

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

KAMILA CABRAL MIELKE

**REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM
SULFENTRAZONE EM FUNÇÃO DA SIMBIOSE
ENTRE *Bradyrhizobium* sp. E *Canavalia ensiformis***

São Mateus – ES
Julho de 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA TROPICAL

**REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM
SULFENTRAZONE EM FUNÇÃO DA SIMBIOSE
ENTRE *Bradyrhizobium* sp. E *Canavalia ensiformis***

KAMILA CABRAL MIELKE

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Espírito Santo, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, para obtenção do título de mestre em Agricultura Tropical.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ribeiro Pires

São Mateus – ES
Julho de 2019

C117r Cabral Mielke, Kamila, 1993-
Remediação de solos contaminados com sulfentrazone em
função da simbiose entre *Bradyrhizobium* sp. e *Canavalia*
ensiformis / Kamila Cabral Mielke. - 2019.
45 f. : il.

Orientador: Fábio Ribeiro Pires.
Coorientadores: Aloísio José Bueno Cotta, João Carlos
Madalão.
Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical) -
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário
Norte do Espírito Santo.

1. Fitorremediação. 2. Biorremediação. I. Ribeiro Pires,
Fábio. II. Bueno Cotta, Aloísio José. III. Carlos Madalão, João.
IV. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro
Universitário Norte do Espírito Santo. V. Título.

CDU: 63

Kamila Cabral Mielke

**Remediação de solos contaminados com sulfentrazone em função
da simbiose entre *Bradyrhizobium* sp. e *Canavalia ensiformis***

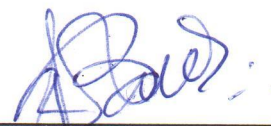
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agricultura Tropical.

Aprovada em 16 de julho de 2019.

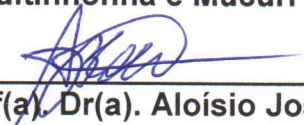
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof(a). Dr(a). Fábio Ribeiro Pires
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador(a)



Prof(a). Dr(a). José Barbosa dos Santos
Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri



Prof(a). Dr(a). Aloísio José Bueno Cotta
Universidade Federal do Espírito Santo

Aos meus pais José Antônio Mielke e Lucy Moreira Cabral Mielke, meus irmãos Cacio Cabral Mielke e Karina Cabral Mielke pelo apoio e companheirismo.

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus pai o criador.

À universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, pela oportunidade concedida.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao professor Fábio Ribeiro Pires pela orientação, confiança e amizade.

Aos meus coorientadores João Carlos Madalão e Aloísio José Bueno Cotta pelos ensinamentos, orientações e sugestões.

Aos meus pais, José Antônio e Lucy M., pela vida, incentivo, companheirismo e amor incondicional.

Aos meus irmãos Cacio Mielke e Karina Mielke, pela amizade, carinho e amor.

Ao meu namorado, Ricardo Araújo, pelo apoio incondicional e incentivo diário que foram de grande importância.

Aos graduandos do grupo de Pesquisa em Fitotecnologia, em especial a Rafaela Bertuani, pela amizade, parceria disponibilidade e apoio. Aos técnicos dos Laboratórios pela disponibilidade e ajuda nos trabalhos

Às demais pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o êxito deste trabalho.

BIOGRAFIA

Kamila Cabral Mielke, filha de José Antônio Mielke e Lucy Moreira Cabral Mielke, nasceu no dia 02 de fevereiro de 1993, na cidade de Jarú, Rondônia.

Em agosto de 2011, ingressou no curso de Engenharia Agrônômica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Rondônia, Campus Colorado do Oeste.

Em agosto de 2017, iniciou Mestrado em Agricultura tropical pela Universidade Federal do Espírito Santo, Campus São Mateus. Submeteu-se a defesa em julho de 2019.

SUMÁRIO

REMEDIÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM SULFENTRAZONE EM FUNÇÃO DA SIMBIOSE ENTRE <i>Bradyrhizobium</i> sp. E <i>Canavalia ensiformis</i>	1
RESUMO	1
ABSTRACT	2
1. Introdução.....	3
2. Material e Métodos	4
2.1. Detalhes experimentais.....	4
2.2. Tratamentos, delineamento experimental e procedimentos.....	5
2.3. Quantificação de resíduos de sulfentrazone no solo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	6
2.3.1. Preparo de uma amostra de solo dopada com Boral 500® SC na concentração de 0,29mg kg ⁻¹	7
2.4. Avaliação microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de <i>Canavalia ensiformis</i>	7
2.5. Bioensaio	8
2.6. Avaliações e amostragens na espécie fitorremediadora	8
2.7. Análise estatística	8
3. Resultados.....	9
3.1. Performance do método de quantificação de resíduos de sulfentrazone no solo	9
3.2. Avaliação das concentrações residuais de sulfentrazone no solo após cultivo de feijão-de-porco com e sem inoculante.....	10
3.3. Atividade microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de <i>Canavalia ensiformis</i>	12
3.4. Bioensaio	15
3.5. Produção de fitomassa de <i>Canavalia ensiformis</i>	17
4. Discussão	19

4.1. Avaliação das concentrações residuais de sulfentrazone no solo após cultivo de feijão-de-porco com e sem inoculante.....	19
4.2. Atividade microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de <i>Canavalia ensiformis</i>	20
4.3. Bioensaio	23
4.4. Produção de fitomassa de <i>Canavalia ensiformis</i>	24
5. Conclusões	26
Referências.....	27
ANEXOS.....	33

REMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM SULFENTRAZONE EM FUNÇÃO DA SIMBIOSE ENTRE *Bradyrhizobium* sp. E *Canavalia ensiformis*

“Preparado de acordo com as normas do Periódico Agriculture, Ecosystems & Environment”

RESUMO

MIELKE, Kamila Cabral; M.Sc.; Universidade Federal do Espírito Santo; Julho de 2019; **Remediação de solos contaminados com sulfentrazone em função da simbiose entre *Bradyrhizobium* sp. e *Canavalia ensiformis***; Orientador: Fábio Ribeiro Pires. Coorientadores: João Carlos Madalão e Aloísio José Bueno Cotta.

A simbiose entre plantas fitorremediadoras e microrganismos com atividade enzimática metabolizadora de herbicidas pode ser uma alternativa eficiente para remediação de solos contaminados com sulfentrazone. Este trabalho objetivou avaliar a eficiência da biorremediação de solos contaminados com sulfentrazone por meio da simbiose entre bactéria (*Bradyrhizobium* sp.) e a leguminosa (*Canavalia ensiformis*). O experimento foi conduzido, entre 03/2018 e 05/2018, em casa-de-vegetação da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), testando-se quatro doses de sulfentrazone (0, 400, 800 e 1200 g ha⁻¹ i.a.) na presença ou ausência da inoculação com *Bradyrhizobium* sp. BR2003 (SEMIA 6156). Após 80 dias de cultivo, as plantas foram cortadas, o solo foi coletado para análise cromatográfica e para o bioensaio com milheto. A concentração de sulfentrazone, nas doses de 400 e 800 g ha⁻¹, foi significativamente reduzida com a inoculação da planta com *Bradyrhizobium* sp., sendo, em média 30,7 %, e 23,3% menor do que sem inoculação, respectivamente. A simbiose promoveu redução de até 75% do herbicida residual no solo. A inoculação com diazotrófico simbiótico potencializou a microbiota do solo e consequentemente aumentou a eficiência da biorremediação. Sob efeito da dose de 1200 g ha⁻¹ a descontaminação não foi satisfatória. Os resultados deste trabalho encorajam a continuidade dos estudos sobre a interação positiva entre microrganismos simbióticos e espécies leguminosas visando à fitorremediação do herbicida sulfentrazone.

Palavras-chave: leguminosas, microrganismos simbióticos, rizodegradação

ABSTRACT

MIELKE, Kamila Cabral; M.Sc.; Federal University of Espírito Santo; July 2019; **Remediation of soils contaminated with sulfentrazone according to the symbiosis between *Bradyrhizobium* sp. and *Canavalia ensiformis***; Advisor: Fábio Ribeiro Pires. Co-advisors: João Carlos Madalão e Aloísio José Bueno Cotta.

The symbiosis between phytoremediation plants and microorganisms with herbicide metabolizing enzymatic activity may be an efficient alternative for the remediation of soils contaminated with sulfentrazone. The objective of this study was to evaluate the efficiency of bioremediation of sulfentrazone contaminated soils by means of symbiosis between bacteria (*Bradyrhizobium* sp.) and legume (*Canavalia ensiformis*). The experiment was conducted between 03/2018 and 05/2018 in a greenhouse at the Federal University of Espírito Santo (UFES), testing four doses of sulfentrazone (0, 400, 800 and 1200 g ha⁻¹ i.a.) in the presence or absence of the inoculation with *Bradyrhizobium* sp. BR2003 (SEMIA 6156). After 80 days of cultivation, the plants were cut, the soil was collected for chromatographic analysis and for the bioassay with millet. The concentration of sulfentrazone, at 400 and 800 g ha⁻¹, was significantly reduced with the inoculation of the plant with *Bradyrhizobium* sp., averaging 30,7 and 23,3% lower than without inoculation, respectively. The symbiosis promoted reduction of up to 75% of the residual herbicide in the soil. The inoculation with symbiotic diazotrophic potentiated the soil microbiota and consequently increased the efficiency of bioremediation. Under the 1200 g ha⁻¹ dose the decontamination was not satisfactory. The results of this work encourage the continuity of the studies on the positive interaction between symbiotic microorganisms and leguminous species aiming at the phytoremediation of the herbicide sulfentrazone.

Keywords: legumes, symbiotic microorganisms, rhizodegradation

1. Introdução

Os produtos fitossanitários são amplamente utilizados nas atividades agrícolas atuais, possibilitando o cultivo de extensas áreas. O Brasil comercializou 540 mil toneladas de ingredientes ativos em 2017 (IBAMA, 2017a), dos quais os herbicidas representam 58% (IBAMA, 2017b). O controle químico de plantas daninhas destaca-se como técnica imprescindível no sistema agrícola intensivo, dada eficiência, praticidade e rapidez do controle.

Alguns herbicidas apresentam elevada persistência no ambiente, o que implica no efeito residual do composto no solo, impedindo o desenvolvimento de certas plantas daninhas durante determinado período (Dan et al., 2010). Entretanto, herbicidas com bioatividade prolongada tornam-se indesejáveis, provocando intoxicações em plantas sensíveis, cultivadas em sucessão ou rotação de culturas (Oliveira et al., 2014). Tais compostos podem afetar a atividade microbiana (Imfeld e Vuilleumier, 2012) e contaminar águas subterrâneas e nascentes (Santos et al., 2015). O sulfentrazone (N - [2,4-dicloro-5- [4-(difluorometil)- 4,5- dihidro-3 metil -5-oxo- 1H - 1,2,4-triazol -1- il] metanosulfonamida) é um herbicida pré-emergente, pertencente ao grupo das aril triazolinonas, que apresenta atividade residual prolongada entre 6 e 24 meses, dependendo do tipo de solo e condições ambientais (Martinez et al., 2008; Monqueiro et al., 2010).

Estudos para o desenvolvimento de técnicas de remediação/mitigação dos danos causados pela presença de herbicidas no solo têm sido intensificados (Santos et al., 2018; Melo et al., 2019; Souza et al., 2017). Uma promissora técnica de descontaminação que utiliza recursos naturais para recuperar um ambiente contaminado e tóxico a uma condição segura é a biorremediação (Kang, 2014). O uso de plantas na remediação é chamado fitorremediação, baseada na ação combinada de plantas e comunidades microbianas associadas para degradar, remover, transformar ou imobilizar compostos tóxicos (Truu et al., 2015).

No Brasil, diversas espécies foram testadas na fitorremediação de herbicidas, dentre elas, a *Canavalia ensiformis* se destacou como eficiente fitorremediadora dos solos contaminados com sulfentrazone (Belo et al., 2016; Ferraço et al., 2017; Madalão et al., 2017b; Melo et al., 2019). A degradação da sulfentrazone é fortemente influenciada pela atividade microbiana do solo (Martinez et al., 2010; Melo et al., 2017a) sendo esta considerada sua principal forma de dissipação (Madalão et al., 2017a). Isso indica que a fitorremediação associada ao enriquecimento microbiano são técnicas promissoras para a biorremediação de solos contaminados (Melo et al., 2017b). Contudo, ainda são poucos os

estudos sobre os efeitos obtidos com a utilização de microrganismos diazotróficos simbióticos, disponibilizados como inoculante comercial, na biorremediação de áreas contaminadas com sulfentrazone. Além da capacidade degradadora de alguns microrganismos, as bactérias diazotróficas são classificadas como fixadores de nitrogênio, convertendo o N_2 atmosférico em NH_3 , que é protonado a NH_4^+ e assimilado pelas plantas (Mus et al., 2016).

As bactérias diazotróficas colonizam o sistema radicular alterando os padrões de enraizamento, o fornecimento de nutrientes e, conseqüentemente, o crescimento das plantas (Ahemad e Kibret, 2014). Espécies de bactérias com potencial na degradação de sulfentrazone foram isoladas de solos contaminados, destacando-se, estirpes de *Rhizobium radiobacter* (Martinez et al., 2010, 2008). Em um dos trabalhos com herbicidas, a bactéria endossimbionte *Rhizobium* sp. em simbiose com *Phaseolus vulgaris* L. foi capaz de reduzir a concentração de atrazina no solo, possivelmente pela degradação da molécula (Madariaga-Navarrete et al., 2017).

Pesquisas já demonstram o potencial de diferentes microrganismos na degradação de herbicidas, o que viabiliza seu uso na biorremediação de solos contaminados (Martinez et al., 2010, 2008; Melo et al., 2017a; Souza et al., 2017). Dessa forma, o estudo de microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos herbicidas são indispensáveis para estabelecer a associação com a fitorremediação. A partir desses resultados, pode-se acelerar o processo de descontaminação do solo, permitindo o cultivo de culturas sensíveis em sucessão, ao mesmo tempo que se ameniza a contaminação do solo e da água. Assim sendo, a hipótese subjacente foi que a inoculação com diazotrófico simbiótico potencializa a microbiota do solo e, conseqüentemente, aumenta a eficiência da biorremediação de solos contaminados com doses elevadas de sulfentrazone. Objetivou-se avaliar a eficiência da biorremediação de solos contaminados com sulfentrazone por meio da simbiose entre bactéria (*Bradyrhizobium* sp.) e a leguminosa (*Canavalia ensiformis*).

2. Material e Métodos

2.1. Detalhes experimentais

O experimento foi conduzido, entre 03/2018 e 05/2018, em casa-de-vegetação localizada na Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), em São Mateus-ES, (18° 43' S; 30° 51' O). A amostra de solo foi classificada como Argissolo amarelo distrófico de textura média (EMBRAPA, 2018) característico da região, coletada na Fazenda Experimental localizada no CEUNES/UFES, em área sem histórico de aplicação de herbicidas, na

profundidade de 0,0-20,0 cm. O solo possuía 106, 10 e 884 g kg⁻¹ de argila, silte e areia, respectivamente, com as seguintes características químicas: pH 4,7; matéria orgânica 21,0 g kg⁻¹; P e K 1,2 e 16 mg dm³, respectivamente; Ca, Mg, Al e H+Al, CTC_{efetiva} e CTC_{pH=7} 0,4, 0,2, 1,0, 5,8, 1,7 e 6,5 cmol_c dm³, respectivamente; e saturação por bases 10,3%.

