



Foto: Paulo Lanzetta

COMUNICADO
TÉCNICO

365

Pelotas, RS
Dezembro, 2018

Embrapa

Potencial de Agentes Bióticos para Remediação de Solos com Resíduos de Imazapique e Imazapir em Arrozaís Irrigados

Maria Laura Turino Mattos
José Francisco da Silva Martins

Potencial de Agentes Bióticos para Remediação de Solos com Resíduos de Imazapique e Imazapir em Arrozais Irrigados¹

¹Maria Laura Turino Mattos, Engenheira-agrônoma, doutora em Ciência do Solo, pesquisadora da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS; José Francisco da Silva Martins, Engenheiro-agrônomo, doutor em Entomologia, pesquisador da Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS.

Introdução

Os herbicidas do grupo químico imidazolinonas, imazapir, imazapique, e imazetapir, são efetivos para o controle de grande número de monocotiledôneas e dicotiledôneas ocorrentes em lavouras de arroz irrigado dos estados do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina (Reunião..., 2016). Formulações comerciais com esses ingredientes ativos (ia) têm sido extensivamente aplicadas, devido ao grande espectro de controle de plantas daninhas.

A persistência desses herbicidas é afetada pelos atributos químicos, físicos e biológicos de diversos solos. Essa influência foi verificada em estudo de persistência de imazapique e imazapir em solo argiloso cultivado com arroz, à profundidade de 0 cm -10 cm, em que as taxas de degradação de 26,26; 29,75; e 25,30 dias foram observadas como os valores de meia vida estimados para imazapir; e 38,51; 34,15; e 25,02 dias para imazapique, para as doses de 75,

150 e 300 g ia ha⁻¹, respectivamente (Bajrai et al., 2017).

Em solo hidromórfico, textura arenosa, cultivado com arroz irrigado, resíduos de imazapique e imazetapir, à profundidade de 0 cm - 20 cm, não foram detectados aos 13 e 25 dias após a aplicação de 25 e 75 g L⁻¹ ia e 90 dias após a colheita (Mattos et al., 2011). Com relação à profundidade do solo, onde há persistência desses ingredientes ativos, Mattos et al. (2013) relataram que imazapique e imazapir acumulam-se em Planossolo Háplico Eutrófico, no mínimo sob profundidade de 0 cm - 5 cm, enquanto o imazapir individualmente acumula-se sob profundidade de 0 cm - 10 cm. Os autores verificaram também que, após 210 dias da aplicação desses herbicidas, não há detecção de resíduos na camada de solo de 0 cm - 20 cm.

Esses resultados indicam a presença de resíduos desses herbicidas na camada superficial de solos e, consequentemente, a necessidade do emprego de tecnologias de biorremediação para

minimizar o risco ambiental em lavouras de arroz irrigado. Nesse contexto, realizou-se este trabalho, visando definir o potencial de agentes bióticos para remediação de solos com resíduos de imazapic e imazapir em arrozais irrigados no Rio Grande do Sul. Buscou-se isolar e caracterizar bactérias com capacidade para degradação de imazapic e imazapir e avaliar a toxicidade dessas substâncias químicas.

Material e Métodos

Químicos e meios de cultura

A formulação comercial (FC) granulada dispersível (WG) contendo 175 g kg⁻¹ de imazapique (17,5%) e 525 g kg⁻¹ de imazapir (52,5%) foi adquirida da BASF S/A. Os padrões analíticos de imazapique (99,5% de pureza) e imazapir (99,7% de pureza) foram adquiridos da AccuStandard® Inc. O meio mineral (MM) foi conforme Kaufman e Kearney (1965), sem ágar originando o caldo sais minerais (CSM) e com adição da dose de 200 mg L⁻¹ da FC o meio MSMK200. O meio ágar nutriente (AN) foi conforme Wollum (1982).

Enriquecimento e isolamento

Na safra 2013/2014, amostra composta de solo foi coletada, na profundidade de 0 cm - 5 cm, de uma parcela

experimental (Figura 1) que recebeu, durante três safras agrícolas (2010/2011, 2011/2012 e 2012/2013), a aplicação de 0,14 kg ha⁻¹ de uma formulação comercial granulada dispersível (WG) contendo 525 + 175 g kg⁻¹ dos ingredientes ativos imazapir e imazapique, oriunda da Estação Experimental Terras Baixas, da Embrapa Clima Temperado, Capão do Leão, RS. Nessa profundidade de solo, na safra 2010/2011, foram detectados os residuais a seguir: 1) cinco dias pós-aplicação: 4,38 e 5,56 µg kg⁻¹ de imazapique e imazapir, respectivamente; 2) dez dias pós-aplicação: 1,39 e 2,22 µg kg⁻¹ de imazapique e imazapir, respectivamente (Mattos et al., 2013).

