

Associação de *Rhizobium* sp. a duas leguminosas na tolerância à atrazina

Danielle Camargo¹, Kelly Lopes Bispo², Luciane Sene³

RESUMO

A associação de bactérias a plantas tem sido estudada como uma possível tecnologia emergente, para fitorremediação de contaminantes, entre eles os herbicidas, que, por sua recalcitrância, ameaçam a qualidade do ambiente. O objetivo deste trabalho foi verificar a tolerância de mucuna-anã (*Stizolobium deeringianum* Bort) e mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy), inoculadas e não inoculadas com *Rhizobium* sp., ao herbicida atrazina. Os tratamentos foram: plantas com inoculante + 0,1 g/m², 0,2 g/m² atrazina e sem atrazina (T1, T2 e T3, respectivamente), sem inoculante + 0,1 g/m², 0,2 g/m² atrazina e sem atrazina (T4, T5 e T6, respectivamente). O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Foram avaliados germinação, sobrevivência, número de nódulos, altura, biomassa verde, biomassa seca da parte aérea, após o crescimento das plantas por 50 dias em casa de vegetação. Nos tratamentos com inoculante, avaliou-se a porcentagem de germinação de plantas bioindicadoras (*Bidens pilosa* L.). Mucuna-preta e mucuna-anã demonstraram maior tolerância ao herbicida quando associadas ao *Rhizobium*. Os valores de sobrevivência de mucuna-preta, nas doses 0,1 e 0,2 g/m² de atrazina (T1 e T2), foram de 34 a 24% superiores aos observados nas mesmas doses, mas sem o inoculante (T4 e T5). Para mucuna-anã, T1 e T2 foram de 17 e 8% superiores a T4 e T5, respectivamente. As alturas médias de mucuna-anã em T1, T2 e T3 foram mais elevadas que em T4, T5 e T6, reforçando a importância do simbiote à resistência ao herbicida. Os resultados encontrados para as variáveis altura, biomassa verde e seca para mucuna-preta não apresentaram diferença estatística entre os tratamentos com e sem inoculante, mostrando uma resistência natural à atrazina e a possibilidade de atuar como planta remediadora. A germinação de *B. pilosa* indica uma possível degradação da atrazina no solo com ambas as espécies de mucunas inoculadas com *Rhizobium* sp.

Palavras-chave: Mucuna-preta, mucuna-anã, degradação, herbicida, bactéria endossimbionte.

ABSTRACT

Association of *Rhizobium* sp. with two legumes on atrazine tolerance

The association of bacteria with plants has been studied as a possible emerging technology for phytoremediation of contaminants, including herbicides, which pose as a threatening to environmental quality due to their recalcitrance. The aim of this study was to assess the tolerance of dwarf mucuna (*Stizolobium deeringianum* Bort) and black mucuna (*Stizolobium aterrimum* Piper & Tracy) inoculated and uninoculated with *Rhizobium* to the herbicide atrazine. The treatments were: plants with inoculant + 0.1 g/m², 0.2 g/m² atrazine, and without atrazine (T1, T2 and T3, respectively), plants without inoculant + 0.1 g/m², 0.2 g/m² atrazine and without atrazine (T4, T5 and T6, respectively). The experiment was arranged in a completely randomized design, with three replications. Plants were grown in a

Recebido para publicação em 26/08/2010 e aprovado em 24/05/2011

¹Bióloga. Mestranda do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (PGEAGRI/CCET/UNIOESTE), Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil. daniellecarnagoc@hotmail.com

²Bióloga. Especialista em Biotecnologia pelo Centro de Ciência Médicas e Farmacêuticas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná (CCMF/UNIOESTE), Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil. bispokelly@ibest.com.br

³Farmacêutica-Bioquímica, Doutora. Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Rua Universitária, 2069, 85819-110, Cascavel, Paraná, Brasil. luciane.sene@unioeste.br

greenhouse for 50 days and the variables germination, survival, number of nodules, height, green/dry biomass of the aerial part were evaluated. In the treatments with inoculants, the germination percentage of bioindicator plants (*Bidens pilosa* L.) was also evaluated. Black mucuna and dwarf mucuna showed greater tolerance to the herbicide when associated with *Rhizobium*. The survival rates of black mucuna at the doses 0.1 and 0.2 g/m² atrazine (T1 and T2) were 34 and 24% higher than those observed at the same doses, but without the inoculant (T4 and T5). For dwarf mucuna, T1 and T2 were 17 and 8% higher than T4 and T5, respectively. The average heights of dwarf mucuna in T1, T2 and T3 were higher than in T4, T5 and T6, reinforcing the importance of the symbiont to the herbicide resistance. The results found for the variables height, green and dry biomass for black mucuna were not significantly different among the treatments with and without inoculant, showing a natural resistance to atrazine and the possibility of acting as a remediation plant. The germination of *B. pilosa* indicates a possible degradation of atrazine in the soil by both mucuna species inoculated with *Rhizobium* sp.