2.2. Tratamentos, delineamento experimental e procedimentos

O experimento foi conduzido em blocos casualizados com quatro repetições em esquema fatorial 4x2. O primeiro fator foi composto por quatro doses do herbicida comercial Boral 500® SC (0, 400, 800 e 1200 g ha⁻¹ i.a.) e o segundo fator foi formado pela presença ou ausência da inoculação com *Bradyrhizobium* sp.

O solo foi submetido à esterilização em autoclave vertical, à pressão de 1,0 atm e temperatura de 120 °C por 40 minutos. Cada unidade experimental correspondeu a um vaso de polietileno com 15,0 kg de solo, revestidos com sacos plásticos para impedir a perda de herbicida juntamente com o solo. A aplicação do sulfentrazone foi realizada, sobre o solo presente no vaso, utilizando-se pulverizador pressurizado com CO₂, com duas pontas espaçadas por 0,5 m, bico tipo leque XR11002VP, com volume de calda de 147 L ha⁻¹, 24 horas antes do plantio.

O inoculante foi o sólido turfoso para feijão-de-porco, *Bradyrhizobium* sp. BR2003 (SEMIA 6156), fornecido pela Embrapa Agrobiologia. Para inoculação, procedeu-se conforme descrito por Signor et al. (2016), onde as sementes foram desinfestadas em álcool 70% por 30s e em seguida imergidas em solução de hipoclorito de sódio 1% por 3 min. Após a desinfecção, as sementes foram lavadas duas vezes sucessivas em água destilada. Preparou-se 20 mL de solução açucarada 10% para umedecimento das sementes e foram adicionados 25 g do inoculante sobre as sementes, homogeneizando-se até completa cobertura. As sementes inoculadas foram secas ao ar por 30 minutos.

Foram semeadas seis sementes de feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*) por vaso, na profundidade de 5,0 cm. Após 15 dias de semeadura, realizou-se o desbaste, deixando-se duas plantas em cada unidade experimental. As irrigações foram realizadas três vezes ao dia, a fim de manter a umidade do solo a 60% da capacidade de campo (CC). As irrigações foram realizadas três vezes ao dia, a fim de manter a umidade do solo a 60% da capacidade de campo (CC). O valor de CC foi determinado em teste realizado antes da implantação do experimento, conforme Casaroli e Jong Van Lier (2008), considerando uma taxa de redução do teor de água de $|d\theta / dt| = 0,001 \text{ d}^{-1}$.

2.3. Quantificação de resíduos de sulfentrazone no solo por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As concentrações residuais do herbicida foram determinadas em amostras de solo coletadas de cada unidade experimental após a remoção da espécie fitorremediadora utilizando o método de extração sólido-líquido com particionamento a baixa temperatura (Goulart et al., 2008) e modificações propostas por Passos et al. (2018). A amostra de solo seca em estufa a 60° C, por 4 horas, foi homogeneizada e peneirada (malha 2,00 mm). Foram pesados $5,0 \pm 0,1$ g em tubo de polipropileno com tampa rosqueável (50 mL) e adicionado 20,0 mL da mistura de extração, que consistia em 10 mL de água destilada e 10 mL de acetonitrila (ACN), grau HPLC (Sigma Aldrich). Os tubos foram agitados em Vortex por 2 min e posteriormente, as amostras foram submetidas a congelamento da fase aquosa (-20° C) em freezer por aproximadamente 12 horas.

Após este período, a fração de solo e água congelada foram descartadas e a fase orgânica (ACN), contendo o herbicida, foi transferida para um tubo de polipropileno (15 mL) e centrifugada por 5 minutos, a 2.500 rpm, para decantação de eventuais partículas remanescentes. Posteriormente, foram pipetados 1,5 mL da fase orgânica para vials de vidro e submetidos a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), em equipamento Shimadzu, modelo Prominence LC-20A, com detector de arranjo de diodos, sendo a detecção e quantificação do sulfentrazone realizadas com os registros de absorção em 210 nm.

As determinações foram realizadas com coluna ODS-C18 (Shimadzu) de 15 cm de comprimento, 4,6 mm de largura, recheada com partículas de 5 μ m, em forno a 40° C. A análise cromatográfica se deu com fase móvel composta por água ultrapura, solução aquosa de ácido fosfórico a 0,1% (v/v) e ACN na proporção (50:10:40); com fluxo de 1 mL min⁻¹ e injeção de 10 μ L. Nestas condições, o tempo de retenção para o sulfentrazone foi de aproximadamente 7,85 minutos, produzindo picos simétricos e livres de interferentes. Isso foi confirmado pela coincidência dos tempos de retenção e do espectro de absorção registrado para padrões, amostras e base de dados para o composto (PubChem, 2019).

Uma solução estoque foi preparada a partir do padrão de sulfentrazone, com teor declarado de 99,5% na concentração de 200 mg L⁻¹, e a partir desta, foi feita uma solução de trabalho de 10,0 mg L⁻¹, ambas em ACN, armazenadas em congelador para evitar degradação. Soluções padrão para calibração, entre 0,020 e 0,50 mg L⁻¹, foram preparadas pela diluição da solução de trabalho em ACN. Amostras de solo ($5,0 \pm 0,1$ g) foram fortificadas pela adição de 150 μ L da solução de trabalho para obter a concentração de 0.30 mg kg⁻¹. Adicionalmente, uma amostra dopada com Boral 500® SC foi analisada para o controle de qualidade das

análises. Todos os solventes e reagentes utilizados foram de grau HPLC obtidos junto à Sigma-Aldrich.

2.3.1. Preparo de uma amostra de solo dopada com Boral 500® SC na concentração de 0,29mg kg⁻¹

Uma porção de 103 g de TFSA de solo coletado em região do estudo, livre de aplicação do herbicida, foi distribuída sobre uma bandeja de plástico de aproximadamente 20 x 30 cm. Sobre o solo, foram borrifados 6,0 mL de uma solução de Boral 500® SC, diluída com água para a concentração de sulfentrazone igual a 5,00 mg L⁻¹. Em seguida, o solo foi seco em estufa a 40° C por 3 horas e homogeneizado com uma espátula.

O solo dopado foi armazenado em geladeira. Porções de 5,0 g foram analisadas para controle de qualidade das determinações e validação do método analítico. A concentração de 0,29 mg kg⁻¹ equivale à dose de 1.6 L ha⁻¹ de Boral 500® SC, conforme recomendação de aplicação para combate a tiririca (*Cyperus rotundus*) na cultura da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) (FMC, 2017).

2.4. Avaliação microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de *Canavalia ensiformis*

Na quantificação da frequência respiratória da microbiota do solo foi utilizado o método respirométrico de avaliação do C-CO₂ evoluído, no qual uma amostra de 150 g de solo rizosférico de feijão-de-porco, peneirada (malha 2,00 mm) e umedecida a (70% da CC), foram incubadas durante 40 dias em frascos hermeticamente fechados em temperatura ambiente. As avaliações ocorreram 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 dias após o início da incubação. O C-CO₂ liberado do solo foi carregado por fluxo contínuo de ar (isento de CO₂) até outro frasco contendo 10 mL de solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Para sua liberação foram adicionados 10 mL de BaCl₂ 0,05 mol L⁻¹, sendo posteriormente titulado com HCl 0,25 mol L⁻¹, acrescidos de três gotas do indicador fenolftaleína a1% (Curl e Rodriguez-Kabana, 1972) e (Stotzky, 1965).

Após 40 dias, 17 g de solo de cada frasco foram pesados para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM) conforme Vance et al. (1987), modificado por Islam e Weil, (1998). A partir dos valores obtidos de C-CO₂ e CBM o quociente metabólico (*q*CO₂) foi calculado dividindo-se o C-CO₂ evoluído do solo pelo CBM determinado no solo (Anderson e Domsch, 1993).

As raízes de cada planta foram separadas dos vasos e, em seguida, foram retirados todos os nódulos presentes para contagem do número de nódulos total. A massa seca de

nódulos (g/plantas) foi avaliada por meio da secagem dos nódulos em estufa de circulação forçada de ar ($70\pm 2^{\circ}\text{C}$), seguida do registro da massa em balança analítica (precisão 0,1 mg) até massa constante.

2.5. Bioensaio

O milho (*Pennisetum glaucum*) foi utilizado por apresentar elevada suscetibilidade ao sulfentrazone, conforme reportado por (Belo et al., 2016; Dan et al., 2011). Vasos plásticos com fundo selado foram preenchidos com 0.5 kg de solo de cada tratamento após o cultivo. Posteriormente, foram semeadas 15 sementes do milho (var. ADR7010), mantendo-se seis plântulas por vaso após o desbaste.

Aos 30 DAS foi avaliada altura de plantas (cm) tendo como referência o meristema apical. A intoxicação visual foi avaliada utilizando-se escala percentual, onde 0 (zero) significa ausência de sintomas (redução da altura das plantas, clorose e necrose das folhas), e 100% morte de todas as plantas (Alam, 1974). No mesmo dia, determinou-se a massa seca da parte aérea, em comparação às plantas do tratamento controle, após secagem até peso constante, a $70\pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.6. Avaliações e amostragens na espécie fitorremediadora

Foi avaliada altura de plantas (cm) aos 80 dias após a semeadura (DAS), tomando-se como base para medição o meristema apical. As plantas foram cortadas na altura do coleto, sendo a massa do material vegetal imediatamente registrada, denominada de biomassa fresca da parte aérea.

As raízes foram cuidadosamente retiradas dos vasos, intactas, separadas, lavadas e pesadas para obtenção da biomassa fresca. Posteriormente, o material vegetal (parte aérea e raiz) foi colocado em estufa de circulação forçada de ar ($70 \pm 2^{\circ}\text{C}$) até massa constante.

2.7. Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F a 5% e 1% de probabilidade de erro. Interações significativas foram avaliadas e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). O efeito dose foi avaliado por análise de regressão e modelos lineares simples ($\bar{Y} = \alpha + \beta_1 X$) e quadráticos ($\bar{Y} = \alpha + \beta_1 X + \beta_2 X^2$) foram ajustados com base nos níveis de significância dos coeficientes em suas equações ($p < 0,05$) e no valor do seu coeficiente de determinação. As análises estatísticas foram realizadas com o software Sisvar® (Ferreira, 2011). Gráficos de regressão e curvas foram criados usando o software SigmaPlot®

(Systat Software, Inc., Chicago, IL, USA).

3. Resultados

3.1. Performance do método de quantificação de resíduos de sulfentrazone no solo

O método utilizado para medir a concentração de sulfentrazone no solo mostrou-se seletivo, não apresentando interferentes no tempo de retenção do analito em estudo (Fig. 3). A resposta instrumental foi a linear ($y=52193,2x-119,83$; $r^2 = 0,999$) para a faixa de concentrações testada, com bom coeficiente de determinação (Fig. 1B). O limite de detecção ($X+3DP$) e limite de quantificação ($X+10DP$) foram de 0,014 e 0,021 mg kg⁻¹, ambos estimados de acordo com INMETRO (2016), a partir da média (X) e desvio-padrão (DP) dos dados obtidos para diferentes brancos do método, preparados ao longo de um mês de análises.

Recuperações das quantidades de sulfentrazone dos solos fortificados com 150 µL do padrão de trabalho (10,0 mg L⁻¹) e dopado com produto comercial (Boral 500® SC) variaram de 89 a 110%, o tempo de retenção permaneceu 7,8 minutos (Tabela 1). O método foi reprodutível nos diferentes dias de análise e forneceu dados suficientemente precisos e exatos (com diferenças entre duplicatas menores que 10%), para as quantidades de sulfentrazone adicionadas às amostras de controle, em conformidade com os critérios de validação de SANTE/11813/2017 (2017) e INMETRO (2016).

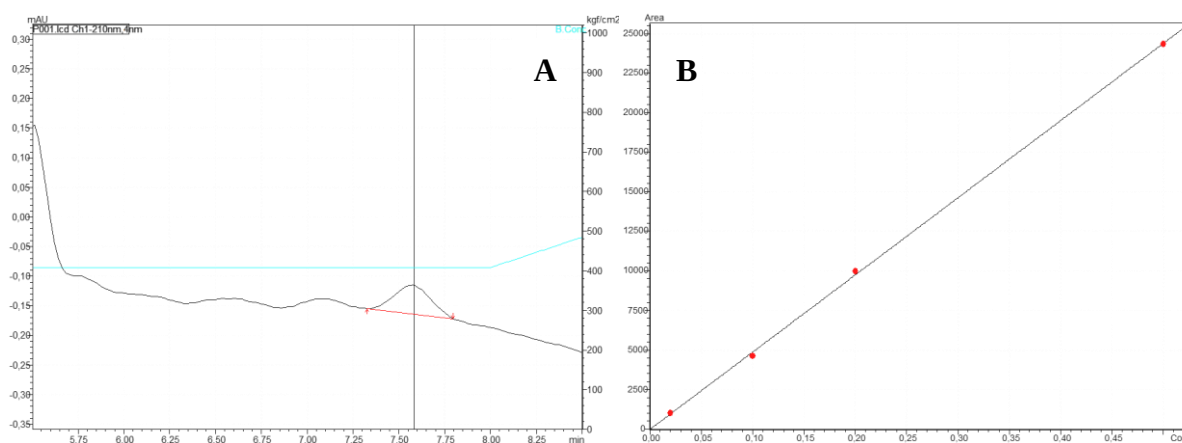


Fig. 1. (A) Cromatograma obtido pelo método descrito, com injeção de 10 µL de solução padrão de 0,020 mg L⁻¹ e (B) curva analítica de 0,02 a 0,50 mg L⁻¹ de sulfentrazone.

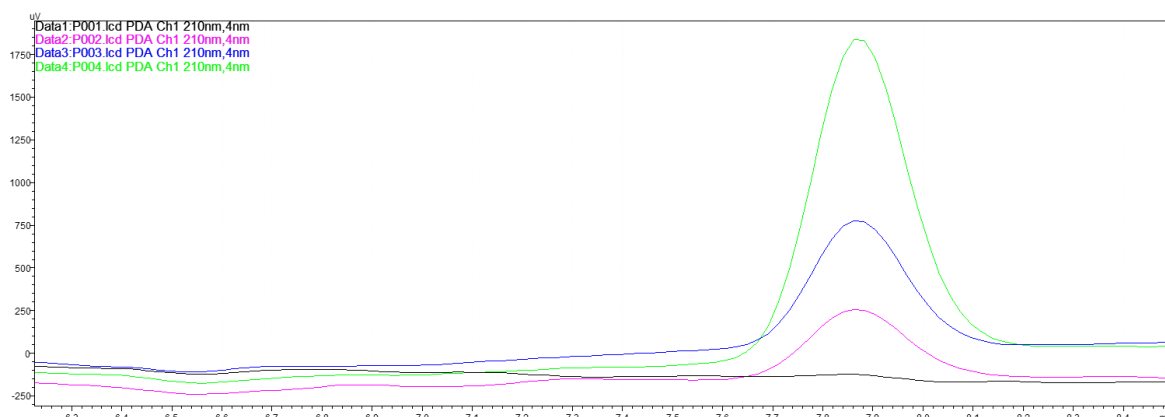


Fig. 2. Cromatogramas, registrados em 210 nm, para os padrões de calibração 0,02 (P001), 0,10 (P002), 0,20 (P003) e 0,50 mg L⁻¹ (P004) de sulfentrazone.

