbioma associado para remoção, diminuição ou imobilização dos herbicidas no ambiente (Rainbird et al. 2018; Cao et al. 2018). O uso de árvores para fitorremediação de áreas com resíduos de herbicidas tornou-se interessante para a agricultura brasileira (Aguiar et al. 2017; Santos et al. 2018; Ferreira et al. 2019), pois podem atuarem como filtros naturais diminuindo o transporte dos herbicidas no subsolo (Chellaiah e Yule, 2018).

A remediação do solo contaminado por herbicidas pode acontecer também por meio de processos ou atividade biológica de microorganismos e suas enzimas, que têm a capacidade de modificar ou decompor certos poluentes, transformando-os em substâncias menos tóxicas ou inertes (Melo et al. 2017). O papel da comunidade microbiana é importante no processo de descontaminação ambiental por resíduos de herbicidas, pois o principal meio de degradação desses poluentes no solo é pela atividade microbiana (Peterson et al. 2016). Por meio de processos biológicos denominados fitoestimulação ou rizodegradação (Rainbird et al. 2017), os exsudados liberados por plantas podem estimular a atividade microbiana que degradam os herbicidas (Ma et al. 2017).

Desta forma, avaliar microrganismos do solo capazes de degradar resíduos de herbicidas é etapa importante do processo de descontaminação ambiental. O estudo *in vitro* do efeito dos herbicidas mais usados sobre simbioses bacterianas de espécies arbóreas constitui etapa relevante no programa para sustentabilidade na agricultura quanto ao uso desses produtos.

O objetivo do trabalho foi avaliar *in vitro*, o efeito de herbicidas sobre bactérias fixadoras de nitrogênio em espécies florestais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em laboratório em delineamento inteiramente casualizado com oito repetições, cada uma com concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ da bactéria diazotrófica *Bradyrhizobium* sp., que foi avaliada em meio de cultura contendo os herbicidas (Tabela 1) e na ausência de herbicida (tratamento controle).

Tabela 1. Nome, marca, dose em g ha⁻¹, dose em µg L⁻¹ e modo de ação dos herbicidas avaliados

Nome	Marca	Dose (g ha ⁻¹)*	Dose (µg L ⁻¹)	Modo de Ação**
2,4-D	Nortox ®	1612	128,2	Mimetizador de Auxinas
Oxyfluorfen	Goal ®	480	128,2	Inibição da Protoporfirinogênio Oxidase
Sulfentrazone	Solara ®	500	64,1	Inibição da Protoporfirinogênio Oxidase
Clomazone	Gamit ®	720	128,2	Inibição da Síntese de Caratenóides
Glyphosate	Roundup ®	960	128,2	Inibição da Síntese da EPSP Sintase
Glufosinato	Finale ®	400	128,2	Inibição da Glutamina Sintetase
Atrazine	Nortox ®	3000	192,3	Inibidores do Fotossistema II
Ametrin	Ametrex ®	3500	320,5	Inibidores do Fotossistema II
Diuron	Nortox ®	1600	128,2	Inibidores do Fotossistema II

Fonte: *Mapa/Agrofit. **HRAC-BR

A estirpe de *Bradyrhizobium* sp (BR 3901), isolada da espécie florestal *Melanoxylon brauna* (Laste et al. 2008), foi obtida da coleção de bactérias diazotróficas do Centro Nacional de Pesquisa da EMBRAPA/Agrobiologia, estocada em glicerol 10% a -20°C na geladeira e ativada em placas de Petri. As bactérias foram multiplicadas em Erlenmeyers com o meio YMA líquido (manitol, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, extrato de levedura, azul de bromotimol) e incubadas em agitador rotatório a 150 rpm e temperatura de 25°C, até a densidade ótica (DO) ideal (próxima a 10^8 unidades formadoras de colônia por mL).

As soluções de herbicidas foram preparadas em ambiente asséptico a partir da diluição dos produtos comerciais em água pura Milli-Q nas concentrações correspondentes às doses recomendadas (Mapa/Agrofit, 2019) e depois adicionadas ao meio de cultura contendo o inóculo de *Bradyrhizobium* sp. (Tabela 1). A incubação e a leitura do crescimento bacteriano foram realizadas em placas de ELISA com 96 células e capacidade de 300 µL com inóculo (195 µL) e a solução do herbicida (60 µL) adicionados ao meio de cultura. Em seguida, as placas foram colocadas em câmara de incubação a 25°C na qual permaneceram sendo agitadas até o fim do experimento. O crescimento das bactérias foi avaliado pela leitura da absorbância em um comprimento de onda de 560 nm no espectrofotômetro por 32 horas.

Os valores da absorbância foram correlacionados às unidades formadoras de colônia (UFC) e transformados em Log de UFC, obtidas por contagem em placas, precedida pela diluição seriada da solução de DO conhecida. As unidades formadoras de colônias foram estimadas com a equação $Y = 0,6055 * \ln(X) + 10,04$.

O teste de degradação de herbicidas pela bactéria foi realizado retirando-se as fontes de carbono (manitol) e nitrogênio (extrato de levedura) do meio de cultura YMA (manitol, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $MgSO_4$, NaCl, extrato de levedura, azul de bromotimol) com os herbicidas e um meio com uma fonte de nitrogênio sintética ($NaNO_3$) (Tabela 2). A utilização do herbicida como fonte de carbono ou nitrogênio pela bactéria caracteriza a degradação das substâncias. O tratamento para controle do crescimento de *Bradyrhizobium* sp. foi composto pelo meio de cultura YMA com todas as fontes de nutrientes e sem os herbicidas. Os tratamentos foram dispostos em placas de Elisa e levados para leitura da absorbância no espectrofotômetro após 72 horas de incubação a 25°C.

Tabela 2. Composição dos tratamentos para teste de degradação. “P” para presente e “A” para ausente no meio de cultura YMA (manitol, K₂HPO₄, KH₂PO₄, MgSO₄, NaCl, extrato de levedura, azul de bromotimol)

Composição do meio				
Tratamentos	Manitol	Extrato de levedura	Herbicidas	Nitrato de sódio
T1	A	A	A	A
T2	A	P	A	A
T3	P	A	A	A
T4	A	A	P	A
T5	P	A	P	A
T6	A	P	P	A
T7	A	A	P	P
T8	P	A	A	P
T9	P	P	A	A

Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram realizados testes bioquímicos para avaliar a atividade das enzimas catalase, esterase, oxidase e urease de *Bradyrhizobium* sp.. Para avaliação da presença da catalase, uma gota de H₂O₂ 3% (v/v) foi depositada sob a cultura bacteriana crescida em meio de cultura sólido YMA por 48 horas a 25°C (Videira et al. 2007). O resultado positivo foi caracterizado pelo desprendimento de gás imediatamente ou após, com formação de bolhas em no máximo, cinco minutos.

Para avaliação da atividade esterase, os isolados foram submetidos a hidrólise de Tween-80. Os isolados foram incubados em meio sólido de Sierra (1957) (10 g L⁻¹ de peptona, 5 g L⁻¹ de NaCl, 0,1 g L⁻¹ de CaCl₂.2H₂O, 18 g L⁻¹ de ágar em pH ajustado para 7,4 e adicionado de 1% de Tween-80 (v/v) após esterilização do meio por 36 horas a 25°C. O resultado positivo foi caracterizado por um halo incolor ao redor da colônia bacteriana.

Para avaliação da oxidase utilizou 2 gotas de solução de TEMED 1% (N-N-dimetil-p-fenilenediamino) sobre um papel de filtro, onde foi depositado uma alçada da colônia bacteriana. O resultado positivo é confirmado pelo aparecimento de coloração violeta sobre o papel após até 15 segundos (Videira et al. 2007).

Para avaliação da atividade da urease os isolados foram ativados em meio líquido YMA até DO próxima de 10⁸ UFC. Foram adicionados 6 mL do meio de cultura descrito por Dye (1962) (5 g L⁻¹ de NaCl, 2 g L⁻¹ de KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ de D-glucose, 15,0 g L⁻¹ de ágar, vermelho fenol (0,0016%) e H₂O, pH 7,0) com e sem adição de solução aquosa de ureia 20%,

previamente esterilizada (concentração final de 2%) incubados por 36 horas a 25°C à solução bacteriana crescida. O resultado positivo da hidrólise da ureia foi caracterizado pela alteração da coloração laranja para rosa purpura (Santos, 2015).

Os dados de crescimento bacteriano foram submetidos à análise de variância a 5% de significância e, quando significativos, analisados por regressão linear. O teste de identidade de modelos foi realizado com auxílio do software R e do pacote “forestmangr” (Braga et al., 2018) para diferenciar as curvas. Estimativas de tempo de crescimento máximo (horas) e densidade celular máxima (Log de UFC ml⁻¹) foram calculadas e as médias agrupadas por Scott-Knott a 5% de significância. Os resultados das análises das enzimas foram apresentados de forma descritiva.

5 RESULTADOS

Para todos os tratamentos o crescimento bacteriano obteve significância na análise de variância. O modelo linear quadrático foi o que melhor descreveu o comportamento de crescimento da bactéria com coeficientes de determinação de 0,99, 0,98, 0,98, 0,79, 0,74, 0,96, 0,88, 0,98, 0,80 e 0,74, respectivamente para os tratamentos controle, 2,4-D, oxyfluorfen, sulfentrazone, clomazone, glyphosate, glufosinato, atrazine, ametrin e diuron (Figura 1).

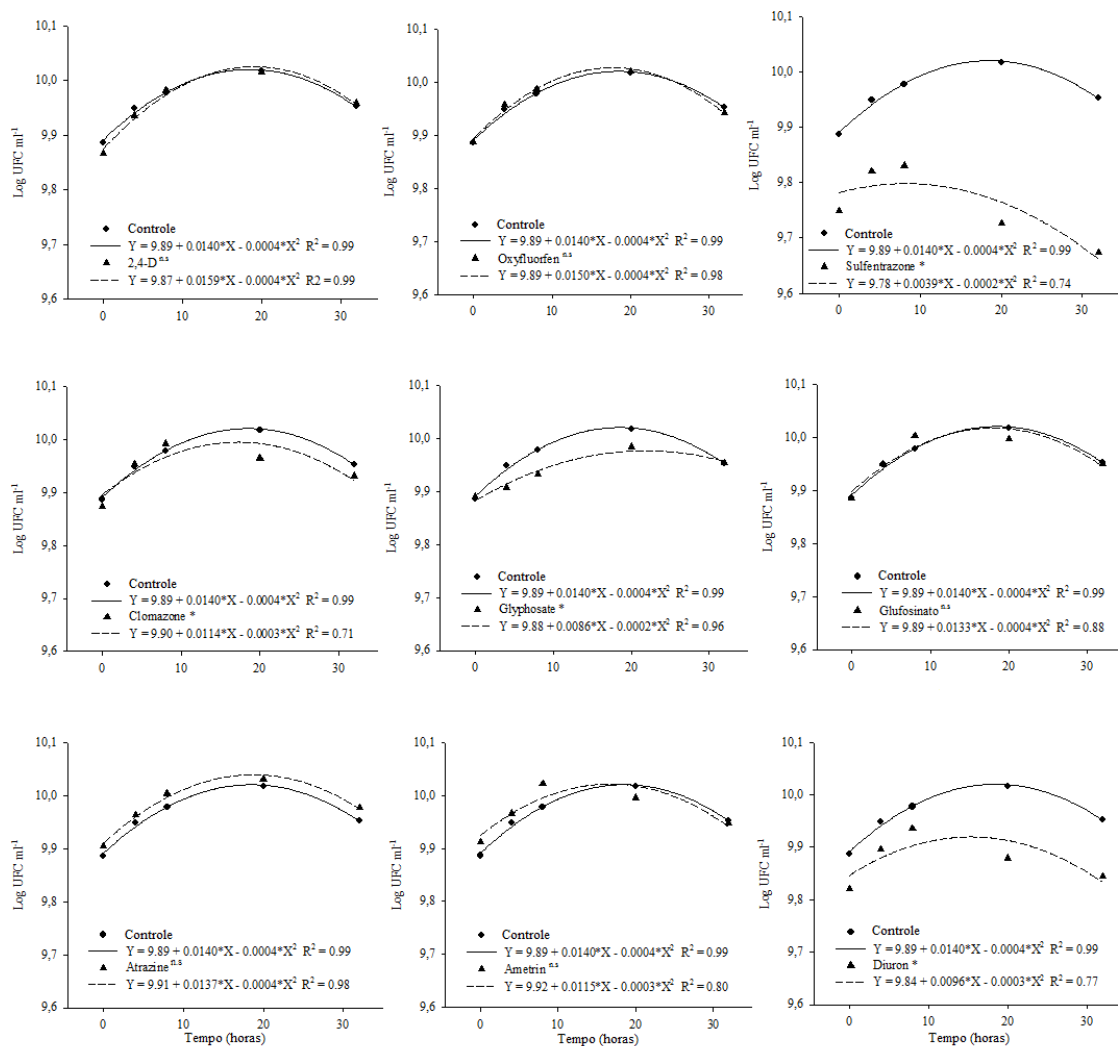


Figura 1: Crescimento bacteriano de *Bradyrhizobium* (Log UFC mL⁻¹) em função do tempo em horas em nível de 5% de significância. Curvas são semelhantes para “n.s” e diferentes para “*”, pelo teste de identidade de modelos a 5% de significância.

