

Bioprospecção de micro-organismos nativos com potencial biorremediador de solos contaminados por herbicidas

Bioprospection of native microorganisms with bio-remediating capacity of soils contaminated by herbicides

Jéssica Maciel Machado¹, Benjamin Dias Osorio Filho², Rodrigo Sanchotene Silva³,
Valeria Pohlmann⁴

RESUMO: Com a intenção de reduzir o uso de insumos químicos, a agricultura orgânica tem crescido de forma considerável. Entretanto, em áreas contaminadas seu desenvolvimento é vetado, sendo necessário um longo período de descontaminação. Uma forma de acelerar este processo é a utilização de biorremediação, que consiste no emprego de micro-organismos vivos, na degradação de pesticidas. O objetivo deste estudo foi realizar o isolamento de micro-organismos com potencial biorremediador de solos contaminados por três herbicidas, e o efeito destes sob os micro-organismos do solo. Para isso, foram realizados testes que consistiram na determinação da emissão de CO₂ pela atividade biológica do solo. O efeito dos contaminantes sob a população microbiana foi avaliado por meio da determinação dos índices de Shannon, Simpson e Pielou. O potencial dos isolados como agentes biorremediadores foi determinado pela avaliação da capacidade de crescimento dos micro-organismos em meio BDA líquido contaminado. Foram isolados 32 micro-organismos, sendo 18 bactérias e 14 fungos. Deste total, seis isolados fúngicos e seis bacterianos foram empregados. O isolado fúngico UERGS-FNI6 demonstrou grande capacidade de se desenvolver em meio líquido contaminado com os herbicidas glifosato e atrazina, tendo seu crescimento estimulado em ambas as situações. Isso também foi verificado para os isolados fúngicos UERGS-FNI4 e UERGS-FNI1 que também tiveram seu desenvolvimento estimulado pelos herbicidas atrazina e glifosato, respectivamente. Quanto aos isolados bacterianos, o UERGS-BNI3 apresentou crescimento satisfatório em meio líquido contaminado por Imazetapir, demonstrando ser resistente a este contaminante, e com potencial para o uso como biorremediadores de solos contaminados com herbicidas.

Palavras-chave: Agricultura orgânica. Agrotóxicos. Biodegradação.

ABSTRACT: Organic farming has grown considerably in the wake of decrease in the use of chemical fertilizers. However, in contaminated areas its development is vetoed, and a long period of decontamination is necessary. A method to speed up the process is the use of bioremediation, or rather, the use of living microorganisms, in the degradation of pesticides. Current study aims at isolating microorganisms with bio-remediator potential of soils contaminated by three herbicides, and the effect of the herbicides on soil microorganisms. Tests were conducted to determine CO₂ emission by soil biological activity. The effect of contaminants under the microbial population

¹ Graduada em Agronomia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), campus Cachoeira do Sul. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brasil.

² Doutor em Ciência do Solo pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UERGS), com estágio doutoral na Universidad Nacional Autónoma de México. Professor Adjunto da Universidade Estadual do Rio Grande do Sul, nos cursos de Bacharelado e Mestrado. Brasil.

³ Doutor em Engenharia pelo Programa de Pós-graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais (PPGE3M) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Professor adjunto da UERGS e Pesquisador Líder do Laboratório de Recuperação e Tratamento de Materiais (LRTM/UERGS). Brasil.

⁴ Graduada em Agronomia pela Universidade Estadual do Rio Grande do Sul (UERGS), campus Cachoeira do Sul. Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Produção Agrícola Familiar na Universidade Federal de Pelotas (UFPEL), Pelotas (RS), Brasil.

was evaluated by determining Shannon, Simpson and Pielou indexes. The potential of isolates as bioremediating agents was determined by the evaluation of the growth capacity of microorganisms in contaminated liquid BDA medium. Thirty-two microorganisms, 18 bacteria and 14 fungi, were isolated. Six fungal isolates and six bacterial isolates were used. The fungal isolate UERGS-FNI6 demonstrated great capacity to develop in liquid medium contaminated with glyphosate and atrazine, and its growth stimulated in both situations. The same was done for fungal isolates UERGS-FNI4 and UERGS-FNI1, which also had their development stimulated by atrazine and glyphosate, respectively. In the case of bacterial isolates, UERGS-BNI3 showed satisfactory growth in liquid medium contaminated by Imazetapir, showing to be resistant to this contaminant, and with potential for use as bioremediators of soils contaminated with herbicides.

Keywords: Biodegradation. Fertilizers. Organic agriculture.

Autor correspondente:Jéssica Maciel Machado: jessimm6@gmail.com

Recebido em: 26/06/2020

Aceito em: 01/04/2021

INTRODUÇÃO

Possuindo como principal objetivo o aumento da produção de alimentos para erradicar a fome, a Revolução Verde, iniciada na década de 60, trouxe para a agricultura um novo modelo de produção, empregando uma série de insumos e tecnologias que proporcionaram a expansão e implantação de lavouras em monocultivo (ALBERGONI *et al.*, 2007). Como resultado, o Brasil está entre os maiores produtores agrícolas e consumidores de agroquímicos do mundo (TAVELLA *et al.*, 2011; PORTO; SOARES, 2012). Esse desempenho deve-se, principalmente, ao desenvolvimento de políticas públicas nacionais que incentivam a utilização destes produtos e facilitam sua comercialização (FAN *et al.*, 2018).

Entre os agroquímicos, os herbicidas são os mais amplamente utilizados na agricultura, empregados para controlar plantas indesejáveis nas lavouras devido ao seu baixo custo e considerável eficiência (VARGAS; ROMAN, 2006; PELLEGRINI *et al.*, 2010). No solo, a molécula de um herbicida pode passar pelos processos de sorção, onde fica retida nos coloides, e dessorção, sendo liberada para a solução do solo. Uma vez na solução do solo podem ser absorvidas pelas plantas ou lixiviadas, podendo alcançar os lençóis freáticos, causando sua contaminação (JUNIOR *et al.*, 2002; BASTOS; SIMONI, 2010).

