

# ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA GLIFOSATO N-FOSFONOMETIL-GLICINA

Adriana da Fonseca de SOUZA; João Vicente Braga de SOUZA  
Bolsista PIBIC/PAIC/FAPEAM; Orientador INPA/CSAS

## 1. Introdução

A preocupação pelo uso intensivo de herbicidas tem aumentado, principalmente sobre sua poluição massiva do solo. Os herbicidas são os produtos mais comercializados do mundo, face à necessidade de controle de ervas indesejáveis na agricultura. Neste sentido, o herbicida Glifosato tem sido amplamente utilizado, devido sua eficiente capacidade de controlar ervas daninhas (Forlani *et al.* 1999).

O glifosato é um potente herbicida de pós-emergência, largo espectro, não seletivo, capaz de controlar efetivamente 76 das 78 plantas invasoras mais agressivas (Gruys e Sikorski 1999). O Glifosato é degradado por microrganismos em solos, entretanto, vários metabólicos têm sido identificados. Caso estes metabólicos não sejam degradados, irão persistir no solo, tornando-se, desse modo, recalcitrantes no ambiente (Rodrigues e Alemida 1995). O herbicida pertence à classe de compostos, conhecidos como ácidos fosfônicos, que contém uma ligação direta de carbono-fósforo, que é quimicamente estável, mas os microrganismos possuem habilidade enzimática de clivar a ligação e liberar fosfato inorgânico (Kertesz *et al.* 1994).

Os fungos são os responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos (celulose, hemicelulose, lignina, quitina...) (Paul e Clark 1989). Em termos de processos e biomassa, são também os organismos dominantes no solo. Em muitos solos, a biomassa dos fungos pode exceder a de outros organismos juntos (excluindo as raízes de plantas) por um fator de 10:1 (Thorn 2000), embora os fungos sejam numericamente de menor prevalência em muitos solos (Pepper *et al.* 1996). Os fungos filamentosos são os envolvidos na degradação de substratos orgânicos e, por sua vez, no comportamento e mitigação de poluição. Com uma diversidade de sistemas enzimáticos, são importantes biodegradadores de agrotóxicos (Pepper *et al.* 1996).

O objetivo deste trabalho foi investigar o isolamento de fungos com capacidade de degradar e converter herbicida glifosato N-fosfonometil-glicina em biomassa de solo contaminado artificialmente com o mesmo

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Isolamento e identificação de linhagens fúngicas de solo contaminado por herbicida Glifosato.

Foi coletado manualmente nas proximidades do Laboratório de Micologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA (Latitude sul 03°09'39", Longitude leste 59°98'77"), 1kg de solo (10 cm de profundidade) o qual foi contaminado com 200 ppm de herbicida Glifosato. Esse solo foi contaminado e incubado por 7 dias à temperatura ambiente em um recipiente de plástico fechado e lacrado (30 x 10 cm).

O isolamento dos fungos foi realizado utilizando a metodologia convencional de diluição, onde em um tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada colocou-se um grama da amostra do solo já contaminado, sendo esta a primeira diluição chamada ( $10^{-1}$ ). A segunda diluição foi realizada transferindo-se 1000 µl da primeira diluição, contendo água destilada contaminada com o solo para o tubo de ensaio ( $10^{-2}$ ) e assim sucessivamente até a diluição ( $10^{-5}$ ). Amostras de 100 µl foram plaqueadas em Meio de Cultura BDA (Batata-Dextrose-Ágar). As placas foram mantidas em temperatura ambiente por 7 dias, onde durante este período realizou-se a purificação das colônias. Os fungos isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo DBA, para serem identificados e conservados para o crescimento de colônias puras.

A identificação dos isolados fúngicos foi realizada segundo (Pit *et al.* 2000 e Lacaz 1998) onde foi observada a macromorfologia (através da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas e da velocidade de crescimento das mesmas) e de sua micromorfologia (por meio de microcultivo em lâmina, onde são visualizadas as estruturas fúngicas de reprodução, como as hifas vegetativas, os conídios e os esporos, o que proporciona uma correta identificação das colônias selecionadas nas placas de coleta).

### 2.2 Determinação da tolerância dos isolados ao Glifosato

Os isolados foram inoculados, em triplicata, em placas contendo o meio Ágar Batata adicionado de herbicida Glifosato nas concentrações de 0, 3, 6, 9 e 12 g/L e essas foram incubadas a 28°C por 7 dias. A cada 48 horas foi avaliado o crescimento radial da cultura.