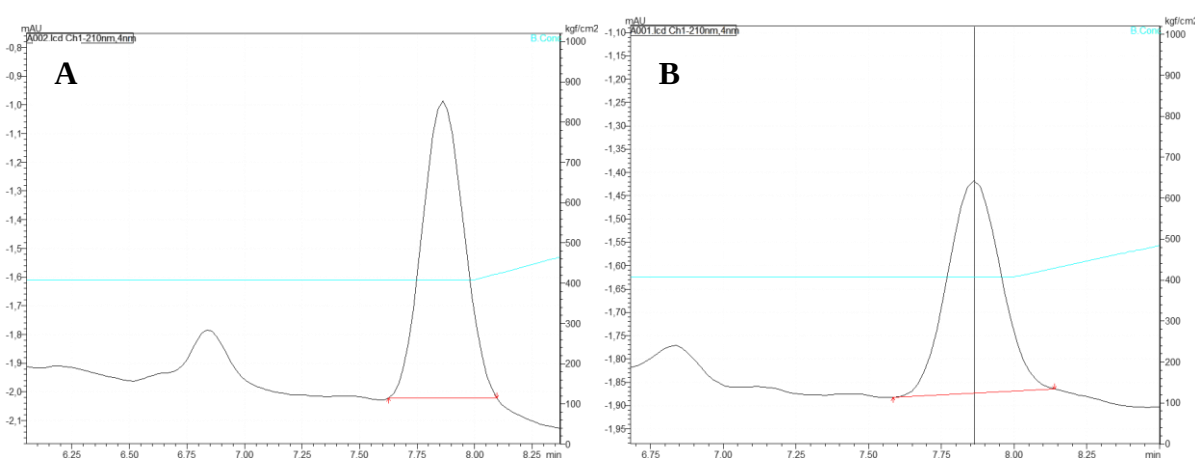


Fig. 3. (A) Cromatogramas obtidos nos extratos de solo fortificado com solução de padrão analítico e (B) dopado com formulação comercial.

Tabela 1. Dados e recuperação de sulfentrazone (Sulf) em amostras de solos dopados com formulação comercial (Boral 500® SC) e fortificada com padrão analítico

Identificação	Tempo de retenção (min)	Recuperação (%)	Concentração (mg kg ⁻¹)
Solo fortificado (0,30 mg kg ⁻¹ de Sulf)	7,8	100	0,299
Solo fortificado (0,30 mg kg ⁻¹ de Sulf)	7,8	89	0,267
Solo dopado (0,29 mg kg ⁻¹ de Sulf)	7,8	110	0,320
Solo dopado (0,29 mg kg ⁻¹ de Sulf)	7,8	101	0,292
Branco do método (mg kg ⁻¹)	-	-0,005 a 0,012	
Limite de detecção (mg kg ⁻¹)	-	0,014	
Limite de quantificação (mg kg ⁻¹)	-	0,021	

3.2. Avaliação das concentrações residuais de sulfentrazone no solo após cultivo de feijão-de-porco com e sem inoculante

A simbiose entre feijão-de-porco e *Bradyrhizobium* sp. atuou de modo significativo sobre os resíduos de sulfentrazone no solo. A concentração foi reduzida com a inoculação da planta com *Bradyrhizobium* sp. (Fig. 4A). Na dose de 400 g ha⁻¹ (0,14 mg kg⁻¹) a redução foi de 30,7 %, em média, quando comparado com a dose não inoculada (Fig. 4A). O percentual

residual no solo, na dose aplicada de 400 g ha⁻¹, foi 57% quando realizada a inoculação da planta e 71% sem o inoculado (Fig. 5), evidenciando o efeito simbiótico sobre a degradação do sulfentrazone.

A inoculação associada ao feijão-de-porco reduziu significativamente (23,3%, em média) a concentração de sulfentrazone do solo, na dose de 800 g ha⁻¹ (0,29 mg kg⁻¹), (Fig. 4A). Conforme apresentado na Fig. 4B, a concentração de sulfentrazone no solo decresceu de modo linear à medida que aumentaram as doses, independente da inoculação. O percentual residual de sulfentrazone no solo, na dose (800 g ha⁻¹) foi de 25%, quando associado ao *Bradyrhizobium* sp., e de 45%, no solo sem inoculação (Fig.5). A dose 1200 g ha⁻¹ apresentou concentração residual de 50% após 80 dias, independente da inoculação, indicando um tempo de meia-vida de igual período (Fig.5).

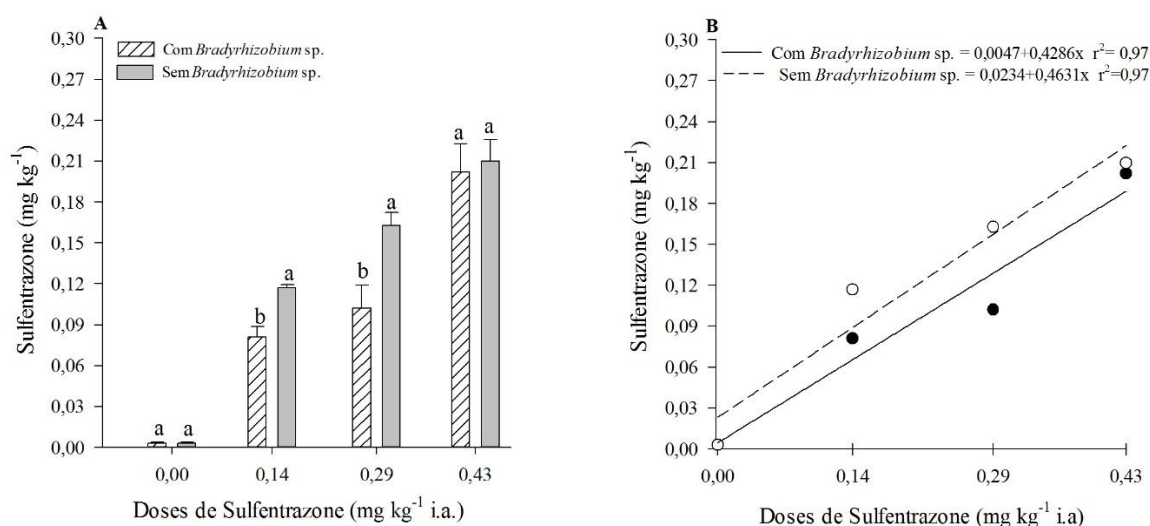


Fig. 4. Concentração de sulfentrazone no solo após fitorremediação com *Canavalia ensiformis*, associada ou não a *Bradyrhizobium* sp. (A), cultivada em solo contaminado com diferentes doses de herbicida (B). Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$). Concentrações de 0,00; 0,14; 0,29 e 0,43 mg kg⁻¹ i.a. equivalem, respectivamente a 0; 400; 800 e 1200 g ha⁻¹ i.a.

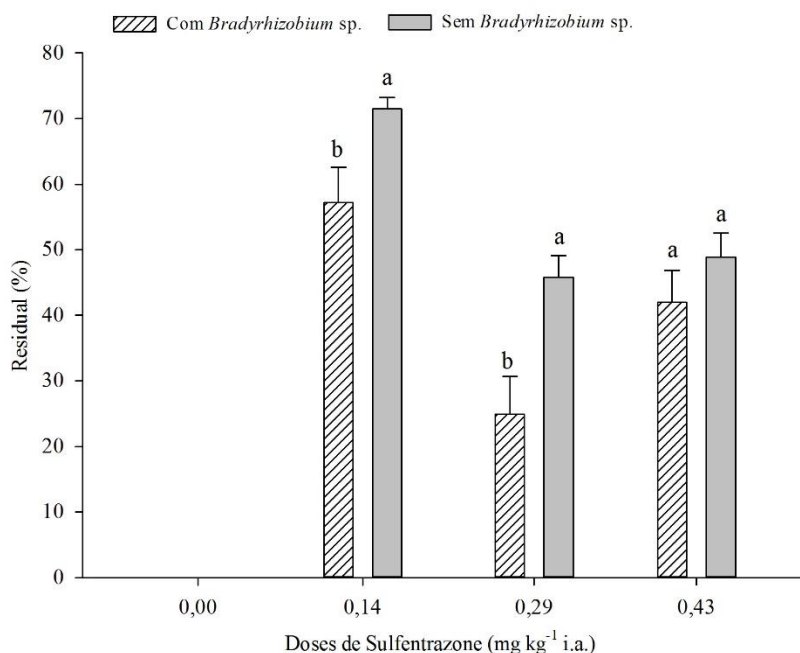


Fig. 5. Percentual residual de sulfentrazone no solo, em relação às doses adicionadas, após fitorremediação com *Canavalia ensiformis*, associada ou não a *Bradyrhizobium* sp. Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$). Concentrações de 0,00; 0,14; 0,29 e 0,43 mg kg⁻¹ i.a. equivalem, respectivamente a 0; 400; 800 e 1200 g ha⁻¹ i.a.

3.3. Atividade microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de *Canavalia ensiformis*

A inoculação do feijão-de-porco com *Bradyrhizobium* sp. interferiu de modo significativo na frequência respiratória (C-CO₂). Não foi possível estabelecer uma regressão entre frequência respiratória e dose, ao longo do tempo, mas houve ajuste de modelo ao C-CO₂ total evoluído. Consequentemente, realizou-se o teste de média Tukey para comparação do fator inoculação. A testemunha (0 g ha⁻¹) apresentou uma oscilação na frequência respiratória não havendo diferenças significativas na inoculação ($p > 0,05$) (Fig. 6A). Na dose 400 g ha⁻¹ de sulfentrazone no solo, a inoculação promoveu um acréscimo médio de 8,59% na frequência respiratória ao longo dos 40 dias de incubação. Maiores taxas respiratórias significativas foram observadas no primeiro e no vigésimo dia de incubação (Fig. 6B).

Solo inoculado e tratado com dose de 800 g ha⁻¹ de sulfentrazone apresentou um incremento médio de 5,17% na taxa respiratória frente ao o solo não inoculado. Os maiores valores foram encontrados aos 5, 10, 20 e 25 dias após incubação do solo (Fig. 6C). Para a dose 1200 g ha⁻¹ a inoculação promoveu um aumento médio de 20,87% na frequência respiratória ao longo dos 40 dias de incubação. No dia primeiro e décimo quinto dia de incubação a inoculação elevou a respiração microbiana significativamente (Fig. 6D).

Para a dose de 1200 g ha⁻¹, o C-CO₂ total evoluído diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre os tratamentos com e sem inoculante (Fig. 7B). Os resultados de C-CO₂ total evoluído, na presença do *Bradyrhizobium* sp., apresentaram uma correlação linear com a dose de sulfentrazone no solo (Fig. 7A).

O carbono da biomassa (CBM) obteve significância apenas para variável inoculação sendo os dados submetidos ao teste de média Tukey. O incremento médio no CBM dos solos inoculados com *Bradyrhizobium* sp. foi 65% comparado com os solos não inoculados. A inoculação promoveu maior incremento para testemunha e para as plantas cultivadas no solo com a dose de 400 g ha⁻¹ (Fig. 8A). O qCO₂ do solo não foi significativo para inoculação e dose ($p > 0,05$) (Fig. 8B).

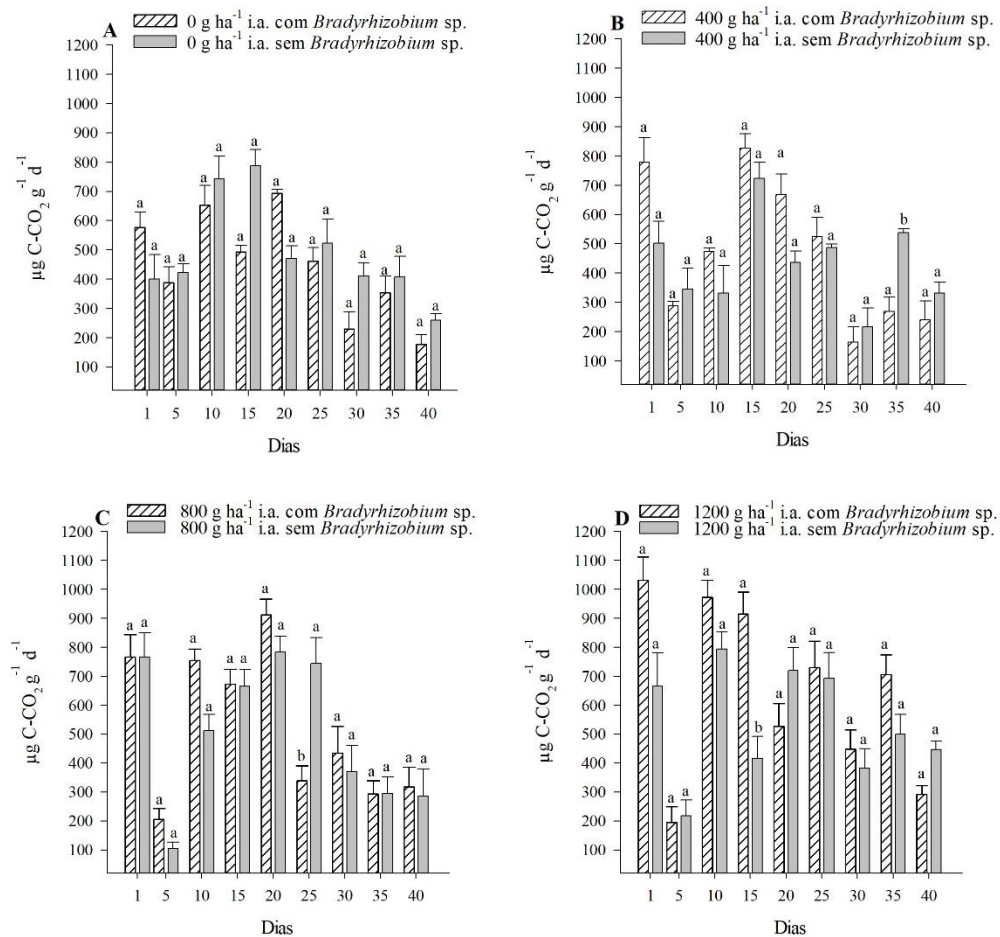


Fig. 6. Frequência respiratória do solo sob a dose de 0 g ha⁻¹ (A), 400 g ha⁻¹ (B), 800 g ha⁻¹ (C) e 1200 g ha⁻¹ (D) de sulfentrazone, cultivado com *Canavalia ensiformis*, associado ou não a *Bradyrhizobium* sp. Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, no mesmo dia, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

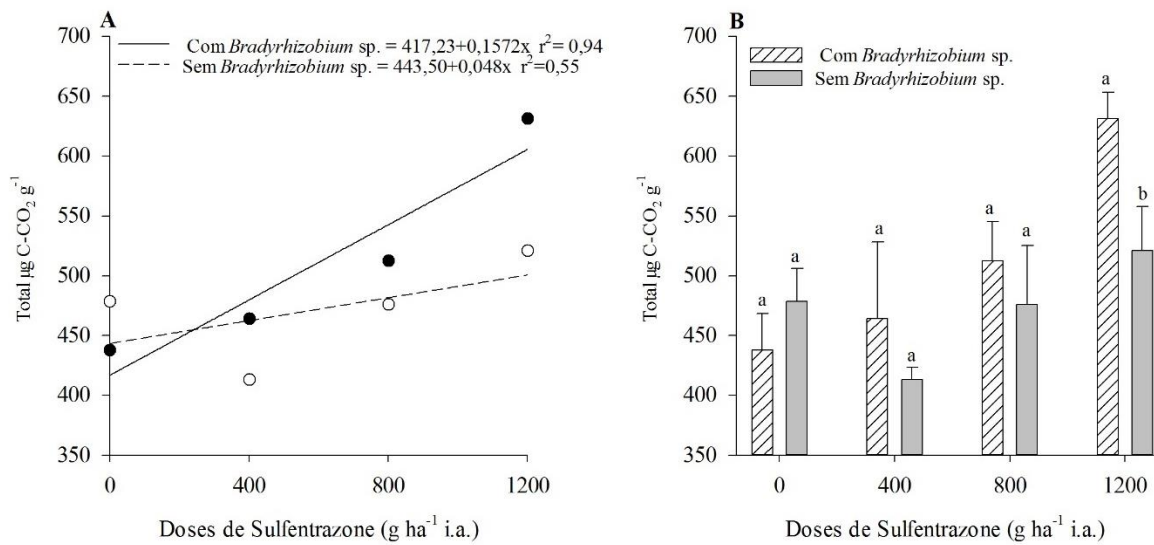


Fig. 7. C-CO₂ total evoluído do solo cultivado com *Canavalia ensiformis*, associado ou não a *Bradyrhizobium* sp., em função das doses de sulfentrazone. Ajuste de modelo em função das doses (A) e comparação entre as médias dentro de cada dose (B). Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

