

DEGRADAÇÃO DE AMETRINA EM AREIA QUARTZOSA COM ADIÇÃO DE SOLO RIZOSFÉRICO DE CANA-DE-AÇÚCAR⁽¹⁾

M. A. COSTA⁽²⁾, R. T. R. MONTEIRO⁽³⁾ & V. L. TORNISIELO⁽⁴⁾

RESUMO

Utilizando amostras de Areia Quartzosa esterilizada, não esterilizada e com adição de 10% de solo da rizosfera de cana-de-açúcar cultivada em campo, na presença e na ausência do herbicida ametrina, a biodegradação de ¹⁴C-ametrina foi avaliada juntamente com a quantidade de resíduos extraíveis, não-extraíveis e número de microrganismos presentes. A taxa de desprendimento de ¹⁴CO₂ aumentou em 3,5 vezes, com adição de solo rizosférico de culturas previamente tratadas com o herbicida, em 1,7 vez, com a adição de solo de rizosfera de culturas não tratadas. A presença de metabólitos detectada por cromatografia de camada delgada revela a maior degradação nas amostras que tiveram a adição de solo rizosférico. A microbiota presente na rizosfera ocasionou maior mineralização do herbicida ametrina.

Termos de indexação: mineralização, herbicida, fitorremediação, biorremediação

SUMMARY: *EFFECT OF RHIZOSPHERE SOIL ADDITION ON AMETRYN DEGRADATION IN SANDY SOIL*

The effect of rhizosphere soil addition on ametryn degradation rate was evaluated. The ¹⁴CO₂ release rate from sterile and non-sterile samples of a sandy soil was compared with the same soil amended with 10% rhizosphere soil from a sugar-cane plantation, treated or not with ametryn. Sterilized soils showed very low ¹⁴CO₂ release as compared with non-sterilized soil. When mineralization of non-amended soil was compared with rhizosphere soil amended from treated and non-treated fields, 3.5 and 1.7 fold increases of mineralization, respectively, were observed in amended soil. Extract TLC showed more degradation on

⁽¹⁾ Parte da Tese de Mestrado apresentada pelo primeiro autor ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - CENA/USP. Recebido para publicação em maio de 1997 e aprovado em dezembro de 1999.

⁽²⁾ Bióloga - PG - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA/USP. Av. Centenário 303, Caixa Postal 96, CEP 13400-970 Piracicaba (SP).

⁽³⁾ Bióloga - Pesquisador, CENA/USP. Email: monteiro@cena.usp.br.

⁽⁴⁾ Ecólogo - Pesquisador, CENA/USP. Email: vtornis@cena.usp.br.

amended samples than on non-amended samples. These results suggest that ametryn is degraded mainly through microbial action and that amendment with soil microbial population from ametryn pre-treated soil increases this herbicide's degradation rate.

Index terms: mineralization, herbicide, phytoremediation, bioremediation.

INTRODUÇÃO

O herbicida ametrina tem seu uso recomendado para culturas de cana-de-açúcar, milho, banana, café, citros e uva (Rodrigues & Almeida, 1995). Sua persistência no solo é alta (Leon et al., 1978), especialmente em solos com altos teores de argila e matéria orgânica (Lui & Cibes-Viadé, 1972). Em solos brasileiros, a persistência de ametrina varia conforme o tipo de solo e adição de substrato orgânico, sendo classificada como alta (Compte, 1997, Prata, 1998) e média (Costa, 1992, Rodrigues & Almeida, 1995, Costa et al., 1997, Prata, 1998).

A mineralização de ametrina foi aumentada de 12 a 13 vezes em Areia Quartzosa (o mesmo solo utilizado neste trabalho) quando 10% de palha de cana-de-açúcar foi adicionada, não exercendo influência no desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ a aplicação prévia de ametrina no campo (Costa et al., 1997). Neste caso, a maior atividade microbiana mostrou-se responsável pela degradação de ametrina.

A degradação de ametrina em meio de cultura líquido foi observada em culturas mistas de bactérias por Kontchou & Gschwind (1999) e Gebendinger & Radosevich (1999), que isolaram culturas de bactérias degradadoras de atrazina. Observou-se que o tratamento prévio do meio com herbicidas do grupo das triazinas não resultou em isolamento de culturas degradadoras de atrazina, mas o tratamento prévio com atrazina ou simazina resultou em culturas degradadoras de atrazina.

