

# CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS E FUNGOS ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DE SULFENTRAZONA EM SOLOS

C. O. Martinez<sup>1</sup>, C. M. M. S. Silva<sup>1</sup> y E. F. Fay<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Meio Ambiente, CP 69, Jaguariúna, SP, CEP: 13820-000, Brasil; e-mail: cclia@cnpma.embrapa.br

**RESUMO.** Uma vez que microrganismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar agrotóxicos, é possível fazer a biorremediação de sítios contaminados, empregando-se microrganismos previamente selecionados. Logo, o isolamento, a caracterização e a identificação de microrganismos, com capacidade para metabolizar compostos potencialmente tóxicos, é de suma importância para a biorremediação. Não há registros na literatura sobre a identificação de microrganismos que degradem a sulfentrazona. Esse herbicida destaca-se como um dos mais utilizados nas principais culturas do Brasil. Assim, é necessário determinar quais os microrganismos que podem estar envolvidos em sua dissipação. Para isso solos sem histórico da aplicação do herbicida foram suplementados com sulfentrazona como única fonte de carbono e energia. Após 255 dias de incubação foram retiradas amostras para o isolamento e identificação dos microrganismos resistentes e ou degradadores do herbicida. Após a diluição em série, alíquotas foram plaqueadas em meio de cultura mínimo suplementado com o herbicida. As colônias que cresceram foram isoladas e selecionadas em meio de cultura mínimo líquido suplementado com concentrações crescentes de sulfentrazona. Após três repicagens os microrganismos foram plaqueados e purificados em meio mínimo sólido. As bactérias e actinomicetos foram identificados pelo perfil de ácidos graxos da membrana celular. Os fungos foram isolados e identificados com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura e o uso de manual de identificação. As bactérias degradadoras de sulfentrazona foram identificadas como *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* e *Methylobacterium radiotolerans*. Os fungos isolados e identificados como degradadores deste herbicida pertencem aos gêneros *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

## 1.- Introdução

A biotransformação de herbicidas tem sido objeto de estudo, devido ao potencial elevado destes compostos orgânicos à contaminação ambiental. A disponibilidade destes compostos para os microrganismos do solo depende dos fatores temperatura e umidade, uma vez que ambos afetam sua adsorção ao solo, influenciando a bioatividade e a persistência dos mesmos (Beulke et al., 2004). Além disso, em escala de campo, a temperatura ótima para degradação de compostos orgânicos é a mesofílica (ao

redor de 25°C a 40°C), e a umidade do solo tem efeito direto e profundo na proliferação dos microrganismos e suas atividades (Fay & Silva, 2004).

O herbicida sulfentrazona destaca-se como objeto de estudo para biotransformação. Ele é um dos herbicidas mais utilizados nas principais culturas do Estado de São Paulo (Fairbanks, 2005). Esta molécula é um ácido fraco que tem uma constante de dissociação (pKa) de 6,56, logo, pode estar nas formas neutra (em pH < 6,56) e aniônica (em pH > 6,56) em solos agrícolas. Em solos arenosos e em valores de pH que excedem seu pKa, sua adsorção diminui e cresce sua susceptibilidade a lixiviação e escoamento superficial (Grey et al., 1997; Grey et al., 2000). Este herbicida é altamente móvel, persistente, tem um alto potencial para contaminação de águas, e é considerado perigoso ao meio ambiente (Agrofit, 2002; EPA, 2003). A degradação microbiana do herbicida sulfentrazona é algo a ser explorado, uma vez que ainda não há relatos referentes a esta ocorrência, e que facilitaria o desenvolvimento de futuros estudos de biorremediação de locais contaminados. Além disso, não há informação sobre os microrganismos que possam estar envolvidos no processo. Assim, o objetivo desse trabalho foi isolar e identificar microrganismos degradadores do herbicida sulfentrazona.