As taxas de crescimento bacteriano (Log UFC mL⁻¹) de *Bradyrhizobium* sp. foram menores do que o controle sob efeito dos herbicidas glyphosate, sulfentrazone e diuron e nenhum dos herbicidas inibiu, totalmente, o crescimento bacteriano (Figura 1).

Os herbicidas glyphosate, diuron e sulfentrazone reduziram os tempos para máximo crescimento de *Bradyrhizobium* sp., sendo o sulfentrazone o que ocasionou o menor tempo (Figura 2A).

Os herbicidas glyphosate, diuron e sulfentrazone diminuíram a densidade celular máxima de *Bradyrhizobium* sp., sendo o sulfentrazone o mais danoso (Figura 2B).

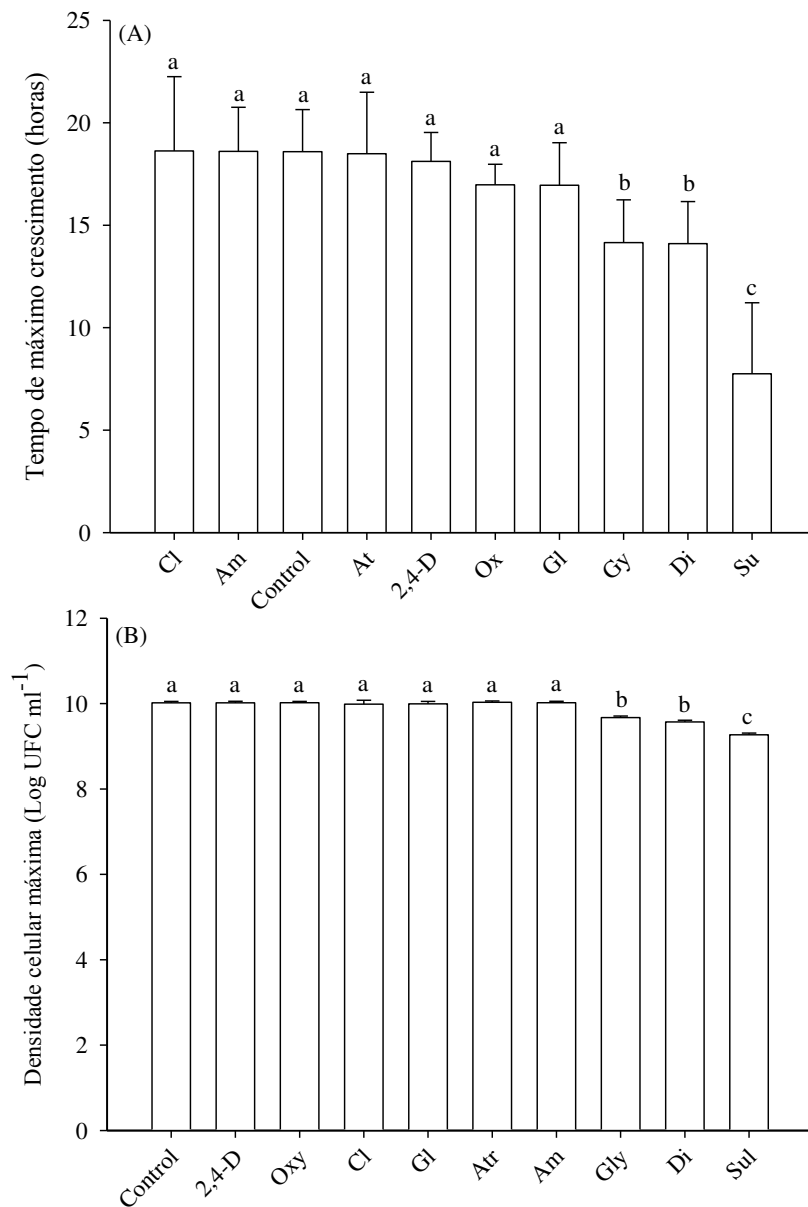


Figura 2: Tempo de máximo crescimento (horas) (A) e densidade celular (UFC mL⁻¹) (B) de *Bradyrhizobium* sp. no controle (Con.) e com os herbicidas 2,4-D (2,4), oxyfluorfen (Ox.), sulfentrazone (Su.), clomazone (Cl.), glyphosate (Gy.), glufosinato (Gl.), atrazine (At.), ametrin (Am.) e diuron (Di) agrupados segundo critério Scott-Knott a 5% de significância.

Os teste da atividade enzimática de *Bradyrhizobium* sp. foram positivos para as enzimas catalase, esterase e urease (Tabela 3).

Tabela 3. Caracterização das enzimas catalase, esterase, oxidase e urease da bactéria *Bradyrhizobium* sp..

Atividade de enzimas			
Catalase	Esterase	Oxidase	Urease
Positiva	Positiva	Negativa	Positiva

O tratamento controle (sem herbicida e com manitol e extrato de levedura, T9), proporcionou maior crescimento de *Bradyrhizobium* sp. do que os tratamentos contendo o herbicida glufosinato e outros meios de cultura (Tabela 4).

Os meios de cultura contendo o herbicida 2,4-D e sem o manitol (T6) e o meio com o tratamento controle (T9) promoveram os maiores crescimentos bacterianos. (Tabela 4).

O tratamento sem manitol mais atrazine e o com manitol sem o herbicida, ambos com a fonte sintética de nitrogênio (T7 e T8) obtiveram crescimentos bacterianos maiores e semelhantes ao tratamento controle (Tabela 4).

O crescimento de *Bradyrhizobium* sp. foi maior sob efeito do controle do que os demais tratamentos, incluindo o com glyphosate e demais meios de cultura (Tabela 4).

O tratamento sem manitol mais sulfentrazone e o com manitol sem o herbicida, ambos com a fonte sintética de nitrogênio (T7 e T8) obtiveram crescimentos bacterianos maiores e semelhantes ao tratamento controle (Tabela 4).

O crescimento de *Bradyrhizobium* sp. foi maior no tratamento controle do que os demais tratamentos, incluindo o com clomazone e demais meios de cultura (Tabela 4).

Os meios de cultura contendo oxyfluorfen e sem o manitol e a fonte de nitrogênio (T4) e o meio com o tratamento controle (T9) promoveram os maiores crescimentos bacterianos (Tabela 4).

O tratamento sem manitol mais diuron e o com manitol sem o herbicida, ambos com a fonte sintética de nitrogênio (T7 e T8) obtiveram crescimentos bacterianos maiores e semelhantes ao tratamento controle (Tabela 4).

Tabela 4. Valores do crescimento (média \pm desvio padrão) de *Bradyrhizobium* sp. com diferentes composições do meio YMA com ou sem herbicidas. T1: sem manitol e extrato de levedura; T2: sem manitol e com extrato de levedura; T3: com manitol e sem extrato de levedura; T4: T1 mais herbicida; T5: T1 com herbicida e manitol; T6: T1 com herbicida e extrato de levedura; T7: T1 com herbicida e nitrato de sódio; T8: com nitrato de sódio e manitol; T9: meio YMA completo sem herbicida (tratamento controle)

	Log UFC mL ⁻¹							
	Herbicidas							
	Glufosinato	2,4-D	Atrazine	Glyphosate	Sulfentrazone	Clomazone	Oxyfluorfen	Diuron
T1	9,16 \pm 0,24 b	9,16 \pm 0,16 b	9,05 \pm 0,07 b	9,40 \pm 0,25 b	9,16 \pm 0,06 b	9,21 \pm 0,07 b	9,00 \pm 0,04 b	9,08 \pm 0,16 b
T2	9,07 \pm 0,27 b	9,19 \pm 0,20 b	9,35 \pm 0,09 b	9,45 \pm 0,22 b	9,21 \pm 0,02 b	9,26 \pm 0,09 b	8,89 \pm 0,33 b	9,26 \pm 0,18 b
T3	9,10 \pm 0,23 b	9,20 \pm 0,15 b	9,14 \pm 0,15 b	9,33 \pm 0,33 b	9,18 \pm 0,04 b	9,39 \pm 0,12 b	8,99 \pm 0,03 b	9,13 \pm 0,08 b
T4	9,10 \pm 0,21 b	9,18 \pm 0,13 b	9,15 \pm 0,08 b	9,37 \pm 0,41 b	9,18 \pm 0,03 b	9,41 \pm 0,06 b	9,36 \pm 0,14 a	9,12 \pm 0,09 b
T5	9,01 \pm 0,12 b	9,23 \pm 0,17 b	9,08 \pm 0,05 b	9,19 \pm 0,35 b	9,19 \pm 0,02 b	9,45 \pm 0,06 b	9,03 \pm 0,11 b	9,14 \pm 0,02 b
T6	9,11 \pm 0,19 b	9,76 \pm 0,36 a	9,23 \pm 0,12 b	9,35 \pm 0,63 b	9,29 \pm 0,07 b	9,35 \pm 0,05 b	8,98 \pm 0,01 b	9,27 \pm 0,17 b
T7	8,90 \pm 0,08 b	9,09 \pm 0,08 b	9,50 \pm 0,33 a	9,17 \pm 0,30 b	9,59 \pm 0,34 a	9,25 \pm 0,12 b	8,98 \pm 0,04 b	9,52 \pm 0,32 a
T8	8,96 \pm 0,14 b	9,02 \pm 0,03 b	9,52 \pm 0,34 a	9,20 \pm 0,18 b	9,61 \pm 0,38 a	9,24 \pm 0,05 b	8,95 \pm 0,02 b	9,51 \pm 0,36 a
T9	9,84 \pm 0,08 a	9,82 \pm 0,08 a	9,86 \pm 0,08 a	9,88 \pm 0,07 a	9,88 \pm 0,07 a	9,86 \pm 0,08 a	9,83 \pm 0,07 a	9,87 \pm 0,09 a
cv (%)	14,02	3,13	2,75	4,14	2,75	1,93	2,11	2,76

* Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si na coluna segundo critério de agrupamento Scott-Knott à 5% de significância.

6. DISCUSSÃO

A estirpe BR 3901 foi inicialmente isolada da rizosfera de *Melanoxylon brauna* e inoculada com sucesso em *Tephrosia adunca* (Laste et al. 2008) com grande potencial para outras espécies arbóreas nativas. Agrotóxicos afetam o crescimento e funcionalidade de bactérias diazotróficas (Banks et al. 2014). A identificação de herbicidas menos tóxicos a essas bactérias é fundamental para a promoção do manejo sustentável de plantas daninhas, principalmente em áreas próximas às vegetações com espécies simbiotes como a *Melanoxylon brauna*, espécie já ameaçada de extinção (Martinelli e Moraes, 2013). Bactérias do gênero *Bradyrhizobium* já foram relatadas como degradadora do herbicida 2,4-D (Serbent et al. 2019), deste modo, avaliar o seu potencial degradador de outros herbicidas é um importante passo para uma agricultura mais limpa.