A rizosfera é uma região de atividade e crescimento microbiano aumentado em comparação com regiões do solo sem interferências de raízes. A excreção de exudados de raízes das plantas contribui para este aumento, e o aumento no número e composição dos microrganismos da rizosfera depende da espécie, idade da planta e tipo de solo (Campbell, 1985), bem como de outros fatores, como a exposição da planta a xenobióticos (Cunnigham et al., 1996). Influência direta na qualidade de exudados, bem como na microbiota rizosférica, após aplicação de pesticidas, foi anteriormente observada por Balasubramanian & Rangaswani (1973), Abdel-Nasser et al. (1979) e Sandmann & Loos (1984). Anderson et al. (1993) observaram um aumento na degradação dos herbicidas metolacoloro, atrazina e trifluralina, quando compararam solos rizosféricos

de *Kochia sp* com solos não-rizosféricos. A degradação acelerada de alaclor também foi observada por Zablotowicz et al. (1995), utilizando *Pseudomonas* spp. fluorescentes recuperadas de rizosfera.

O objetivo deste estudo foi investigar o processo de degradação de ametrina sob a influência da microbiota rizosférica de cana-de-açúcar cultivada na presença e na ausência do herbicida ametrina, para isto foi utilizada a ^{14}C ametrina como traçador.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de Areia Quartzosa (AQ) foram coletadas na profundidade de 0-20 cm, no município de Charqueada, SP. Solos de rizosfera (SR) de cana-de-açúcar cultivada na ausência de herbicida (SR) e com aplicação prévia do herbicida ametrina (SRH) foram coletados em plantação de cana-de-açúcar, no ano de 1991, três meses após a última aplicação, em uma área onde a ametrina (Gesapax 800 PM) havia sido aplicada por dois anos consecutivos, na taxa de 4 kg ha⁻¹ ano⁻¹. Os solos rizosféricos foram provenientes da fazenda da Usina Santa Bárbara, no município de Santa Bárbara D'Oeste (SP).

As análises químicas dos solos AQ, SRH e SR encontram-se no quadro 1.

Amostras de 10 g de solo, com quatro tratamentos e cinco repetições, foram distribuídas em frascos de vidro, seguindo um delineamento experimental inteiramente casualizado:

Tratamento	1: 10 g solo AQ,
Tratamento	2: 9 g solo AQ + 1 g SR,
Tratamento	3: 9 g solo AQ + 1 g SRH,
Tratamento	4: 10 g solo AQ Esterilizada

O teor de umidade das amostras de solo foi ajustado para 70% da capacidade de campo e foi corrigido, semanalmente, por gravimetria. Os frascos foram fechados, pesados e deixados em ambiente escuro a 23°C, por um período de sete dias. Cinco frascos foram esterilizados em autoclave a 120°C, durante uma hora, por três dias consecutivos. Após reativação do solo, aplicou-se 1 mL de solução de ametrina (2-metil-4-etilamino-6-isopropilamino), na concentração de 8,3 µg mL⁻¹ e atividade de 800 Bq mL⁻¹, em todos os tratamentos (IBAMA, 1990).

Quadro 1. Análise química de Areia Quartzosa (AQ), solo rizosférico não tratado (SR) e solo rizosférico tratado com ametrina (SRH)

Solo	P ⁽¹⁾	pH	M.O.	K	Ca	Mg	H + Al	S	T	V%
		CaCl ₂	%							
AQ	11,3	5,3	1,75	0,24	1,76	0,18	1,64	2,2	3,8	57,1
SR	18,1	4,5	3,33	0,11	1,61	0,72	5,8	2,4	8,2	29,6
SRH	17,8	4,6	3,20	0,24	1,81	0,84	4,23	2,9	7,1	40,6

⁽¹⁾ Analisado por resina de troca iônica, análise realizada pelo Departamento de Solos ESALQ/USP – Piracicaba (SP).

O herbicida ¹⁴C-ametrina radiomarcado uniformemente em todos os carbonos do anel foi fornecido pela Ciba-Geigy Corporation, Depto de Síntese Química e Dow Chemical Company, Midland, USA, com atividade específica de 26, 71 $\mu\text{Ci mg}^{-1}$ e pureza radioquímica de 98,4%.