Key words: Black mucuna, dwarf mucuna, degradation, herbicide, endosymbiont bacteria.

INTRODUÇÃO

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida seletivo, pertencente à família das s-triazinas, cuja estrutura química contém um anel aromático hexamérico e simétrico, constituído por três átomos de carbono e três de nitrogênio em posições alternadas. Age sobre as espécies susceptíveis por meio da ligação à proteína quinona no fotossistema II, inibindo o transporte de elétrons na fotossíntese.

A atrazina tem sido utilizada no controle de plantas daninhas nas culturas de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* L.), milho (*Zea mays* L.), sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), abacate (*Persea americana* Mill.), abacaxi (*Ananas comosus* (L.) Merr.), banana (*Musa* spp.), cacau (*Theobroma cacao* L.), café (*Coffea arabica* L.), citros (*Citrus* sp.), manga (*Mangifera indica* L.), pêssego (*Prunus persica* (L.) Batsch), maçã (*Malus communis* Desf.), coníferas (Pinaceae), seringueira (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Müll. Arg.), pimenta-do-reino (*Piper nigrum* L.) e de roseira (*Rosa* spp.). Este herbicida permanece na camada superficial do solo e atua no combate às espécies caruru (*Amaranthus viridis* L.), picão-preto (*Bidens pilosa* L.), capim-marmelada (*Cenchrus echinatus* L.), capim-carrapicho (*Digitaria* sp.), trapoeraba (*Commelina erecta* L.), capim-colchão (*Echinochloa* sp.), beldroega (*Portulaca oleracea* L.), entre outras, durante um período de até cinco meses (Hertwig, 1977; Gelmini, 1991; Khouri, 2007; Colla *et al.*, 2008). Os impactos da sua presença na água e seus efeitos ecotoxicológicos já são bastante conhecidos (Hayes *et al.*, 2002; Christin *et al.*, 2004; Weiner *et al.*, 2004; Ma *et al.*, 2006; Murphy *et al.*, 2006).

Os micro-organismos são os principais responsáveis pela sua dissipação no solo, onde alguns podem, enzimaticamente, levar à completa mineralização do

herbicida, por meio de reações de N-desalquilação ou N-desaminação das cadeias laterais, produzindo subprodutos como o desetilatraxina (DEA) e desisopropilatraxina (DIA) (Struthers *et al.*, 1998). Entre as bactérias, há relatos sobre a degradação de atrazina por linhagens individuais, tais como *Pseudomonas* sp. (Mandelbaum *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 2001), *Rhodococcus rhodochromus* Zopf (Jones *et al.*, 1998), *Acinetobacter* spp. (Singh *et al.*, 2004), *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. e *Delftia acidovorans* den Dooren de Jong (Vargha *et al.*, 2005), bem como por consórcio de espécies, tais como *Agrobacterium tumefaciens* Smith & Townsend, *Caulobacter crescentus* Poindexter, *Pseudomonas putida* Trevisan, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp. e *Variovorax paradoxus* Davis (Smith *et al.*, 2005).

A degradação cooperativa desse herbicida deve-se ao fato de os genes envolvidos no seu metabolismo estarem distribuídos entre as diferentes espécies nestas comunidades (Smith & Crowley, 2006). *Rhizobium* sp. foi identificada como capaz de promover a hidroxilação da atrazina por meio de uma enzima constitutiva, com um fragmento de 24 aminoácidos, com 92% de identidade com a sequência da cloro-hidrolase (AtzA), produzida por *Pseudomonas* sp. ADP (Bouquard *et al.*, 1997). Os genes *atzB* e *atzC*, responsáveis pelas reações de desalquilação, também foram identificados numa linhagem de *Rhizobium* sp. (Smith *et al.*, 2005; Smith & Crowley, 2006).

Embora a fitorremediação apresente resultados promissores em áreas contaminadas com metais pesados, hidrocarbonetos de petróleo, pesticidas, explosivos, solventes clorados e resíduos industriais tóxicos (Cunningham & Ow, 1996), o emprego desta técnica em solos contaminados com herbicidas apresenta várias limitações. No entanto, a fitorremediação de atrazina, seja pela ação direta das plantas, seja pela degradação na re-

gião rizosférica, foi comprovada com várias espécies vegetais resistentes (Burken & Schnoor, 1996; Garcinunoa *et al.*, 2003; Sulmon *et al.*, 2007).