O comportamento bacteriano explicado pelo modelo sigmoidal corresponde às fases de crescimento normais (Bukhman et al. 2015). Esses modelos caracterizam as fases Lag (de latência), exponencial (multiplicação celular), estacionária (população constante) e de morte celular (Pandey et al. 2016). O intervalo de quatro horas entre a primeira e segunda avaliação

neste experimento, não foi o suficiente para identificar a fase de latência. A fase Lag pode durar apenas minutos, dificultando sua identificação e gerando a necessidade de utilizar outros modelos lineares (Peleg et al. 2011), como o quadrático.

A menor taxa de crescimento bacteriano com glyphosate pode ser explicada por meio da inibição enzimática pelo herbicida, como relatado para o menor crescimento de estirpes de *Bradyrhizobium* sp e *Bradyrhizobium japonicum* (Fan et al. 2017). O glyphosate inibe, em plantas, a enzima 5-enolpiruvilchiquimato-3-fostato-sintase (EPSPs) que atua na rota do chiquimato, também presente em bactérias (Tohge et al. 2013), a inibição da via chiquímica em *Bradyrhizobium* pelo glyphosate já foi relatada (Santos et al. 2005). Quando o herbicida inibe processos comuns entre planta e microrganismos há maior chance de intoxicação (Gonzalez et al. 1996), conseqüentemente menor crescimento dos microrganismos. A inibição da EPSPS em microrganismos gera a paralisação da síntese proteica (Aristilde et al. 2017), e diminuição da proteína DnaA responsável pela iniciação da replicação do DNA bacteriano que antecede a duplicação das células (Leonard and Grimwade, 2011).

Os herbicidas diuron e sulfentrazone também reduziram o crescimento de *Bradyrhizobium* sp.. O herbicida diuron é um inibidor da fotossíntese e age interrompendo o fluxo de elétrons da Qa para Qb no cloroplasto (Duke, 1990) e o sulfentrazone é inibidor da síntese da protoporfirinogênio oxidase, na síntese da clorofila (Vieira et al. 2007). A diminuição do crescimento bacteriano em meios contendo esses herbicidas não pode ser explicada pelos seus mecanismos de ação, já que os produtos não atuam no metabolismo da bactéria. Essa diminuição pode estar relacionada aos adjuvantes utilizados em suas formulações como relatado para diminuição do crescimento de *Bradyrhizobium* em diferentes formulações de glyphosate (Santos et al. 2005). Os adjuvantes são adicionados às formulações para modificarem as características ou atividade dos herbicidas, principalmente pela redução da tensão superficial onde a penetração é facilitada, neste caso as bactérias podem se tornar mais sensíveis à ação do herbicida (Malkones, 2000). Os aditivos utilizados em formulações comerciais de agrotóxicos, como os adjuvantes, na maioria das vezes não são divulgados (Mullin et al. al. 2016), o que dificulta identificar como esses produtos podem influenciar o crescimento de *Bradyrhizobium* sp..

A diminuição do tempo para crescimento máximo das bactérias com glyphosate, diuron e sulfentrazone pode ser explicada pela redução do tempo da fase Lag. A fase Lag é o período de adaptação e preparação para o crescimento populacional e pode variar dependendo do meio de cultura ou substâncias adicionadas (Rolfe et al. 2012), como os herbicidas. O tempo de crescimento nestes tratamentos mostra que a adaptação a esses meios foi mais

rápida. Além disso, a quantidade e o consumo de carbono dos meios também pode influenciar o tempo de máximo crescimento (Rolfe et al. 2012).

A diminuição da densidade celular máxima das bactérias pode estar associada à redução da eficiência de utilização de carbono e energia do meio de cultura contendo os herbicidas sulfentrazone, glyphosate e diuron e devido à diminuição do tempo para máximo crescimento (Figura 1A). Isto acontece porque em condições de estresse, parte da energia disponível ao organismo é despendida para manter mecanismos moleculares e bioquímicos de tolerância (Schimel et al. 2007), como relatado para a bactéria diazotrófica *Herbaspirillum seropedicae* em meios contendo herbicidas (Procópio et al. 2014).

Atividade positiva para a enzima catalase em bactérias está relacionada com a proteção contra o estresse oxidativo (Pandey et al. 2013), já que esta enzima decompõe peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água e oxigênio e é responsável também pelo consumo de outros oxigênios reativos (Sharma et al. 2012). As esterases são enzimas lipolíticas que catalisam a clivagem de ligações de ésteres em meio aquoso e a reação reversa em solventes orgânicos sendo amplamente expressas em vários organismos, incluindo bactérias (López-López et al. 2014). As estereases têm ampla aplicação como biocatálise em indústrias alimentícias, farmacêuticas e agroquímicas, produção de biodiesel, biorremediação e tratamento de resíduos (Barone et al. 2014; López-López et al. 2014; de Lourdes Moreno et al. 2016; Parte et al. 2017). A atividade positiva das enzimas oxidases bacterianas está relacionada à redução do oxigênio e bombeamento de prótons dentro da célula (García-Horsman et al. 1994). A enzima urease em bactérias é responsável pela hidrólise da uréia em amônia e ácido carbônico (Fiaron 1923). A atividade da urease tem sido avaliada em processos inovadores em vários campos da engenharia, onde é usado como meio de biocementação e biorremediação para limpeza residuais e água subterrânea de tóxicos metais, radionuclídeos, etc (Anbu et al. 2016). Maior crescimento de *Bradyrhizobium* sp. apenas no tratamento contendo o controle evidencia que o herbicida glufosinato não pôde ser degradado pela bactéria, pois nos tratamentos sem as fontes de carbono e nitrogênio e com o herbicida, o crescimento foi menor. Algumas formas de degradação microbiana do glufosinato são pela atividade de enzimas transaminases, como a oxidase (Altman, 2018), que não foi positiva para o *Bradyrhizobium* sp., impedindo assim a degradação do herbicida.

Maior crescimento bacteriano no meio sem manitol e com o herbicida demonstra que o *Bradyrhizobium* sp. conseguiu degradar o 2,4-D e utilizá-lo como fonte de carbono, substituindo o manitol. Vários isolados bacterianos foram descritos capazes de usar 2,4-D como única fonte de carbono e energia (Baelum et al. 2010; Sandoval-Carrasco et al. 2013),

incluindo o *Bradyrhizobium* sp. (Serbent et al. 2019). A capacidade degradadora do herbicida 2,4-D pelo *Bradyrhizobium* sp., está relacionada à presença dos fragmentos de genes *tfdA* (*tfdAa*), *tfdB* e *tftA* (*cadA*) (Huong et al. 2007). Maior crescimento de *Bradyrhizobium* sp. nos meios T7 (sem manitol e com nitrato de sódio) e T8 com atrazine e tratamento controle (T9), evidenciam que este herbicida também foi utilizado como única fonte de carbono pela bactéria. As enzimas conhecidas para degradação do atrazine são codificadas pelos genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE*, *atzF* e *trzN*, já relatados para bactéria *Pseudomonas* sp. (Singh e Singh, 2014). Apesar de ainda não ter sido relatada a presença destes genes para *Bradyrhizobium* sp., eles podem estar ligados à degradação do atrazine por esta bactéria. O atrazine é decomposto em amônia e gás carbônico (Siripattanukul et al. 2009).

Menores crescimentos bacterianos nos tratamentos sem as fontes de carbono e nitrogênio e com o glyphosate evidenciam que o *Bradyrhizobium* sp. não foi capaz de degradar este herbicida. As conversões do glyphosate a ácido aminometilfosfônico e sarcosina são duas principais vias de degradação em microrganismos que inclui a clivagem da ligação de azoto de carboximetileno, por sua vez catalisada por uma oxidase que produz ácido aminometilfosfônico e glioxilato; em seguida a clivagem direta da ligação carbono-fósforo, catalisada pela C-P liase produzindo sarcosina (Zhan et al. 2018). A primeira reação é catalisada por uma oxidase, que neste trabalho foi negativa para *Bradyrhizobium* sp., o que pode justificar a não degradação do herbicida. Maior crescimento de *Bradyrhizobium* sp. nos meios T7 e T8 com sulfentrazone e o controle (T9), evidenciam que o herbicida foi utilizado como fonte de carbono pela bactéria. Outras bactérias do solo, como *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas putida* já foram relatadas como degradadoras de sulfentrazone (Melo et al. 2017). Entretanto, não foram encontrados relatos de *Bradyrhizobium* sp. como degradador deste herbicida. Desta maneira, não foi possível concluir como esta bactéria poderia utilizar alguma das enzimas analisadas para degradar o herbicida e utilizá-lo como fonte de carbono.

Menores crescimentos bacterianos nos tratamentos sem as fontes de carbono e nitrogênio e com o clomazone demonstram que o *Bradyrhizobium* sp. não foi capaz de degradar este herbicida. Uma das vias de degradação microbiana do clomazone envolve a hidroxilação do anel aromático e hidroxilação benzílica, com desidrogenação subsequente (Van Scoy et al. 2014). A partir das informações contidas na literatura, não foi possível associar a atividade ou não de alguma das enzimas testadas no processo de degradação deste herbicida.

Maior crescimento bacteriano no meio com o herbicida oxyfluorfen sem o manitol e nitrogênio demonstra que o *Bradyrhizobium* sp. conseguiu degradar o herbicida oxyfluorfen e utilizá-lo como fonte de carbono e nitrogênio. Uma das vias de degradação do oxyfluorfen em bactérias é iniciada com clivagem da ligação éter ou de cloração, redução do grupo nitro e, em seguida, aminoacetilação (Zhao et al. 2016). Esta rota de degradação foi observada para a espécie *Azotobacter chroococcum* (Chakraborty et al. 2002), porém, as reações envolvidas na quebra da molécula do oxyfluorfen não puderam ser associadas à atividade positiva das enzimas avaliadas neste trabalho. *Bradyrhizobium* sp. não foi encontrado na literatura como degradador do oxyfluorfen até o momento.

Maior crescimento de *Bradyrhizobium* sp. nos meios T7 com diuron, T8 e controle (T9), demonstra que o herbicida foi utilizado como única fonte de carbono pela bactéria. O herbicida diuron é classificado como feniluréia (uréia substituída) (Sing e Sing, 2014), a degradação deste herbicida pelo *Bradyrhizobium* sp. pode estar ligada a atividade positiva para enzima urease, que degrada a uréia em amônia e ácido carbônico (Ferris et al. 2004). Outras vias de degradação vistas em espécies como *Stenotrophomonas acidaminiphila*, *Achromobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* envolvem reações de N-desmetilação seguida por clivagem da ligação amida para gerar 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA) (Egea et al. 2017).

7 CONCLUSÕES

O efeito de doses comerciais dos herbicidas testados na bactéria *Bradyrhizobium* sp. variou entre os mesmos. O glyphosate, sulfentrazone e diuron foram os mais tóxicos e diminuíram o crescimento das bactérias. Os herbicidas sulfentrazone, glyphosate e diuron diminuíram a densidade celular máxima e o tempo de máximo crescimento celular. *Bradyrhizobium* sp. degradou os herbicidas 2,4-D, atrazine, sulfentrazone e diuron e os utilizou como fonte de carbono para seu crescimento.

8 REFERÊNCIAS

Agrofit, Sistema de agrotóxicos e fitossanitários. <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> (Acessado 10 jan. 2019).

AGUIAR, L. M; SANTOS, J. B; COSTA, V. A; BRITO, L. A; FERREIRA, E. A; PEREIRA, I. M; ASPIAZU, I. Tolerancia a herbicidas y eficiencia del uso del agua en especies forestales utilizadas en programas de recuperación de zonas degradadas. **Bosque**. v. 37, n. 3, p. 493-500. 2017.