## 2.- Material e métodos

Foram utilizados três solos representativos das regiões de uso da sulfentrazona no Brasil: Latossolo vermelho escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA). Para cada tipo de solo, sem histórico de aplicação do herbicida, foram retiradas dez sub-amostras ao acaso, à profundidade de 0-10cm, as quais foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma amostra composta para cada solo. Em laboratório as amostras foram peneiradas em malha de 2mm e mantidas em câmara fria a 4°C até sua utilização. De cada amostra composta foram retiradas sub-amostras (150g) que foram acondicionadas em Erlenmeyer, e incubadas a temperatura ambiente por uma semana para equilíbrio da população microbiana. Posteriormente os solos foram suplementados com sulfentrazona (FMC Química do Brasil; grau técnico; 91,93% de pureza) na concentração de campo (0,7µg g<sup>-1</sup>), sendo, logo em seguida, ajustado seu teor de umidade com água esterilizada, para 70 % da capacidade de campo. Os frascos foram mantidos a 27°C e a umidade foi mantida constante, por meio de pesagens efetuadas periodicamente. As amostras controle constaram de solo sem aplicação do herbicida. Com 30, 60, 120, 180 e 255 dias de incubação,

amostras foram retiradas para avaliação da degradabilidade do herbicida, através de quantificação por cromatografia gasosa.

Após os 255 dias foram isolados microrganismos das amostras de solo com e sem herbicida. Em Erlenmeyers foram pesados 10g de cada solo e adicionados 90mL de água. Após agitação manual, procedeu-se as diluições em série. As diluições foram feitas com água destilada autoclavada, precedidas do plaqueamento de 0,1mL das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  para o isolamento de bactérias, fungos e actinomicetos em meio de cultura mínimo (1000 mL água; 3 g  $\text{NaNO}_3$ ; 1 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{KCl}$ ; 0,01 g  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 16 g ágar). Os isolamentos procedentes de solo com o herbicida foram realizados em meios de cultura suplementados com sulfentrazona ( $0,7\mu\text{g mL}^{-1}$ ) como única fonte de carbono e energia, o qual foi adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem. Meio sem o herbicida foi usado como controle. As colônias de bactérias, actinomicetos e fungos que cresceram após 2, 7 e 17 dias foram isoladas. As colônias de actinomicetos e de bactérias foram então inoculadas em meio mínimo líquido, suplementado com diferentes concentrações de sulfentrazona (2,13; 4,22 e  $7,0\mu\text{g a.i. mL}^{-1}$ ) para seleção dos microrganismos resistentes e/ou degradadores do herbicida. As culturas foram transferidas três vezes, seguindo o mesmo procedimento, em um período de quinze dias. Posteriormente procedeu-se a diluição em série, transferindo-se alíquota de 1mL da suspensão ( $10^{-1}$ ) a um tubo de ensaio contendo 9mL de água destilada, e assim sucessivamente até a diluição  $10^{-4}$ . Alíquotas (0,1mL) das diluições  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$  foram plaqueadas em meio mínimo sólido com as mesmas doses do herbicida já utilizadas anteriormente. Após a inoculação as placas foram mantidas sob incubação a  $27^\circ\text{C}$ . Depois de quatro dias de crescimento procedeu-se a contagem das colônias formadas. Essas foram isoladas e purificadas, de acordo com diferenças morfológicas visuais. Foram identificadas as bactérias tolerantes às doses maiores do herbicida pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular, usando o Microbial Identification System desenvolvido por Microbial ID (MIDI, Newark, DE). Os ácidos graxos da membrana celular foram extraídos pelo método de Sasser (1990) e foram separados por cromatografia gasosa. Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector de ionização de chama (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas ChemStation A.09.01 [1206] e MIDI Sherlock Microbial Identification System 4.0. A biblioteca selecionada foi a TSBA 40. O tempo da corrida de cada amostra foi de 20,7 minutos. O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contém área de picos e tempo de retenção nomeados. O resultado final foi apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão (Microbial, 2001).

Os fungos isolados foram mantidos em meio Sabouraud (Tuite, 1969) até a identificação. Eles foram observados quanto as suas características morfológicas (coloração e

conformação micelial), e submetidos à microscopia óptica. Para facilitar a identificação algumas linhagens foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo esta também aplicada para ilustração das linhagens tolerantes ao herbicida. Para visualização em MEV, adaptou-se a metodologia de Nogueira e Barroso (1998). A determinação do gênero das linhagens fez-se mediante o uso de manual de identificação (Barnett & Hunter, 1972).

### 3.- Resultados e Discussão

Houve efeito da ausência\*presença do herbicida sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de actinomicetos nos três solos estudados. Para o crescimento de bactérias, somente o solo LVA apresentou baixa evidência do efeito do herbicida em UFC, enquanto para os solos AVA e LVA este efeito foi identificado na comunidade fúngica.