Pesquisas recentes demonstram que a utilização de bactérias endofíticas pode acentuar o processo de fitorremediação de substratos contaminados com herbicidas, pois reduzem os níveis de resíduos tóxicos dos herbicidas nas plantas cultivadas e aumentam a tolerância a compostos normalmente fitotóxicos (Germaine *et al.*, 2006; Doty, 2008). Ryan *et al.* (2008) confirmaram que essas bactérias têm potencial para retirar contaminantes do solo, aumentando a fitorremediação, além de contribuir para a fertilidade do solo por meio da solubilização de fosfato e fixação de nitrogênio.

A associação de bactérias endofíticas a plantas mostrou-se eficaz na fitorremediação de outros compostos orgânicos, além dos herbicidas. *Burkholderia cepacia* Palleroni & Holmes, uma endofítica natural do lupino amarelo, após ser geneticamente modificada com o plasmídeo pTOM, promoveu uma melhoria na degradação de tolueno (Barac *et al.*, 2004). Moore *et al.* (2006) demonstraram que várias estirpes endofíticas, isoladas de dois cultivares de choupo, usados na remediação *in situ* de BTEX, apresentaram potencial para incrementar a fitorremediação, por sua capacidade de degradar compostos BTEX ou de crescer na presença do TCE. Dashti *et al.* (2009) comprovaram que as leguminosas *Vicia faba* L. e *Lupinus albus* L., que apresentavam nódulos radiculares colonizados com bactérias, apresentaram maior potencial de fitorremediação de solos pobres contaminados com óleo.

Num estudo utilizando sementes de *Trifolium repens* L. inoculadas com *Rhizobium leguminosarum* Frank, foi verificada a possibilidade de rizorremediação, com base nos bons resultados desta associação para biodegradação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), uma vez que o crescimento radicular e o da parte aérea foram maiores nos tratamentos que receberam o inóculo, confirmando, assim, seu impacto positivo sobre o vigor das plantas (Johnson *et al.* 2005).

Diante do exposto, objetivou-se avaliar o efeito da associação da bactéria endossimbionte *Rhizobium* sp. às culturas de *Stizolobium deeringianum* (mucuna-anã) e *S. aterrimum* (mucuna-preta) na tolerância à atrazina.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento constituiu-se da utilização das espécies mucuna-anã e mucuna-preta, submetidas aos seguintes tratamentos: T1: com inoculante + 0,1g/m² atrazina; T2: com inoculante + 0,2g/m² atrazina; T3: com inoculante e sem atrazina; T4: sem inoculante + 0,1g/m² atrazina; T5: sem inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T6: sem inoculante e sem atrazina.

As sementes passaram por desinfecção, lavagem, secagem e inoculação com a bactéria *Rhizobium* sp., específica para cada espécie vegetal, conforme o método descrito pelo fabricante (Embrapa Agrobiologia), nos tratamentos previstos. O plantio das espécies foi realizado em vasos de polietileno com capacidade de 2,5 L, preenchidos com solo classificado como latossolo Vermelho, coletado em área florestal, sem atividade antrópica, no município de Cascavel, Paraná, cujas características físico-químicas estão descritas na Tabela 1.

A contaminação do solo com o herbicida procedeu-se de forma direta e manual e, após 24 horas, efetuou-se o plantio das espécies. Os vasos foram levados à casa de vegetação, com temperatura de 25 ± 5 °C, irrigação automática e umidade controlada, onde permaneceram por 50 dias, com acompanhamento constante para avaliação do desenvolvimento das plantas.

Após este período, as plantas foram colhidas para avaliação da porcentagem de germinação e sobrevivência, altura, biomassa verde e seca da parte aérea e número de nódulos. Posteriormente à retirada das plantas, nos vasos cujos tratamentos receberam o inoculante (T1, T2 e T3), semeou-se picão-preto (*Bidens pilosa*), como planta bioindicadora. Os vasos foram mantidos em casa de vegetação e após uma semana realizou-se a contagem das sementes germinadas.