### 2.3 Bioconversão do herbicida Glifosato em Biomassa

Em erlenmeyers de 125 mL foram colocados 50 mL de um meio líquido contendo 0,5 g/L de extrato de levedura, denominado (A), tendo como controle cada erlenmeyer, meio de cultura com 1g/L de Glifosato e 0,5g/L de Extrato de Levedura, denominado (B). As dez linhagens fúngicas isoladas foram inoculadas no meio, para que fosse analisado potencial de bioconversão do herbicida em biomassa pelos isolados. Os erlenmeyers foram lacrados mantidos a temperatura ambiente por 7 dias.

Após o período de incubação (sete dias), procedeu-se a quantificação da biomassa micelial por meio da técnica de peso seco. As culturas foram filtradas em papel de filtro (seco) de massa conhecida. A biomassa e o papel foram secos em estufa de circulação forçada por 48 horas à 70°C. A biomassa e o papel foram pesados e a biomassa foi calculada.

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Isolamento e identificação de linhagens fúngica de solo contaminado por herbicida Glifosato.

Foram isolados dez fungos do gênero *Aspergillus* a partir de solo contaminado com herbicida Glifosato. Os mesmos foram purificados (Figura 2) e identificados (Tabela 1), observando-se a macromorfologia (através da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas e da velocidade de crescimento das mesmas) e de sua micromorfologia (através do microcultivo em lâmina, onde são visualizadas as estruturas fúngicas de reprodução, como as hifas vegetativas, os conídios e os esporos, o que proporciona uma correta identificação das colônias selecionadas nas placas de coleta).

#### 3.2 Determinação da tolerância dos isolados ao Glifosato:

A tolerância das linhagens ao herbicida glifosato (N-fosfonometil-glicina) foi avaliada por meio da avaliação do crescimento dos isolados em cultura suplemento pelo herbicida, esse ensaio foi realizado em triplicata. Ensaio controle foram realizados cultivando o microrganismo em meio de cultura sem glifosato (Tabela 2 e Figura 2). Os isolados *Aspergillus* 13N10-2, *Aspergillus* 14N10-1, *Aspergillus* 12N10-3 e *Aspergillus* 6N10-4 somente cresceram no ensaio controle. Os isolados *Aspergillus* 10V10-4, *Aspergillus* 7N10-4 e *Aspergillus* 8M10-4 desenvolveram-se em concentrações entre 3-9 g/L do herbicida (Tabela 2) e os isolados *Aspergillus* 9V10-4, *Aspergillus* 1V10-5 e *Aspergillus* B10-5 apresentaram a maior tolerância ao herbicida (12 g/L).

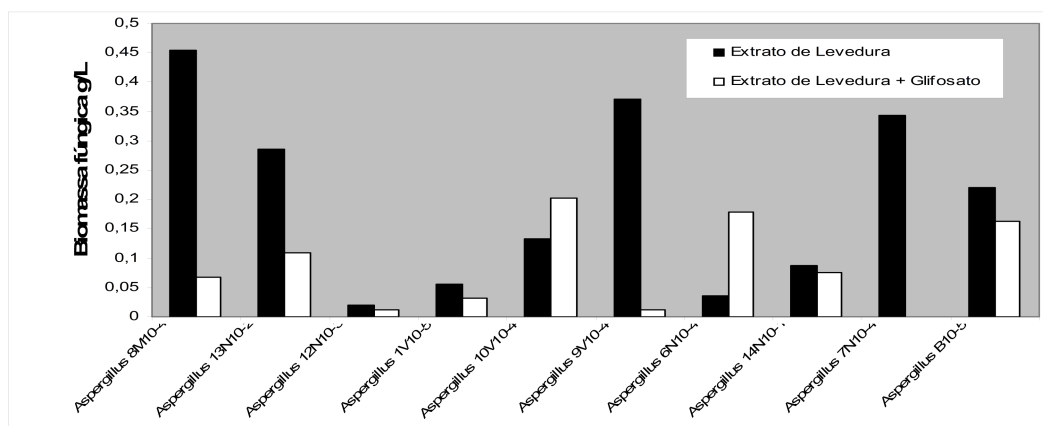
Os impactos do Glifosato na microbiota e os processos biológicos do solo têm sido bastante estudados (Busse et al. 2001). Quanto à tolerância, especificamente em estudos realizados com a microbiota do solo, (Záchaayub e Castro 2006), observaram que o herbicida nas concentrações usuais na agricultura não inibe o crescimento dos microrganismos. Esse resultado está de acordo com o descrito no trabalho realizado por (Wardle & Parkinson 1990), (Grossbard & Harris 2009); (Souza, Ferreira e Silva 2010) e existem relatos que descreveram até mesmo estímulo no crescimento microbiano heterotrófico (Roslycky, 1982).