Para capturar o ¹⁴CO₂, desprendido no processo de mineralização da ametrina, frascos de cintilação com 1 mL de solução de monoetanolamina foram colocados dentro dos recipientes com solo. Semanalmente, durante nove semanas, foram realizadas as trocas dos frascos coletores de CO₂. Após as trocas, foram adicionados aos frascos coletores 15 mL de solução cintiladora: 4 g de 2,5-diphenyl-oxazole (PPO); 0,2 g de 1,4 bis [5-Phenyl 2-2-oxazolyl]- benzene, 2,2'- p-Phenylene-bis [phenyloxazole] (POPOP); 340 mL Renex 95%; e 660 mL de tolueno (Mesquita & Ruegg, 1984), e a radioatividade de cada amostra foi avaliada, durante 15 min, em espectrômetro de cintilação líquida (ELC) (Beckman-modelo 5801).

Após nove semanas de incubação, foi realizada a extração dos resíduos e de seus metabólitos. Aos frascos com 10 g de amostra de solo de cada tratamento foram adicionados 10 g de sulfato de sódio anidro e 20 mL de metanol. Após duas horas de agitação (120 rpm) e 30 min de repouso, para decantação, o sobrenadante foi filtrado e o processo repetido por mais duas vezes, combinando os sobrenadantes. O volume final foi medido e 5 mL foram transferidos para frasco de cintilação. O solvente foi evaporado e então 15 mL de solução cintiladora foram adicionados e a radioatividade foi determinada. Aliquotas de 200 μL do mesmo filtrado e 10 μL da solução-padrão do herbicida radiomarcado foram aplicadas em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck). A eluição das placas foi efetuada com o sistema de solvente acetone-tril-água-ácido fórmico (94:5:1, v/v), de acordo com Burkard & Guth (1976). O produto e os possíveis metabólitos foram visualizados com auxílio de luz ultravioleta (345-366 nm), e as manchas foram confirmadas por autoradiografia.

Após a extração, o ¹⁴C remanescente como resíduo não-extraível das amostras de solo foi determinado em oxidador biológico (Biological Material Oxidizer-Beckman), utilizando-se 1 g de amostra e catalisador metálico (CuO). O ¹⁴CO₂ resultante da combustão foi coletado em 15 mL de solução cintiladora (3,3 g PPO; 600 mL tolueno; 300 mL éteretilenoglicol monometílico; 100 mL monoetanolamina), conforme Andrea et al. (1982), e quantificado em ELC.

O número de microrganismos (bactérias, fungos e actinomicetos) foi avaliado no início e no final do experimento pelo método de diluição e plaqueamento em meios de cultura seletivos. Na contagem das bactérias, fungos e actinomicetos, foram utilizados nutriente ágar, meio de Martin (Martin, 1950) e meio amido caseína (Kuster & Williams, 1964), respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O desprendimento de ¹⁴CO₂ da ametrina (Figura 1) indica que os tratamentos sem adição de solo rizosférico, (AQ e AQ/Est) apresentaram, após nove semanas de incubação, menor percentagem de ¹⁴CO₂ desprendido (0,70 e 0,58%, respectivamente), ou seja, uma mineralização da ametrina. A maior quantidade de ¹⁴CO₂ desprendido foi do tratamento AQ/SRH (2,56%), seguido por AQ/SR (1,25%). Este aumento na taxa de degradação é conhecido como degradação acelerada (Felsot & Dzantor, 1990) decorrente de aplicações sucessivas de um mesmo pesticida, ocorrendo adaptação da microbiota do solo na degradação de diversos produtos (Monteiro, 1997).