ALTMAN, J. 2018. Pesticide interactions in crop production: Beneficial and deleterious effects. CRC Press.

ANBU, P; KANG, C. H; SHIN, Y. J; SO, J. S. Formations of calcium carbonate minerals by bacteria and its multiple applications. **Springerplus**. v. 5, n. 1, p. 250. 2016.

ARISTILDE, L; REED, M. L; WILKES, R. A; YOUNGSTER, T; KUKURUGYA, M. A; KATZ, V; SASAKI, C. R. Glyphosate-induced specific and widespread perturbations in the metabolome of soil *Pseudomonas* species. **Frontiers in Environmental Science**. v. 5, p. 34. 2017.

BAELUM, J; JACOBSEN, C. S; HOLBEN, W. E. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. **Syst Appl Microbiol**. v. 33, p. 67–70. 2010.

BANKS, M. L; KENNEDY, A. C; KREMER, R. J; EIVAZI, F. Soil microbial community response to surfactants and herbicides in two soils. **Appl Soil Ecol**. v. 74, p. 12-20. 2014.

BARONE, R; DE SANTI, C; PALMA ESPOSITO, F; TEDESCO, P; GALATI, F; VISONE, M; DE PASCALE, D. Marine metagenomics, a valuable tool for enzymes and bioactive compounds discovery. **Frontiers in Marine Science**. v. 1, p. 38. 2014.

BUKHMANN, Y. V; DIPIAZZA, N. W; PIOTROWSKI, J; SHAO, J; HALSTEAD, A. G; BUI, M. D; SATO, T. K. Modeling microbial growth curves with GCAT. **Bio Energy Research**. v. 8, p. 1022-1030. 2015.

CAO, B; ZHANG, Y; WANG, Z; LI, M; YANG, F; JIANG, D; JIANG, Z. Insight into the variation of bacterial structure in atrazine-contaminated soil regulating by potential phytoremediator: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 864. 2018.

CHAKRABORTY, S. K; BHATTACHARYYA, A; CHOWDHURY, A. Degradation of oxyfluorfen by *Azotobacter chroococcum* (Beijerinck). **Bulletin of environmental contamination and toxicology**. v. 69, n. 2, p. 203-209. 2002.

CHELLAIAH, D; YULE, C. M. Effect of riparian management on stream morphometry and water quality in oil palm plantations in Borneo. **Limnologica**. v. 69, n.2, p.72-80. 2018.

DE LOURDES MORENO, M; MÁRQUEZ, M. C; GARCÍA, M. T; MELLADO, E. Halophilic bacteria and archaea as producers of lipolytic enzymes. **In Biotechnology of Extremophiles: Springer**. p. 375-397. 2016.

DUKE, S. O. Overview of herbicide mechanisms of action. **Environmental Health Perspectives**. v. 87, p. 263-271. 1990.

EGEA, T. C; DA SILVA, R; BOSCOLO, M; RIGONATO, J; MONTEIRO, D. A; GRÜNIG, D; GOMES E. Diuron degradation by bacteria from soil of sugarcane crops. **Heliyon**. v. 3, n. 12, p. e00471. 2017.

FAN, L; FENG, Y; WEAVER, D. B; DELANEY, D. P; WEHTJE, G. R; WANG G. Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean. **Applied Soil Ecology**. v. 121, p. 11-19. 2017.

FEARON, W. R. Urease. Part I. The chemical changes involved in the zymolysis of urea. **Biochemical Journal**. v. 17, n. 1, p. 84. 1923.

FERRIS, F. G; PHOENIX, V; FUJITA, Y; SMITH, R. W. Kinetics of calcite precipitation induced by ureolytic bacteria at 10 to 20 C in artificial groundwater. **Geochimica et Cosmochimica Acta**. v. 68, n.8, p. 1701-1710. 2004.

GARCÍA-HORSMAN, J. A; BARQUERA, B; RUMBLEY, J; MA, J; Gennis, R. B. The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. **Journal of Bacteriology**. v. 176, n. 18, p. 5587. 1994.

GONZALEZ, A; GONZALEZ-MURUA, C; ROYUELA, M. Influence of imazethapyr on *Rhizobium* growth and its symbiosis with Pea (*Pisum sativum*). **Weed Science Champaign**. v. 44, p. 31-37. 1996.

Hrac – BR, Associação brasileira de ação a resistência de plantas daninhas aos herbicidas. <<https://www.hrac-br.org/>> (Acessado 10 jan. 2019).

HUONG, N. L; ITOH, K; SUYAMA, K.. Diversity of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) and 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid (2, 4, 5-T)-degrading bacteria in Vietnamese soils. **Microbes and environments**. v. 22, n. 3, p. 243-256. 2007

LASTE, K; GONÇALVES; DE FARIA, S. M. Estirpes de rizóbio eficientes na fixação biológica de nitrogênio para leguminosas com potencial de uso na recuperação de áreas mineradas. Embrapa Agrobiologia. Comunicado Técnico. 2008.

LEONARD, A. C; GRIMWADE, J. E. Regulation of DnaA assembly and activity: taking directions from the genome. **Annual Review of Microbiology**. v. 65, p. 19-35. 2011.

LÓPEZ-LÓPEZ, O; E CERDAN, M. I; GONZALEZ SISO, M. New extremophilic lipases and esterases from metagenomics. **Current Protein and Peptide Science**. v. 15, n. 5, p. 445-455. 2014.

MA, L; CHEN, S; YUAN, J; YANG, P; LIU, Y; STEWART, K. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 116, n. 1, p. 133-140. 2017.

MALKOMES, H. P. Comparison of the effects of differently formulated herbicides on soil microbial activities: a review. **Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz, Sonderh.** v. 1, p. 781-789. 2000.

MARTINELLI, G; MORAES, M. A. Livro vermelho da flora do Brasil. 749-818. 2013.

MELO, C. A; MASSENSINI, A. M; PASSOS, A. B. R; CARVALHO, F. P; FERREIRA, L. R; SILVA, A. A; COSTA, M. D. Isolation and characteristics of sulfentrazone-degrading bacteria. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**. v. 52, n. 2, p. 115-121. 2017.

MULLIN, C. A; FINE, J. D; REYNOLDS, R. D; FRAZIER, M. T. Toxicological risks of agrochemical spray adjuvants: organosilicone surfactants may not be safe. **Frontiers in public health**. v. 4, p. 92. 2016.

PANDEY, P. P; JAIN, S. Analytic derivation of bacterial growth laws from a simple model of intracellular chemical dynamics. **Theory in Biosciences**. v. 135, p. 121-130. 2016.

PANDEY, S; BARAI, P. K; MAITI, T. K. Influence of heavy metals on the activity of antioxidant enzymes in the metal resistant strains of *Ochrobactrum* and *Bacillus* sp. **Journal of environmental biology**. v. 34, n. 6, p. 1033. 2013.

PARTE, S; SIRISHA, V. L; D'SOUZA, J. S. Biotechnological applications of marine enzymes from algae, bacteria, fungi, and sponges. **Adv. Food Nutr. Res.** v. 75, p.106. 2017.

PELEG, M; CORRADINI, M. G. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. **Critical reviews in food science and nutrition**. v. 51, p. 917-945. 2011.

PETERSON, M. A; MCMASTER, S. A; RIECHERS, D. E; SKELTON, J; STAHLMAN, P. W. 2, 4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**. v. 30, n. 2, p. 303-345. 2016.

PROCÓPIO, S. D. O; FERNANDES, M. F; TELES, D. A; SENA, F; CARGNELUTTI FILHO, A; RESENDE, M. A; VARGAS, L. Toxicity of herbicides used in the sugarcane crop to diazotrophic bacterium *Herbaspirillum seropedicae*. **Semina: Ciências Agrárias**. v. 35, n. 5, p. 2383-2398. 2014.

RAINBIRD, B; BENTHAM, R. H; SOOLE, K. L. Rhizoremediation of residual sulfonylurea herbicides in agricultural soils using *Lens culinaris* and a commercial supplement. **International Journal of Phytoremediation**. v. 20, n. 2, p. 104-113. 2018.

ROLFE, M. D; RICE, C. J; LUCCHINI, S; PIN, C; THOMPSON, A; CAMERON, A. D. S; ALSTON, M; STRINGER, M. F; BETTS, R. P; BARANYI, J; PECK, M. W, HINTON, J. C D. Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. **Journal of Bacteriology**. v. 194, n. 3, p. 686-701. 2012.

SANDOVAL-CARRASCO, C. A; AHUATZI-CHACÓN, D; GALÍNDEZ-MAYER, J; RUIZ-ORDAZ, N; JUÁREZ-RAMÍREZ, C; MARTÍNEZ-JERÓNIMO, F. Biodegradation of a mixture of the herbicides ametryn, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in a compartmentalized biofilm reactor. **Bioresour Technol.** v. 145, p. 33–6. 2013.

SANTOS, N. M. C; COSTA, V. A. M; ARAÚJO, F. V; ALENCAR, T. B; RIBEIRO, V. H; OKUMURA, F; SIMEONE, M. L. F; SANTOS J B. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 25, n. 27, p. 27561-27568. 2018.

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

SANTOS, L. L. Caracterização bioquímica, genética e patogênica de *Burkholderia andropogonis* e reavaliação taxonômica da espécie. 101f. Campinas SP. 2015.

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

SERBENT, M. P; REBELO, A. M; PINHEIRO, A; GIONGO, A; TAVARES, L. B. B. Biological agents for 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid herbicide degradation. **Applied microbiology and biotechnology.** p. 1-14. 2019.

SHARMA, P; JHA, A. B; DUBEY, R. S; PESSARAKLI, M. 2012. Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. **Journal of botany.** 2019.

SINGH, B; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical reviews in microbiology.** v. 42, n. 2, p. 245-261. 2016.

SIRIPATTANAKUL, S; WIROJANAGUD, W; MCEVOY, J; LIMPIYAKORN, T; KHAN, E. 2009. Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization. **Journal Appl Microbiol.** v. 106, p. 986–92. 2016.

TOHGE, T; WATANABE, M; HOEFGEN, R; FERNIE, A. R. Shikimate and phenylalanine biosynthesis in the green lineage. **Frontiers in Plant Science.** v. 4, p. 62. 2013.

VIDEIRA, S. S; SIMÕES-ARAÚJO, J. L; BALDANI, V. L. D. Metodologia para isolamento e posicionamento taxonômico de bactérias diazotróficas oriundas de plantas não-leguminosas. **Embrapa Agrobiologia.** 2007.

VIEIRA, R. F; SILVA, C. M. M; SILVEIRA, A. P. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant and soil.** v. 300, n. 1-2, p. 95-103. 2007.

YAO, Y; WANG, R; LU, J. K; SUI, X. H; WANG, E. T; CHEN, W. X. Genetic diversity and evolution of *Bradyrhizobium* populations nodulating *Erythrophleum fordii*, an evergreen tree

indigenous to the southern subtropical region of China. **Appl Environ Microbiol.** v. 80, p. 6184–6194. 2014.

ZHAN, H; FENG, Y; FAN, X; CHEN, S. Recent advances in glyphosate biodegradation. **Applied microbiology and biotechnology.** v. 102, p. 5033-5043. 2018.

ZHAO, H; XU, J; DONG, F; LIU, X; WU, Y; WU, X; ZHENG, Y. Characterization of a novel oxyfluorfen-degrading bacterial strain *Chryseobacterium aquifrigidense* and its biochemical degradation pathway. **Applied microbiology and biotechnology.** v. 100, n. 15, p. 6837-6845. 2016.

