

Caracterização de microrganismos isolados de solo contaminado com Glifosato na região sul do Brasil**Characterization of microorganisms isolated from soil contaminated with Glyphosate in southern Brazil**

Recebimento dos originais: 01/11/2019

Aceitação para publicação: 30/12/2019

Fernanda Natali Demichelli

Mestre em Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável pela Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: fernanda_int@uffs.edu.br

Gabriela Silva Moura

Doutora em Agronomia (Proteção de Plantas/Fitopatologia) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: bismoura@hotmail.com

Gilmar Franzener

Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas/Fitopatologia) pela Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: gilmar.franzener@uffs.edu.br

Thiago Bergler Bitencourt

Doutor em Química Orgânica pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: bitencourt@uffs.edu.br

Catia Tavares dos Passos Francisco

Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente (2010), pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: catia.passos@uffs.edu.br

Luisa Helena Cazarolli

Doutora em Farmácia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Instituição: Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS)

Endereço: Rodovia BR 158 - Km 405, Laranjeiras do Sul - PR, Brasil

E-mail: luisacazarolli@gmail.com

RESUMO

O uso abusivo de glifosato, um dos agrotóxicos mais utilizados no Brasil, está relacionado à problemas de saúde e ao ambiente, visando fazer um estudo preliminar sobre a interação do agrotóxico com a microbiota, o trabalho teve como objetivo isolar microrganismos e identificar os fungos filamentosos, possíveis degradadores de glifosato de um solo com uso intensivo deste agrotóxico. Foram coletadas amostras de solo aleatoriamente, homogeneizadas e transferidas para erlenmeyer contendo meio mineral com glifosato. Após três transferências subsequentes, (1mL) a cada cinco dias, a 28°C, foi feita a contagem em placas. Bactérias e fungos morfológicamente diferentes foram isolados. Destes, foi possível identificar oito gêneros diferentes de fungos. Os resultados sugerem que os microrganismos isolados são tolerantes e podem apresentar alto potencial de degradação de glifosato, podendo ser utilizados em futuros estudos de biorremediação de solos contaminados com este agrotóxico.

Palavras-chave: agrotóxicos, isolamento, biorremediação, fungos, bactérias.

ABSTRACT

Glyphosate is one of the most commonly used pesticides in Brazil, and it is related to health issues and environmental problems. Thus, the present study aimed to make a preliminary study on the interaction of the pesticide with the microbiota, the objective was to isolate fungi and bacteria, identify the fungi from a glyphosate contaminated soil, which indicate glyphosate degradation potential. The soil samples were collected randomly, homogenized and transferred to a flask with mineral medium supplemented glyphosate. Then, we performed three subsequent transfers, (1mL) every 5 days, at 28° C, plaque counting was done. Bacteria and fungi morphologically different were isolated. It was possible to identify eight different genera of fungi. The results suggest that the isolated microorganisms are tolerant and may present high glyphosate degradation potential and could be use in further bioremediation studies of soils contaminated with this pesticide.

Keywords: pesticides, isolate, bioremediation, fungi, bacteria.

1 INTRODUÇÃO

A cada ano tem se verificado o aumento da produção, comercialização e aplicação de agrotóxicos em todo mundo, sendo o Brasil, o maior consumidor desde o ano de 2008 (CARNEIRO, 2015). Dentre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, o glifosato ocupa lugar de destaque, podendo causar efeitos negativos na saúde de animais, humanos além de problemas ambientais (CATTANI et al., 2013; CAVALLI et al., 2013; ROUSH; TABASHNIK, 1990).

O glifosato pode ser degradado por microrganismos, que podem utilizá-lo como fonte de energia, fósforo e nitrogênio. Existem duas vias principais de degradação microbiana do glifosato: na primeira, ocorre a clivagem da ligação C-P do composto, por ação da enzima C-P liase, produzindo sarcosina. Na segunda rota, acontece a clivagem da molécula produzindo o ácido aminometilfosfônico (AMPA), principal metabólito na degradação do glifosato, (FORLANI et al., 1999; ARAÚJO, 2003; GOMEZ et al., 2008).