O volume de 100 mL de CSM foi transferido para frascos erlenmeyers de 500 mL. Após autoclavagem dos frascos e esfriamento sob temperatura ambiente, foi adicionada a formulação comercial na concentração de 200 mg L⁻¹ (CSMK200) e 1,0 de solo em cada frasco. Os frascos foram incubados em um agitador orbital (180 rpm) a 28 °C. Após dez dias de incubação, foi transferido 1,0 mL dessa cultura para um novo CSMK200. Essa cultura foi incubada por dez dias e o procedimento repetido, totalizando 30 dias de enriquecimento do solo com o herbicida. Como resultado, as culturas com turbidez indicaram microrganismos degradadores do herbicida.

Bactérias foram isoladas dessas culturas pelo método de espalhamento com alça de *Drigalsky* em placas contendo MSMK200, que foram incubadas a 28 °C por até 72 horas. Colônias

foram purificadas em MSMK200 e NA, sendo selecionadas para verificar suas capacidades degradativas na presença da FC como fonte de carbono em placas contendo MSMK200.

Identificação dos acessos

A caracterização fenotípica englobou as características tanto celulares, por meio do teste da coloração de Gram, quanto das colônias, bem como as bioquímicas e fisiológicas. A caracterização morfológica das colônias incluiu: borda, cor, densidade, elevação, forma e superfície. As caracterizações bioquímicas e fisiológicas foram realizadas, em triplicata, por meio das seguintes análises: ágar triplo açúcar ferro, aerobiose, catalase, crescimento e fluorescência em King A e King B endósporo, fermentação de glicose, lactose e sacarose, mobilidade, morfologia celular oxidase, produção de H_2S , produção de indol, reação Gram e utilização de citrato. Em todos os ensaios os materiais utilizados, como placas de Petri, tubos, bem como os meios utilizados, foram devidamente autoclavados a 121 °C por 15 min. Acessos foram identificados em nível de gênero com base em Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Holt et al., 1994).

Concentração mínima inibitória (CMI)

Esse teste foi realizado com o objetivo de avaliar o comportamento dos

ingredientes ativos imazapique e imazapir como agentes antimicrobianos, conforme procedimento descrito por Gilbert e Al-Taae (1985). Os padrões analíticos na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram usados no teste CMI. Soluções-estoques dos agentes teste foram preparadas, sendo constituídas como a seguir: imazapique e imazapir: 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em água destilada estéril.

Os controles foram constituídos como a seguir: Controle 1: positivo (CN + inóculo); Controle 2: negativo (CN); Controle 3: negativo (CN + solução estoque).

Os inóculos foram preparados em caldo DGYs (28 °C, 180 rpm, 24 horas). Após 24 horas de incubação, 25 mL do caldo foi centrifugado (10 mil g/5 min.), o precipitado lavado em 25 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%), ressuspenso e diluído em solução salina estéril (NaCl 0,9%) até a concentração de 107 UFC mL^{-1} .

Foram preparados 11 frascos (em duplicata) com 2,0 mL de caldo nutriente, sendo que o 11º foi usado como padrão (sem adição do herbicida), então autoclavados e incubados a 28 °C por 24 horas. Após, foi preparada uma diluição seriada de 1/2 – 1/1.024 com os produtos a serem testados. Os tubos foram inoculados com 0,5 μL de um inóculo de 107 UFC mL^{-1} com 24 horas de crescimento (28 °C, 180 rpm) dos acessos selecionados para o teste, e incubados a 28 °C. Em 48 horas, foi realizada uma avaliação do crescimento, por meio da visualização da turvação do caldo de

cultura. Realizou-se a confirmação por meio do plaqueamento das diluições em meio ágar nutritivo, que indicou as concentrações que inibiram o crescimento dos acessos bacterianos.

Resultados e Discussão

Com base na análise morfológica dos acessos purificados, selecionaram-se dez isolados com características

diferentes (Tabela 1), os quais foram submetidos às análises bioquímicas e fisiológicas (Tabela 2). Os acessos foram depositados na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT) e receberam os códigos CMM de 1091 – 1100.