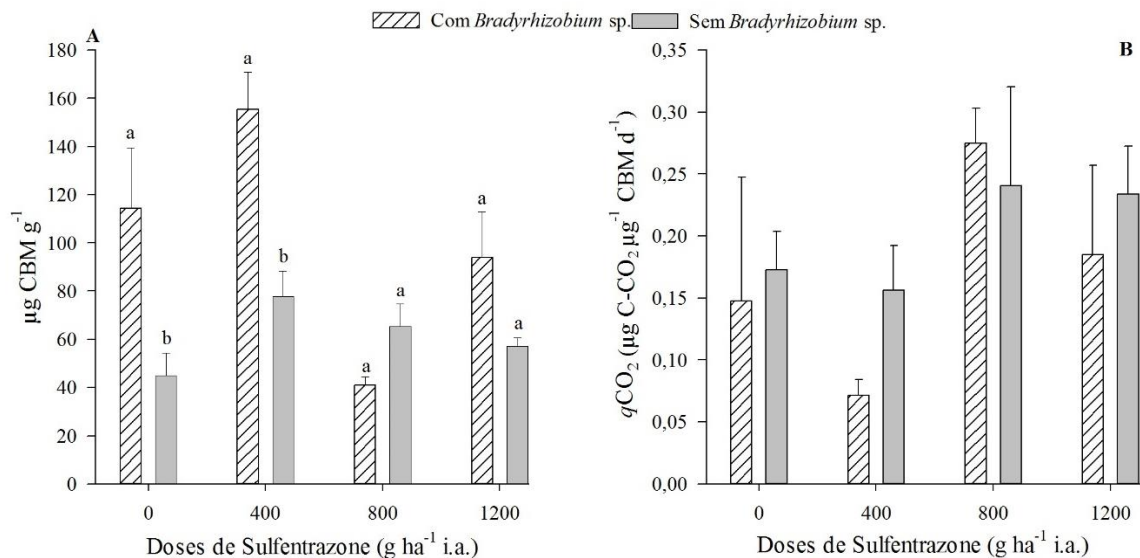


Fig. 8. Carbono da biomassa microbiana (A) e Quociente metabólico (B) do solo contaminado com sulfentrazone, cultivado com *Canavalia ensiformis*, associado ou não a *Bradyrhizobium* sp. Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

O número de nódulos total foi maior quando realizada a inoculação com *Bradyrhizobium* sp., não variando de modo significativo frente as diferentes doses ($p > 0,05$). O incremento médio foi de 65,4% para as plantas inoculadas, com resultado significativo apenas para inoculação na dose de 1200 g ha^{-1} (Fig. 9A). A massa seca dos nódulos não foi significativa para inoculação ($p > 0,05$) (Fig. 9B), apesar da tendência de maiores valores nas plantas inoculadas, independentemente das doses de sulfentrazone.

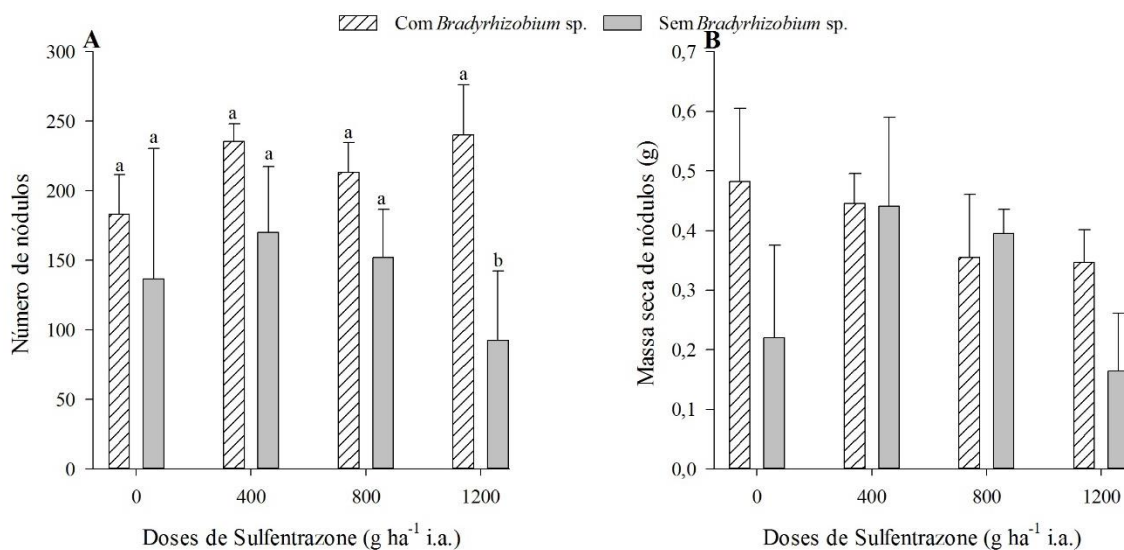


Fig. 9. Número de nódulos total (A) e Massa seca de nódulos (B) de *Canavalia ensiformis*, associado ou não a *Bradyrhizobium* sp., cultivada em solo contaminado com diferentes doses de sulfentrazone. Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

3.4. Bioensaio

As variáveis analisadas nas plantas de milho (*Pennisetum glaucum*) seguiram uma tendência quadrática à medida que aumentou a dose, independente da inoculação (Fig. 10). Não houve diferenças significativas para a variável inoculação ($p > 0,05$). À medida que aumentou a dose de sulfentrazone no solo, a altura (Fig. 10A) e a massa seca (Fig. 10B) das plantas de milho diminuíram, consequentemente, a fitotoxidade (Fig. 10C) na parte aérea aumentaram com o aumento da dose. Todavia há uma tendência de melhores resultados quando a fitorremediadora foi associada ao *Bradyrhizobium* sp.

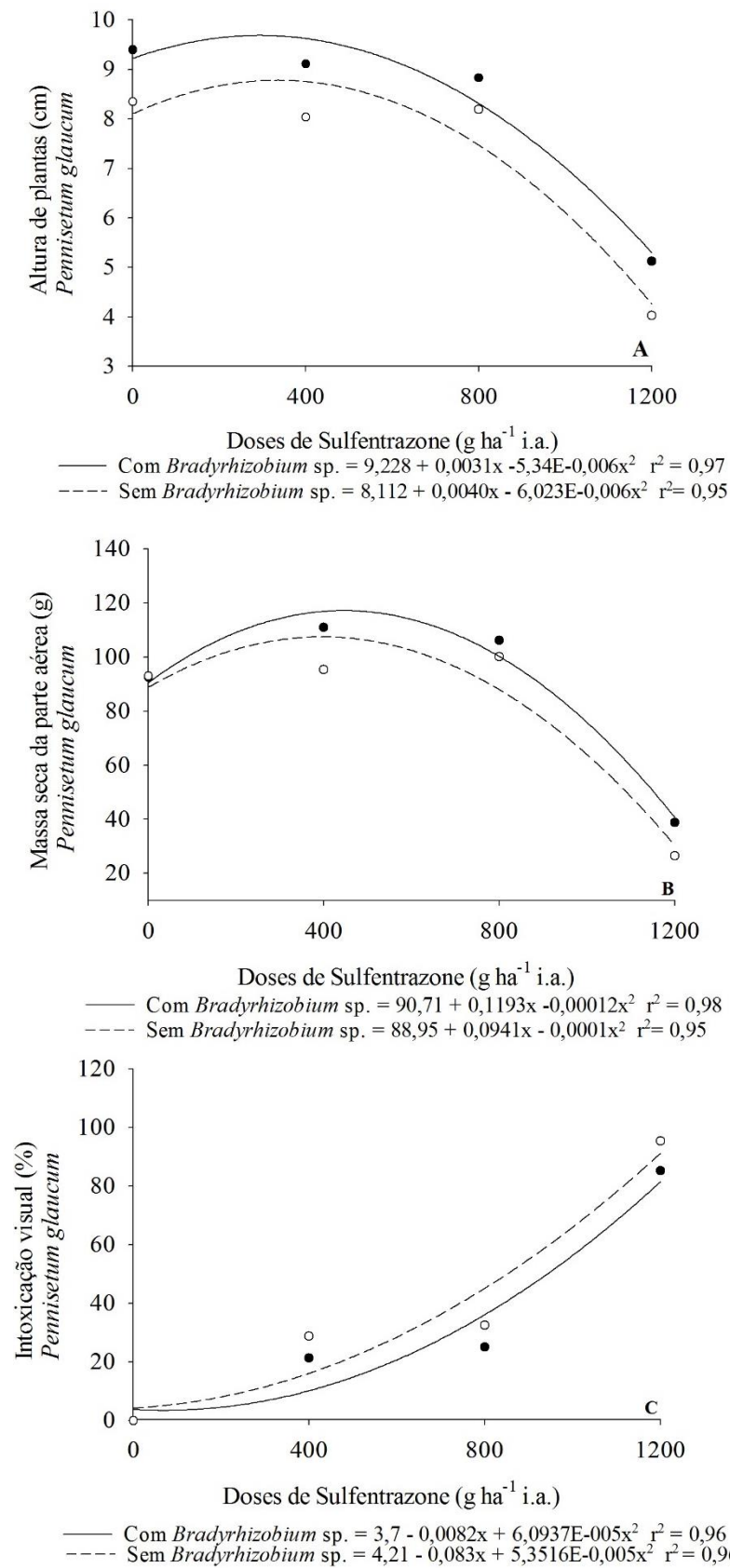


Fig. 10. Altura de planta (A), massa seca da parte aérea (B) e intoxicação visual (C) de *Pennisetum glaucum* cultivado em solo fitorremediado com *Canavalia ensiformis*, associado ou não a *Bradyrhizobium* sp.

3.5. Produção de fitomassa de *Canavalia ensiformis*

A altura de plantas diminuiu linearmente conforme aumentou a dose de sulfentrazone no solo, tanto com e sem inoculação (Fig. 11A). As plantas (com e sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp.) apresentaram maiores alturas para a testemunha (0 g ha⁻¹), decrescendo até a dose de 1200 g ha⁻¹ de sulfentrazone (Fig. 11B). Pelos valores das estimativas, temos que a cada aumento da dose, ocorre um decréscimo na altura de plantas de feijão-de-porco de 0,0167 e 0,0191, respectivamente para solo com e sem inoculação, observando maior decréscimo para plantas não inoculadas. (Fig. 11A).

A produção aérea de massa fresca e seca não foi influenciada pela inoculação ($p > 0,05$), no entanto, decréscimo médio de 19,1 e 17,5%, respectivamente na massa fresca e seca da parte aérea foram observados para a dose de 1200 g ha⁻¹ em relação as plantas inoculadas (Tabela 2). A massa fresca de raiz diminuiu linearmente com o aumento das doses de sulfentrazone independente da inoculação (Fig. 12A). Quando inoculadas, as raízes apresentaram maior massa fresca nas doses 400, 800 e 1200 g ha⁻¹ de sulfentrazone (Fig. 12B). A taxa de perda de massa fresca da raiz com o aumento da dose é maior na ausência da inoculação, com decréscimo de 0,0114 e 0,0153, respectivamente para solo com e sem inoculação (Fig. 12A).

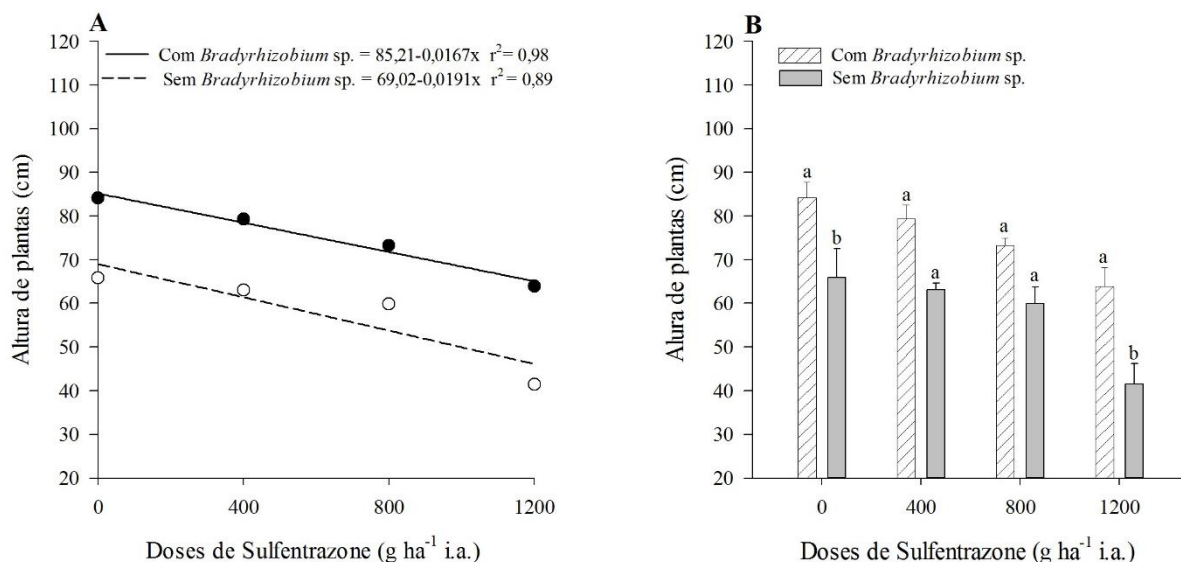


Fig. 11. Altura de plantas de *Canavalia ensiformis*, com e sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp., cultivadas em solo contaminado com diferentes doses de sulfentrazone. Ajuste de modelo em função das doses (A) e comparação entre as médias dentro de cada dose (B). Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

Tabela 2. Massa fresca e seca da parte aérea de *Canavalia ensiformis*, com e sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp., cultivadas em solo contaminado com diferentes doses de sulfentrazone

Doses de Sulfentrazone (g ha ⁻¹)	Massa fresca da parte aérea (g)		
	Com <i>Bradyrhizobium</i> sp	Sem <i>Bradyrhizobium</i> sp	Variação Percentual (%)
0	116,65	126,00	-7,4
400	138,75	124,32	11,5
800	132,00	112,00	17,8
1200	124,65	104,65	19,1
*CV (%)	12,19		

Doses de Sulfentrazone (g/ha ⁻¹)	Massa seca da parte aérea (g)		
	Com <i>Bradyrhizobium</i> sp	Sem <i>Bradyrhizobium</i> sp	Variação Percentual (%)
0	34,74	32,44	7,0
400	35,03	33,32	5,1
800	36,89	31,54	16,8
1200	36,15	30,76	17,5
CV (%)	21,48		