O delineamento adotado em ambos os ensaios foi inteiramente casualizado, com três repetições e cinco sementes por vaso. Os dados foram submetidos à análise de variância pelo teste F e as médias comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade, com utilização do programa estatístico SISVAR.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A emergência das plântulas no solo, para ambas as espécies de leguminosas, não diferiu estatisticamente dos tratamentos sem herbicida (Tabelas 2 e 3). Isso indica que as sementes não sofreram a interferência do produto durante seu desenvolvimento inicial, mesmo nas doses mais elevadas. A utilização do *Rhizobium* também não alterou a germinação das sementes, em comparação com aquelas que não receberam o inoculante. Isso provavelmente se explica pelo fato de que, durante o estágio inicial da germinação, a planta utiliza as reservas cotiledonares disponíveis na semente, não realizando a fotossíntese (Belo, 2006). Visto que a atrazina é um herbicida que pertence ao grupo de inibidores do fotossistema II, atua posteriormente, no decorrer do desenvolvimento dos vegetais, ou seja, age na membrana do cloroplasto durante a fase luminosa da fotossíntese, não interferindo na germinação, ou enquanto a planta não estiver realizando fotossíntese.

Posteriormente, no decorrer do crescimento das plantas, constatou-se que ambas as espécies apresentavam sintomas de intoxicação severos, conforme a concentração do herbicida aplicado, afetando, inclusive, a sobrevivência. Comparando-se as plantas de mucuna-preta nos tratamentos T1 e T2, percebeu-se que a porcentagem de sobrevivência permaneceu em 71 e 57%, respectivamente; já nos tratamentos T4 e T5, que não receberam o inoculante, a taxa de sobrevivência foi de 37 e 33%, respectivamente. Ressalta-se que a tolerância da mucuna-preta ao herbicida foi ainda maior quando estabelecida relação simbiótica com *Rhizobium*, visto que a porcentagem de plantas que conseguiram sobreviver foi superior aos tratamentos sem o inoculante (Tabela 2).

Segundo Rodrigues & Almeida (1995), quando a atrazina é utilizada em pré-emergência, as plantas sensíveis emergem naturalmente, sem sintomas de toxicidade, porém, quando iniciam o processo de fotossíntese, tornam-se cloróticas, com necrose, culminando com sua morte, sintomas também observados neste experimento.

Quando analisados os resultados da mucuna-anã, nas mesmas condições, observou-se que a sobrevivência das plantas inoculadas na dose menor (T1) e na maior (T2) da atrazina foi de 33 e 8%; no entanto, com as não inocula-

gem de plantas que conseguiram sobreviver foi superior aos tratamentos sem o inoculante (Tabela 2).

Tabela 1. Composição físico-química do solo utilizado no experimento

Análise Granulométrica (dag kg ⁻¹)						
Argila %	Silte %	Areias %	Classificação Textural			
69	16	15	Classe Argila = solo tipo 3			
Análise Química						
pH	P	K ⁺	Al ³⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	H ⁺ + Al ³⁺
(H ₂ O)	(mg/dm ³)	(cmol _c /dm ³)				
3,80	1,30	1,14	2,08	0,71	0,29	11,26

Análises realizadas pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola (COODETEC). Extratores: cloreto de cálcio para pH; Mehlich (ácido sulfúrico + ácido clorídrico) para P e K; cloreto de potássio para Al³⁺, Ca²⁺, Mg²⁺; Tampão SMP para H⁺ + Al³⁺.

Tabela 2. Efeito da aplicação de atrazina em plantas de mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*) inoculadas, ou não, com *Rhizobium* sp. sobre a germinação, sobrevivência, crescimento e número de nódulos na planta

Variáveis	Tratamentos ¹							DMS	CV (%)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6			
Germinação (%)	53,3 ^a	53,3 ^a	46,6 ^a	53,3 ^a	73,3 ^a	73,3 ^a	50,10	31	
Sobrevivência (%)	71 ^b	57 ^c	100 ^a	37 ^d	33 ^d	100 ^a	10,89	8	
Altura da planta (cm)	74,86 ^a	56,98 ^a	61,52 ^a	44,44 ^a	37,50 ^a	56,98 ^a	71,80	10	
Biomassa da parte aérea verde (g)	7,47 ^a	3,86 ^a	6,35 ^a	4,27 ^a	2,02 ^a	5,70 ^a	7,47	8	
Biomassa da parte aérea seca (g)	1,78 ^a	0,89 ^a	2,30 ^a	1,08 ^a	0,39 ^a	1,32 ^a	2,30	3	
No. de nódulos	6,50 ^a	2,00 ^c	4,60 ^b	0,0 ^d	0,16 ^d	0,08 ^d	0,15	23	