Em áreas onde foi realizada a aplicação de agroquímicos, o desenvolvimento da agricultura orgânica é impossibilitado, necessitando de um longo período de descontaminação, entre a última aplicação do agroquímico e a consolidação da produção orgânica. O tempo de permanência e o destino destes produtos no solo são dependentes de uma série de fatores, como características físico-químicas da molécula, fatores ambientais, como o índice pluviométrico, e atributos do solo como o teor de matéria orgânica e a capacidade de troca de cátions (CTC) (MANCUSO *et al.*, 2011; SILVA, 2018). Diversos estudos têm demonstrado que a permanência de determinados agroquímicos no solo pode ser superior a um ano, não havendo um período exato para a total degradação do produto no solo. Em casos mais extremos, pode levar décadas para sua degradação completa (BLANCO; VELINE, 2005; JABLONOWSKI *et*

al., 2009; BLANCO; VELINI; BATISTA FILHO, 2010; SEGATTO *et al.*, 2018). No Brasil, a Instrução Normativa 007/99 do Ministério da Agricultura e do Abastecimento exige os prazos de 12 e 18 meses para culturas anuais e perenes, respectivamente.

Como alternativa para acelerar o processo de degradação desses contaminantes, a biorremediação tem sido evidenciada como uma prática eficiente. A técnica consiste na utilização de organismos vivos (micro-organismos e plantas) capazes de se desenvolver em meio contendo o material poluente, reduzindo-o ou até mesmo eliminando sua toxicidade (BELO *et al.*, 2011). Dentre as vantagens do uso da biorremediação, pode-se destacar o custo-benefício, já que se trata de uma técnica de baixo custo quando em comparação as demais técnicas de remediação empregadas. Além de demonstrar maior eficiência na degradação de compostos tóxico e recalcitrantes, pode ser realizada em condições ambientais e de forma segura ao ecossistema (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010; GIMENES, 2010; MALLMANN *et al.*, 2019).

A degradação de agroquímicos por micro-organismos pode ocorrer por duas vias principais: a metabólica e a co-metabólica. A primeira é também chamada de mineralização e resulta na degradação total do poluente, convertendo este a dióxido de carbono (CO₂), água e íons inorgânicos, e proporcionando benefício nutricional para os micro-organismos (JANKE *et al.*, 1985). Na segunda via, há uma degradação parcial das moléculas do pesticida, transformando-os em produtos que não fornecem energia para o seu metabolismo (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Com a intensificação do cultivo de alimentos orgânicos, se torna necessário o aumento das áreas aptas à sua produção. A biorremediação pode ser uma aliada na redução do período de conversão da produção convencional para orgânica. Em estudo realizado por Martins *et al.* (2007), por exemplo, as bactérias testadas foram capazes de degradar 35% da concentração inicial do herbicida S-Metolachlor em apenas 10 dias. Diante desse cenário, esta pesquisa teve como objetivo principal o isolamento de micro-organismos do solo, fungos e bactérias, para serem empregados como agentes biorremediadores de solos contaminados por herbicidas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 COLETA DE SOLO E APLICAÇÃO DE HERBICIDAS

O experimento foi realizado no município de Cachoeira do Sul, sendo o solo coletado no Distrito de Três Vendas, coordenada 29°53'2.94"S, 53°0'28.69"W, em área cultivada com azevém (*Lolium multiflorum*). A profundidade de coleta foi de 0 a 30 cm, sendo o solo classificado como Argissolo Vermelho distrófico típico. Após peneirar o solo coletado, foram separadas quatro amostras de dois quilogramas. Cada uma delas recebeu um dos herbicidas

testados, Imazetapir, Atrazina e Glifosato, nome comercial Zethapyr, Atanor 50 SC e Roundup DI, respectivamente. Uma das amostras permaneceu sem contaminação, sendo empregada como amostra controle. A inoculação do herbicida foi realizada em câmara de fluxo com o auxílio de uma pipeta automática.

A dosagem aplicada foi conforme recomendação vigente na bula do produto e dez vezes o volume recomendado para aplicação a campo para cada um dos herbicidas testados. A fim de se obter uma distribuição homogênea do herbicida adicionado, foi realizada a diluição do agroquímico na quantidade de água necessária para atingir 60% da capacidade de retenção de água do solo empregado, determinada anteriormente conforme metodologia proposta por Monteiro e Frighuetto (2000).

2.2 AVALIAÇÃO DA EMISSÃO DE CO₂ EM SOLO CONTAMINADO

Por meio da técnica de respirometria adaptada, descrita por Silva *et al.* (2007), foi determinada a taxa de emissão de CO₂ do solo, de forma a estimar e correlacionar com a biodegradação. O solo, anteriormente contaminado com dez vezes o volume recomendado, foi esbrugado e pesado em balança de precisão na quantidade de 100 g e acondicionado em recipientes de vidro com volume de 3 L. Utilizou-se como testemunha um copo plástico contendo hidróxido de sódio (NaOH) 1 mol.L⁻¹, e uma amostra de solo sem contaminação, sendo realizadas, para todos os tratamentos, três repetições. O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado.

A incubação ocorreu por 21 dias, realizadas avaliações diárias. A medição da emissão de CO₂ foi realizada por meio de titulação. No décimo primeiro dia de incubação, foram adicionados ao solo 8 g de palha de soja, para que se pudesse avaliar a atividade microbiana no processo de degradação desse material. Diariamente, no momento da titulação, as unidades experimentais foram pesadas e, se necessário, completada a quantidade de água evaporada.

2.3 ISOLAMENTO DOS MICRO-ORGANISMOS

O isolamento dos micro-organismos do solo com potencial biorremediador foi realizado a partir do solo anteriormente contaminado, por meio da metodologia adaptada descrita por Colla *et al.* (2008). As amostras foram inoculadas em meio Batata Dextrose Agar (BDA). Da segunda diluição (10⁻²), foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e realizada a inoculação na superfície do meio. As placas foram incubadas a 28 °C, em câmara de crescimento tipo BOD, marca Solab, modelo SL-224, por durante cinco dias. Por um período de quatro dias foi realizado o acompanhamento do crescimento microbiológico, sendo feitas imagens das placas a cada 12 horas. No quinto dia, o isolamento foi realizado mediante a técnica de esgotamento por estrias.