* Coeficiente de variação

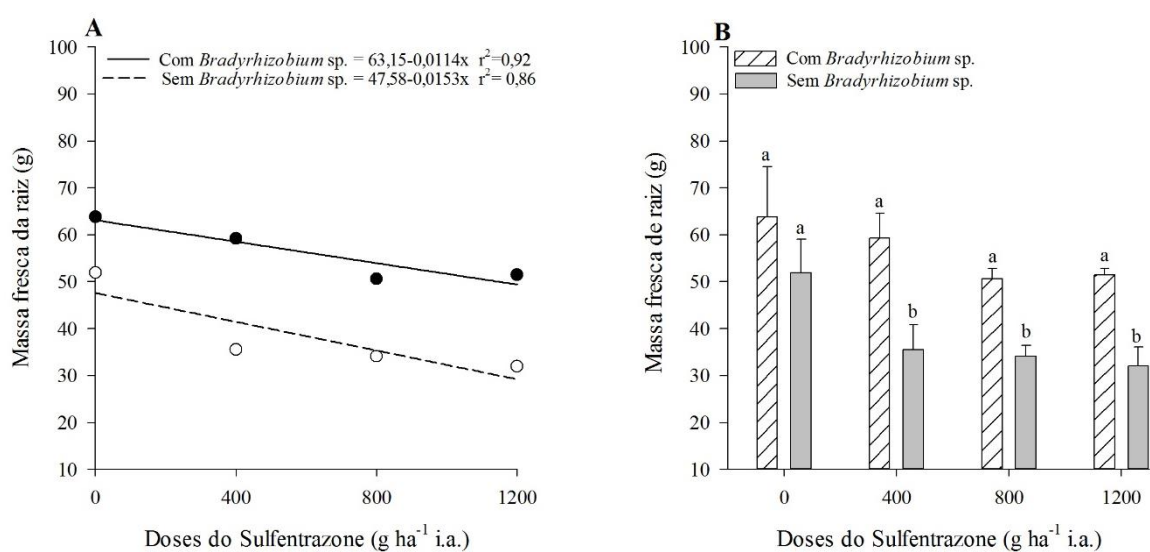


Fig. 12. Massa fresca de raiz de *Canavalia ensiformis*, com e sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp., cultivadas em solo contaminado com diferentes doses de sulfentrazone. Ajuste de modelo em função das doses (A) e comparação entre as médias dentro de cada dose (B). Valores médios (± 1 desvio padrão) seguidos pela mesma letra, na mesma dose, não diferiram significativamente de acordo com o teste t ($p > 0,05$).

4. Discussão

4.1. Avaliação das concentrações residuais de sulfentrazone no solo após cultivo de feijão-de-porco com e sem inoculante

A simbiose estabelecida entre *Bradyrhizobium* sp. e feijão-de-porco foi mais eficiente na degradação do herbicida no solo do que em solos cultivados sem inoculação, uma vez que estes últimos apresentaram maiores concentrações residuais de sulfentrazone após o cultivo (Fig. 4A). Esse resultado favorável decorrente da simbiose estabelecida entre a fitorremediadora (feijão-de-porco) e o microrganismo *Bradyrhizobium* sp., mostram eficiência na biorremediação do solo. As bactérias que povoam a rizosfera promovem o crescimento e desenvolvimento das plantas desencadeando respostas imunes, modulando o equilíbrio hormonal, protegendo contra patógenos e mobilizando nutrientes (Glick, 2012; Venturi e Keel, 2016). Tais organismos podem atuar como biofertilizantes, fitoestimuladores, rizoremediadores, degradando contaminantes orgânicos e biopesticidas e ainda controlando doenças através da síntese de antibióticos e metabólitos antifúngicos (Somers et al., 2004). Todavia, os resultados da pesquisa não permitem afirmar quais mecanismos foram desenvolvidos pela simbiose de feijão-de-porco e *Bradyrhizobium* sp. Esse efeito pode ter sido decorrente da ação rizodegradadora do microrganismo sobre o contaminante, ou mesmo, o efeito benéfico do microrganismo para a planta, desencadeando melhor eficiência na degradação do sulfentrazone, uma vez que essa leguminosa foi considerada eficiente fitorremediadora de sulfentrazone (Ferraço et al., 2017; Madalão et al., 2017b). Martinez et al. (2010) sugerem que a principal rota de degradação do sulfentrazone no solo é via microbiana, onde os microrganismos *Nocardia brasiliensis* e *Penicillium* sp. foram identificados como potenciais degradadores do herbicida no solo.

Outro fator importante é o estágio em que as plantas foram manejadas/colhidas. O experimento foi conduzido até o pleno florescimento. Esta fase é caracterizada pela alta atividade metabólica das plantas e na qual há maior liberação de exsudados radiculares, contribuindo para maior número de microrganismos associados à rizosfera (Aulakh et al., 2001). Este fato pode ter tornado mais eficiente a degradação de sulfentrazone. De forma semelhante, o cultivo de *Stizolobium aterrimum* até seu completo florescimento favoreceu o acúmulo de exsudatos na região das raízes, permitindo crescimento e desenvolvimento de maior número de grupos de microrganismos (Santos et al., 2007)

Com o aumento da dose de sulfentrazone ocorreu um aumento da concentração encontrada no solo (Fig. 4B). Porém, observa-se que para as doses de 400 e 800 g ha⁻¹, quando as plantas foram inoculadas, houve diminuição da concentração e percentual residual

do herbicida no solo (Fig. 4A). Isso indica que os microrganismos adicionados conseguiram estabelecer melhor relação com a planta e atuar na remediação do solo, enquanto para a dose mais elevada do herbicida comprometeu o desenvolvimento do feijão-de-porco (menores altura) e apresentou tendência de desequilíbrio microbiológico (alta respiração, baixa CBM e maiores valores de qCO_2) especialmente sem o inoculante. Doses elevadas de herbicida podem provocar danos para planta e comunidades microbianas do solo (Faria et al., 2018; Oliveira Júnior, 2011) afetando os resultados da biorremediação. De acordo com os resultados obtidos por Melo et al. (2019) a inoculação foi importante para *C. ensiformis*, uma vez que os solos cultivados sem a presença de microrganismos apresentaram pequena redução na concentração de sulfentrazone durante os períodos de avaliação.

A dose 1200 g ha⁻¹ apresentou concentração residual de 50% após 80 dias, independente da inoculação (Fig. 5) tal valor se aproxima do tempo de meia-vida estimado por Brum et al. (2013) mas inferiores aos 150 dias estimados por Martinez et al. (2008). Em solos cultivados com *C. ensiformis* na presença de inoculação, o tempo de meia-vida do herbicida foi observado perto de 47 dias, enquanto para *C. ensiformis*, na ausência de consórcio bacteriano, foi alcançado somente após 76 dias.

4.2. Atividade microbiana da rizosfera e nodulação das raízes de *Canavalia ensiformis*

O cultivo do feijão-de-porco em simbiose com *Bradyrhizobium* sp. proporcionou maior desprendimento de CO₂ e, conseqüentemente, maior respiração microbiana do solo do que sem o inoculante, nas diferentes doses de sulfentrazone (Fig. 7). O aumento proporcionado na frequência respiratória indica uma intensa atividade dos microrganismos e pode ser um indicativo da decomposição rápida de resíduos orgânicos (Santos et al., 2009). A degradação microbiana do sulfentrazone pode ser através de reações enzimáticas catabólicas, onde microrganismos do solo podem utilizar o herbicida como fonte de energia, ou através do metabolismo, que requer outra fonte de carbono e energia para sustentar o crescimento microbiano (Brum et al., 2013; Melo et al., 2017a). Logo, o cultivo de espécie fitorremediadoras em simbiose com microrganismos pode favorecer o crescimento da microbiota do solo e a liberação de C-CO₂ durante o processo de remediação.

Apesar do solo ter sido submetido ao processo de autoclavagem, a frequência respiratória sem inoculação apresentou-se alta (Fig. 7). Esse fato pode estar relacionado à morte de microrganismos pelo processo de autoclavagem, o qual fornece a degradação dos compostos orgânicos usadas como fonte de energia para os microrganismos que cresceram ao longo do período de cultivo (Souza et al., 2017). O estímulo à atividade microbiana,

promovida pela liberação de substâncias radiculares, favorecem a multiplicação de microrganismos que podem atuar degradando o herbicida no solo, caracterizando, em algumas plantas, como aptidão rizosférica na remediação desses compostos (Madalão et al., 2016). A presença do sulfentrazone no solo, e particularmente o cultivo de *Canavalia ensiformis* e *Helianthus annuus*, podem apoiar o crescimento microbiano e induzir a liberação de C-CO₂ crescente ao longo do tempo de biorremediação (Melo et al., 2017b). Estudos mostraram que diferentes microrganismos inoculados em diferentes solos promoveram a degradação do diuron, liberando CO₂ para a atmosfera (Villaverde et al., 2017).

A utilização do feijão-de-porco pode ter favorecido a atividade microbiana, uma vez que a planta apresenta alta capacidade em estimular os microrganismos no ambiente rizosférico. Madalão et al. (2016) observaram maior respiração microbiana em solo rizosférico cultivado com *C. ensiformis*. Evidências reforçam que *C. ensiformis* é eficaz em estimular a microbiota e muito promissora para a remediação de solos contaminados com sulfentrazone (Melo et al., 2017b).

O efeito positivo da inoculação do feijão-de-porco com o simbiótico *Bradyrhizobium* sp. pode ser verificado pela variação na biomassa microbiana do solo (Fig. 8A). O alto CBM proporcionado pela inoculação está relacionado a maior atividade microbiológica do solo quando comparado com o solo não inoculado, uma vez que, a microbiota do solo é sensível as modificações do ambiente. Em outro estudo, *C. ensiformis* e um consórcio bacteriano destacaram-se em relação à biomassa e ao quociente microbiano sobre a fitorremediação de solo contaminado com sulfentrazone ao longo do tempo (Melo et al., 2017b).

A biomassa microbiana é considerada a fração viva da matéria orgânica do solo e um expressivo reservatório de nutrientes nos solos, atuando ativamente no processo de decomposição/mineralização de resíduos orgânicos (Kaschuk et al., 2010). Assim, a biomassa microbiana ativa, associada ao feijão-de-porco, é de grande interesse, pois pode intensificar a descontaminação do solo com sulfentrazone no processo de biorremediação.

A taxa de respiração por unidade de biomassa microbiana, conhecida como quociente metabólico ($q\text{CO}_2$), foi aceito como um indicador sensível da resposta dos estresses ambientais sob a comunidade microbiana do solo (Wardle e Ghani, 1995). Altos valores de $q\text{CO}_2$ são encontrados em locais submetidos a condições adversas, ou seja, em solos onde a biomassa microbiana oxida mais carbono para sua manutenção (Lacerda et al., 2013).

Os baixos valores não significativos para $q\text{CO}_2$, independente da inoculação com *Bradyrhizobium* sp., para 0 e 400 g ha⁻¹ (Fig. 8B), podem estar relacionados ao efeito não limitante do herbicida sobre a comunidade microbiana e possivelmente reflete um ambiente

mais estável na rizosfera do feijão-de-porco. Valores próximos a $0,18 \mu\text{g} \cdot \mu\text{g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ de $q\text{CO}_2$ foram observados durante a biorremediação em solos cultivados com *C. ensiformis* em consórcio bacteriano por 85 dias (Melo et al., 2017b). De forma semelhante, a aplicação do picloram não afetou o carbono da biomassa microbiana e o $q\text{CO}_2$ nos solos rizosféricos de *P. maximum* e *U. brizantha* indicando que a rizosfera dessas espécies pode contribuir para a descontaminação dos solos tratados com picloram (Souza et al., 2017).

Apesar dos resultados não significativos para $q\text{CO}_2$, observam-se maiores valores para as doses crescentes de sulfentrazone e, não obstante, a taxa respiratória também aumentou conforme elevou a dose (Fig. 7 e 8B). A taxa respiratória dos microrganismos pode aumentar ou diminuir dependendo dos fatores que contribuem para tais mudanças, incluindo, a degradação de compostos usados como fonte de nutrientes, ou intoxicação por xenobióticos, que levam à menor eficiência de utilização do carbono, promovendo, em ambos os casos, aumento na emissão de CO_2 (Santos et al., 2007). Esses fatos indicam que pode estar ocorrendo maior gasto de energia para a manutenção da comunidade microbiana, ou seja, devido a um estresse, possivelmente gerado pela alta dose do herbicida no solo (1200 g ha^{-1} do sulfentrazone), utilizada nesse experimento. Nesse caso, os microrganismos oxidam carbono de suas células para sua manutenção e sobrevivência no solo (Lacerda et al., 2013). De acordo com Souto et al. (2013), quanto maior a concentração da mistura de imazetapir + imazapique houve a tendência de maior produção de C-CO_2 , observado em solo rizosféricos de 6 espécies vegetais.

Os resultados revelaram que feijão-de-porco inoculado com *Bradyrhizobium* sp. atua de modo satisfatório sobre os aspectos biológicos do solo, principalmente para a dose de 400 g ha^{-1} (Fig. 7, 8A e B). No contexto da biorremediação, esta descoberta é importante para o processo de descontaminação do solo com sulfentrazone, uma vez que o cultivo de plantas fitorremediadoras em associação com microrganismos estimula a microbiota e melhorar a eficiência na descontaminação do solo. A comunidade microbiana em equilíbrio se torna mais eficiente em utilizar os recursos disponíveis e, conseqüentemente, maior quantidade de carbono pode ser incorporada aos tecidos microbianos.

A simbiose estabelecida entre *Bradyrhizobium* sp. e feijão-de-porco foi observada através da nodulação das raízes das plantas (Fig. 9A). O número de nódulos total foi afetado pela inoculação e contaminação com sulfentrazone do que a massa seca dos nódulos (Fig. 9B), indicando um efeito direto na iniciação nodular e não no desenvolvimento do nódulo. Isso indica que as bactérias estavam viáveis e foram capazes de realizar a nodulação das raízes e conseqüentemente fornecer produtos nitrogenados como aminoácidos e ureídos e em

troca, a planta recebe fotossintatos à bactéria (Mus et al., 2016). As bactérias fixadoras de nitrogênio têm potencial de modificar diretamente a microflora da rizosfera, melhorando as condições ambientais e a disponibilidade de nutrientes através do nitrogênio orgânico fixado, facilitando o crescimento e a atividade de outros biodegradadores do solo (Teng et al., 2015). A presença desse tipo de bactéria pode contribuir para o crescimento da planta em solos contaminados (Mandal e Bhattacharyya, 2012) e, conseqüentemente, resultar em uma maior taxa de remoção de poluentes (Glick, 2010).