Sobre o impacto do glifosato na população microbiana, Araújo (2003) observou em estudo

sobre a biodegradação do glifosato no solo, que o número de fungos e actinomicetos tiveram um aumento significativo com a presença do glifosato, enquanto que as bactérias permaneceram em número constante durante o período de incubação de 32 dias. Anteriormente, Wardle e Parkinson (1990) isolaram quarenta e dois fungos a partir de solo adicionado de glifosato, as espécies *Mucorhiemalis*, *Fusariumoxysporum*, e *Penicilliumnigricans*, permaneceram em número constante, em todas as concentrações testadas. *Mortierella alpina*, *Trichodermaharzianum*, e *Arthriniumphaerospermum* tiveram aumento populacional significativamente estimulado pelo glifosato, enquanto *Cladosporiumcladosporioides* apresentou diminuição populacional nas concentrações mais elevadas de glifosato.

Os estudos relacionados à biodegradação de agrotóxicos são ferramentas importantes para entender e otimizar a eliminação desses resíduos do ambiente, contribuindo para futuras técnicas de biorremediação com a utilização de microrganismos autóctones. Nesse sentido, o trabalho teve como objetivo realizar uma investigação acerca dos microrganismos presentes no solo, potenciais degradadores do agrotóxico glifosato, provenientes de uma propriedade com uso intensivo desse agrotóxico no município de Laranjeiras do Sul, Paraná – Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de solo foram coletadas em uma propriedade, de aproximadamente 17 ha, localizada no município de Laranjeiras do Sul-PR. Foi escolhida uma área de lavoura homogênea (plantio direto), com uso de glifosato há, aproximadamente, 15 anos. Foram feitas 12 coletas de amostras simples, em pontos aleatórios em caminhamento ziguezague, com profundidade de 0-10 cm. Estas foram reunidas em um recipiente esterilizado, misturadas até obter uma amostra composta homogênea (OLIVEIRA et al., 1990). O isolamento dos microrganismos foi realizado segundo Meyer (2011), com modificações. Para a incubação foi retirada uma amostra de 25 g, de forma aleatória. Dessa última amostra, foi retirado 1 g de solo e inoculado em erlenmeyer de 250 mL, contendo 80 mL de meio mineral mínimo (MM1) (RICHARD; VOGEL, 1999), composição de macronutrientes: KCl 0,7 g/L; KH₂PO₄ 2 g/L; Na₂HPO₄ 3 g/L; NH₄NO₃ 1 g/L; e micronutrientes: 1 mL/L MgSO₄ 4 g/L; FeSO₄ 0,2 g/L; MnCl₂ 0,2 g/L; CaCl₂ 0,2 g/L, pH 7.2, contendo 100 mg/L de glifosato. Posteriormente, o erlenmeyer foi incubado sob agitação horizontal a 150 rpm, à temperatura de 28°C. A cada 5 dias foi realizada uma transferência subsequente de 1 mL do frasco inicial, para novo frasco sob as mesmas condições. Foram feitas mais duas transferências subsequentes, a cada 5 dias, e incubado sob as mesmas condições, para assegurar que o crescimento microbiano ocorresse às expensas do glifosato, como única fonte de carbono. Ao final dos 15 dias foi realizada contagem em placas contendo ágar *Sabouraud* e nutriente, enriquecidos com 100,

200 e 300 mg/L de glifosato, em triplicata. As placas foram incubadas em estufa a 28 °C/5 dias. Os diferentes microrganismos foram isolados, em ágar inclinado, com 300 mg/L de glifosato, sob a mesma temperatura. Bactérias e fungos morfológicamente diferentes foram isolados em ágar nutriente e *Sabouraud* com 300 mg/L de glifosato, respectivamente. Destes, os fungos filamentosos foram identificados quanto ao gênero, por visualização em microscópio ótico e comparação com a literatura (BARNETT; HUNTER, 1998), após a coloração de lâminas preparadas pela técnica de microcultivo. Os dados da contagem de microrganismos, representados pela média e desvio padrão, foram avaliados por meio da ANOVA e as comparações médias foram realizadas pelo Teste de Tukey.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como pode ser observado na Tabela 1, a partir da amostra de solo, foram encontradas contagens estatisticamente semelhantes entre as concentrações de glifosato utilizadas. Isto sugere que, mesmo dobrando ou triplicando a concentração desse agrotóxico, não caracterizou um efeito negativo no número de microrganismos encontrados. Neste sentido outros trabalhos também demonstraram que não houve alteração da contagem de microrganismos isolados de solos com histórico de aplicação de glifosato, Araújo (2003) observou em estudo sobre biodegradação de glifosato no solo, que o número de bactérias presentes no início e ao final de 32 dias de incubação permaneceram constantes. Provavelmente estes solos, provenientes de áreas com histórico de aplicação, possuam microrganismos adaptados, aos quais, o glifosato não apresentaria efeitos adversos. Os resultados apresentados na Tabela 1, sugerem que os microrganismos isolados, também são adaptados a toxicidade do glifosato, podendo ainda, utilizá-lo como fonte de nutriente.