Comparando os parâmetros analisados dos tratamentos que o solo recebeu com a taxa de degradação, verifica-se que o tratamento AQ/SRH apresentou 3,5 vezes mais ¹⁴CO₂ que os tratamentos AQ, evidenciando a adaptação dos microrganismos da rizosfera de cultura de cana-de-açúcar previamente tratada. Portanto, nestes campos, a degradação da ametrina deve ocorrer mais

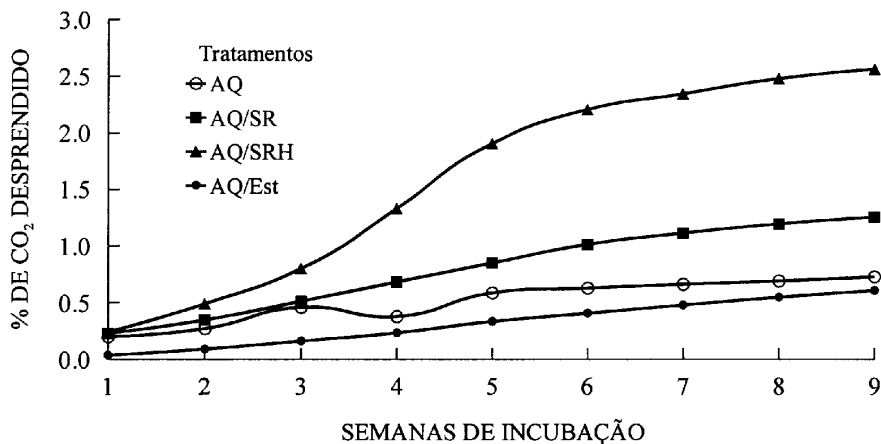


Figura 1. Percentagem relativa ao total aplicado de ¹⁴CO₂ desprendido em Areia Quartzosa (AQ), com adição de solo rizosférico não tratado (AQ/SR), com adição de solo rizosférico tratado (AQ/SRH) e Areia Quartzosa esterilizada (AQ/Est), durante nove semanas de incubação com ¹⁴C-ametrina.

rapidamente do que em campos sem aplicação. Costa et al. (1997) observaram que a adição ao solo de 10% de palhas de cana-de-açúcar tratadas previamente com ametrina e não tratadas aumentou em 13 e 12 vezes, respectivamente, a biodegradação da ametrina e concluíram que a degradação ocorreu por cometabolismo.

A quantidade do radiocarbono extraível (Figura 2) foi em média 55% do radiocarbono aplicado inicialmente para todos tratamentos AQ, AQ/SRH, AQ/SR e AQ/Est (57,35; 62,93; 46,70 e 52,41%, respectivamente), enquanto o não-extraível ficou ao redor de 29% em média dos tratamentos

AQ, AQ/SRH, AQ/SR e AQ/Est (34,0; 29,06; 28,60 e 23,23%, respectivamente). De acordo com Führ & Mittelstaedt (1980), o processo de formação de resíduos não-extraíveis de pesticidas nos solos está relacionado principalmente com a matéria orgânica dos solos, uma vez que a fração orgânica do solo tem potencial para formar ligações químicas estáveis com pesticidas e, ou, seus produtos de degradação. A fração de resíduos extraíveis é a fração que está mais biodisponível no solo, enquanto a fração não-extraível se encontra mais estável, entretanto, a liberação desses resíduos depende, principalmente, da ação dos microrganismos (Scheunert et al., 1986).

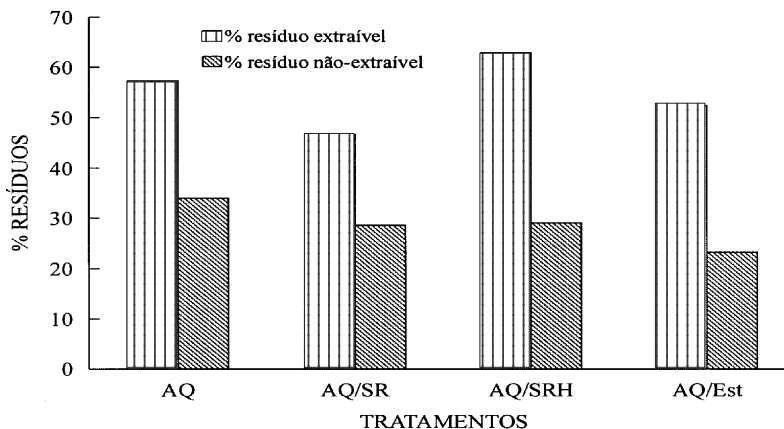


Figura 2. Percentagem relativa ao total aplicado de resíduo extraível e resíduo não-extraível em Areia Quartzosa (AQ), com adição de solo rizosférico não tratado (AQ/SR), com solo rizosférico tratado (AQ/SRH,) e Areia Quartzosa esterilizada (AQ/Est), durante nove semanas de incubação com ¹⁴C-ametrina.