CAPITULO CIENTÍFICO II:

**ATIVIDADE DE FUNGOS MICORRÍZICOS EM ESPÉCIES ARBÓREAS
SUBMETIDAS A HERBICIDAS RESIDUAIS**

1 RESUMO

BARROSO, M. G. **Atividade de fungos micorrízicos em espécies arbóreas submetidas a herbicidas residuais**. 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

A fitorremediação utiliza plantas e microrganismos da rizosfera para retirar resíduos de herbicidas do solo. O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade de fungos micorrízicos em espécies arbóreas submetidas a herbicidas residuais. Os trabalhos foram conduzidos em casa de vegetação e o experimento foi delineado em quatro blocos e esquema em fatorial 6 x 3. O primeiro fator foi composto por seis espécies arbóreas (*Inga edulis* Mart, *Myrsine gardneriana* A.DC., *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Toona ciliata* M. Roem., *Trichilia hirta* L. e *Triplaris americana* L.) e o segundo por três soluções: atrazine (4000 g ha⁻¹), sulfentrazone (600 g ha⁻¹) e apenas água (controle). As mudas foram cultivadas em vasos com substrato e a irrigação feita pelo subsolo nos pratos de contenção. As doses totais dos herbicidas foram fracionadas em quatro aplicações feitas via subirrigação. Foram determinadas as massas secas totais das plantas, a quantidade de esporos e a respiração basal dos fungos micorrízicos. As massas secas totais da espécie *T. hirta* foram maiores nos tratamentos contendo atrazine e sulfentrazone. Os herbicidas diminuíram a biomassa total de *T. americana*. Os herbicidas influenciaram negativamente a atividade dos fungos micorrízicos. As espécies *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. ciliata* foram as que tiveram comportamento semelhante às espécies no tratamento sem herbicida, sendo mais tolerantes aos herbicidas.

Palavras-chave: atividade microbiana, atrazine, espécies arbóreas, sulfentrazone, respiração basal.

2 ABSTRACT

BARROSO, M. G. **Mycorrhizal fungi activity in arboreal species submitted to residual herbicides**. 2019. 53 p. Dissertação (Ciência Florestal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2019.

Phytoremediation utilizes rhizosphere plants and microorganisms to remove herbicide residues from the soil. The objective of this work was to evaluate the activity of mycorrhizal fungi in arboreal species submitted to residual herbicides. The work was conducted in a greenhouse and the experiment was designed in four blocks and a 6 x 3 factorial scheme. The first factor was composed of six tree species (*Inga edulis* Mart, *Myrsine gardneriana* A.DC., *Schizolobium parahyba* (Vell.) Blake, *Toona ciliata* M. Roem., *Trichilia hirta* L. e *Triplaris americana* L.) and the second by three solutions: atrazine (4000 g ha⁻¹), sulfentrazone (600 g ha⁻¹) and water only (control) . The seedlings were cultivated in pots with substrate and the irrigation made underground in the containment dishes. The total doses of the herbicides were fractionated in four applications made via subirrigation. The total dry masses of the plants, the amount of spores and the basal respiration of the mycorrhizal fungi were determined. The total dry masses of the *T. hirta* species were higher in treatments containing atrazine and sulfentrazone. The herbicides decreased total *T. americana* biomass. The herbicides negatively influenced the activity of mycorrhizal fungi. The species *M. gardneriana*, *S. parahyba* and *T. ciliata* were those that had similar behavior to the species in the treatment without herbicide, being more tolerant to the herbicides.

Key words: microbial activity, atrazine, tree species, sulfentrazone, basal respiration.

3 INTRODUÇÃO

Herbicidas residuais como atrazine e sulfentrazone são importantes no manejo de plantas daninhas em culturas agrônômicas, sistemas agroflorestais ou recuperação de áreas degradadas devido à capacidade de controlarem plantas indesejadas e o banco de sementes daninhas, diminuindo o número de aplicações de herbicidas. Por outro lado, o efeito residual pode ser prejudicial às culturas sucessoras sensíveis na área de cultivo. Além disso, esses herbicidas podem se deslocar no solo por escoamento superficial e lixiviação, chegando a cursos hídricos e áreas adjacentes às agrícolas (Masiol et al. 2018; Merel et al. 2018).

O atrazine é um herbicida inibidor do fotossistema II (Fan et al., 2018), apresenta baixa adsorção às partículas do solo, persistência variável (Barchanska et al. 2014) e alto potencial para contaminação de cursos hídricos (Sequinatto et al. 2013), sendo o principal agrotóxico contaminante de aquíferos no mundo (Benvenuto et al. 2010). O sulfentrazone é inibidor da enzima protoporfirinogênio oxidase (Dayan e Watson , 2011), e suas principais características são o tempo de meia vida superior a 500 dias e a baixa sorção ao solo, o que possibilita ser classificado como extremamente perigoso a águas superficiais e subterrâneas (Gustafson, 1989, Passos et al. 2013).

Uma alternativa para diminuir os efeitos danosos dos herbicidas em áreas adjacentes às lavouras é a fitorremediação que utiliza plantas e seu microbioma associado para remoção, diminuição ou imobilização dos herbicidas no solo ou na água (Rainbird et al. 2018; Cao et al. 2018). O uso de árvores para fitorremediação de áreas com resíduos de herbicidas tornou-se interessante para a agricultura brasileira (Aguiar et al. 2017; Cabral et al. 2017; Santos et al. 2018). As árvores são fundamentais para proteção de corpos hídricos, revegetação de áreas degradadas, proteção de áreas sensíveis à erosão e da fauna e flora. As espécies também atuam como filtros naturais e podem diminuir o transporte dos herbicidas no subsolo (Chellaiah & Yule, 2018).

O papel da comunidade de microrganismos da rizosfera é importante no processo de fitorremediação, já que o principal meio de degradação de herbicidas no solo é pela atividade microbiana (Peterson et al. 2016), por meio de processos biológicos denominados fitoestimulação ou rizodegradação (Rainbird et al. 2017). Nestes processos os exsudados liberados por plantas podem estimular a atividade microbiana que degradam os herbicidas (Ma et al. 2017). Os fungos micorrízicos são importantes microssimbiontes que têm efeito estimulante de crescimento vegetal (Pereira et al. 2018). Nesta associação, as plantas fornecem compostos de carbono aos fungos, enquanto os fungos beneficiam as plantas,

causando maior absorção de nutrientes e água, além de promover a retenção de umidade, agregação e estabilidade do solo (Smith e Smith, 2012). Alguns indicadores de atividade microbiana no solo, como dos fungos micorrízicos, são obtidos por meio de contagem de esporos, colonização das raízes e por valores de respiração basal (desprendimento de CO₂) (Anderson e Domsch, 2010).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade de fungos micorrízicos em espécies arbóreas submetidas a herbicidas residuais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi inicialmente instalado em casa de vegetação no Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Uberlândia, em Monte Carmelo – MG, Brasil. O experimento foi delineado em quatro blocos e esquema em fatorial (6 x 3). O primeiro fator foi composto por seis espécies arbóreas (Tabela 1) e o segundo por três soluções: atrazine (4000 g ha⁻¹), sulfentrazone (600 g ha⁻¹) e apenas água (controle).

Tabela 1: Caracterização das espécies arbóreas estudadas quanto à tolerância a atrazine e sulfentrazone e potencial remediador do solo.

Espécie	Nome popular	Importância
<i>Inga edulis</i> Mart.	Ingá	Restauração florestal
<i>Myrsine gardneriana</i> A.DC.	Pororoca	Restauração florestal
<i>Schizolobium parahyba</i> (Vell.) Blake	Guapuruvu	Restauração florestal /silvicultural
<i>Toona ciliata</i> M. Roem.	Cedro	Restauração florestal/silvicultural
<i>Trichilia hirta</i> L.	Pompéia	Restauração florestal
<i>Triplaris americana</i> L.	Pau-formiga	Restauração florestal

Fonte: Flora do Brasil, 2019.

Foram utilizadas mudas entre 15 e 20 cm, sendo que dentro da mesma espécie todas eram da mesma matriz e tinham as mesmas alturas e idades e os mesmos números de folhas. As mudas foram transplantadas para unidades de contenção com capacidade para 20 dm³ preenchidos com substrato contendo solo caracterizado química e fisicamente (Tabela 2). A amostra de solo utilizada foi coletada em área sem histórico de aplicação de herbicidas em profundidade de 0-20 cm, adubada e homogeneizada.

Tabela 2. Análise química e física da amostra de solo utilizada para cultivo das mudas em amostragem realizada no momento do transplântio.

P me ⁻¹	S-SO ₄ =	B	Cu	Fe	Mn	Zn
----- mg dm ⁻³ -----						

145,4	50,0	1,42	4,5	31	11,7	11,5

Organic matter	Sand	Silt		Clay	Textural class	
----- % -----						

4,2	43	20	37	clay loam		

pH H ₂ O	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Al ³⁺	H + Al	
----- cmol _c dm ⁻³ -----						
--						
6,1	1,17	5,0	2,2	0,0	2,50	

As unidades de contenção, com o fundo perfurado, foram colocadas sobre pratos de contenção com altura de seis cm. As mudas foram transplantadas para essas unidades e permaneceram em crescimento por 60 dias, para aclimação. A irrigação foi realizada considerando a capacidade de campo do solo e utilização de uma balança de precisão. O substrato permaneceu a 70% da capacidade de campo durante todo o experimento.

Após 60 dias de aclimação os herbicidas foram aplicados. A dose total foi fracionada em quatro aplicações com intervalos de 30 dias, sendo cada aplicação correspondente a ¼ da dose comercial (atrazine: 4000 g ha⁻¹ e sulfentrazone: 600 g ha⁻¹ – MAPA, Agrofit, 2019). As doses foram calculadas em função da área da unidade de contenção e as aplicações feitas por subirrigação. Os herbicidas foram diluídos em 200 mL de água e a solução foi colocada nos pratos de contenção posicionados abaixo de cada unidade. A solução foi prontamente absorvida pelo solo simulando a chegada dos herbicidas via subsolo.

As plantas foram cortadas rente ao solo e determinadas a massa seca total das plantas aos 120 dias após a primeira aplicação de herbicidas. Para determinação da biomassa utilizou-se estufa de circulação forçada de ar, a 65°C, até peso constante.

A ocorrência de fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) foi avaliada pelas metodologias de avaliação da colonização radicular e extração e contagem de esporos. As raízes das espécies arbóreas foram coletadas aos 120 e conservadas em solução de FAA (formaldeído, ácido acético e álcool etílico). Para a avaliação da colonização as raízes foram previamente lavadas, colocadas em cassetes para biópsias e imersas em KOH 10% por uma noite. Em seguida, as amostras foram aquecidas a 60 °C em KOH 10% por 10 minutos para clarificação. As raízes foram lavadas com água destilada e em seguida imersas em H₂O₂ 15% por 10 segundos. Após clarificação as estruturas fúngicas foram coradas por 3 minutos a 90°C em solução com tinta de caneta comercial Parker® 5%, ácido acético 5% e lactoglicerol 10%. Para avaliação da intensidade de colonização radicular foram preparadas lâminas de microscopia contendo 10 segmentos de raiz de aproximadamente 1 cm e analisadas em microscópio óptico. Notas de 0 a 100 foram atribuídas conforme ocupação da área radicular pelas estruturas fúngicas. Para extração dos esporos, uma porção de 50 g proveniente do solo rizosférico das espécies foi lavada por três vezes com água de torneira e peneirada em malhas de 0,71 mm e 0,053 mm. O material retido na peneira de malha 0,035 mm foi transferido com água destilada para tubo de centrífuga e centrifugado durante 3 min a 1500 ppm. O sobrenadante foi descartado e uma solução de sacarose a 70% foi acrescentada, o material sedimentado foi agitado com a finalidade de tornar os esporos suspensos na solução. Em seguida, foi realizada a centrifugação por 2 min a 700 rpm. O sobrenadante foi passado em peneira de 0,053 mm e o material retido foi transferido para placa canelada e a contagem realizada com o auxílio de microscópio estereoscópio.