4.3. Bioensaio

Os ganhos proporcionados pela inoculação na redução do sulfentrazone do solo não foram visualmente percebidos através da intoxicação do milho (*Pennisetum glaucum*). Os resultados mostraram que a massa seca e altura diminuíram e, proporcionalmente à dose de sulfentrazone aplicada, a fitotoxicidade aumentou, independente da simbiose com *Bradyrhizobium* sp (Fig. 10A, B e C). Os resultados refletem a sensibilidade do milho na detecção do herbicida no solo, principalmente para o residual de doses muito elevadas, como 1200 g ha⁻¹ utilizado nesse trabalho. Resultados semelhantes foram obtidos por (Ferraço et al., 2017), o qual relatou que a fitotoxicidade do milho aumentou (a massa seca diminuiu) com aumento da dose de sulfentrazone após cultivo com diferentes espécies leguminosas. Em outro estudo, o cultivo misto de *C. ensiformis* e *Heliantus annuus* e *H. annuus* como uma única cultura, independente do solo ter sido inoculado com *Pseudomonas* sp. mostraram reduções na concentração aos 85 dias após o desbaste, mas este período não foi suficiente para permitir o crescimento da planta indicadora sem a ocorrência de toxicidade (Melo et al., 2019). Entretanto, essas constatações não inviabilizam a fitorremediação, pois resultados satisfatórios para a redução do resíduo de sulfentrazone no solo foram alcançados.

A eficiência de fitorremediação, nas doses 400 e 800 g ha⁻¹, assemelhou-se muito nos resultados obtidos e apresentou menores danos às plantas de milho, mesmo sem o inoculante. Pela análise de regressão e pelas tabelas nota-se, entretanto, a tendência de melhores resultados para os tratamentos inoculados. Isso demonstra o efeito sinérgico do inoculante junto as plantas de feijão-de-porco em remediar o solo contaminado com sulfentrazone, possivelmente pelo estímulo da atividade microbiana no solo. Estudos mostraram que plantas de feijão-de-porco podem promover remediação rizosférica, pois os flavonóides e outros compostos liberados pelas raízes podem estimular o crescimento e a atividade de microrganismos degradadores, ou mesmo reagir com o herbicida, imobilizando-o (Leigh et al., 2006, 2002). Assim, cultivo de feijão-de-porco em áreas contaminadas com

sulfentrazone pode reduzir os riscos de impactos ambientais por sua eficiência no processo de remediação do solo.

4.4. Produção de fitomassa de *Canavalia ensiformis*

Comparando-se os tratamentos com e sem inoculante, o maior desenvolvimento significativo em altura, mesmo para a dose de 1200 g ha⁻¹ de sulfentrazone (para o tratamento inoculado) e a maior produção de raiz em todas as doses (plantas com inoculação) (Fig. 11 e 12) provavelmente decorrem da ação dos microrganismos, por meio da produção de substâncias promotoras de crescimento que podem estimular o aumento de raízes secundárias e da superfície radicular, traduzindo-se em maior crescimento da planta (Souza et al., 2015). Os microrganismos podem ajudar no crescimento da planta através da excreção de substâncias promotoras de crescimento vegetal, como fitormônios (ácido indolacético, etileno), aminoácidos e substâncias reguladoras do metabolismo (Thuler et al., 2003). Maior matéria seca de raiz foi observada ao longo do tempo em plantas de feijão-de-porco cultivadas por 65 e 85 dias após o desbaste em solo inoculado com *Pseudomonas* spp. do que no solo não inoculado com bactérias (Melo et al., 2018). Esse incremento resulta em melhoria na absorção de água e nutrientes, melhorando a capacidade da planta em produzir e suportar estresses ambientais, ocasionados nesse caso, pelo uso do herbicida sulfentrazone.

As doses mais altas de herbicidas tendem a diminuir a altura e massa seca de raiz, como observado no gráfico de regressão (Fig. 11A e Fig. 12A), indicando os efeitos negativos no desenvolvimento da planta, mesmo em se tratando de uma planta tolerante ao sulfentrazone. Madalão et al. (2013) observaram que a partir de 800 g ha⁻¹ as plantas potencialmente fitorremediadoras como a *Canavalia ensiformis* apresentaram desenvolvimento decrescente na altura, registrando-se, na dose de 1.600 g ha⁻¹, cerca de 58% de redução no porte das plantas em relação àquelas que cresceram em solo livre da presença do sulfentrazone.

O solo utilizado nesse estudo foi submetido ao processo de autoclavagem, o que pode ter alterado algumas características físicas e químicas do solo. Apesar de não ter realizado análises químicas e físicas do solo após processo de esterilização, tem sido relatado que os métodos de esterilização frequentemente utilizados causam algum efeito secundário no solo e alteram suas propriedades físicas e químicas (Fuentes et al., 2017; Razavi Darbar e Lakzian, 2007; Safari Sinigani e Hosseinpour, 2010; Wang et al., 2011; Zamani et al., 2015). A autoclavagem diminuiu significativamente o pH em solos contaminados e não contaminados (0,27 e 0,12 unidades, respectivamente) e, em média, a condutividade elétrica foi 30% maior

nos solos autoclavados (Zamani et al., 2015). Tais mudanças podem influenciar no processo de remoção do contaminante do solo, como observado por Fuentes et al. (2017), onde diferenças na remoção de pesticidas em solos estéreis e não estéreis foi afetada pelo processo de autoclavagem, alterando o crescimento microbiano ao longo do tempo e a degradação de pesticidas.

Um fator que pode ter afetado o crescimento das plantas de feijão-de-porco e, conseqüentemente, a fitotoxidade das plantas de milho, são as características químicas e físicas do solo em estudo. A sorção e mobilidade do sulfentrazone dependem do tipo, pH e manejo do solo (Passos et al., 2013), sendo considerado um ácido fraco com uma constante de dissociação (pK_a) de 6,56, podendo ser encontrado na forma neutra, quando o $pH < 6,56$, ou aniônica, quando o $pH > 6,56$ (Grey et al., 1997). O pH do solo em estudo foi menor que o pK_a do herbicida, a tendência do sulfentrazone é permanecer principalmente na forma neutra e assim a sorção pode ter sido favorecida. Langaro et al. (2019) observaram maior sorção do sulfentrazone em solo com baixo pH (4,7), baixo teor de argila (17%) e baixa matéria orgânica (2,5). Martinez et al. (2010) observaram baixo valor de pH (5,01) em Latossolo vermelho, abaixo do valor de pK_a do sulfentrazone, observando sua forma neutra, na qual a solubilidade foi reduzida aumentando a adsorção.

A inoculação do feijão-de-porco com *Bradyrhizobium* sp. não alterou o desenvolvimento da planta em relação a massa seca e fresca (Tabela 2) afirmando novamente certa resistência natural e eficiência em atuar como planta fitorremediadoras do sulfentrazone. Em outra pesquisa, a alocação de matéria seca na parte aérea de *C. ensiformis* não foi influenciado pela ação do sulfentrazone, aplicado em várias doses (Belo et al., 2011).

A inoculação com microrganismos diazotróficos é uma técnica empregada em vários estudos e mostra-se adequada para uso em espécies de interesse agrícola (Hungria e Mendes, 2015) na aceleração da recuperação de áreas contaminadas (Ferreira et al., 2018; Melo et al., 2017a) e pode trazer benefícios para remediação do sulfentrazone como mostrado nesse trabalho. A praticidade, associada ao fácil fornecimento de inoculante comercial para feijão-de-porco, mostram que esta prática agrônômica de baixo custo pode incrementar a técnica de fitorremediação e alcançar uma recomendação ainda mais adequada e eficiente para despoluição de áreas contaminadas com sulfentrazone. Assim, estratégias como cultivos consecutivos do feijão-de-porco na área contaminada ou coinoculação com simbioses e endofíticos pode ser uma possibilidade para aumentar o potencial da técnica e a eficiência da biorremediação.

5. Conclusões

A simbiose entre feijão-de-porco e *Bradyrhizobium* sp. promoveu significativa redução na concentração residual de sulfentrazone no solo, para as doses de 400 e 800 g ha⁻¹.

A inoculação com diazotrófico simbiótico potencializou a microbiota do solo e consequentemente aumentou a eficiência da biorremediação de solos contaminados com doses de sulfentrazone.

Os indicadores microbiológicos mostraram a tendência de estabilidade da rizosfera, com resultados satisfatórios principalmente para a dose de 400 g ha⁻¹.

Na dose de 1200 g ha⁻¹ do sulfentrazone, o desempenho da fitorremediação por *C. ensiformis* não foi satisfatório. Sugerindo que a presença de altos níveis de resíduos do herbicida no solo alteram e comprometem os mecanismos promotores da remediação.

O feijão-de-porco apresentou boa resistência aos níveis de sulfentrazone no solo, independentemente do inoculante. Danos foram perceptíveis apenas na dose mais alta, sendo esta, muito elevada (2,4 L ha⁻¹) em relação aos níveis alcançados nas recomendações agronômicas (1,6 L ha⁻¹).

Os resultados deste trabalho encorajam a continuidade dos estudos sobre a interação positiva entre microrganismos simbióticos e espécies leguminosas visando à fitorremediação do herbicida sulfentrazone.

Referências

- Ahemad, M., Kibret, M., 2014. Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. J. King Saud Univ. - Sci. 26, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Alam, A.L.D.M., 1974. Recomendaciones sobre unificación de los sistemas de evaluación en ensayos de control de malezas. http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinksandref&4000090andpid=S0100-8358201400040001700001andlng=pt (Acesso 21 de Março de 2018).
- Anderson, T.H., Domsch, K.H., 1993. The metabolic quotient for CO₂ (q_{CO_2}) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Soil Biol. Biochem. 25, 393–395. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(93\)90140-7](https://doi.org/10.1016/0038-0717(93)90140-7)
- Aulakh, M.S., Wassmann, R., Bueno, C., Rennenberg, H., 2001. Impact of root exudates of different cultivars and plant development stages of rice (*Oryza sativa* L.) on methane production in a paddy soil. Plant Soil 230, 77–86. <https://doi.org/10.1023/A:1004817212321>
- Belo, A.F., Pires, F.R., Bonomo, R., Cargnelutti Filho, A., Tenis, L.H.O., 2016. Sulfentrazone phytoremediation under field conditions. Rev. Caatinga 29, 119–126. <https://doi.org/10.1590/1983-21252016v29n114rc>
- Brum, C.S., Franco, A.A., Scorza Júnior, R.P., 2013. Degradação do herbicida sulfentrazone em dois solos de Mato Grosso do Sul. Rev. Bras. Eng. Agrícola e Ambient. 17, 558–564. <https://doi.org/10.1590/s1415-43662013000500014>
- Casaroli, D., Jong van Lier, Q. de, 2008. Critérios para determinação da capacidade de vaso. Rev. Bras. Cienc. do Solo 32, 59–66.
- Curl, E.A., Rodriguez-Kabana, R., 1972. Microbial interactions, in: Research Methods in Weed Science. Southern Weed Science Society, Atlanta, pp. 162–194.
- Dan, H.A., Dan, L.G.M., Barros, A.L.L., Procópio, S.O., Oliveira JR., R.S., Silva, A.G., Lima, M.D.B., Feldkircher, C., 2010. Residual activity of herbicides used in soybean agriculture on grain *Sorghum* crop succession. Planta Daninha 28, 1087–1095. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000500016>
- Dan, H.A., Dan, L.G.M., Barroso, A.L.L., Procópio, S.O., Oliveira JR., R.S., Assis, R.L., Silva, A.G., Feldkircher, C., 2011. Effect of the residual activity of pre-emergent herbicides applied in soybean on pearl millet cultivated in succession. Planta Daninha 29, 437–445. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582011000200022>
- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Solos., 2018. Sistema brasileiro de classificação de solos, 5ª edição. ed, Brasília.
- Faria, A.T., Gonçalves, B.F.D.S., Saraiva, D.T., Souza, M.D.F., Da Silva, A.A., Silva, D.V., 2018. Activity of rhizosphere soil microorganisms of sugarcane cultivars after spraying of herbicides: Diuron, tebuthiuron, ametryn and diuron + hexazinone. Rev. Caatinga 31, 593–601.

- Ferraço, M., Pires, F.R., Belo, A.F., Filho, A.C., Bonomo, R., 2017. Effect of population density of *Canavalia ensiformis* on the phytoremediation of soil contaminated with sulfentrazone. *Rev. Cienc. Agron.* 48, 32–40. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170004>
- Ferreira, D.F., 2011. Sisvar: a computer statistical analysis system. *Ciência e Agrotecnologia* 35, 1039–1042. <https://doi.org/10.1590/s1413-70542011000600001>
- Ferreira, P.A.A., Dahmer, S. de F.B., Backes, T., Silveira, A. de O., Jacques, R.J.S., Zafar, M., Pauletto, E.A., Santos, M.A.O. dos, Silva, K. da, Giachini, A.J., Antonioli, Z.I., 2018. Isolation, characterization and symbiotic efficiency of nitrogen-fixing and heavy metal-tolerant bacteria from a coalmine wasteland. *Rev. Bras. Ciência do Solo* 42, 1–17. <https://doi.org/10.1590/18069657rbc20170171>
- FMC, 2017. Produtos. <https://www.fmcagricula.com.br/produtosdetalhes.aspx?cod=40> (Acesso em 02 de Março de 2018).
- Fuentes, M.S., Raimondo, E.E., Amoroso, M.J., Benimeli, C.S., 2017. Removal of a mixture of pesticides by a *Streptomyces* consortium: Influence of different soil systems. *Chemosphere* 173, 359–367. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.01.044>
- Glick, B.R., 2012. Plant growth-promoting bacteria: mechanisms and applications. *Scientifica* (Cairo). 2012, 1–15.
- Glick, B.R., 2010. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol. Adv.* 28, 367–374. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.001>
- Goulart, M.S., Queiroz, M.E.L.R., Neves, A.A., Queiroz, J.H., 2008. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. *Talanta* 75, 1320–1323. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.01.058>
- Grey, T.L., Walker, R.H., Wehtje, G.R., Hancock, H.G., 1997. Sulfentrazone adsorption and mobility as affected by soil and pH. *Weed Sci.* 45, 733–738. [https://doi.org/https://doi.org/10.1017/S0043174500093425](https://doi.org/10.1017/S0043174500093425)
- Hungria, M., Mendes, I.C., 2015. Nitrogen Fixation with Soybean: The Perfect Symbiosis? *Biol. Nitrogen Fixat.* 2–2, 1009–1024. <https://doi.org/10.1002/9781119053095.ch99>
- IBAMA, 2017a. Relatório de comercialização de agrotóxicos. <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos> (Acesso em 21 de Abril de 2019)
- IBAMA, 2017b. Levantamento sistemático da Produção Agrícola. <https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9201-levantamento-sistematico-da-producao-agricola.html?=&t=o-que-e> (Acesso em 21 de Abril de 2019)
- INMETRO, 2016. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos, DOQ-CGCRE-008. Inst. Nac. Metrol. Qual. e Tecnol. URL http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf (Acesso em 21 de Abril de 2019)

- Imfeld, G., Vuilleumier, S., 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. *Eur. J. Soil Biol.* 49, 22–30. <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2011.11.010>
- Islam, K.R., Weil, R.R., 1998. Microwave irradiation of soil for routine measurement of microbial biomass carbon. *Biol. Fertil. Soils* 27, 408–416. <https://doi.org/10.1007/s003740050451>
- Kang, J.W., 2014. Removing environmental organic pollutants with bioremediation and phytoremediation. *Biotechnol. Lett.* 36, 1129–1139. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1466-9>
- Kaschuk, G., Alberton, O., Hungria, M., 2010. Three decades of soil microbial biomass studies in Brazilian ecosystems: Lessons learned about soil quality and indications for improving sustainability. *Soil Biol. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.08.020>
- Lacerda, K.A.P., Cordeiro, M.A.S., Verginassi, A., Salgado, F.H.M., Paulino, H.B., Carneiro, M.A.C., 2013. Organic carbon, biomass and microbial activity in an Oxisol under different management systems. *Rev. Ciências Agrar. - Amaz. J. Agric. Environ. Sci.* 56, 249–254. <https://doi.org/10.4322/rca.2013.036>
- Langaro, A.C., Barros, J.P.A., Souza, M.F., Silva, E.M.G., Silva, A.A., 2019. Estimation of sulfentrazone leaching in isolated application and in mixture with Glyphosate. *Planta Daninha* 37, 1–9. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582019370100017>
- Leigh, M., Fletcher, J., Fu, X., Schmitz, F., 2002. Root turnover: An important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36, 1579–1583.
- Leigh, M., Prouzová, P., Macková, M., Macek, T., Nagle, D., Fletcher, J., 2006. Polychlorinated biphenyl (PCB)-degrading bacteria associated with trees in a PCB-contaminated site. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2331–2342. <https://doi.org/10.1128/aem.72.4.2331-2342.2006>
- Madalão, J.C., De Freitas, M.A.M., Tavares, C.J., Jakelaitis, A., Silva, A.A., Jesus Passos, A.B.R., Pires, F.R., 2017a. Leaching of sulfentrazone in Brazilian “Cerrado” soils by chromatographic and biological methods. *Rev. Bras. Ciências Agrar.* 12, 446–451. <https://doi.org/10.5039/agraria.v12i4a5476>
- Madalão, J.C., de Souza, M.F., Silva, A.A., Silva, D.V., Jakelaitis, A., Pereira, G.A.M., 2017b. Action of *Canavalia ensiformis* in remediation of contaminated soil with sulfentrazone. *Bragantia* 76, 292–299. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.526>
- Madalão, J.C., Pires, F.R., Filho, A.C., Nascimento, A.F., Chagas, K., Araújo, R.S., Procópio, S. de O., Bonomo, R., 2013. Susceptibilidade de espécies de plantas com potencial de fitorremediação do herbicida sulfentrazone. *Rev. Ceres* 60, 111–121. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2013000100016>
- Madalão, J.C., Silva, A.A. da, Orlando, W. de A., Saraiva, D.T., Melo, C.A.D., D'Antonino, L., 2016. The sulfentrazone interferes with microbial biomass and soil microbial activity. *Rev. Ciências Agrar. - Amaz. J. Agric. Environ. Sci.* 59, 54–59.