Para a determinação dos índices de diversidade procedeu-se a diluição do solo contaminado da forma descrita acima, no entanto, a contaminação foi realizada na quantidade recomendada para aplicação a campo e 10 vezes este volume. O solo contaminado permaneceu sob incubação por sete dias, sendo posteriormente diluído e inoculado em placas de petri com dimensões de 60 x 15 mm, contendo meio BDA. Da mesma forma como descrita anteriormente, procedeu-se o monitoramento das placas por cinco dias, sendo realizada a contagem de indivíduos e espécies no quinto dia. Esta foi realizada de acordo com a morfoespécie dos fungos e bactérias que se desenvolveram nas placas inoculadas, avaliado com o auxílio de lupa e microscópio óptico. Foi determinado o número de morfoespécies distintas em cada placa e o número de indivíduos de uma mesma morfoespécie. Foram determinados os índices de Shannon (SHANNON; WEAVER, 1949), Simpson (SIMPSON, 1949) e Pielou (PIELOU, 1969).

Para a avaliação do potencial dos isolados bacterianos em crescer em meio contaminado pelos herbicidas, foi realizada a avaliação em meio BDA líquido. Para isso, o meio BDA, sem a adição de ágar, foi adicionado em tubos de 50 ml do tipo Falcon. A cada tubo contendo 30 ml do meio líquido, foi adicionada uma quantidade do herbicida equivalente a uma concentração de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Cada herbicida foi previamente filtrado utilizando-se de filtro biológico para seringa, com membrana em PES millipore e poros de 0,45 μm .

Os micro-organismos foram inoculados ao meio com o auxílio de uma alça de platina. Após a inoculação os tubos foram mantidos sob agitação a 160 rpm por sete dias em mesa agitadora, marca Solab, modelo SL-180/DT.

A quantificação do crescimento dos isolados foi realizada por meio de pesagem e secagem em estufa. Para isso, após sete dias em que os isolados foram mantidos sob agitação, o meio foi filtrado com o auxílio de filtros de papel. Para que houvesse a completa separação entre a biomassa microbiana e o meio líquido, esperou-se um período de 24 horas até a completa filtração das amostras por gravidade. Após esse período, os filtros contendo as hifas que ficaram retidas foram levados para secagem em estufa a 105 °C por um período de aproximadamente 48 horas. Foram realizadas três repetições em cada tratamento, o controle consistiu em meio líquido inoculado sem a aplicação do herbicida, também com três repetições. Em todos os parâmetros analisados os resultados foram submetidos à análise de variância e quando significativo aplicado o teste de Scott Knott ($p < 0,05$), por meio de programa estatístico Sisvar 5.6 (FERREIRA, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 AVALIAÇÃO DAS TAXAS DE EMISSÃO DE CO₂ EM SOLOS CONTAMINADOS

Ao analisar a emissão de CO₂ pelos micro-organismos naturalmente existentes no solo contaminado, não houve diferença estatística ($p < 0,05$). Entretanto, por meio da análise da Figura 1 é possível verificar um aumento da taxa de emissão de CO₂ após a adição, aos 11 dias, da palha de soja. Naqueles tratamentos que receberam a aplicação do herbicida glifosato percebe-se um leve incremento na emissão de CO₂ após a adição da palha.

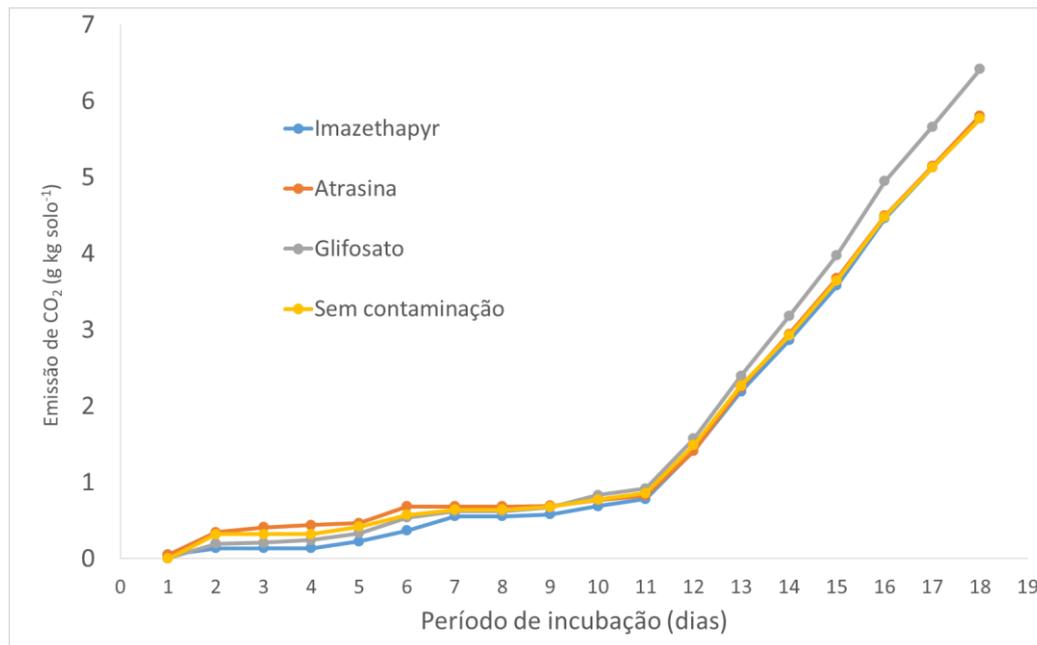


Figura 1. Determinação da emissão de CO₂ relativa aos diferentes herbicidas aplicados ao solo.
Fonte: Autores, 2020.