Conforme os resultados da análise estatística (Teste t de Student; Tab. 1), baseada nos microrganismos cultiváveis em meio de cultura (1% de 100 milhões  $\text{g}^{-1}$  solo), nota-se que o crescimento de bactérias foi favorecido pelo herbicida no solo AVA ( $P=0,0632$ ), e afetado negativamente no solo LVE ( $P=0,01410$ ), enquanto no solo LVA não se observou diferença no crescimento nos solos com e sem herbicida ( $P=0,1846$ ). O contrário ocorreu para o crescimento fúngico, o qual foi favorecido pelo herbicida no solo LVE ( $P=0,00069$ ) não sendo afetado por ele nos solos LVA e AVA ( $P>0,14$ ). O crescimento de actinomicetos foi estimulado na presença do herbicida em todos os solos ( $P\leq 0,02$ ). As bactérias isoladas do solo AVA e LVA foram capazes de crescer nos meios contendo  $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$  de sulfentrazona. Para o solo LVE, houve um crescimento muito pequeno ( $<25$  UFC placa $^{-1}$ , em diluição  $10^{-2}$ ) nas doses 2,13 e  $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Entre as linhagens bacterianas selecionadas como potenciais degradadoras de sulfentrazona, pelo seu crescimento em dose até 10 vezes superior a dose de campo, no solo LVE, a espécie *Nocardia brasiliensis* (tolerante a dose  $4,22\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi encontrada em maior número. Enquanto no solo AVA foi a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* (tolerante a dose  $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já no solo LVA se destacaram em número as espécies *Ralstonia pickettii* e *Rhizobium radiobacter* (tolerante a dose  $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Os fungos isolados e identificados do solo LVA com aplicação de sulfentrazona, selecionados como possíveis degradadores do herbicida, foram *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. As linhagens isoladas do solo controle foram *Aspergillus* sp., duas linhagens de *Penicillium* sp., *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces*. *Penicillium* sp. foi o único fungo isolado do solo LVE como possível degradador de sulfentrazona. Para o solo AVA foram isolados e identificados como possíveis degradadores do herbicida os fungos *Chrysosporium* sp., duas linhagens de *Eupenicillium* sp., *Metarrhizium* sp. e *Paecilomyces* sp. *Penicillium* sp. foi isolado e identificado apenas no solo controle.

Tabela 1. Avaliação do efeito do herbicida sulfentrazone no número médio de unidades formadoras de colônias microbianas isoladas dos solos LVE, LVA e AVA, mediante aplicação do Teste t de Student.

Organismos	Solo	Sulfentrazone (0,7µg g <sup>-1</sup> )	Média <sup>a</sup> (UFC)	Limite inferior <sup>b</sup>	Limite superior <sup>b</sup>	Valor p <sup>c</sup>
Actinomiceto	AVA	Ausente	303,33	116,885	489,78	
Actinomiceto	AVA	Presente	696,67	341,571	1051,76	
Actinomiceto	AVA	Diferença <sup>a</sup>	393,33			0,02393
Actinomiceto	LVA	Ausente	203,33	119,923	526,59	
Actinomiceto	LVA	Presente	753,33	414,239	1092,43	
Actinomiceto	LVA	Diferença	550,00			0,00727
Actinomiceto	LVE	Ausente	233,33	175,965	290,70	
Actinomiceto	LVE	Presente	523,33	312,060	734,61	
Actinomiceto	LVE	Diferença	290,00			0,02135
Bactéria	AVA	Ausente	1046,67	588,390	1504,94	
Bactéria	AVA	Presente	1440,00	960,877	1919,12	
Bactéria	AVA	Diferença	393,33			0,06325
Bactéria	LVA	Ausente	1233,33	795,721	1670,95	
Bactéria	LVA	Presente	1826,67	506,953	3146,38	
Bactéria	LVA	Diferença	593,33			0,18463
Bactéria	LVE	Ausente	433,33	225,001	641,67	
Bactéria	LVE	Presente	33,33	18,991	47,68	
Bactéria	LVE	Diferença	-400,00			0,01401
Fungos	AVA	Ausente	22,33	-14,288	58,96	
Fungos	AVA	Presente	2,67	-0,202	5,54	
Fungos	AVA	Diferença	-19,67			0,14626
Fungos	LVA	Ausente	7,00	-3,828	17,83	
Fungos	LVA	Presente	2,00	-0,484	4,48	
Fungos	LVA	Diferença	-5,00			0,18019
Fungos	LVE	Ausente	11,33	-19,327	41,99	
Fungos	LVE	Presente	109,33	77,295	141,37	
Fungos	LVE	Diferença	98,00			0,00069

a) Diferença entre o número de UFC das amostras com e sem sulfentrazone.

b) Valor 1000 vezes menor do que o observado (divididos por 1000).

c) Valor P relativo ao teste t.