Tabela 1. Quantificação de microrganismos presentes em diferentes concentrações de glifosato.

Glifosato (mg/L)	(UFC/g solo)**
Bactérias (Incubadas por 48 h)	
100	41,16 x 10 ⁶ ± 3,53 ^a
200	55,80 x 10 ⁶ ± 4,47 ^a
300	58,50 x 10 ⁶ ± 4,47 ^a
Fungos (Incubados por 5 dias)	
100	17,16 x 10 ³ ± 1,08 ^a
200	20,33 x 10 ² ± 1,78 ^a
300	12,00 x 10 ² ± 1,08 ^a

*Médias ± desvio padrão de três repetições, seguidas pela mesma letra na linha, não diferem entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

** UFC = Unidade formadora de colônia.

Em experimento sobre a contagem de microrganismos em solo exposto ao glifosato, Ratcliff et al. (2006) relatou que esporos fúngicos foram levemente elevados, enquanto que bactérias e hifas fúngicas não foram afetadas após a adição de 50 mg/Kg de glifosato. Weaver et al. (2007) não observaram efeito significativo na abundância de espécies de fungos biomarcados em solos com adição de 0,140 mg/g de glifosato.

Posteriormente, foi realizado o isolamento dos microrganismos presentes nas três diferentes concentrações que apresentaram diferenças visuais na morfologia colonial. Obteve-se como resultado do isolamento: 25 bactérias, seis leveduras e 18 fungos filamentosos.

Foram identificados oito gêneros de fungos filamentosos e dois falsos fungos que possivelmente utilizaram glifosato como única fonte de carbono. De acordo com Amorim (2011) os falsos fungos pertencem ao Reino Chromista e possivelmente à classe *Oomycetes*. Os oito demais fungos identificados pertencem ao Reino Fungi e fazem parte dos fungos verdadeiros. Os gêneros encontrados: *Fusarium* sp., *Aspergillus* sp., *Geotrichum* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. e *Trichoderma* sp. pertencem ao Filo Ascomycota. Esses seis gêneros apresentam como característica básica a formação, após a meiose, de esporos sexuais, os ascósporos, dentro de uma estrutura em forma de saco, o asco. O gênero *Rhizoctonia* sp. pertence ao Filo Basidiomycota, possuem em comum uma estrutura reprodutiva denominada basídio, que produz os basidiósporos, análogos aos ascósporos, mas são produzidos fora do basídio (PELCZAR et al., 1997).

Côrrea (2013) realizou a identificação de gêneros fúngicos tolerantes ao glifosato, isolados de uma amostra de solo da floresta amazônica e obteve como resultado os gêneros: *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp. Adicionalmente, o gênero *Aspergillus* sp. foi identificado como melhor degradador em diferentes concentrações de glifosato (0, 50, 100, 200 e 300 mg/L) a partir de amostras de solos provenientes de fazendas na Arábia Saudita (EMAN et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível isolar bactérias e fungos cultiváveis de amostras de solo com histórico de aplicação de glifosato. Dos 18 fungos filamentosos, potenciais degradadores, destes oito foram identificados como pertencentes aos gêneros: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Rhizoctonia* sp., além de dois falsos fungos. Tanto os fungos quanto as bactérias são microrganismos promissores que podem ser utilizados em técnicas de biorremediação e com isso auxiliar na eliminação do glifosato no solo.