Avaliando-se a respiração induzida pelo substrato, ao adicionar uma fonte orgânica, como neste caso o herbicida, Andrighetti (2014) encontrou aumentos da taxa de emissão de CO₂ nas amostras de solo que receberam a aplicação de glifosato. Bohm *et al.* (2011) observaram um aumento de 20% e 26,7% na taxa de emissão de CO₂ nos solos que receberam aplicação de glifosato em relação à capina e ao imazetapir. Araújo *et al.* (2003) encontraram resultados semelhantes, obtendo uma taxa média de CO₂ de 0,46 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para o solo que recebeu o herbicida glifosato e 0,37 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ para solo sem aplicação do agroquímico, demonstrando que alguns micro-organismos edáficos podem ser capazes de utilizar as moléculas do herbicida como fonte de carbono. Outra alternativa a ser considerada é que o herbicida possa ter apresentado toxidez para os micro-organismos sensíveis à sua presença no solo, ocasionando sua morte. Isso poderia explicar o aumento das taxas de emissão de CO₂, provocado pela degradação da população microbiana sensível ao glifosato pelos micro-organismos resistentes ou tolerantes a esse herbicida (SOULAS *et al.*, 1984). Quando há repetidas aplicações de glifosato ao solo, verifica-se um aumento da taxa de degradação do produto, explicada pela

adaptação dos micro-organismos presentes no solo e/ou provocada pela seleção de micro-organismos que possuem enzimas específicas para metabolizá-lo (ROBERTSON; ALEXANDER, 1994; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Em doses muito superiores às aplicadas a campo, Maly, Siqueira e Moreira (2006) verificaram um efeito inibitório do crescimento de *Bradyrhizobium* spp. e algumas espécies de fungos micorrízicos arbusculares em meio de cultura adicionado do produto comercial Roundup®, formulado à base de glifosato. Com relação às estirpes de rizóbios, *Bradyrhizobium elkanii* se mostrou mais resistente ao glifosato do que a estirpe *Bradyrhizobium japonicum*. Demichelli *et al.* (2019) isolaram diferentes micro-organismos capazes de crescer em solo contaminado por glifosato, entre eles: *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Geotrichum* sp., *Fusarium* sp., *Trichoderma* sp., *Penicillium* sp., *Rizoctonia* sp., *Penicillium* sp. Já Nogueira *et al.* (2021) e Andrighetti *et al.* (2014) encontraram efeito negativo sob o crescimento dos micro-organismos testados, reforçando a existência de seleção de micro-organismos resistentes ao glifosato provocada pela aplicação do herbicida. Evidencia-se, portanto, que a seleção e isolamento de micro-organismos específicos capazes de metabolizar esse herbicida são essenciais para o sucesso da biorremediação.

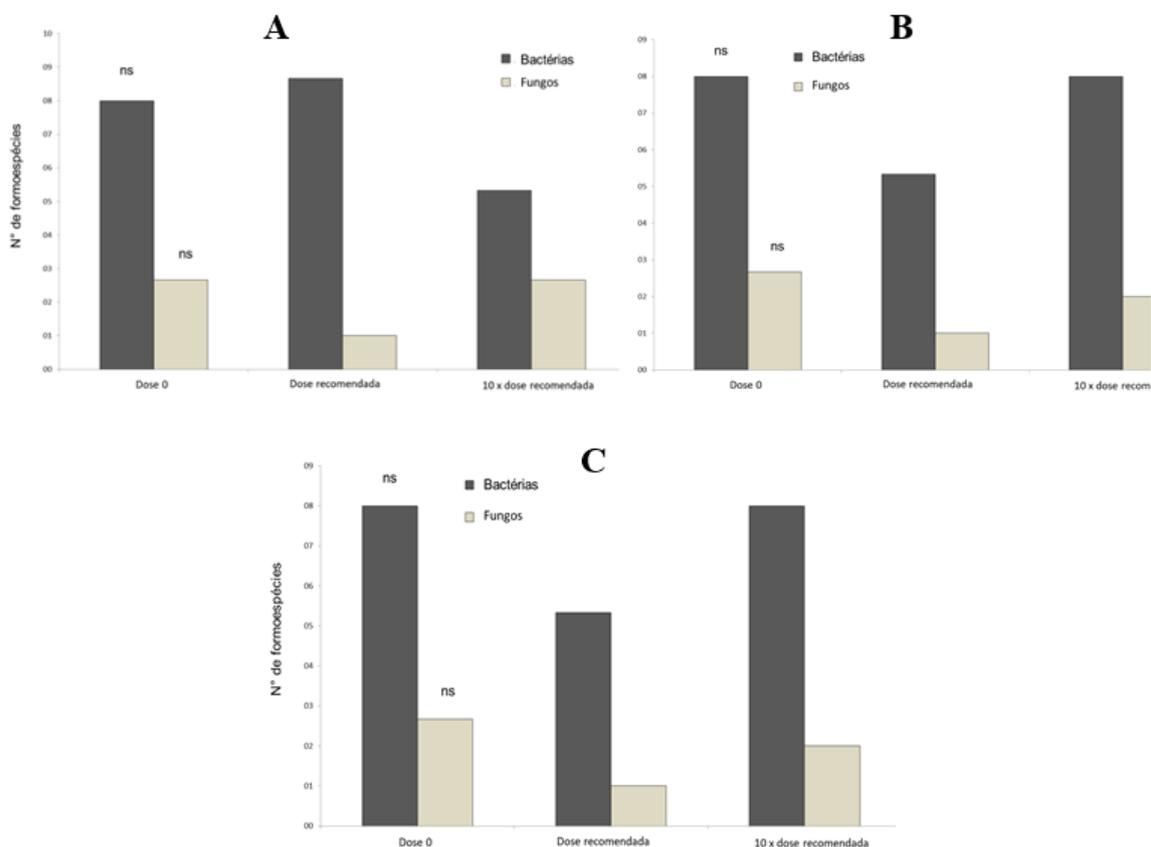
3.2 ISOLAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS

Os índices de Shannon, Pielou e Simpson não apresentaram diferença significativa entre os tratamentos propostos. Ao avaliar o efeito de herbicidas pré-emergentes na fauna edáfica, Silva *et al.* (2012) também obtiveram resultados semelhantes, não havendo diferença estatística entre tratamentos para estes mesmos índices. Lupwayi *et al.* (2009) observaram que os herbicidas 2,4-D, glifosato, ethalfluralin, setoxidim, ethametsulfuron e clopyralid em diferentes aplicações e combinações não refletiram na variância do índice de Shannon, em solo com plantio de canola.

O índice de Simpson avalia a abundância das espécies mais comuns em determinado local, sendo um índice de dominância (LIMA *et al.*, 2019). Assim, quanto menor for este índice, maior será a diversidade da comunidade encontrada no local (SILVA *et al.*, 2012). Mesmo não diferindo estatisticamente, é possível observar que a testemunha, sem aplicação dos herbicidas, apresentou uma tendência a reduzir o índice de Simpson. Essa observação reforça a discussão do teste anterior, demonstrando que os herbicidas provocam uma redução do número de espécies e favorecimento de espécies específicas que possuem enzimas capazes de metabolizar esses herbicidas.