<https://doi.org/10.4322/rca.2016>

- Madariaga-Navarrete, A., Rodríguez-Pastrana, B.R., Villagómez-Ibarra, J.R., Acevedo-Sandoval, O.A., Perry, G., Islas-Pelcastre, M., 2017. Bioremediation model for atrazine contaminated agricultural soils using phytoremediation (using *Phaseolus vulgaris* L.) and a locally adapted microbial consortium. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 52, 367–375. <https://doi.org/10.1080/03601234.2017.1292092>
- Mandal, S., Bhattacharyya, R., 2012. Rhizobium–legume symbiosis: a model system for the recovery of metal-contaminated agricultural land, in: *Toxicity of Heavy Metals to Legumes and Bioremediation*. pp. 115–127. <https://doi.org/10.1007/978-3-7091-0730-0>
- Martinez, C.O., Silva, C.M.M.S., Fay, E.F., Abakerli, R.B., Maia, A.H.N., Durrant, L.R., 2010. Microbial degradation of sulfentrazone in a Brazilian rhodic hapludox soil. *Brazilian J. Microbiol.* 41, 209–217. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822010000100030>
- Martinez, C.O., Silva, C.M.M.S., Fay, E.F., Nunes Maia, A. de H., Abakerli, R.B., Durrant, L.R., 2008. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. *Soil Biol. Biochem.* 40, 879–886. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.11.008>
- Melo, C.A.D., De Souza, W.M., Medeiros, W.N., Massenssini, A.M., Ferreira, L.R., Costa, M.D., 2018. *Pseudomonas* spp. as growth promoting agents of sunflower and jack bean in soil with sulfentrazone. *Científica* 46, 17. <https://doi.org/10.15361/1984-5529.2018v46n1p17-29>
- Melo, C.A.D., Massenssini, A.M., Passos, A.B.R.J., Carvalho, F.P., Ferreira, L.R., Silva, A.A., Costa, M.D., 2017a. Isolation and characteristics of sulfentrazone-degrading bacteria. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 52, 115–121. <https://doi.org/10.1080/03601234.2016.1248136>
- Melo, C.A.D., Passos, A.B.R. de J., Madalão, J.C., Silva, D.V., Massenssini, A.M., da Silva, A.A., Costa, M.D., Souza, M. de F., 2019. Bioaugmentation as an associated technology for bioremediation of soil contaminated with sulfentrazone. *Ecol. Indic.* 99, 343–348. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.12.034>
- Melo, C.A.D., Souza, W.M. de, Carvalho, F.P. de, Massenssini, A.M., Silva, A.A. da, Ferreira, L.R., Costa, M.D., 2017b. Microbial activity of soil with sulfentrazone associated with phytoremediator species and inoculation with a bacterial consortium. *Bragantia* 76, 300–310. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.203>
- Monqueiro, P.A., Silva, P.V., Silva Hidrata, A.C., Tablas, D.C., Orzari, I., 2010. Leaching and persistence of sulfentrazone and imazapic. *Planta Daninha* 28, 185–195. <https://doi.org/10.1590/S0100-83582010000100022>
- Mus, F., Crook, M.B., Garcia, K., Costas, A.G., Geddes, B.A., Kouri, E.D., Paramasivan, P., Ryu, M., Oldroyd, G.E.D., Poole, P.S., Udvardi, M.K., Voigt, C.A., Ané, J., Petersa, J.W., 2016. Symbiotic nitrogen fixation and the challenges to its extension to nonlegumes. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3698–3709. <https://doi.org/10.1128/AEM.01055-16> Editor
- Oliveira JR, R.S., 2011. Mecanismos de ação dos herbicidas, in: *Biologia e Manejo de Plantas Daninhas*. Omnipax, Curitiba, p. 348.

- Oliveira, M.A., Pires, F.R., Ferrão, M., Belo, A.F., 2014. The validation of an analytical method for sulfentrazone residue determination in soil using liquid chromatography and a comparison of chromatographic sensitivity to millet as a bioindicator species. *Molecules* 19, 10982–10997. <https://doi.org/10.3390/molecules190810982>
- Passos, A.B.R.J., Freitas, M.A.M., Torres, L.G., Silva, A.A., Queiroz, M.E.L.R., Lima, C.F., 2013. Sorption and desorption of sulfentrazone in Brazilian soils. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 48, 646–650. <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.777313>
- Passos, A.B.R.J., Souza, M.F., Silva, D.V., Saraiva, D.T., da Silva, A.A., Zanuncio, J.C., Gonçalves, B.F.S., 2018. Persistence of picloram in soil with different vegetation managements. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 23986–23991. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2443-y>
- PubChem, D., 2019. National Center for Biotechnology Information. Sulfentrazone, CID=8636 PubChem Database. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/86369> (Acesso em 21 de Abril de 2019)
- Razavi Darbar, S., Lakzian, A., 2007. Evaluation of chemical and biological consequences of soil sterilization methods. *Casp. J. Environ. Sci.* 5, 87–91.
- Safari Sinegani, A.A., Hosseinpour, A., 2010. Evaluation of effect of different sterilization methods on soil biomass phosphorus extracted with NaHCO₃. *Plant, Soil and Environment*. <https://doi.org/10.17221/86/2009-PSE>
- Santos, N.M.C. dos, Costa, V.A.M. da, Araújo, F.V. de, Alencar, B.T.B., Ribeiro, V.H.V., Okumura, F., Simeone, M.L.F., Santos, J.B. dos, 2018. Phytoremediation of Brazilian tree species in soils contaminated by herbicides. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 27561–27568. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2798-0>
- Santos, E.A., Correia, N.M., Silva, J.R.M., Velini, E.D., Passos, A.B.R.J., Durigan, J.C., 2015. Herbicide detection in groundwater in Córrego Rico-SP watershed. *Planta Daninha* 33, 147–155. <https://doi.org/10.1590/s0100-83582015000100017>
- Santos, E.A., Santos, J.B., Ferreira, L.R., Costa, M.D., Silva, A.A., 2007. Phyto-stimulation by *Stizolobium aterrimum* as remediation of soil contaminated with trifloxysulfuron-sodium. *Planta Daninha* 25, 259–265. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S0100-83582007000200004>
- Santos, J.B., Ferreira, E.A., Fialho, C.M.T., Santos, E.A., Galon, L., Conceço, G., Aasiazú, I., Silva, A.A., 2009. Biodegradation of glyphosate in rhizospheric soil cultivated with *Glycine max*, *Canavalia ensiformis* and *Stizolobium aterrimum*. *Planta Daninha* 27, 781–787.
- SANTE/11813/2017, 2017. Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. *Eur. Comm. Dir. Heal. Food Saf.* 11945, 1–42. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33021.77283>. (Acesso em 21 de Abril de 2019).
- Signor, D., Dionísio, J.A., Pimentel, I.C., 2016. Inoculação de sementes de leguminosas, in: *Guia Prático de Biologia do Solo*. pp. 67–71.

- Somers, E., Vanderleyden, J., Srinivasan, M., 2004. Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* 30, 205–240. <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>
- Souto, K.M., Jacques, R.J.S., Avila, L.A. de, Machado, S.L. de O., Zanella, R., Refatti, J.P., 2013. Biodegradation of the herbicides imazethapyr and imazapic in rhizosphere soil of six plant species. *Ciência Rural* 43, 1790–1796. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782013001000010>
- Souza, W.M. de, Guimarães, F.A.R., Souza, M. de F., Silva, D.V., Melo, C.A.D., 2017. Rhizospheric activity of phytoremediation species in soil contaminated with picloram. *Pesqui. Agropecuária Trop.* 47, 127–133. <https://doi.org/10.1590/1983-40632016v4743289>
- Souza, R., Ambrosini, A., Passaglia, L.M.P., 2015. Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genet. Mol. Biol.* 38, 401–419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Stotzky, G., 1965. Methods of Soils Analysis. *Am. Soc. Agron.* 2, 1550–1572.
- Teng, Y., Wang, X., Li, L., Li, Z., Luo, Y., 2015. Rhizobia and their bio-partners as novel drivers for functional remediation in contaminated soils. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 7, 1673–1697. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2018.703.200>
- Thuler, D.S., Floh, E.I.S., Handro, W., Barbosa, H.R., 2003. *Beijerinckia dextrii* releases plant growth regulators and amino acids in synthetic media independent of nitrogenase activity. *J. Appl. Microbiol.* 95, 799–806. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02047.x>
- Truu, J., Truu, M., Espenberg, M., Nölvak, H., Juhanson, J., 2015. Phytoremediation and plant-assisted bioremediation in soil and treatment wetlands: A Review. *open Biotechnonology J.* 9, 85–92. <https://doi.org/10.2174/1874070701509010085>
- Vance, E.D., Brookes, P.C., Jenkinson, D.S., 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19, 1–5. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Venturi, V., Keel, C., 2016. Signaling in the Rhizosphere. *Trends Plant Sci.* 21, 187–198. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.01.005>
- Villaverde, J., Rubio-Bellido, M., Merchán, F., Morillo, E., 2017. Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. *J. Environ. Manage.* 188, 379–386. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2016.12.020>
- Wang, C.Y., Wang, F., Wang, T., Yang, X.L., Bian, Y.R., Kengara, F.O., Li, Z.B., Jiang, X., 2011. Effects of autoclaving and mercuric chloride sterilization on PAHs dissipation in a two-liquid-phase soil slurry. *Pedosphere* 21, 56–64. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(10\)60079-3](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(10)60079-3)
- Wardle, D.A., Ghani, A., 1995. A critique of the microbial metabolic quotient ($q\text{CO}_2$) as a bioindicator of disturbance and ecosystem development. *Soil Biol. Biochem.* [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(95\)00093-T](https://doi.org/10.1016/0038-0717(95)00093-T)

Zamani, J., Hajabbasi, M.A., Alaie, E., 2015. The effect of steam sterilization of a petroleum-contaminated soil on PAH concentration and maize (*Zea mays* L.) growth. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* 4, 93–104.

ANEXOS



Fig. 13. Autoclavagem do solo (A); Pesagem 15 kg de solo (B); Contaminação do solo com sulfentrazone utilizando o pulverizador pressurizado com CO₂ (C).

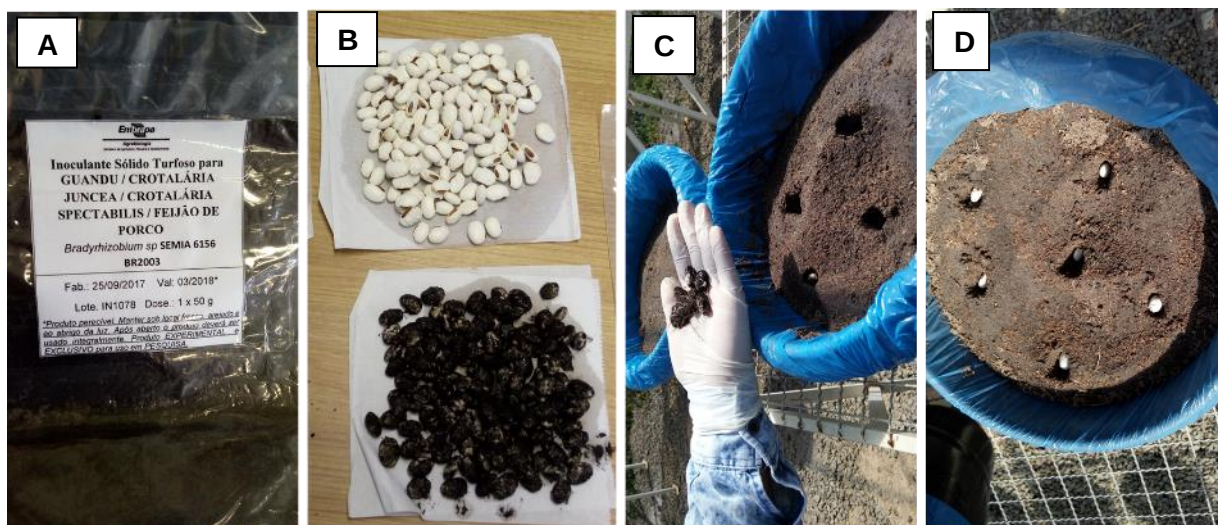


Fig. 14. Inoculante comercial turfoso para feijão-de-porco (A); Sementes de feijão-de-porco inoculadas e não inoculadas (B); Plantio das seis sementes nos vasos 24 h após o processo de contaminação do solo (C e D).



Fig. 15. Desenvolvimento das plantas de feijão-de-porco até 80 dias após plantio.

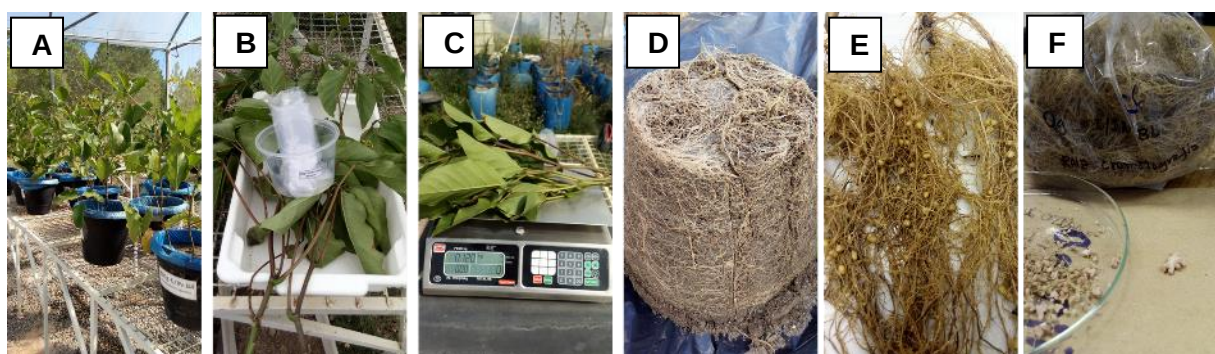


Fig. 16. Retirada do experimento (A e B); Pesagem da parte aérea das plantas (C); Retirada das raízes (D e E); Separação dos nódulos (F).