Para quantificar a respiração basal do solo segundo, 10 g de solo úmido foi separado para determinar a massa de solo seco, em seguida foi determinado a capacidade de retenção de água (CRA) e corrigido a umidade para 60% da CRA com água destilada. Após esse processo pesou-se 100 g de solo úmido, previamente tamisado, em peneira número 10 (abertura de 2,00 mm), transferido para um frasco de vidro com tampa hermética, e após acondicionados dentro dos frascos juntamente com o solo. Um tubo de ensaio contendo 15 ml de NaOH 0,5 N padronizado, para capturar o CO₂ produzido e outro tubo de ensaio contendo 10 ml de água destilada foram utilizados para manter a umidade do ambiente, após esse processo os frascos foram fechados e encubados em estufa a 25°C por uma semana. Após esse período de incubação, os tubos de ensaio contendo NaOH foram retirados dos frascos e transferido para erlenmeyer de 125,0 mL e adicionado 1,0 ml de BaCl₂ (50%) e 2 gotas de fenolftaleína, e após essa padronização foi titulado o excesso de NaOH com HCl 0,5N.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e diferenciados pelo teste de Tukey para os tratamentos com e sem herbicidas e agrupadas segundo critério de Skott-Knott para o fator espécies, ambos a 5% de significância. Os dados das espécies com e sem herbicidas também foram submetidos à análise multivariada, ordenados por escalonamento multidimensional não-métrico (NMDS) (Clarck, 1993), representação 2D, usando matriz de similaridade de Bray-Curtis para análise de semelhanças (Culman et al., 2008). Valores de stress do NMDS maiores que 0,2 sugerem uma representação mais fraca e difícil de interpretar (Blaud et al., 2015), neste caso duas dimensões podem não ser suficientes para refletir as diferenças de forma precisa se a estrutura dos dados for complexa (Schütte et al., 2008).

5 RESULTADOS

As massas secas totais da espécie *T. hirta* foram maiores nos tratamentos contendo atrazine e sulfentrazone. Os herbicidas diminuíram a biomassa total de *T. americana*. As espécies apresentaram comportamento diferenciado para alocação de massa seca total nos tratamentos com os herbicidas. As espécies *S. parahyba* e *T. americana* foram as mais prejudicadas e *T. hirta* a que melhor se desenvolveu quando expostas ao atrazine. *T. americana* foi a mais sensível ao sulfentrazone (Figura 1).

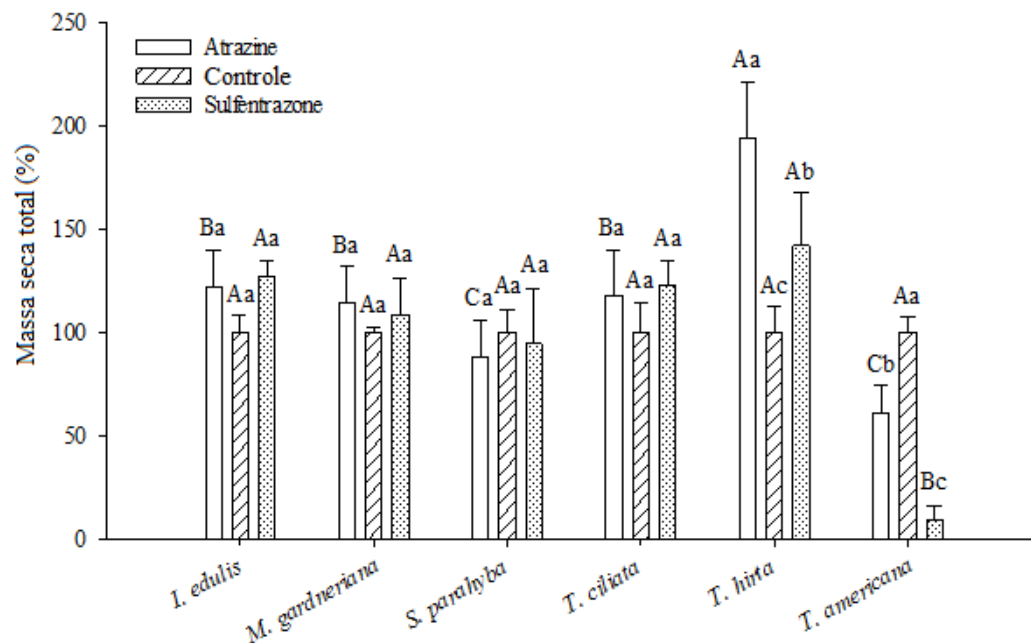


Figura 1. Gráfico da massa seca total de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância para os herbicidas e controle.

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si segundo critério de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância para as espécies. CV = 18,3%.

A colonização rizosférica por fungos micorrízicos foi maior no tratamento contendo sulfentrazone para a espécie *I. edulis* e menor para *M. gardneriana*, *T. ciliata* e *T. hirta*, comparadas ao tratamento controle. *Inga edulis* e *T. hirta* tiveram diminuição da colonização na presença do atrazine se comparadas ao tratamento sem herbicida. As espécies apresentaram comportamento diferencial para esta variável nos tratamentos com atrazine e sulfentrazone, sendo que *I. edulis*, *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. americana* foram as que mais se destacaram em solo contaminado com atrazine e *I. edulis* no solo com sulfentrazone (Figura 2).

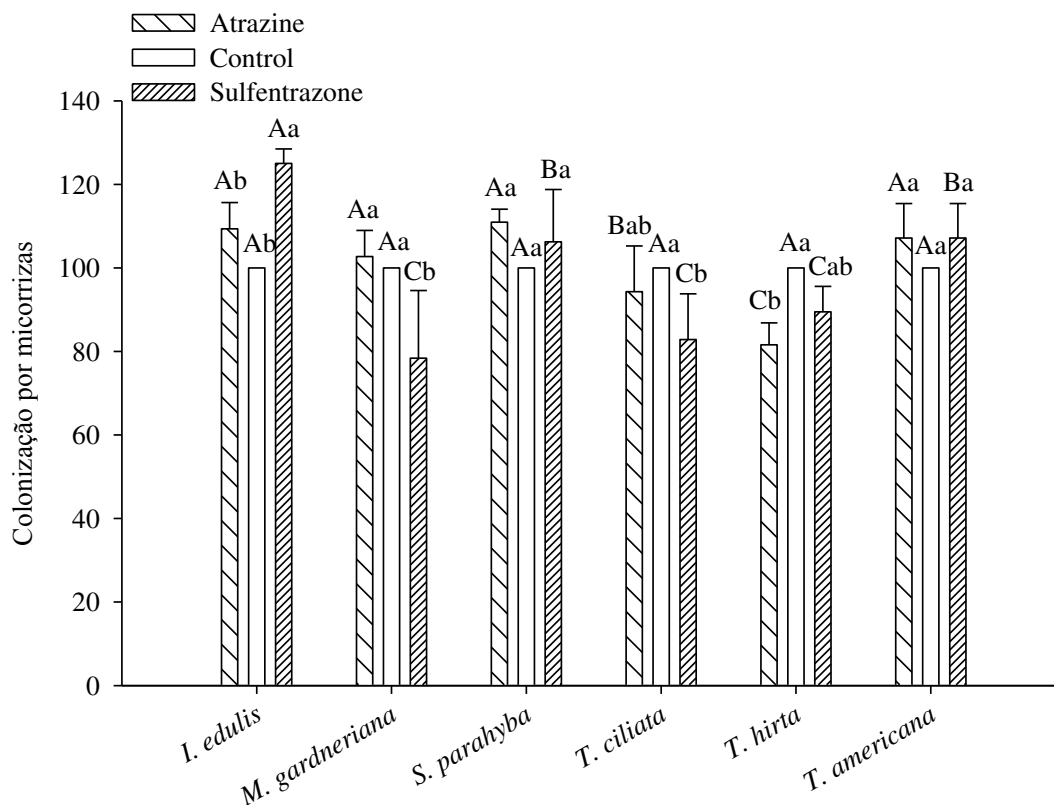


Figura 2. Gráfico da colonização rizosférica por micorrizas de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância para os herbicidas e controle. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si segundo critério de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância para as espécies. CV = 6,93 %.

Os herbicidas não influenciaram a contagem de esporos dos fungos rizosféricos das espécies florestais. Porém, entre as espécies houve diferenças para o tratamento com atrazine, as espécies que tiveram melhor desempenho foram *I. edulis*, *T. ciliata* e *T. hirta* (Figura 3).

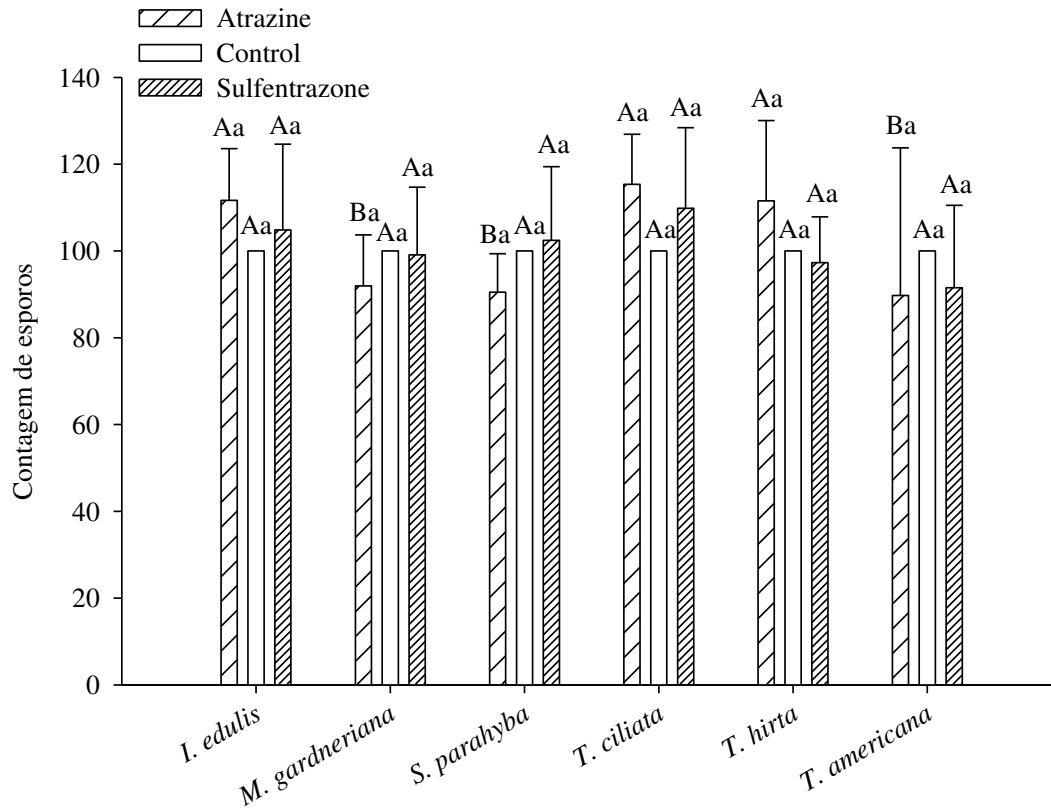


Figura 3. Gráfico da contagem de esporos de fungos micorrízico da rizosfera de espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância para os herbicidas e controle. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si segundo critério de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância para as espécies. CV = 6,93 %.

A respiração basal do solo foi menor no tratamento contendo sulfentrazone na rizosfera de *T. hirta* e no tratamento contendo atrazine na rizosfera de *T. americana*. Todas as espécies arbóreas avaliadas tiveram o mesmo comportamento para essa variável com herbicida atrazine, já sob efeito do sulfentrazone, *I.edulis*, *M. gardneriana* e *T. americana* apresentaram maior desprendimento de CO₂ da amostra de solo rizosférico (Figura 4).