Quando comparado de forma individual, para cada herbicida, nenhum dos parâmetros analisados nesta etapa do experimento diferiram estatisticamente entre o número de morfoespécies de fungos ou bactérias, solo com e sem contaminação e a dose de herbicida aplicada. Não obstante, é possível observar pela análise da Figura 2 (A, B e C) que a aplicação

dos herbicidas provocou uma redução do número de morfoespécies, principalmente para fungos.



ns: não significativo pelo teste de análise de variância ANOVA

Figura 2. Número de morfoespécies de fungos e UFC bacterianas em função das doses de aplicação do herbicida (A) glifosato, (B) atrazina e (C) imazetapir na dose recomendada e dez vezes mais.

Fonte: Autores, 2020.

A comparação entre herbicidas, mostrada na Figura 3, demonstra que as placas que receberam solo contaminado por imazetapir apresentaram o menor número de morfoespécies fúngicas, enquanto que o solo sem nenhuma contaminação, o maior número. Esse herbicida apresenta como modo de ação na planta a inibição da enzima acetolactato sintase (ALS), responsável pela síntese de aminoácidos (STUART, 2006). A mesma enzima pode ser encontrada também em fungos e bactérias, atuando na síntese de aminoácidos de cadeia ramificada, valina, leucina e isoleucina, por uma via comum às plantas (DUGGLEBY; PANG, 2000). Essa similaridade entre as enzimas de ambos os grupos possibilita a ação do imazetapir não apenas sobre as plantas, mas também sobre os fungos do solo, influenciando em seu metabolismo (STUART, 2006; BOTELHO; MONTEIRO, 2011).

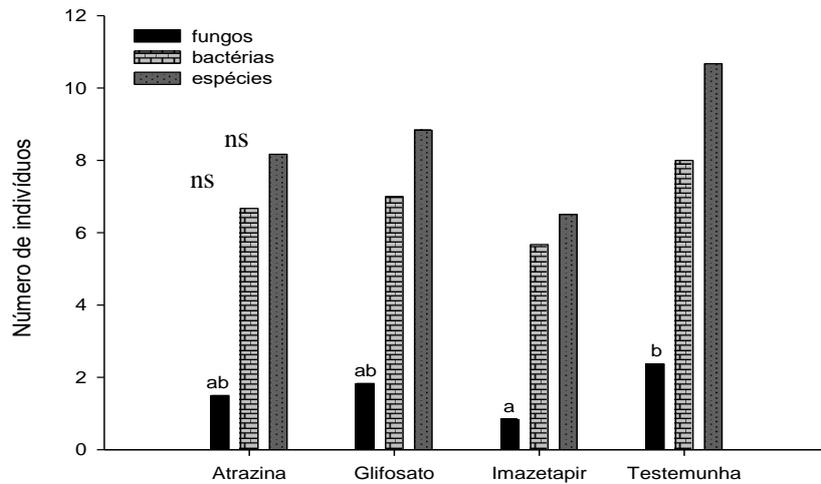


Figura 3. Número de morfoespécies para cada um dos herbicidas aplicados. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade de erro.

Fonte: Autores, 2020.

Botelho e Monteiro (2011) verificaram que o herbicida imazetapir, pertencente a mesma família do imazetapir e com o mesmo modo de ação, afetou o crescimento micelial e a viabilidade dos conídios de *B. bassiana*, bem como provocou uma redução do crescimento micelial e esporulação do fungo *M. anisopliae*, quando em comparação com a testemunha.

As amostras de solo contaminado por glifosato e atrazina não diferiram significativamente. Para o número de espécies totais e de bactérias não houve diferença significativa. Outros trabalhos também concluíram que a aplicação de glifosato não altera o número de bactérias, como Araújo (2002), Castro Júnior *et al.* (2006) e Maria *et al.* (2020). Demichelli *et al.* (2020) constataram que mesmo triplicando a concentração desse herbicida no solo não houve efeito negativo sobre o crescimento de fungos e bactérias. Com diferentes doses de atrazina em um solo do semiárido, Ros *et al.* (2006) observaram que o número de unidades formadoras de colônias bacterianas para solos com 100 e 1000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de atrazina foi maior do que para os tratamentos de 1 e 10 $\mu\text{g g}^{-1}$. Kolekar *et al.* (2019) isolaram diferentes bactérias com a capacidade de degradar esse herbicida, com destaque para os gêneros *Rhodococcus sp.* e *Bacillus sp.* Góngora-Echeverría *et al.* (2020) identificaram 21 espécies de bactérias com a capacidade de degradar diferentes herbicidas, sendo a do gênero *Ochrobactrum sp.* a que melhor degradou os herbicidas Atrazina e Glifosato. Isso demonstra grande resistência de bactérias na presença desses herbicidas, sugerindo o potencial destas como agentes biorremediadores de solos contaminados.

Observando-se a Figura 3, é possível verificar que houve uma redução geral na ocorrência de fungos e bactérias em comparação com a testemunha, sugerindo a morte desses micro-organismos ocasionada pela toxidez do herbicida aplicado. Embora essa alteração da comunidade microbiana não tenha sido estatisticamente significativa para todos os parâmetros

analisados neste trabalho, nos sistemas naturais alterações microbiológicas provocadas pelo uso de xenobióticos podem causar desequilíbrios na dinâmica do solo, causando prejuízos para as atividades agrícolas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TRIQUES, 2021; WIN, 2021).

No total, foram isolados 32 micro-organismos de solo contaminado com cada um dos três herbicidas, sendo 18 bactérias e 14 fungos. Deste total, seis fungos e seis bactérias foram selecionados para avaliação em meio líquido contaminado por cada herbicida. Na Tabela 1 é possível verificar a partir de qual contaminante do solo esses isolados foram bioprospectados.