Os tratamentos que não receberam adição de substratos (AQ e AQ/Est) apresentaram os metabólitos de Rfs 0,11 e 0,63 junto com a ametrina, Rf igual a 0,73, e o tratamento com a adição de solo rizosférico resultou no aparecimento de um metabólito a mais de Rf 0,21. Pode-se verificar, então, a formação de produtos que provavelmente se adsorveram (Figura 2) de formas diferentes do produto mãe (Hsu & Bartha, 1976; Katan & Lichtenstein, 1977; Lichtenstein, 1980).

O quadro 2 mostra que a presença da ametrina nos tratamentos com adição de solo rizosférico aumentou o número de microrganismos, principalmente bactérias. É provável que este aumento da população de microrganismos tenha sido o principal responsável pela mineralização da ametrina. Evidências de que a ametrina seria degradada por bactérias do solo foram também observadas por Cook & Hütter (1982).

Assim, pelo aumento do desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$, aparecimento de metabólitos e número de microrganismos, a adição em areia quartzosa de solos de rizosfera, com e sem aplicação prévia de ametrina, houve aumento na mineralização de ^{14}C -ametrina, indicando que a presença de plantas facilita a degradação de xenobióticos. Tal degradação pode ocorrer particularmente quando o contaminante orgânico é degradado cometabolicamente, uma vez que a rizosfera provê um ambiente condutivo de transformações cometabólicas (Cunningham et al., 1996). Neste processo, o composto não é utilizado para gerar energia ou crescimento microbiano da população degradadora, mas a atividade microbiana é muito importante.

CONCLUSÃO

A mineralização da ametrina é de origem microbiológica e o enriquecimento do solo arenoso

com solo rizosférico aumenta a degradação desse herbicida. O aumento pode ser ainda maior quando se realizam aplicações prévias desse herbicida.

LITERATURA CITADA

- ABDEL-NASSER, M.; MAKAWI, A.A. & ABDEL-MONEIM, A.A. Occurrence of certain microorganisms in rhizosphere soils of common bean and cotton as affected by the application of Temik or orthocide pesticides. *Egyptian J. Microbiol.* 14:37-44, 1979.
- ANDERSON, T.A.; GUTHRIE, E.A. & WALTON, B.T. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.*, 27:2630-2636, 1993.
- ANDREA, M.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R.H. & RUEGG, E. Degradation of parathion by soil kept moist with and without repeated applications. *Environ. Pollut.*, 27:167-177, 1982.
- BALASUBRAMANIAN, A. & RANGASWANI, G. Influence of foliar application of chemicals on the root exudations and rhizosphere microflora of *Sorghum vulgare* and *Crotalaria juncea*. *Folha Microbiol.*, 18:492-498, 1973.
- BURKHARD, N. & GUTH, J.A. Photodegradation of atrazine, atraton and ametryne in aqueous solution with acetone as a photosensitizer. *Pest. Sci.*, 7:65-71, 1976.
- CAMPBELL, R. *Plant microbiology*, Baltimore, Edward Arnold, 1985. 191p.
- COMPTE, V.X. Avaliação de metodologias de coleta de $^{14}\text{CO}_2$ em estudos de biodegradação de agroquímicos em solos. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 1997. 55p. (Tese de Mestrado)
- COOK, A.M. & HÜTTER, R. Ametryne and prometryne as sulfur source for bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:781-786, 1982.
- COSTA, M.A. Biodegradação de ^{14}C -Ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 1992. 107p. (Tese de Mestrado)

Quadro 2. Unidades formadoras de colônias (UFC) por grama de solo, no início e após nove semanas de incubação de Areia Quartzosa (AQ), com adição de solo rizosférico não tratado (AQ/RS) e tratado com herbicida ametrina (AQ/SRH) e solo esterilizado (AQ/Est)

Tratamento	Bactéria $1 \cdot 10^5$		Fungos $1 \cdot 10^4$		Actino $1 \cdot 10^3$		Média $1 \cdot 10^5$	
	Zero	64 dias	Zero	64 dias	Zero	64 dias	Zero	64 dias
AQ	4	5	5	3	3	300	4,53	8,83
AQ/SR	5	20000	10	20	5	Zero	6,25	18000
AQ/SRH	0,01	30	2	0,7	6	Zero	0,27	29
AQ/Est.	Zero	40	Zero	Zero	Zero	Zero	Zero	13