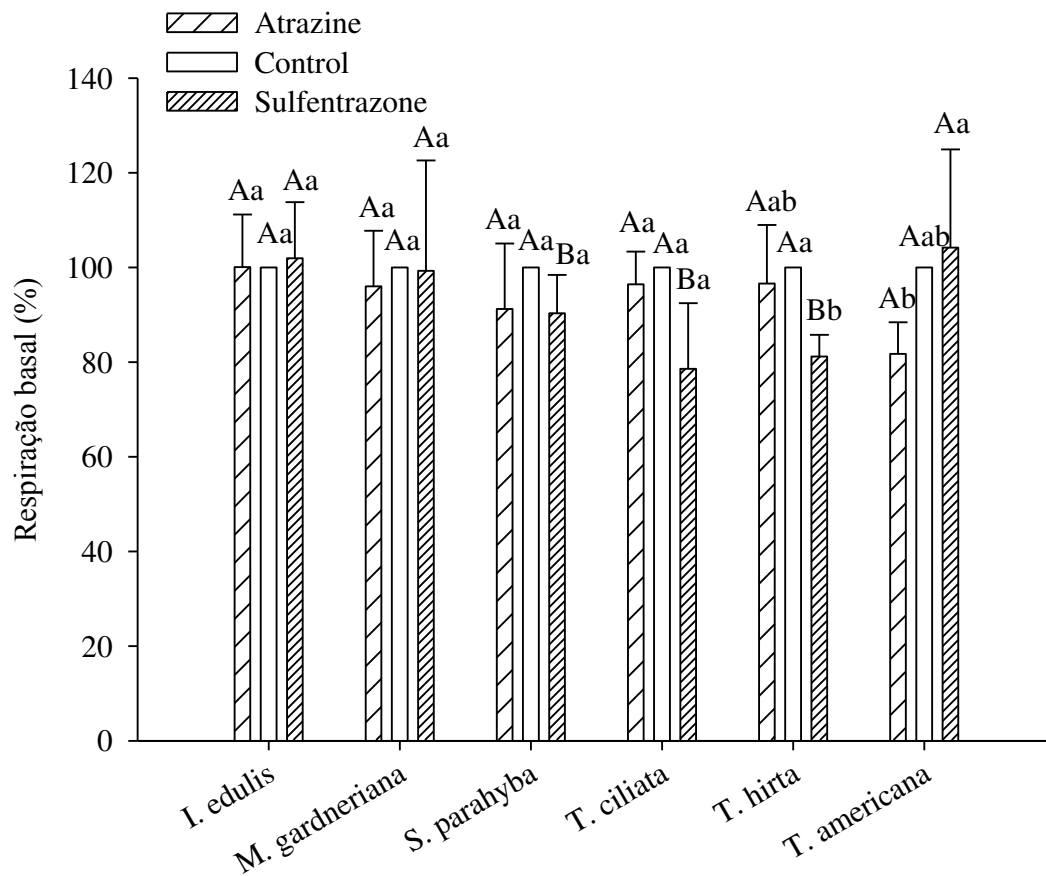


Figura 4. Gráfico da respiração basal do solo onde foram cultivadas espécies florestais submetidas aos herbicidas atrazine, sulfentrazone e tratamento controle. Médias seguidas de mesma letra minúscula não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância para os herbicidas e controle. Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem entre si segundo critério de agrupamento Scott-Knott a 5% de significância para as espécies. CV = 6,93 %.

O escalonamento multidimensional não-métrico apresentou valor de stress menor do que 0.2. Houve uma tendência de agrupamento de comportamento de todas as espécies no tratamento controle com as espécies *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. ciliata* com o herbicida atrazine e *S. parahyba* e *T. ciliata* com o sulfentrazone (Figura 5).

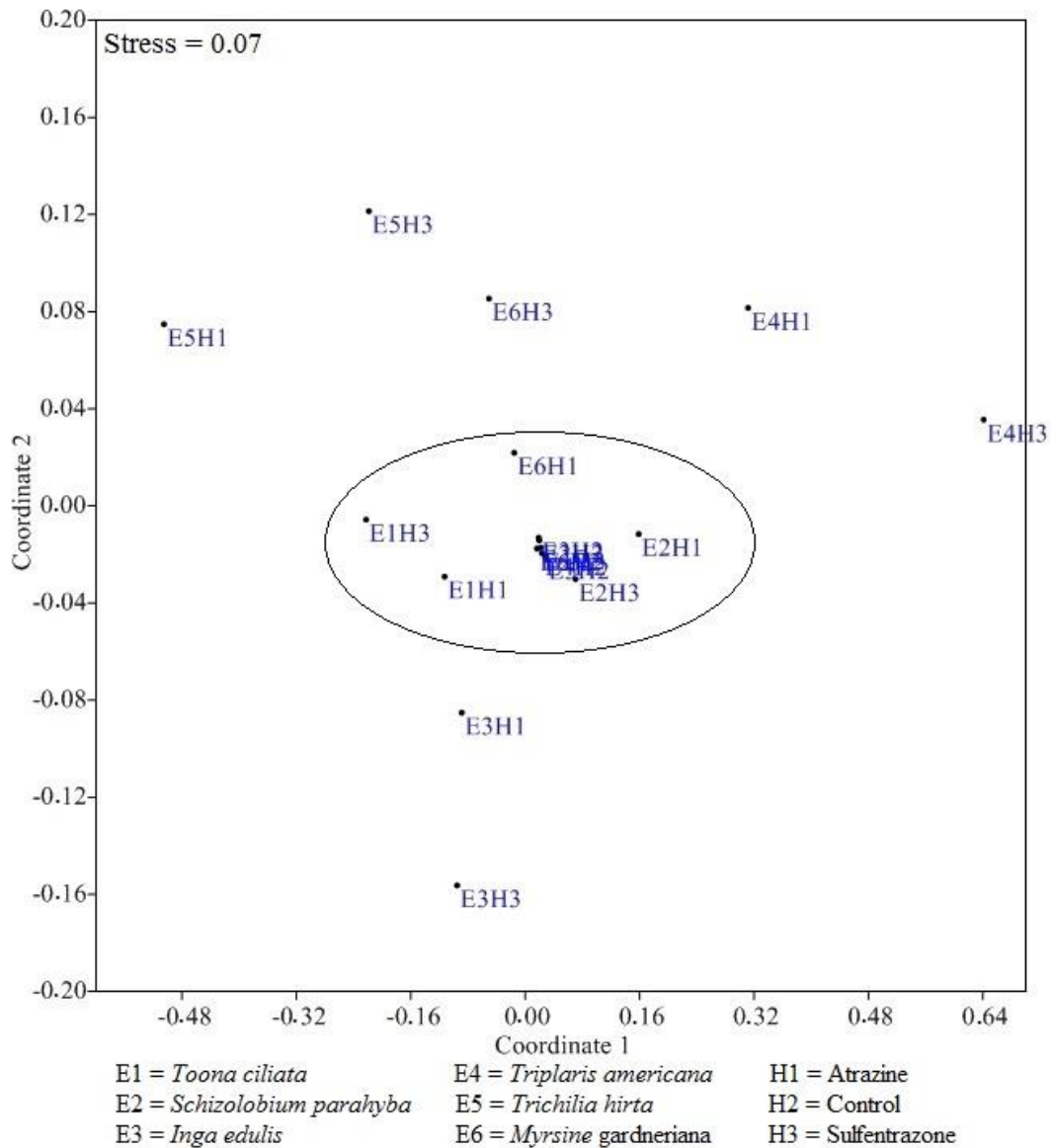


Figura 5. Ordenação multidimensional não-métrica (NMDS) de espécies arbóreas tratadas com herbicidas e controle.

6 DISCUSSÃO

Os fungos micorrízicos arbusculares (FMAs) são componentes bióticos primários do solo e simbiontes obrigatórios de espécies vegetais, carboidratos e nutrientes minerais são trocados dentro das raízes através da interface entre planta e fungo (Berruti et al. 2016). Os FMAs podem diminuir o impacto negativo da falta de nutrientes nas plantas (Nouri et al. 2014) e

contribuem na fitorremediação de poluentes. (Joner e Leyval, 2009). Porém, atividades antrópicas podem levar a uma diminuição da abundância e diversidade desses fungos no solo comprometendo a eficiência do ecossistema (Berruti et al. 2016).

O maior acúmulo de massa seca nos tratamentos contendo herbicidas para a espécie *T. hirta* pode ser devido a efeito hormético, que é uma resposta diferencial de algumas plantas a subdoses de herbicidas (Belz e Duke, 2014), já que as aplicações foram feitas fracionadas e o herbicida tem seu comportamento na solução do solo influenciado pelas características físicas e químicas do mesmo. Comportamento hormético já foi relatado para vários herbicidas como tebuthiuron, glyphosate, ammonium glufosinate e 2,4-D em diversas plantas (Ather Nadeem et al. 2017; Belgers et al. 2010; Dragičević M et al. 2013; Faria et al. 2018). Outra possibilidade de maior acúmulo de biomassa de uma planta em solo com herbicida na rizosfera é o efeito negativo sobre os microrganismos do solo (Kalia et al. 2011), que imobilizam alguns nutrientes por um tempo (Hobbie, 2015), como observado pela menor colonização micorrízica desta espécie nos tratamentos com herbicidas (Figura 2). Desta forma, o herbicida contribuiria para maior disponibilidade de nutrientes na solução do solo, aumentando a oferta para as plantas. Por outro lado, a espécie *T. americana* se mostrou sensível aos dois herbicidas, com diminuição do acúmulo de biomassa total. Menor massa seca total da espécie em solo contendo atrazine se deve ao mecanismo de ação desse herbicida, que inibe o fluxo de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I (Nakka et al. 2017). Essa inibição gera um alto estado energético que promove a formação de oxigênios reativos (Triantaphylidès e Havaux, 2009), resultando em clorose e necrose do tecido foliar (Aguiar et al. 2018), promovendo menor acúmulo de biomassa seca de plantas sensíveis como *T. americana*. O herbicida sulfentrazone promove acúmulo de protoporfirinogênio no cloroplasto, levando ao rompimento da membrana celular lipídica (Dayan e Watson, 2011), causando clorose seguida de necrose dos tecidos foliares e, com isto, redução da massa seca de *T. americana*. Com relação às diferenças entre as espécies, as condições anatômicas das plantas influenciam na movimentação dos herbicidas nos tecidos das plantas e há enorme variabilidade entre elas, inclusive dentro da mesma espécie (Bailey et al. 2003). Por isso, se observam diferenças entre as espécies florestais tratadas com atrazine e sulfentrazone.

Maior colonização rizosférica por fungos micorrízicos em *I. edulis* pode ser explicada devido à capacidade dessa espécie em fitorremediar solos com resíduos de sulfentrazone (Silva Filho, 2018). Desta maneira, os microrganismos podem ter usado os compostos desta degradação como fonte de energia para seu crescimento e, conseqüentemente, terem aumentado sua colonização. Por outro lado, as espécies *M. gardneriana*, *T. ciliata* e *T. Hirta*,

não foram encontradas na literatura como degradadoras de sulfentozone, sendo assim, a toxicidade do herbicida pode ter tido efeito negativo sobre o crescimento desses microrganismos, como observado para a colonização da soja por fungos micorrízicos (Vieira et al. 2007).

Ausência de efeito dos herbicidas sobre a contagem de esporos dos fungos rizosféricos pode ser explicada devido a esta variável estar mais diretamente relacionada com a espécie arbórea utilizada. A produção de esporos destes tipos de fungos é dependente do grupo de plantas as quais pertencem (Aguilar-Trigueros et al. 2019). No caso da diferença entre espécies tratadas com o atrazine, esse comportamento diferencial pode ser explicado devido a alterações no metabolismo de produção de esporos dos fungos na presença deste herbicida, mostrando que algumas espécies podem não contornar de forma adequada o estresse causado pela toxicidade deste herbicida.