Outros trabalhos já demonstraram a participação de bactérias do gênero *Nocardia* na degradação do herbicida atrazina Mulbry *et al.* (2002); *Methylobacterium organophilum* e *Methylobacterium radiotolerans* apresentaram capacidade para degradar tebutiuron, e *Rhodococcus equi*, o herbicida hexazinona (Mostafa & Helling, 2003). A influência de agrotóxicos sobre grupos bacterianos com importante função na transformação do nitrogênio do solo tem sido o foco de muitos estudos. Em geral, os herbicidas têm pouca influência sobre a amonificação do solo (Das & Mukherjee, 1998).

Linhagens de *Penicillium* também têm sido isoladas como degradadoras de herbicidas. O fungo *Penicillium steckii* degradou o herbicida simazine (Kodama *et al.*, 2001) enquanto o fungo *Penicillium cyclopium* foi o mais ativo na degradação de fototiazuron, um fotoproducto do herbicida tidiazuron (Benezet & Knowles, 1982). O fungo *Cladosporium oxysporum* degradou 89% do inseticida endosulfan (1.83mg kg<sup>-1</sup>) em 15 dias (Mukherjee & Mittal, 2005).

#### 4.- Conclusão

Não foram encontrados na literatura artigos que abordem o isolamento e a identificação de microrganismos degradadores do herbicida sulfentrazone. No presente trabalho linhagens bacterianas e fúngicas foram selecionadas como potenciais degradadoras deste herbicida

em solos suplementados com o herbicida para enriquecimento dos microrganismos e incubados por 255 dias. A meia-vida do herbicida foi de 146,5 no solo LVA; 172,4 no solo AVA e 91,6 no solo LVE (dados não mostrados).

#### Referências

- AGROFIT. Disponível:  
[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons/](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons/)  
 Consultado em: 25 set. 2004.
- BARNETT, H L y HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3<sup>rd</sup>. ed. Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1972. 241 p.
- BENEZET, H. J. y KNOWLES, C. O. Microbial degradation of thidiazuron and its photoproduct. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 11, p. 107-110, 1982.
- BEULKE, S., BROWN, C. D., FRYER, C. J. y BEINUM, W. van. Influence os kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere*, v. 57, p. 481-490, 2004.
- DAS, A. y MUKHERJEE, D. Persistence of phorate and carbofurano in relation to their effect on the mineralization of C, N and P in alluvial soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.61, p.709-715, 1998.
- EPA. Federal Register: Sulfentrazone; Pesticide Tolerances, 2003. Disponível em:  
<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm> Consultado em: 25 set. 2004.
- FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam mercado. Disponível em:  
[http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos\\_agricolas.htm](http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos_agricolas.htm)  
 Consultado em: 03 mar. 2005.
- FAY, E. F. y SILVA, C. M. M. S. Persistência de moléculas xenobióticas. In: SILVA, C. M. S.; FAY, E. F. (Ed.). *Agrotóxicos & ambiente*.

- Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 221-257.
- GREY, T. L., WALKER, R. H., DAYAN, F. E., WEETE, J. D., HANCOCK, H. G. y KWON, O. Behavior of sulfentrazone in ionic exchange resins eletrophoresis gels, and cation-saturated soils. *Weed Science*, v. 48, p. 239-247, 2000.
- GREY, T. L., WALKER, R. H. y HANCOCK, H. G. Sulfentrazone adsorption and mobility affected by soil and pH. *Weed Science*, v. 45, p. 733-738, 1997.
- KODAMA, T., DING, L., YOSHIDA, M. y YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p. 1073-1078, 2001.
- MICROBIAL identification system operating manual. Newark: MIDI, Inc, 2001. 145 p.
- MOSTAFA, F. I. y HELLING, C. S. Isolation and 16S DNA characterization of soil microorganisms from tropical soils capable of utilizing the herbicides hexazinone and tebuthiuron. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, v. 38, p. 783-797, 2003.
- MULBRY, W. W., ZHU, H., NOUR, S. M. y TOPP, E. The triazine hydrolase gene atzN from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, v. 206, p. 75-79, 2002.
- NOGUEIRA, N. L. y BARROSO, P. A. V. Microscopia eletrônica aplicada aos estudos de ecologia microbiana. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.279-307.
- TUTTE, J., 1969. *Plant Pathology Methods: Fungi and Bacteria*. Burgess, Minneapolis, MD, 239pp.