REFERÊNCIAS

- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. Manual de Fitopatologia. 4 ed. Piracicaba: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.
- ARAUJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. *Chemosphere*. Oxford, v. 52, p. 799-804, 2003.
- BARNETT, H. L.; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 4. ed. Minnesota: APS press, 1998. 218 p.
- CARNEIRO, F. F.; AUGUSTO, L. G. S.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; FRIEDRICH, K.; FARIA, N. M. X.; BÚRIGO, A. C.; FREITAS, V.M.T.; GUIDUCCI FILHO, E. Dossiê ABRASCO: Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO. 2ª Parte, 2012. 135 p.
- CATTANI, D.; CAVALLI, V. L. L. O.; RIEG, C. E. H.; DOMINGUES, J. T.; DAL CIM T.; TASCA, C. I.; SILVA, F. R. M. B.; ZAMONER, A., Mechanisms underlying the neurotoxicity induced by glyphosate-based herbicide in immature rat hippocampus: Involvement of glutamate excitotoxicity. *Toxicology*, v. 320, p. 34–45, 2014.
- CAVALLI, V. L. L. O.; CATTANI, D.; RIEG, C. E. H.; PIEROZAN, P.; ZANATTA, L.; PARISOTTO, E. B.; WILHELM FILHO, D.; SILVA, F. R. M. B.; PESSOA-PUREUR, R.; ZAMONER, A. Roundup disrupts male reproductive functions by triggering calcium-mediated cell death in rat testis and Sertoli cells. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 65 p. 335–346, 2013.
- CORREA, L. O. Degradação De Glifosato (N-Fosfometil-Glicina) Por Fungos Isolados De Solo Da Floresta Amazônica. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais). Universidade Do Estado Do Amazonas, Escola De Ciências Da Saúde. Programa De Pós-Graduação Em Biotecnologia e Recursos Naturais Da Amazônia. Manaus, 2013.
- EMAN, A.; ABDEL-MEGEED, A.; SULIMAN, A. M. A.; SADIK, M. W.; SHOLKAMY, E. N. Biodegradation of Glyphosate by fungal strains isolated from herbicide polluted-soils in Riyadh area. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 2, p. 359-381, 2013.
- FORLANI, G.; MANGIAGALLI, A.; MIELSEN, E.; SUARDI, C. M., MENSINK, H.; JANSSEN, P. Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate in soil: evidence for a possible involvement of unculturable microorganisms. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, p. 991-997, 1999.
- GOMEZ, E.; FERRERAS, L.; LOVOTTI, L.; FERNANDEZ, E. Impact of glyphosate application on microbial biomass and metabolic activity in a Vertic Argiudoll from Argentina. *European Journal of Soil Biology*, v. 45, p. 163-167, 2008.

- OLIVEIRA, E.L.; PARRA, M.S. & COSTA, A. Plantio convencional. In: IAPAR (Londrina, PR). Amostragem de solo para análise química: plantio direto e convencional, culturas perenes, várzeas, pastagens e capineiras. Londrina, 1996. p.9-10. (IAPAR - Circular, 90)
- MEYER, D. D. Avaliação da biodegradabilidade de misturas de diesel e biodiesel (B0, B20 e B100) em dois solos com diferentes granulometrias. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Porto Alegre, RS, 2011.
- PELCZAR, M. J. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Microbiologia; conceitos e aplicações. 2. ed., São Paulo: Pearson Makron Books, 1997.
- RATCLIFF A. W., BUSSE M. D., SHESTAK C. J. Changes in microbial community structure following herbicide (glyphosate) addition to forest soils. *Applied Soil Ecology*, v. 34, p. 114–124, 2006.
- RICHARD J. Y., VOGEL T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 44, p. 93-100, 1999.
- ROUSH, R. T.; TABASHNIK, B. E. Pesticide resistance in arthropods. London: Chapman and Hall, 1990. 303 p.
- WARDLE, D. A.; PARKINSON, D. Influence of the herbicide glyphosate on soil microbial community structure. *Plant and Soil*, v. 122, p. 29–37, 1990.
- WEAVER M. A., KRUTZ L J., ZABLOTOWICZ R. M., REDDY K. N. Effects of glyphosate on soil microbial communities and its mineralization in a Mississippi soil. *Pest Management Science*, v. 63, p. 388–393, 2007.