Tabela 1. Capacidade de crescimento dos isolados empregados neste estudo em meio contaminado pelos herbicidas testados

Isolados Bacterianos	Contaminação original
UERGS-BNI1	Atrazina
UERGS-BNI2	Atrazina
UERGS-BNI3	Imazetapir
UERGS-BNI4	Glifosato
UERGS-BNI5	Glifosato
UERGS-BNI6	Glifosato
Isolados Fungicos	Contaminação original
UERGS-FNI1	Atrazina
UERGS-FNI2	Glifosato
UERGS-FNI3	Glifosato
UERGS-FNI4	Atrazina
UERGS-FNI5	Glifosato
UERGS-FNI6	Imazetapir

Fonte: Autores, 2020.

Foi possível verificar diferença significativa nos tratamentos que receberam aplicação do herbicida glifosato e inoculação com fungo. Cada um dos seis isolados fúngicos diferiu da testemunha. Apesar de ter sido verificada uma diminuição do crescimento dos fungos em meio contaminado em quatro dos seis isolados testados, os isolados UERGS-FNI1 e UERGS-FNI6 apresentaram um maior crescimento quando comparado com a testemunha, mostrada na Figura 4-A. Castro Junior *et al.* (2006), ao testarem o efeito do herbicida glifosato sob microbiota do solo, verificaram que o herbicida não apresentou efeito tóxico sob as cepas *Fusarium* testadas. Os autores reportaram a capacidade desses fungos em crescer mesmo na ausência de nitrogênio e fósforo, demonstrando que estes micro-organismos foram capazes de utilizar o herbicida como fonte de nutriente. Demichelli (2016) identificou 11 fungos capazes de utilizar o glifosato como fonte de C, com destaque para os gêneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. e *Geotrichum* sp. Para os isolados bacterianos, a aplicação ou não do herbicida afetou seu crescimento (Figura 4-B).

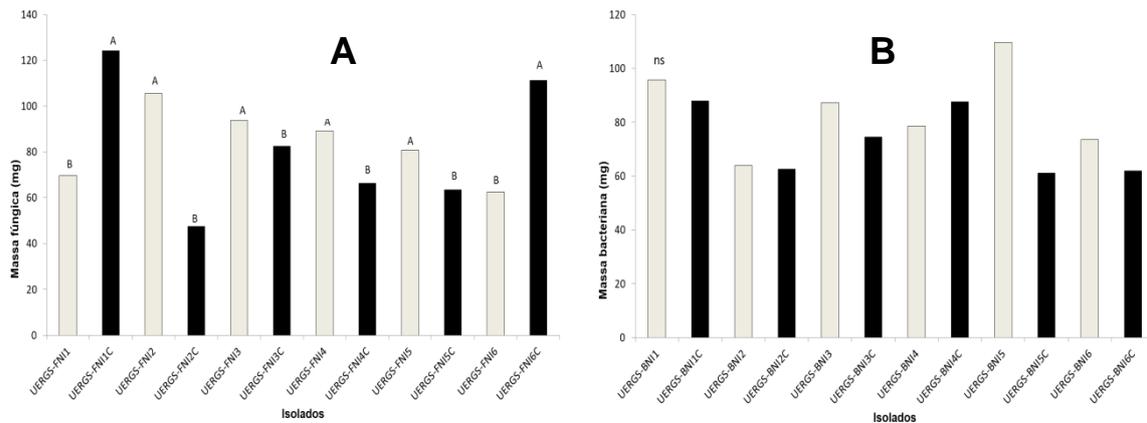


Figura 4. Crescimento de isolados fúngicos (A) e bacterianos (B) em meio líquido com e sem a aplicação do herbicida glifosato. A letra C no final do nome das amostras indica a contaminação do meio com o herbicida. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% de probabilidade de erro. ns: não significativo pelo teste de análise de variância ANOVA.

Fonte: Autores, 2020.

Quando aplicado o herbicida atrazina, obteve-se diferença significativa entre as médias que foram inoculadas com bactérias, não havendo diferença para os isolados fúngicos, mostrado na Figura 5-AB. Houve uma expressiva redução do crescimento bacteriano nos tratamentos que receberam o herbicida, para todas as seis bactérias inoculadas. Esses dados corroboram os encontrados por Godoi *et al.* (2012), que ao avaliar o efeito deste herbicida na população bacteriana do solo, encontraram um efeito negativo sob a abundância de espécies. É possível indicar que o grupo mais afetado pelo herbicida foi o dos planctomicetos com uma abundância 57% menor em solo contaminado, seguido do grupo de bactérias nitrificadoras e proteobactérias.

Mesmo não apresentando diferença significativa, os fungos UERGS-FNI4 e UERGS-FNI6 apresentaram maior valor médio de crescimento em meio contaminado com o herbicida do que em meio sem o contaminante, demonstrando uma possível tendência de resistência ou tolerância a Atrazina, conforme observado na Figura 5-A.

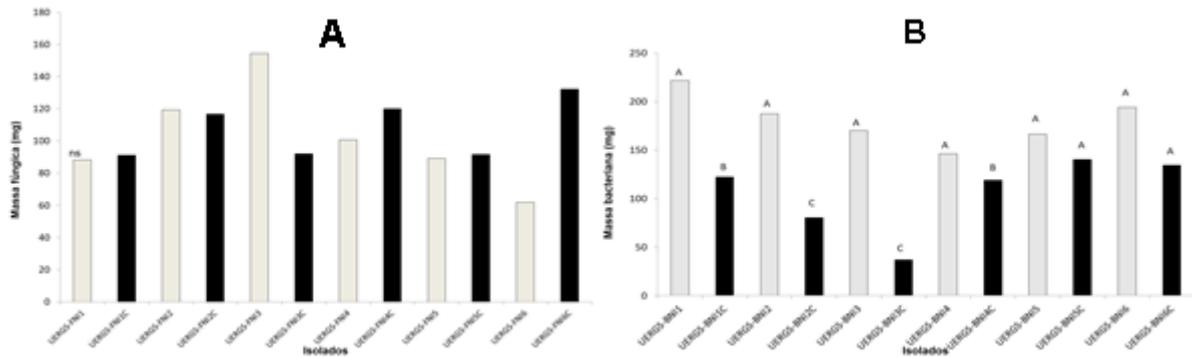
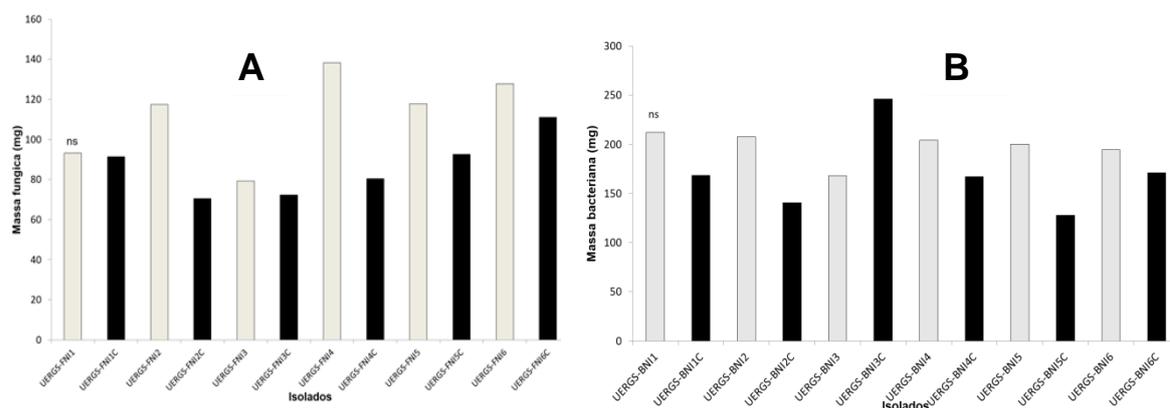