Tabela 1. Características morfológicas dos dez isolados de bactérias degradadoras de herbicida. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Acessos	Borda	Cor	Densidade	Elevação	Forma	Superfície
CMM 1091	Ondulada	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Radiada
CMM 1092	Ondulada	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Granular
CMM 1093	Ondulada	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Rugosa
CMM 1094	Ondulada	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Rugosa
CMM 1095	Ondulada	Branca	Opaca	Elevada	Circular	Granular
CMM 1096	Inteira	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Granular
CMM 1097	Inteira	Creme	Opaca	Plana	Circular	Lisa
CMM 1098	Ondulada	Branca	Opaca	Elevada	Circular	Granular
CMM 1099	Ondulada	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Granular
CMM1100	Inteira	Creme	Opaca	Convexa	Circular	Granular

Tabela 2. Características bioquímicas e fisiológicas dos dez isolados de bactérias degradadoras de herbicida. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Acesso	Reação Gram	Morfologia celular	Crescimentos		Ágar Tripo açúcar ferro	Produção H ₂ S	Fermentações			Endosporo	Produção indol	Mobilidade	Aerobiose	Reações		Utilização citrato
			King B	King A			Sacarose	Lactose	Glicose					Oxidase	Catalase	
CMM1091	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CMM1092	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CMM1093	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CMM1094	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+
CMM1095	+	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
CMM1096	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CMM1097	-	Bastonete	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
CMM1098	+	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
CMM1099	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
CMM1100	-	Bastonete	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+

Os isolados foram agrupados em função da reação Gram: Grupo 1: Gram negativos (CMM1091, CMM1092, CMM1093, CMM1094, CMM1096, CMM1097, CMM1099 e CMM1100); e Grupo 2: Gram positivos (CMM1095 e CMM1098). Todos os acessos foram negativos para a prova de coliformes termotolerantes em caldo EC, que tem como principal representante *Escherichia coli*. A lactose presente no meio favorece as bactérias lactose positivas, especialmente coliformes e *E.coli*. (Eaton et al., 1998). Sete acessos do Grupo 1 (CMM1091, CMM1092, CMM1093, CMM1094, CMM1096, CMM1099 e CMM1100) apresentaram características morfológicas, bioquímicas e fisiológicas típicas de espécies da família *Pseudomonadaceae*. Espécies de *Pseudomonas* (*P. mandelii*, *P. monteilii*, *P. putida* e *P. veronii*) têm sido associadas com a rizosfera do arroz (Rangarajan et al., 2002). Além disso, apresentam capacidade de degradar herbicidas imidazolinonas, como imazetapir, imazapir, imazapic e imazamox, bem como mitigar efeitos fitotóxicos de imazetapir sobre o milho, como *Pseudomonas* sp. cepa IM-4 (Huang et al., 2009). Os isolados não produziram pigmento fluorescente em meio King B. Somente CMM 1097 diferiu dos demais do Grupo 1, por não crescer em King A e King B e com reação catalase negativa.

Os acessos do Grupo 2 apresentam características fenotípicas do gênero *Bacillus*. Posteriormente, os acessos, que estão preservados na CMMCT, serão submetidos à análise polifásica para confirmação da identificação taxonômica.

Para o teste de concentração mínima inibitória, selecionaram-se cinco acessos que mostraram perfil fenotípico diverso (Grupo 1: CMM 1092, CMM 1094, CMM 1097, CMM 1100; Grupo 2: CMM 1098). Os resultados da CMI são apresentados nas Tabelas 3 e 4. Pode-se observar que 100% dos acessos foram resistentes aos dois agentes teste até a concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Não houve ação inibitória para o crescimento desses acessos na presença dos agentes teste, nas concentrações avaliadas.

Os resultados mostram que, apesar da toxicidade desses ingredientes ativos, com classificação toxicológica II (altamente tóxico) e ambiental III (produto perigoso) (Reunião..., 2016), as bactérias degradadoras não apresentaram susceptibilidade às concentrações que foram inferiores às detectadas no solo na profundidade de 0-5 cm (Mattos et al., 2013). Este trabalho permite também inferir na tolerância desses acessos a concentrações superiores, em formulações comerciais, usadas para o controle de plantas daninhas.

Tabela 3. Concentração mínima inibitória do agente teste imazapique para acessos reação Gram positivo e Gram negativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Acessos				
	CMM 1092	CMM 1094	CMM 1097	CMM 1098	CMM 1100
1	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+
0,0625	+	+	+	+	+
0,03125	+	+	+	+	+
0,015625	+	+	+	+	+
0,0078125	+	+	+	+	+
0,00390625	+	+	+	+	+
0,001953125	+	+	+	+	+
Controle 1	+	+	+	+	+
Controle 2	-	-	-	-	-
Controle 3	-	-	-	-	-

Controle 1= positivo; Controle 2 e 3= negativo.