- COSTA, M.A.; MONTEIRO, R.T.R. & TORNISIELO, V.L. Influência da adição da palha de cana-de-açúcar na degradação de ^{14}C -ametrina em solo areia quartzosa. *Sci. Agric.*, 54:117-122, 1997.
- CUNNINGHAM, S.D.; ANDERSON, T.A.; SCHWAB, A.P. & HSU, F.C. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.*, 56:55-114, 1996.
- FELSOT, A.S. & DZANTOR, E.K. Enhancing biodegradation for detoxification of herbicide waste in soil. In: RACKE, J.K. & COATS, J.R. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment, Washington, D.C., ACS, 1990. p.249-268 (ACS. Symposium Series, 426)
- FÜHR, F. & MITTELSTAEDT, W. Plant experiments on the bioavailability of unextracted (carbonyl- ^{14}C) methabenzthiazuron residues from soil. *J. Agric. Food Chem.*, 28:122-125, 1980.
- GEBENDINGER, N. & RADOSEVICH, M. Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in bacterial isolate M91-3. *Appl. Microbiol. Biot.*, 51:375-381, 1999.
- HSU, T.S. & BARTHA, R. Hydrolyzable and nonhydrolyzable 3,4-dichloroaniline - humus - complexes and their respective rates of biodegradation. *J. Agric. Food Chem.*, 24:118-122, 1976.
- INSTITUTO BRASILEIRO DA AMAZONIA E DO MEIO AMBIENTE - IBAMA. Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos. 2.ed. Brasília, 1990. 351p.
- KATAN, J. & LICHTENSTEIN, E.P. Mechanisms of production of soil-bound residues of ^{14}C -parathion by microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, 25:1404-1408, 1977.
- KONTCHOU, C.Y. & GSCHWIND, N. Biodegradation of s-triazine compounds by a stable mixed bacterial community. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 43:47-56, 1999
- KUSTER, E. & WILLIAMS, S.T. Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nature*, 202:928-929, 1964.
- LEON, L.; MANUEL, C. & BORNEMISZA, E. Resíduos, degradación y comportamiento de la ametrina en un vertisol de Guanacaste, Costa Rica. *Turrialba*, 28:3-7, 1978.
- LICHTENSTEIN, E.P. Bound residues in soils and transfer of soil residues in crops. *Resid. Rev.*, 76:147-153, 1980.
- LUI, L.C. & CIBES-VIADÉ, H. Effect of various herbicides on the respiration of soil microorganisms. *J. Univ. Puerto Rico*, 56:17, 1972.
- MARTIN, J.P. Use of acids rose-bengall and streptomycin in the plate method for estimating soil fungi. *Soil Sci.*, 134:1538-1539, 1950.
- MESQUITA, T.B. & RUEGG, E.F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação Beta. *Cienc. Cult.*, 36:446-450, 1984.
- MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação de pesticidas. In: MELO, I.S. & AZEVEDO, J.L., eds. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna, EMBRAPA, CNPMA, 1997. p.107-124.
- PRATA, F.P. Biodegradação e adsorção dos herbicidas diuron e ametrina em solos tratados com vinhaça. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998. 73p. (Tese de Mestrado)
- RODRIGUES, B.N. & ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas, Londrina, IAPAR, 1995. 675p.
- SANDMANN, E. & LOOS, M.A. Enumeration of 2,4-D degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media: high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Chemosphere*, 13:1073-1084, 1984.
- SCHEUNERT, I.; MEER-BEKK, C.T. & KORT, F. Distribution and biodegradability of ^{14}C -residues bound in various soil fractions after treatment of the soil with model ^{13}C -chemicals. In: International Atomic Energy Agency. Quantification, nature and bioavailability of bound ^{14}C -pesticide residues in soil, plant and food. Vienna, 1986. p.31-40.
- ZABLOTOWIEZ, R.M.; HOAGLAND, R.E.; LOCKE, M.A. & HICKEY, W.J. Glutathione-S-transferase activity and metabolism of glutathione conjugates by rhizosphere bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1045-1060, 1995.