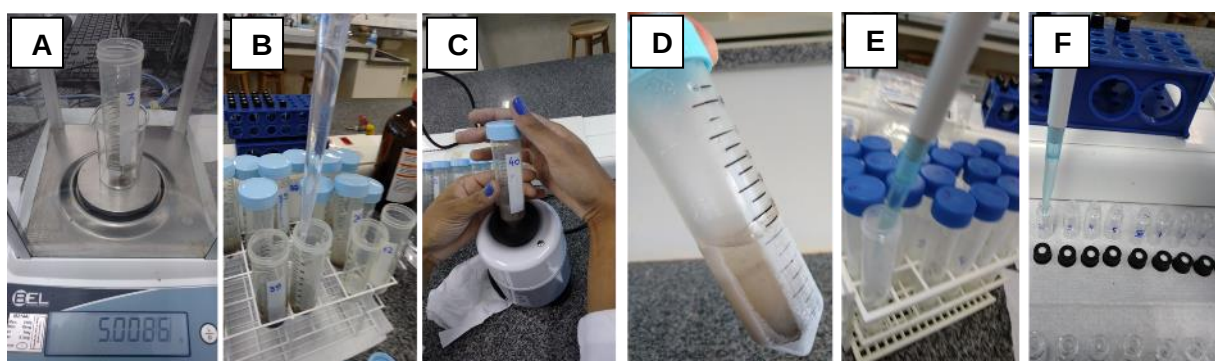


Fig. 17. Procedimentos para análise de cromatografia líquida: (A) Pesagem da amostra de solo; Adição de 10 mL de acetonitrila e 10 mL de água destilada (B); Agitação por 2 min (C); Congelamento da amostra (D); Retirada da fase orgânica após congelamento (E); Transferência de 1,5 mL da fase orgânica para vials (F).

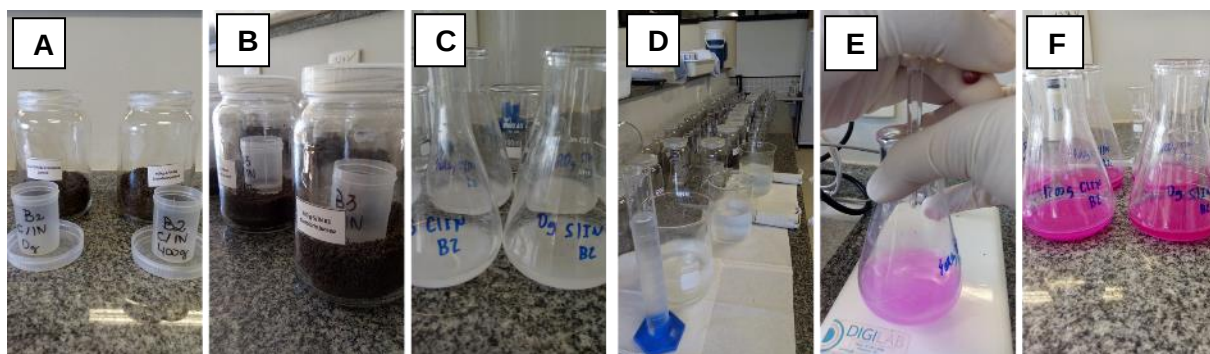


Fig. 18. Avaliação da respiração microbiana do solo (C-CO₂): Amostras de solo incubadas em frascos hermeticamente fechados (A e B); Solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ após incubação (C); Solução de BaCl₂ 0,05 mol L⁻¹ utilizada para liberação do C-CO₂ (D); Titulação das amostras com HCl 0,25 mol L⁻¹ acrescidos de três gotas do indicador fenolftaleína (1%) (E e F).

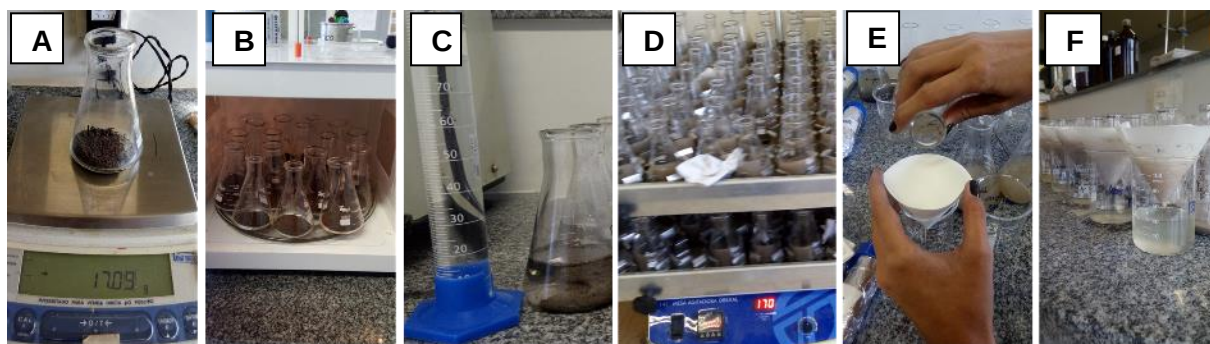


Fig. 19. Processo de extração das amostras para determinação do carbono da biomassa microbiana (CBM): Pesagem da amostra de solo que foram incubadas (A); Irradiação das amostras (B); Adição de 80 mL K₂SO₄ (C); Agitação das amostras por 1 h (D); Filtragem das amostras (E e F).

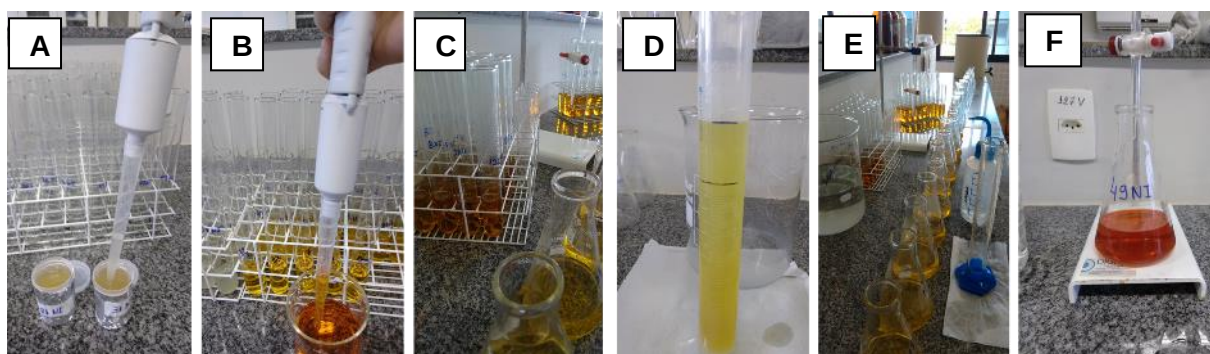


Fig. 20. Extração do carbono da biomassa microbiana: Retirada de 10 mL da solução extraída do solo (A); Adição de 2 mL de dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) (B); Adição de 10 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) (C); Aferição do volume para 100 mL com água destilada (D); Titulação das amostras com sulfato de ferro (FeSO₄) acrescidos de oito gotas do indicador Ferroin (E e F).



Fig. 21. Semeadura e desenvolvimento do *Pennisetum glaucum* (var. ADR7010) cultivado após fitorremediação do solo com feijão-de-porco.



Fig. 22. Desenvolvimento das plantas de milho e análise de fitotoxidade.

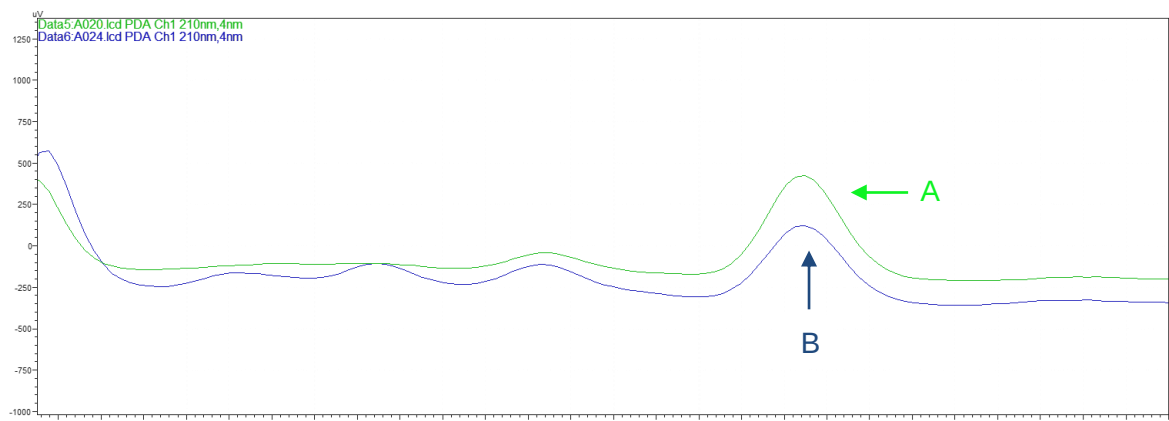


Fig. 23. Amostra de solo com 1200 g ha^{-1} i.a. de sulfentrazone sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (A) e com 1200 g ha^{-1} i.a. de sulfentrazone com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (B).

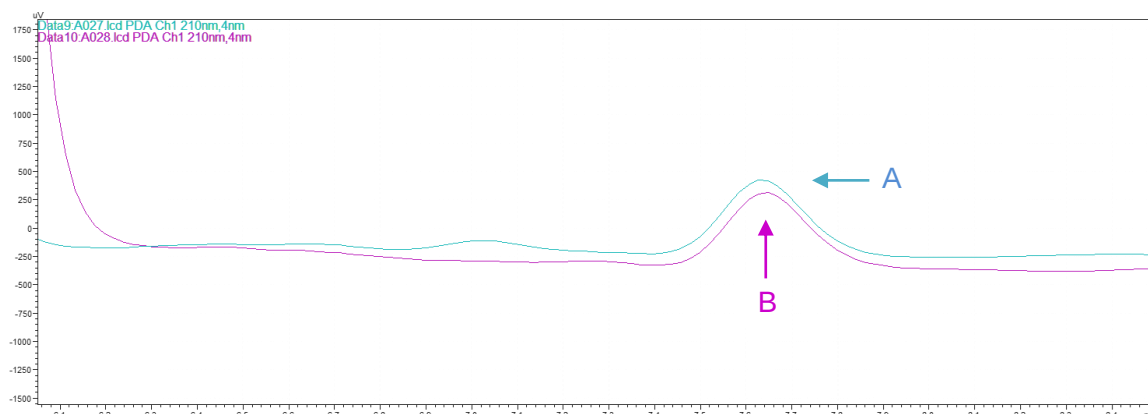


Fig. 24. Amostra de solo com 800 g ha⁻¹ i.a. de sulfentrazone sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (A) e com 800 g ha⁻¹ i.a. de sulfentrazone inoculado com *Bradyrhizobium* sp (B).

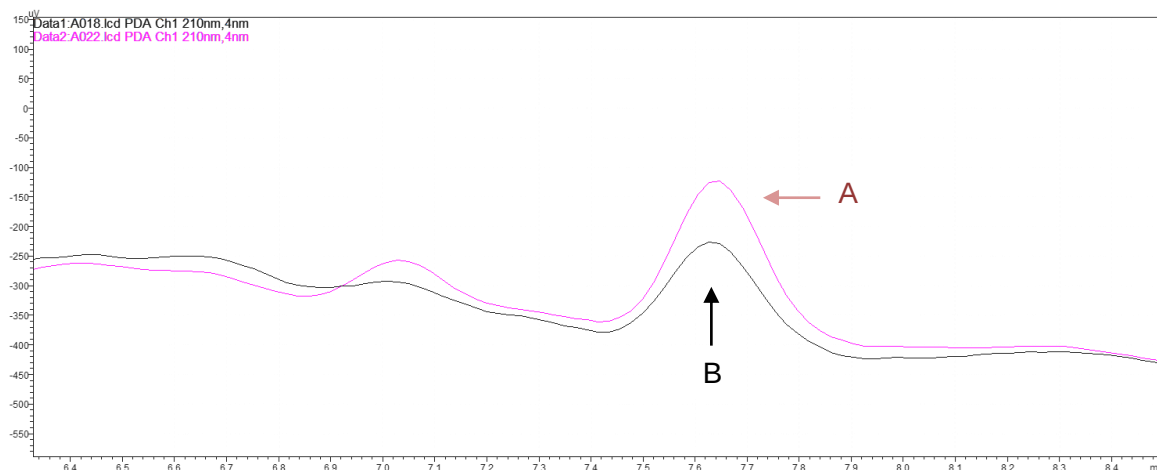


Fig. 25. Amostra de solo com 400 g ha⁻¹ i.a. de sulfentrazone sem inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (A) e com 400 g ha⁻¹ i.a. de sulfentrazone com inoculação com *Bradyrhizobium* sp. (B).

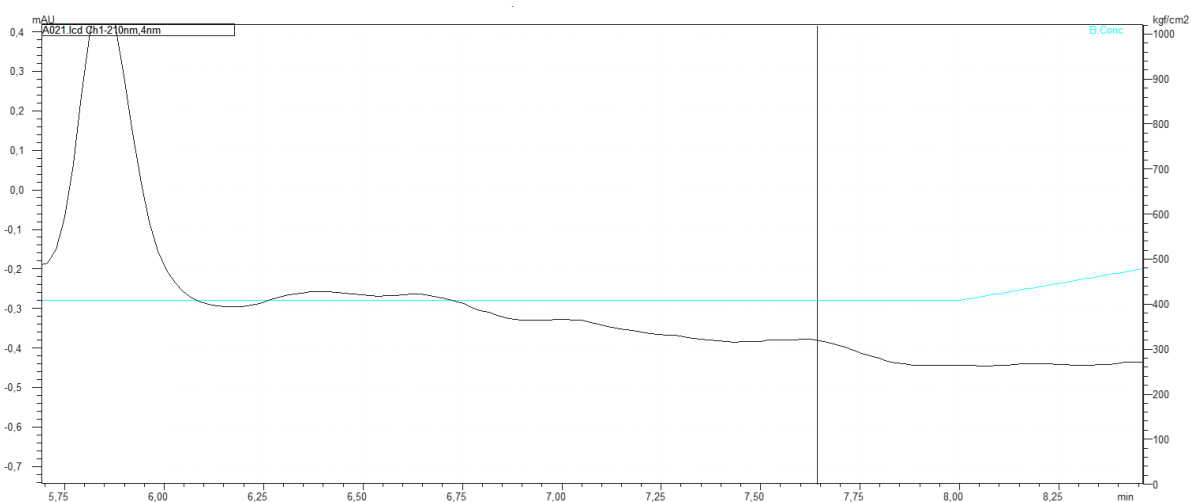


Fig. 26. Amostra sem presença de sulfentrazone (0 g ha⁻¹ i.a.).