Tabela 4. Concentração mínima inibitória do agente teste imazapir para acessos reação Gram positivo e Gram negativo. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2018.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Acessos				
	CMM 1092	CMM 1094	CMM 1097	CMM 1098	CMM 1100
1	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+
0,25	+	+	+	+	+
0,125	+	+	+	+	+
0,0625	+	+	+	+	+
0,03125	+	+	+	+	+
0,015625	+	+	+	+	+
0,0078125	+	+	+	+	+
0,00390625	+	+	+	+	+
0,001953125	+	+	+	+	+
Controle 1	+	+	+	+	+
Controle 2	-	-	-	-	-
Controle 3	-	-	-	-	-

Controle 1= positivo; Controle 2 e 3= negativo.

Considerações Finais

A biorremediação é um método de baixo custo e efetivo para degradação de compostos tóxicos em produtos inócuos. O sucesso na remoção de herbicidas do solo depende da implantação de bactérias com capacidade para catabolizar os diferentes ingredientes ativos. Neste estudo, obteve-se dez acessos com potencial para remediação de solos com histórico de aplicação dos herbicidas imazapique e imazapir em arrozais irrigados, os quais, associados a plantas fitorremediadoras, por meio da aplicação da nanotecnologia, podem reduzir a toxicidade desses herbicidas e o impacto ambiental.

Agradecimentos

Aos funcionários do laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental, da Embrapa Clima Temperado, pelo auxílio na realização deste trabalho.

Referências

- BAJRAI, F. S. M.; ISMAIL, B. S.; MARDIANA-JANSAR, K.; OMAR, R. Persistence of imazapic and imazapyr in paddy soil and water. **International Journal of Advances in Agricultural and Environmental Engineering**, v. 4, n. 1, p. 12-15, 2017.
- EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. (Ed.). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: American Public Health Association, 1998.
- GILBERT, P.; AL-TAAE, A. Antimicrobial activity of some alkyltrimethylammonium bromides. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 101-104, 1985.
- HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H. A.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 824 p.
- HUANG, X.; PAN, J.; LIANG, B.; SUN, J.; ZHAO, Y.; LI, S. Isolation, characterization of a strain capable of degrading imazethapyr and its use in degradation of the herbicide in soil. **Current Microbiology**, v. 59, p. 363-367, 2009.
- KAUFMAN, D. D.; KEARNEY, P. C. Microbial degradation of isopropyl N-3-chlorophenyl-carbamate and 2-chloroethyl N-3-chlorophenylcarbamate. **Applied Microbiology**, v. 13, p. 443-446, 1965.
- MATTOS, M. L. T.; ANDRES, A.; MARTINS, J. F. da S. **Residual dos herbicidas imazapir e imazapique em solo, água e sedimento de lavoura de arroz irrigado no Rio Grande do Sul**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2013. 4 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 154).
- MATTOS, M. L. T.; ANDRES, A.; MARTINS, J. F. da S. MATTOS, M. L. T.; ANDRES, A.; MARTINS, J. F. da S. **Dissipação dos herbicidas imazetapir e imazapique na lavoura de arroz irrigado**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2011. 8 p. (Embrapa Clima Temperado. Circular Técnica, 127).
- RANGARAJAN, S.; SALEENA, L. M.; NAIR, S. Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from rice rhizosphere populations grown along a salinity gradient. **Microbial Ecology**, v. 43, n. 2, p. 280-290, 2002.
- REUNIÃO TÉCNICA DA CULTURA DO ARROZ IRRIGADO, 31., 2016, Bento Gonçalves, RS. **Arroz irrigado: recomendações técnicas para o sul do Brasil**. Bento Gonçalves: SOSBAI, 2016. 197 p.
- WOLLUM, A. G. Cultural methods for soil microorganisms. In: PAGE, A. L.; MILLER, R. H.; KEENEY, D. R. **Methods of soil analysis chemical and microbiological properties**. Madson: American Society of Agronomy, 1982. p. 781-801.

Embrapa Clima Temperado
BR 392 km 78 - Caixa Postal 403
CEP 96010-971, Pelotas, RS
Fone: (53) 3275-8100
www.embrapa.br/clima-temperado
www.embrapa.br/fale-conosco

1ª edição
Obra digitalizada (2018)

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Clima Temperado

Presidente

Ana Cristina Richter Krolow

Vice-Presidente

Ênio Egon Sosinski

Secretária-Executiva

Bárbara Chevallier Cosenza

Membros

*Ana Luiza B. Viegas, Fernando Jackson,
Marilaine Schaun Pelufê, Sônia Desimon*

Revisão de texto

Bárbara Chevallier Cosenza

Normalização bibliográfica

Marilaine Schaun Pelufê

Editoração eletrônica

Nathália Santos Fick (estagiária)

Foto da capa

Paulo Lanzetta