Figura 5. Crescimento de isolados fúngicos (A) bacterianos (B) em meio líquido com e sem a aplicação do herbicida atrazina. A letra C no final do nome das amostras indica a contaminação do meio com o herbicida. Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott Knott a 1% de probabilidade de erro. ^{ns}: não significativo pelo teste de análise de variância ANOVA.

Fonte: Autores, 2020.

Nos meios de cultura acrescidos do herbicida imazetapir, independente do micro-organismo inoculado, não foi constatada diferença significativa (Figura 6-AB). Entretanto, pode-se verificar que houve uma redução do crescimento de fungos, todos os seis isolados apresentaram uma menor taxa de crescimento quando em comparação com os isolados que foram inoculados em meio não contaminado. Já os isolados bacterianos, embora verifique-se uma redução do crescimento de cinco dos seis isolados testados, a bactéria UERGS-BNI3 apresentou um maior crescimento em meio contaminado. Comparando esse isolado com os demais, nota-se um maior crescimento com relação a todos os outros isolados testados, incluindo a própria morfoespécie em meio sem contaminação, como observado na Figura 6-B.

Diante dos resultados obtidos com este estudo, é possível verificar que os herbicidas, comumente utilizados na agricultura para controle de plantas espontâneas, influenciam de forma direta sob a microbiota do solo. Essa influência negativa afetará não apenas esses micro-organismos, mas toda a dinâmica do sistema solo e conseqüentemente sua capacidade produtiva.



Fonte: Autores, 2020.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado fúngico UERGS-FNI6 demonstrou grande capacidade de se desenvolver em meio líquido contaminado com os herbicidas glifosato e atrazina, tendo seu crescimento estimulado em ambas as situações. O mesmo foi verificado para os isolados fúngicos UERGS-FNI4 e UERGS-FNI1, que também apresentaram desenvolvimento estimulado pelos herbicidas atrazina e glifosato, respectivamente.

Quanto aos isolados bacterianos, o UERGS-BNI3 apresentou crescimento satisfatório em meio líquido contaminado por imazetapir, demonstrando uma possível resistência a esse contaminante.

Os micro-organismos UERGS-FNI6, UERGS-FNI4, UERGS-FNI1 e UERGS-BNI3 apresentam potencial biorremediador para atuar em metodologias que proporcionem a descontaminação de solos.

REFERÊNCIAS

ALBERGONI, L.; PELAEZ, V. Da revolução verde à agrobiotecnologia: ruptura ou continuidade de paradigmas? **Revista de Economia**, v. 33, n. 1, 2007.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ANDRIGHETTI, Marília Scopel *et al.* Biodegradação de glifosato pela microbiota de solos cultivados com macieira. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 38, n. 5, p. 1643-1653, 2014.

ARAÚJO, A. S. F. de. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade de São Paulo, 2002.

ARAÚJO, A. S. F. *et al.* Biodegradação de glifosato em dois solos brasileiros. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, 2003.

BASTOS, F. A.; SIMONI, J. A. Determinação da variação de entalpia da interação entre o herbicida glifosato e os íons cálcio, cobre, zinco e alumínio em solução aquosa por calorimetria por titulação isotérmica. **Augmdomus**, La Plata, v. 2, n. 1, p. 60-71, 2010.

BELO, A. F. *et al.* Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta daninha**, v. 29, n. 4, p. 821-828, 2011.

BLANCO, F. M. G.; VELINI, E. D. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com soja e seu efeito em culturas sucedâneas. **Planta Daninha**, v. 23, n. 4, p. 693-700, 2005.

BLANCO, F. M. G.; VELINI, E. D.; BATISTA FILHO, A. Persistência do herbicida sulfentrazone em solo cultivado com cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 69, n. 1, p. 71-75, 2010.

BOHM, G. M. B. *et al.* Controle de plantas daninhas, biomassa e metabolismo microbiano do solo em função da aplicação de glifosato ou imazetapir na cultura da soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 32, n. 3, p. 919-929, 2011.

BOTELHO, A. A. A.; MONTEIRO, A. C. Sensibilidade de fungos entomopatogênicos a agroquímicos usados no manejo da cana-de-açúcar. **Bragantia**, v. 70, n. 2, p. 361-369, 2011.

CASTRO JÚNIOR, J. V.; SELBACH, P. A.; ZÁCHAAYUB, M. A. Avaliação do efeito do herbicida glifosato na microbiota do solo. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 16, 2006.

COLLA, L. M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

DEMICHELLI, F. N. *et al.* 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. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 3, n. 1, p. 2-8, 2020.

DEMICHELLI, F. N. *et al.* **Isolamento, seleção e avaliação do potencial de biodegradação de glifosato (n-(Fosfometil) glicina) por microrganismos isolados de solo de lavoura, em Laranjeiras do Sul, PR**. 2016. Dissertação de mestrado - Universidade Federal da Fronteira Sul.