¹ Médias seguidas de letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. T1: com inoculante + 0,1 g/m² atrazina; T2: com inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T3: com inoculante e sem atrazina; T4: sem inoculante + 0,1 g/m² atrazina; T5: sem inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T6: sem inoculante e sem atrazina; DMS: Diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

Tabela 3. Efeito da aplicação de atrazina em plantas de mucuna-anã (*Stizolobium deeringianum*) inoculadas, ou não, com *Rhizobium* sp. sobre a germinação, sobrevivência, crescimento e número de nódulos na planta

Variáveis	Tratamentos ¹						DMS	CV (%)
	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
Germinação (%)	80 ^a	86 ^a	86 ^a	80 ^a	100 ^a	86 ^a	38,80	16
Sobrevivência (%)	33 ^b	8 ^d	100 ^a	16 ^c	0 ^e	100 ^a	2,88	2
Altura da planta (cm)	26,5 ^c	4,03 ^d	63,64 ^a	1,20 ^e	0,0 ^f	40,6 ^b	0,64	10
Biomassa da parte aérea verde (g)	2,09 ^a	0,49 ^b	5,11 ^a	0,48 ^b	0,0 ^b	4,14 ^a	2,90	50
Biomassa da parte aérea Seca (g)	0,38 ^b	0,03 ^b	1,43 ^a	0,14 ^b	0,0 ^b	1,02 ^a	0,58	41
No. de nódulos	2,0 ^b	0,36 ^d	5,03 ^a	0,33 ^d	0,00 ^e	0,71 ^c	0,31	25

¹ Médias seguidas de letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. T1: com inoculante + 0,1 g/m² atrazina; T2: com inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T3: com inoculante e sem atrazina; T4: sem inoculante + 0,1 g/m² atrazina; T5: sem inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T6: sem inoculante e sem atrazina; DMS: Diferença mínima significativa; CV: coeficiente de variação.

das (T4 e T5), os valores foram 16% e nenhuma planta sobrevivente, respectivamente. Isso indica uma considerável contribuição da inoculação para a sobrevivência dos vegetais, na presença do herbicida (Tabela 3). As plantas de mucuna-anã mostraram-se mais sensíveis à ação do herbicida, com redução da sobrevivência, em relação à mucuna-preta, com a qual foi registrado o maior número de plantas sobreviventes.

Procópio *et al.* (2005) consideraram a mucuna-preta eficiente na remediação do herbicida Trifloxysulfuron-sodium, com base no cultivo da espécie com quatro densidades populacionais (0, 10, 25 ou 40 plantas/m²) e duas doses do Trifloxysulfuron-sodium (0 e 15 g/ha) como pré-tratamentos. O plantio posterior de feijão, como bioindicador, mostrou que o rendimento de grãos nos tratamentos com cultivo prévio de mucuna-preta + Trifloxysulfuron-sodium foi semelhante ao obtido na área não tratada com o herbicida.

Neste trabalho, as variáveis altura das plantas e biomassa verde e seca não apresentaram diferença estatística significativa para a espécie mucuna-preta não inoculada, o que mostra certa resistência natural e levanta a possibilidade de atuar como planta remediadora em solos contaminados com baixas doses de atrazina (Tabela 2). Resultados semelhantes foram encontrados em trabalhos com mucuna-preta e o Tebuthiuron, tendo sido verificada fitotoxicidade menos acentuada e menor redução na altura das plantas, da biomassa seca da parte aérea, de raízes e do total da planta, em comparação com outras culturas (Pires *et al.*, 2003).

Ao analisar o efeito da associação entre *Rhizobium* e mucuna-preta sobre os valores médios das mesmas variáveis, não foi verificado efeito significativo em relação aos tratamentos não inoculados. Rodrigues *et al.* (1994), ao realizarem um experimento com mucuna-preta e feijão de porco para uma comparação entre inoculação, calagem e adubação, também não observaram diferença para a produção de biomassa seca, nas parcelas que receberam inoculação com bactérias do gênero *Rhizobium*.

Os resultados encontrados para altura da mucuna-anã evidenciam a colaboração da bactéria para o crescimento da planta, provavelmente pelo seu papel na fixação do nitrogênio, visto que este é elemento constituinte de macromoléculas essenciais ao crescimento do vegetal. Isto pode ser averiguado, nos tratamentos dessa cultura, nos solos sem herbicida, por meio do aumento da altura das plantas de 56,7% em T3, em que havia a associação com *Rhizobium* sp., em relação a T6 (Tabela 3).