Por outro lado, a literatura possui vários trabalhos que demonstram a nocividade do glifosato (Quinn et al., 1988; Gorchach-Lira et al. 1997).

Um experimento realizado por (Laatikainen e Tanski 2009) demonstrou a dificuldade de encontrar isolados fúngicos tolerantes a concentrações maiores que 200 ppm do herbicida. No presente trabalho alguns fungos isolados foram capazes de tolerar concentrações de a 12.000ppm, no entanto, fica clara a capacidade deste herbicida em inibir o crescimento de outros isolados. Portanto, provavelmente, o herbicida impõe ao solo uma seleção que culmina na diminuição da diversidade do solo e aumento do desenvolvimento de microrganismos tolerantes ou até mesmo que utilizem o glifosato como fonte de nutriente.

#### 3.3 Bioconversão do herbicida Glifosato em Biomassa

Foi realizado ensaio de bioconversão de glifosato em biomassa. A Figura 3 apresenta o crescimento do isolados em meio de cultura contendo somente extrato de levedura e em meio contendo extrato de levedura e glifosato. A maior parte dos isolados foram inibidos pela presença do glifosato. Os isolados que apresentaram melhor conversão do glifosato em biomassa foram *Aspergillus* 10V10-4 e *Aspergillus* 6N10-4. (Ternan, McMullan e Quinn 2008) realizaram experimentos que demonstram que os microrganismos que degradam Glifosato podem vir a utilizar o composto como fonte de fósforo (por meio de liases C-P) ou como aporte de carbono e nitrogênio.



**Figura 3-** Crescimento dos isolados (g/L) em meio de cultura contendo somente extrato de levedura (controle) e em meio contendo extrato de levedura e glifosato (experimental). Experimento realizado em triplicata. Erros experimentais inferiores a 10% da média.

#### 4. Conclusão

A metodologia de isolamento utilizada neste trabalho selecionou de forma adequada microrganismos tolerantes ao Glifosato, bem como, eficazes na conversão em biomassa o herbicida.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Almeida, M.E.S. 1988. Identificação da microbiota fúngica de ambientes considerados assépticos. *Revista de Saúde Pública*, 22:201-206.
- Busse, M.D. et al. 2001. *Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control and soil on soil microbial communities*. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, 33: 1777-1789.
- Gorlach, K.; Stefaniak, O.; Slizak, W.; Owedyk, I. 1997. The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup. *Microbiological Research*, 152:319-329.
- Gruys K J, Sikorski J A. 1999. Inhibitors of Tryptophan, Phenylalanine and Tyrosine Biosynthesis as Herbicides (Dekker, New York).
- Kertez, M. A.; Cook, A. M.; Leisinger, T. 1994. Microbial metabolism of sulfur and phosphorus-containing xenobiotics. *FEMS Microbiology Review*, 15: 195-215.
- Lacaz, C.L. 1998. Guia para identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico.
- Paul, E. A.; Clark, F. E. 1989. Soil as a habitat for organisms and their reactions. *Soil Microbiology and Biochemistry*. 6: 275-277.
- Pepper, I. L.; Gerba, C. P.; Brusseau, M. L. 1996. Pollution science. Academic Press, 34: 397-399.
- Pitt, J.I.; Basílico, J.C.; Abarca, M.L.; López, C. (2000). Mycotoxins and toxigenic fungi. *Medical Mycology*, 38:41- 46.
- Quinn, J.P.; Peden, J.M.M.; Dick, R.E. 1988. Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 29: 511-516.
- Riddel, R.W. 1950. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture *Mycology*, 42:265-270.
- Rodrigues, B. N.; Almeida, F. S. 1995. *Guia de herbicidas*. 16: 696-699.
- Roslycky, E.B. 1982. Glyphosate and the response of the soil microbiota. *Soil Biology and Biochemistry*, 14: 87-92.
- Souza, A.P.; Ferreira, F.A.; Silva, A.A. 2010 Respiração microbiana do solo sob doses de glifosato e imazapir. *Planta Daninha*, 17: 245-262.
- Thorn, R. G. 2000. *Soil fungi*. Handbook of soil science. 38: 22-23.
- Torstensson, L. 1980. *Role of microorganisms in decomposition. Interactions between herbicides and the soil*. Academic Press, 44: 349 -351.
- Wardle, D. A.; Parkinson, D. 1990. Effects of three herbicides on soil microbial biomass and activity. *Plant Soil*, 122: 21-28.