A taxa de respiração basal do solo está relacionada ao CO₂ emitido dos processos de respiração por microrganismos aeróbicos presentes, predominantemente, na região rizosférica (Moreira e Siqueira, 2006). Alteração entre valores como aqueles observados como superior por *I.edulis*, *M. gardneriana* e *T. americana* sob efeito do sulfentrazone não significam, necessariamente, efeito positivo. Em situações onde a biomassa microbiana diminui com a elevação da taxa de respiração basal pode-se afirmar que há insustentabilidade na atividade que levou à tal ocorrência, nesse caso, resíduos do sulfentrazone. Por outro lado, caso a biomassa não tenha sofrido alteração, ou mesmo tenha aumentado, pode-se afirmar que o herbicida tenha promovido maior alocação de carbono via degradação desse composto o que é positivo. Esse mesmo efeito pode ser observado caso a taxa de CO₂ tenha diminuído, como observado para *S. parahyba*, *T. ciliata* e *T. hirta*, sob efeito do sulfentrazone, desde que a biomassa microbiana não tenha alteração ou tenha aumentado. Essas relações são inferidas pelo quociente metabólico (qCO₂) que relaciona respiração e biomassa microbiana, indicando sustentabilidade quando da prática de atividades agrícolas, como manejo do solo para plantio, ou aplicação de insumos como adubos ou os herbicidas (Melo et al. 2017). Quanto menor o valor de qCO₂, mais sustentável será a atividade, indicando que menos carbono será perdido para a atmosfera e, portanto, maior alocação de matéria orgânica ao solo com o tempo (Melo et al. 2017).

Valor de stress menor que 0.2 do escalonamento multidimensional não-métrico significa que a representação obtida foi forte e facilmente interpretável (Blaud et al. 2015), sendo as duas dimensões suficientes para refletir as diferenças de forma precisa (Schütte et al. 2008). A partir da análise multivariada obteve-se agrupamento das espécies do tratamento

controle com *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. ciliata* tratada com atrazine e *S. parahyba* e *T. ciliata* com o sulfentrazone, o que indica comportamento similar mesmo diante do estresse causado pelos herbicidas, demonstrando maior tolerância dessas espécies e menor efeito sobre a funcionalidade de seus fungos micorrízicos.

7 CONCLUSÕES

Algumas atividades dos fungos micorrízicos arbusculares das árvores submetidas aos herbicidas atrazine e sulfentrazone foram comprometidas. Os herbicidas afetaram também a alocação de matéria seca de *T. americana*.

As espécies *M. gardneriana*, *S. parahyba* e *T. ciliata* foram as que tiveram comportamento semelhante às espécies no tratamento sem herbicida a partir do escalonamento multidimensional não-métrico feito com as variáveis analisadas.

8 REFERÊNCIAS

- AGUIAR, L. M; SANTOS, J. B; COSTA, V. A; BRITO, L. A; FERREIRA, E. A; PEREIRA, I. M; ASPIAZU, I. Tolerancia a herbicidas y eficiencia del uso del agua en especies forestales utilizadas en programas de recuperación de zonas degradadas. **Bosque**. v. 37, n. 3, p. 493-500. 2017.
- AGUILAR-TRIGUEROS, C. A; HEMPEL, S; POWELL, J. R; CORNWELL, W. K; RILLIG, M. C. Ligando ecología reproductiva e microbiana: um estudo de caso em fungos micorrízicos arbusculares. **A revista ISME**. v. 13, n. 4, p. 873. 2019.
- ANDERSON, T. H; DOMSCH, K. H. Soil microbial biomass: the eco-physiological approach. **Soil Biology and Biochemistry**. v. 42, n. 12, p. 2039-2043. 2010.
- BAILEY, W. A; HATZIOS, K. K; BRADLEY, K. W; WILSON, H. P. Absorption, translocation, and metabolism of sulfentrazone in potato and selected weed species. **Weed science**. v. 51, n. 1, p. 32-36. 2003.
- BARCHANSKA, H; BABILAS, B; GLUZICKA, K; ZRALEK, D; BARANOWSKA, I. Rapid determination of mesotrione, atrazine and its main degradation products in selected plants by MSPD – HPLC and indirect estimation of herbicides phytotoxicity by chlorophyll quantification. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**. v. 94, n. 2, p. 99–114. 2014.
- BENVENUTO, F; MARÍN, J. M; SANCHO, J. V; CANOBBIO, S; MEZZANOTTE, V; HERNÁNDEZ, F. Simultaneous determination of triazines and their main transformation products in surface and urban wastewater by ultra-high-pressure liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 397, n. 7, p. 2791-2805. 2010.
- BERRUTI, A; LUMINI, E; BALESTRINI, R; BIANCIOTTO, V. Arbuscular mycorrhizal fungi as natural biofertilizers: let's benefit from past successes. **Frontiers in microbiology**. v. 6, p. 1559. 2016.
- BLAUD, A; DIOUF, F; HERRMANN, A. M; LERCH, T. Z. Analysing the effect of soil organic matter on bacterial communities using T-RFLP fingerprinting: different methods, different stories?. **Biology and Fertility of soils**. v. 51, n. 8, p. 959-971. 2015.
- CABRAL, C. M; SANTOS, J. B; FERREIRA, E. A; MACHADO, V. M; PEREIRA, I. M; SILVA, D. V. Tolerance to the herbicide clomazone and potential for changes of forest species. **Bioscience Journal**. v. 33, n. 4, p. 897-904. 2017.
- CAO, B; ZHANG, Y; WANG, Z; LI, M; YANG, F; JIANG, D; JIANG, Z. Insight into the variation of bacterial structure in atrazine-contaminated soil regulating by potential phytoremediator: *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. **Frontiers in Microbiology**. v. 9, p. 864. 2018.
- CHELLAIAH, D; YULE, C. M. Effect of riparian management on stream morphometry and water quality in oil palm plantations in Borneo. **Limnologica**. v. 69, n. 2, p.72-80. 2018.

CLARKE, K. R. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. **Aust. J. Ecol.** v.18, p. 117–143. 1993.

CULMAN, S. W; GAUCH H, G; BLACKWOOD, C. B; THIES, J. E. Analysis of T-RFLP data using analysis of variance and ordination methods: a comparative study. **Journal of Microbiological Methods.** v. 75, n. 1, p. 55-63. 2008.

DAYAN, F. E; WATSON, S. B. Plant cell membrane as a marker for light dependent and light independent herbicide mechanisms of action. **Pesticide Biochemistry and Physiology.** v. 101, n. 3, p.182–190. 2011.

FAN, X; CHANG, W; FENG, F; SONG, F. Responses of photosynthesis-related parameters and chloroplast ultrastructure to atrazine in alfalfa (*Medicago sativa* L.) inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. **Ecotoxicology and environmental safety.** v. 166, p. 102-108. 2018.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. **Environmental Toxicology and Chemistry.** v. 8, n. 4, p. 339-357. 1989.

JONER, E. J; LEYVAL, C. Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. **In Sustainable Agriculture.** Springer. p. 885-894. 2009.

MA, L; CHEN, S; YUAN, J; YANG, P; LIU, Y; STEWART, K. Rapid biodegradation of atrazine by *Ensifer* sp. strain and its degradation genes. **International Biodeterioration & Biodegradation.** v. 116, n. 1, p. 133-140.

MASIOL, M; GIANNI, B; PRETE, M. Herbicides in river water across the northeastern Italy: occurrence and spatial patterns of glyphosate, aminomethylphosphonic acid, and glufosinate ammonium. **Environmental Science and Pollution Research.** v. 25, n. 24, p. 24368–24378. 2018.

MELO, C. A. D; SOUZA, W. M. D; CARVALHO, F. P. D; MASSENSINI, A. M; SILVA, A. A. D; FERREIRA, L. R; COSTA, M. D. Microbial activity of soil with sulfentrazone associated with phytoremediator species and inoculation with a bacterial consortium. **Bragantia.** v. 76, n. 2, p. 300-310. 2017.

MEREL, S; BENZING, S; GLEISER, C; DI NAPOLI-DAVIS, G; ZWIENER, C. Occurrence and overlooked sources of the biocide carbendazim in waste water and surface water. **Environmental Pollution.** v. 239, n. 8, p. 512-521. 2018.

MOREIRA, F. M. S; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo: 2. ed. Lavras: UFLA, 2006.

NOURI, E; BREUILLIN-SESSOMS, F; FELLER, U; REINHARDT, D. Phosphorus and nitrogen regulate arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Petunia hybrida*. **PLoS One.** v.9, n. 3, p. e90841.z. 2014.

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

PETERSON, M. A; MCMASTER, S. A; RIECHERS, D. E; SKELTON, J; STAHLMAN, P. W. 2, 4-D past, present, and future: a review. **Weed Technology**. v.30, n. 2, p. 303-345. 2016.

RAINBIRD, B; BENTHAM, R. H; SOOLE, K. L. Rhizoremediation of residual sulfonylurea herbicides in agricultural soils using *Lens culinaris* and a commercial supplement. **International Journal of Phytoremediation**. v.20, n. 2, p. 104-113. 2018.

SANTOS, N. M. C; COSTA, V. A. M; ARAÚJO, F. V; ALENCAR, T. B; RIBEIRO, V. H; OKUMURA, F; SIMEONE, M. L. F; SANTOS, J. B. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. **Environmental Science and Pollution Research**. v.25, n. 27, p. 27561-27568. 2018.

SCHÜTTE, U. M; ABDO, Z; BENT, S. J; SHYU, C; WILLIAMS, C. J; PIERSON, J. D; FORNEY, L. J. Advances in the use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis of 16S rRNA genes to characterize microbial communities. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.80, n. 3, p. 365-380. 2008.

SEQUINATTO, L; REICHERT, J. M; SANTOS, D. R; REINERT, D. J; COPETTI, A. C. C. Occurrence of agrochemicals in surface waters of shallow soils and steep slopes cropped to tobacco. **Química Nova**. v.36, n. 6, p. 768-722. 2013.

SILVA, FILHO. U. S. D. Potencial de espécies florestais para remediação de áreas contaminadas com herbicidas residuais. 2018.

SMITH, S. E; SMITH, F. A. Fresh perspectives on the roles of arbuscular mycorrhizal fungi in plant nutrition and growth. **Mycologia**. v.104, n. 1, p. 1-13. 2012.

VIEIRA, R. F; SILVA, C. M. M; SILVEIRA, A. P. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. **Plant and soil**. v. 300, n. 1-2, p. 95-103. 2007.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os herbicidas são a classe de agrotóxicos mais comercializados no Brasil e no mundo, o uso mesmo que correto pode fazer com que seus resíduos atinjam áreas adjacentes e afetem organismos não alvo. Desta maneira, o uso consciente destes produtos é indispensável para evitar maiores prejuízos ao meio ambiente. A utilização de herbicidas para o controle de plantas indesejadas é eficaz e necessário, entretanto, a busca pelo manejo mais sustentável do solo deve ser prioridade para a produção mundial. Algumas alternativas são os sistemas agroflorestais, plantios mistos, preservação e restauração de áreas de preservação, fitorremediação de áreas contaminadas, dentre outros.

A restauração florestal, por exemplo, pode ser otimizada usando-se espécies arbóreas e seus microssimbiontes tolerantes aos resíduos de herbicidas, que poderiam remediar as áreas contaminadas. Além disso, em zonas ripárias, elas funcionariam como filtros, impedindo ou diminuindo a chegada de resíduos de herbicidas aos cursos hídricos. As espécies arbóreas e seu microbioma potencializariam a retirada e degradação desses poluentes.

Dentre os herbicidas, o glyphosate, sulfentrazone e diuron foram os mais negativos aos microrganismos e devem, portanto, serem usados com maior critério. Entre as espécies, *Inga edulis*, *Myrsine gardneriana*, *Schizolobium parahyba*, *Toona ciliata* e *Trichilia hirta* foram mais tolerantes e, portanto, com potencial para reintrodução ou enriquecimento nas áreas contaminadas pelo atrazine e sulfentrazone. Por outro lado, *Triplaris americana*, foi mais sensível e pode ter sua perpetuação comprometida caso resíduos de herbicidas se movimentem até suas raízes.