Ainda para esta mesma variável, observou-se que o tratamento T1 da mucuna-anã apresentou diferença estatística em relação aos demais tratamentos. Neste tratamento, comparado com aqueles isentos de atrazina, verificou-se que a altura das plantas foi de 59 e 35% inferior à

verificada em T3 e T6, respectivamente. Já, quando comparados os tratamentos com a mesma dose de atrazina (0,1 g/m²), verificou-se que a altura média foi 25,3 cm mais elevada no tratamento com inoculante (T1), em relação à do sem inoculante (T4). Corrobora-se que a inoculação pode ter auxiliado no crescimento da leguminosa em doses baixas de atrazina (Tabela 3).

Confrontadas as médias da altura das plantas de mucuna-anã, cultivadas na concentração mais alta do herbicida e na ausência do *Rhizobium* (T5), verificou-se que todas as plantas foram susceptíveis e morreram, enquanto, com o inoculante (T2), os valores médios foram de 4,03 cm, confirmando novamente a possibilidade da associação para uma maior resistência e possível degradação do herbicida. Segundo Johnson *et al.* (2004), a inoculação simbiótica de rizóbios pode desempenhar um papel importante na rizorremediação, pelo aumento da parte aérea da planta e do crescimento radicular.

A biomassa da parte aérea verde da mucuna-anã em T1 não diferiu daquelas crescidas em solo sem herbicida. As plantas conseguiram alta produção de biomassa verde mesmo no solo contaminado, porém, com menor dose do herbicida. Ainda para biomassa verde, o tratamento com inoculante, na maior dose de atrazina (T2), apresentou peso médio estatisticamente igual ao dos tratamentos com o herbicida e sem inoculante (T4 e T5). Já as médias da biomassa seca desta mesma cultura foram estatisticamente iguais nos tratamentos sem o herbicida (T3 e T6), sendo superiores e estatisticamente diferentes das dos tratamentos com e sem inoculante, independentemente da concentração de atrazina (T1, T2, T4 e T5) (Tabela 3).

Os resultados encontrados por Pires *et al.* (2003), com a espécie de *S. atterimum*, assemelham-se aos deste trabalho, uma vez que, ao utilizar o herbicida Tebuthiuron até a dose 1,0 kg/ha, foram observados menores sintomas de toxicidade e redução da altura e da biomassa, em relação aos da testemunha, com potencial para uso da espécie na fitorremediação de solos contaminados com aquele herbicida.

Ao analisar a simbiose para ambas as espécies (Tabelas 2 e 3), verificou-se que, nos três tratamentos, cujas sementes haviam recebido o inoculante, a quantidade de nódulos foi maior que nas plantas sem inoculante. Isso indica que as bactérias estavam viáveis e foram capazes de realizar a adesão e formar os nódulos. Segundo Siqueira *et al.* (1994), esta associação é benéfica pela relação de fornecimento de fotossintatos à bactéria e recebimento, em troca, de produtos nitrogenados como aminoácidos e ureídeos. Geralmente, os nódulos são visíveis de cinco a dez dias após a semeadura, enquanto a atividade da nitrogenase só é detectada após seu aparecimento. Em algumas espécies, os sinais de beneficiamento da simbiose

demonstram-se evidentes depois de 10 a 15 dias da germinação. Além disso, em todas as leguminosas, a fixação do nitrogênio não começa até que a planta possa dispor de parte dos produtos da fotossíntese para esta atividade, ou até que haja um excesso de carbono em relação ao nitrogênio da planta.

A maior quantidade de nódulos encontrados em mucuna-preta (Tabela 2) verificou-se em T1, no qual havia a menor concentração da atrazina, inclusive sendo este valor superior ao do tratamento com solo sem atrazina (T3), demonstrando sua resistência ao herbicida e a possibilidade de o *Rhizobium* ter contribuído para o crescimento da planta e para a degradação da molécula da atrazina, minimizando seu efeito nocivo ao vegetal. Nos vasos que continham a maior dose de atrazina (T2), o número de nódulos foi significativamente menor em comparação com o dos tratamentos T1 e T3. A bactéria associada à mucuna-anã demonstrou ser sensível à atrazina, fato evidenciado pela progressiva redução dos nódulos com o aumento da concentração do herbicida em relação ao tratamento sem atrazina (Tabela 3).