DUGGLEBY, R. G.; PANG, S. S. Acetohydroxyacid synthase. **BMB Reports**, v. 33, n. 1, p. 1-36, 2000.

FAN, F. M. *et al.* Resíduos de agrotóxicos em água e solo de município em região produtora de fumo no Rio Grande do Sul. **Saúde coletiva, desenvolvimento e (in) sustentabilidades no rural**. p. 89-108, 2018.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação. **Biociência & Desenvolvimento**, v. 34, p. 36-43, 2005.

GIMENES, L. J. **Fungos Basidiomicetos**. Instituto de Botânica de São Paulo. São Paulo, 2010.

GODOI, I. **Impacto da presença de atrazina na comunidade bacteriana do solo**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) - Universidade Estadual do Oeste do Pará, 2012.

GÓNGORA-ECHEVERRÍA, V. R. *et al.* Pesticide bioremediation in liquid media using a microbial consortium and bacteria-pure strains isolated from a biomixture used in agricultural areas. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 200, p. 110734, 2020.

JABLONOWSKI, N. D. *et al.* Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 7, p. 2126-2131, 2009.

JANKE, D.; FRITSCH, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. **Journal of basic microbiology**, v. 25, n. 9, p. 603-619, 1985.

JUNIOR, O. P. *et al.* Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química nova**, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.

KOLEKAR, P. D. *et al.* Microcosm study of atrazine bioremediation by indigenous microorganisms and cytotoxicity of biodegraded metabolites. **Journal of Hazardous Materials**, v. 374, p. 66-73, 2019.

LIMA, S. A. O.; FREITAS, A. J. R.; ANDRADE, H. A. Diversidade da malacofauna associada à distribuição de *Anomalocardia flexuosa* (Linnaeus, 1767) (Mollusca: Bivalvia) em uma praia arenosa tropical. **Biotemas**, v. 32, n. 4, p. 51-62, 2019.

LUPWAYI, N. Z. *et al.* Soil microbial response to herbicides applied to glyphosate-resistant canola. **Agriculture, ecosystems & environment**, v. 129, n. 1-3, p. 171-176, 2009.

MALLMANN, V. *et al.* As Vantagens da Biorremediação na Qualidade Ambiental. **Ensaio e Ciência**, v. 23, n. 1, p. 12-15, 2019.

MALTY, J. S.; SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F. M. S. Efeitos do glifosato sobre microrganismos simbióticos de soja, em meio de cultura e casa de vegetação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 2, p. 285-291, 2006.

MARIA, M. A. *et al.* Efeito do Herbicida Roundup Original® a base de glifosato em organismos não alvo utilizando modelo mesocosmo. **Revista em Agronegócio e Meio Ambiente**, v. 13, n. 1, p. 279-300, 2020.

MARTINS, P. F. *et al.* Selection of microorganisms degrading s-metolachlor herbicide. **Brazilian archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 153-159, 2007.

MONTEIRO, R. T. R.; FRIGHETTO, R. T. S. Determinação da umidade, pH e capacidade de retenção de água do solo. *In: Indicadores biológicos e bioquímicos da qualidade do solo*, [S.l: s.n.], 2000.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. Microbiologia e bioquímica do solo **UFLA, Lavras**, 2006.

NOGUEIRA, O. M. N. *et al.* Tolerância de microrganismos eucariotos ao herbicida glifosato. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 42, n. 1, p. 103-112, 2021.

PELLEGRINI, L. G. *et al.* Produção de forragem e dinâmica de uma pastagem natural submetida a diferentes métodos de controle de espécies indesejáveis e à adubação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2380-2388, 2010.

PIELOU, E. C. **An introduction to mathematical ecology**. New York: Wiley Interscience, 1969. 286p.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisa inovadora. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 17-31, 2012.

ROBERTSON, B. K.; ALEXANDER, M. Growth-linked and cometabolic biodegradation: Possible reason for occurrence or absence of accelerated pesticide biodegradation. **Pesticide Science**, v. 41, n. 4, p. 311-318, 1994.

ROS, M. *et al.* Molecular and physiological bacterial diversity of a semi-arid soil contaminated with different levels of formulated atrazine. **Applied Soil Ecology**, v. 34, n. 2-3, p. 93-102, 2006.

SEGATTO, A. *et al.* Fitotoxicidade do herbicida imazethapyr na cultura da aveia em sucessão com arroz irrigado. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 10, n. 2, 2018.

SHANNON, C. E.; WEAVER, W. **The Mathematical Theory of Communication**. Urbana: University of Illinois Press, 1949. 131p.

SILVA, E. E.; DE AZEVEDO, P. H. S.; DE-POLLI, H. Determinação da respiração basal (RBS) e quociente metabólico do solo (qCO₂). **Embrapa Agrobiologia-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)**, 2007.

SILVA, P. V. da. **Comportamento ambiental e bioatividade sobre plantas daninhas de herbicidas residuais aplicados sobre a palha de cana-de-açúcar em diferentes condições hídricas do solo**. 2018. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2018.

SILVA, R. F. *et al.* Influência da aplicação de herbicidas pré-emergentes na fauna do solo em sistema convencional de plantio de cana-de-açúcar. **Biotemas**, v. 25, n. 3, p. 227-238, 2012.

SIMPSON, E. H. Measurement of diversity. **Nature**, New York, v. 163, n. 4148, p. 688, 1949.

SOULAS, G.; CHAUSSOD, R.; VERGUET, A. Chloroform fumigation technique as a means of determining the size of specialized soil microbial populations: application to pesticide-degrading microorganisms. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 16, n. 5, p. 497-501, 1984.

STUART, R. M. **Comunidade de fungos endofíticos associada à cana-de-açúcar convencional e geneticamente modificada**. 2006. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, 2006.

TAVELLA, L. B. *et al.* O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 06-12, 2011.

TRIQUES, Maria Carolina *et al.* Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2, 4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 208, p. 111622, 2021.

VARGAS, L.; ROMAN, E. S. Resistência de plantas daninhas a herbicidas: conceitos, origem e evolução. **Embrapa Trigo-Documents (INFOTECA-E)**, 2006.

WIN, P. M.; MATSUMURA, E.; FUKUDA, K. Effects of Pesticides on the Diversity of Endophytic Fungi in Tea Plants. **Microbial Ecology**, p. 1-11, 2021.