Produtos como herbicidas, aplicados antes do plantio, podem matar o rizóbio, diminuir a nodulação e a fixação biológica do nitrogênio, ou ter efeito indireto através da planta ou demais organismos do solo (Siqueira *et al.*, 1994). Segundo Santos *et al.* (2006), a aplicação de herbicidas sobre culturas que realizam simbiose com bactérias fixadoras de nitrogênio pode prejudicar a eficiência na assimilação deste nutriente, sendo que a maior interferência desses compostos ocorre quando eles agem sobre a biossíntese de aminoácidos, ou sobre as rotas metabólicas comuns entre micro-organismos e plantas.

Jacques *et al.* (2010) ao realizarem experimento para avaliar a sensibilidade de três estirpes de *Bradyrhizobium* à aplicação do glifosato sobre a soja resistente a este herbicida, verificaram que as estirpes apresentaram sensibilidade diferenciada somente nas concentrações mais baixas do glifosato, com prejuízo à simbiose. Além disso, consideraram que essa sensibilidade foi dependente da concentração do herbicida, pois nas doses mais elevadas todas as estirpes tiveram o crescimento severamente reduzido.

No presente trabalho, ao confrontar a quantidade de plantas germinadas de picão-preto para ambas as espécies em todos os tratamentos (Tabela 4), observou-se que não houve diferença para o solo sem atrazina (T3), em relação aos daqueles que continham o herbicida (T1 e T2). Estes valores, juntamente com os demais resultados, podem representar um indicativo de descontaminação por utilização de *Rhizobium* em associação com as leguminosas. É importante salientar que outros estudos devem ser realizados a fim de verificar a mineralização do herbicida no solo.

Tabela 4. Quantidade de plantas de picão-preto (*Bidens pilosa*) germinadas após o desenvolvimento das plantas inoculadas com *Rhizobium* sp. em solo com atrazina

Tratamentos ¹	Quantidade de plantas germinadas	
	Mucuna-preta	Mucuna-anã
T1	3,33 ^a	3,35 ^a
T2	2,66 ^a	2,01 ^a
T3	3,66 ^a	4,50 ^a
CV (%)	1 ^a	19 ^a

¹Médias seguidas de letras diferentes nas linhas indicam diferença estatística significativa, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. T1: com inoculante + 0,1 g/m² atrazina; T2: com inoculante + 0,2 g/m² atrazina; T3: com inoculante e sem atrazina; CV: coeficiente de variação.

CONCLUSÕES

A bactéria endossimbionte *Rhizobium* sp. proporciona maior tolerância às plantas de *Stizolobium deeringianum* (mucuna-anã) e *S. aterrimum* (mucuna-preta), não somente por sua capacidade de fixar nitrogênio, mas, provavelmente, pelo potencial de degradar a molécula da atrazina.

É possível considerar que mucuna-preta, por sua maior resistência à atrazina, possa ser utilizada num processo biológico de descontaminação do solo, em áreas afetadas com doses baixas do herbicida, oferecendo perspectivas para uma metodologia alternativa de fitorremediação, ou seja, a rizorremediação.

REFERÊNCIAS

- Belo AF (2006) Técnicas para fitorremediação de solo contaminado com herbicidas. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 66p.
- Barac T, Taghavi S, Borremans B, Provoost A, Oeyen L, Colpaert JV, Vangronsveld J & Lelie DVD (2004) Engineered endopytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, 22:583-588.
- Bouquard C, Ouazzani J, Promé J, Michel-Briand Y & Plésia TP (1997) Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Environmental Microbiology*, 63:862-866.
- Burken JG & Schnoor JL (1996) Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *Journal of Environmental Engineering*, 122:958-963.
- Christin MS, Menard L, Gendron AD, Ruby S, Cyr D, Marcogliese DJ, Smith LR & Fournier M (2004) Effects of agricultural pesticides on the immune system of *Xenopus laevis* and *Rana pipiens*. *Aquatic Toxicology*, 6:33-43.
- Colla LM, Primaz AL, Lima M, Bertolin TE & Costa JAV (2008) Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciência e Agrotecnologia*, 32:809-813.
- Cunningham SD & Ow DW (1996) Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*, 110:715-719.
- Dashti N, Khanafer M, El-Nemr I, Sorkhoh N, Ali N & Radwan S (2009) The potential of oil-utilizing bacterial consortia associated with legume root nodules for cleaning oily soils. *Chemosphere*, 10:1354-1359.

- Doty SL (2008) Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*, 179:318-333.
- Garcinunoa RM, Fernandez-Hernandob P & Camaraa C (2003) Evaluation of pesticide uptake by *Lupinus* seeds. *Water Research*, 37:3481-3489.
- Gelmini CA (1991) *Agrotóxicos*. São Paulo, Fundação Cargill. 838p.
- Germaine KJ, Liu X, Cabellos GG, Hogan JP, Ryan D & Dowling DN (2006) Bacterial endophyte-enhanced phytoremediation of the organochlorine herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Microbiology Ecology*, 57:302-310.
- Hertwig KV (1977) *Manual de herbicidas desfolhantes, dessecantes e fitoregulares*. São Paulo, Agronômica CERES. 480p.
- Hayes TB, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart AA & Vonk A (2002) Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99:5476-5480.
- Jacques RJS, Procópio SO, Santos JB, Kasuya MCM & Silva AA (2010) Sensibilidade de estirpes de *Bradyrhizobium* ao glyphosate. *Revista Ceres*, 57:28-33.
- Johnson DL, Maguire KL, Anderson DR & McGrath SP (2004) Enhanced dissipation of chrysene in planted soil: the impact of a rhizobial inoculum. *Soil Biology and Biochemistry*, 36:33-38.
- Johnson DL, Anderson DR & McGrath SP (2005) Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 37:2334-2336.
- Jones LR, Owen SA, Horrell P & Burns RG (1998) Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. *Water Research*, 32:2542-2549.
- Katz I, Dosoretz CG, Mandelbaum RT & Green M (2001) Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of *Pseudomonas* ADP. *Water Research*, 35:3272-3275.
- Khouri AG (2007) *Análise de resíduos de atrazina e simazina em abacaxi no estado de Goiás*. Dissertação de Mestrado. Universidade Católica de Goiás, Goiás, 72p.
- Ma J, Wang S, Wang P, Ma L, Chen X & Xu R (2006) Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63:456-462.
- Mandelbaum RT, Allan DL & Wackett LP (1995) Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:1451-1457.
- Moore FP, Barac T, Borremans B, Oeyen L, Vangronsveld J, Campbell VLD & Moore ER (2006) Endophytic bacterial diversity in poplar trees growing on a BTEX-contaminated site: the characterisation of isolates with potential to enhance phytoremediation. *Systematic and Applied Microbiology*, 29:539-556.
- Murphy MB, Hecker M, Coady KK, Tompsett AR, Jones PD, Preez LHD, Everson GJ, Solomon KR, Carr JA, Smith EE, Kendall RJ, Kraak VD & Giesy JP (2006) Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. *Aquatic Toxicology*, 76:230-245.
- Pires FR, Souza CM, Silva AA, Procópio SO & Ferreira LR (2003) Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. *Planta Daninha*, 21:335-340.
- Procópio SO, Santos JB, Pires FR, Silva AA, Santos EA & Ferreira LR (2005) Fitorremediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium por mucuna-preta (*Stizolobium aterrimum*). *Planta Daninha*, 23:719-724.
- Rodrigues EFG, Polli H & Eira PA (1994) Inoculação, calagem e adubação para mucuna-preta e feijão-de-porco num solo Podzólico Vermelho-Amarelo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 29:807-814.
- Rodrigues BN & Almeida FS (1995) *Guia de herbicidas*. 3ª ed. Londrina, Edição dos autores. 675p.
- Ryan RP, Germaine K, Franks A, Ryan DJ & Dowling DN (2008) Bacterial endophytes: recent developments and applications. *Microbiology Letters*, 278:1-9.
- Santos JB, Silva AA, Costa MD, Jakelaitis A, Vivian R & Santos EA (2006) Ação de herbicidas sobre o crescimento de estirpes de *Rhizobium tropici*. *Planta Daninha*, 24:457-465.
- Singh P, Suri CR & Cameotra SS (2004) Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. *Systematic and Applied Microbiology*, 317:697-702.
- Siqueira JO, Moreira F, Grisi B, Hungria M & Araujo RS (1994) *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. Brasília, Embrapa. 142p.
- Smith D, Alvey S & Crowley DE (2005) Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *Microbial Ecology*, 53:265-273.
- Smith D & Crowley DE (2006). Contribution of ethylamine degrading bacteria to atrazine degradation in soils. *Microbial Ecology*, 58:271-277.
- Struthers JK, Jayachandran K & Moorman TB (1998) Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64:3368-3375.
- Sulmon C, Gouesbet G, Binet F, Martin-Laurent F, Amrani AE & Coue'e I (2007) Sucrose amendment enhances phytoaccumulation of the herbicide atrazine in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental Pollution*, 145:507-515.
- Vargha M, Takats Z & Márialigeti K (2005) Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. *Water Research*, 39:1560-1568.
- Weiner JA, De Lorenzo ME & Fulton MH (2004) Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. *Aquatic Toxicology*, 68:121-128.