



Bioprospecção de microrganismos resistentes e/ou degradadores de herbicidas

Anderson Ferreira¹, Fernando Adami Tcacenco²,
José Alberto Noldin³ e Domingos Sávio Eberhardt⁴

Resumo – O uso de herbicidas facilita o controle das plantas daninhas, mas preocupa quando o assunto é impacto ambiental. Por isso, muitos cientistas vêm somando forças para entender mais sobre os herbicidas e as suas relações com o ambiente. Foi realizado um estudo com o objetivo de isolar microrganismos com genes de resistência e/ou degradação de herbicidas utilizados na cultura do arroz. Foram realizados dois experimentos: 1) verificação da presença de microrganismos em um tanque de descarte de agrotóxicos; 2) isolamento de microrganismos de dois frascos do herbicida Bispyribac-sodium (Nominee[®]), um novo e outro em uso, e a capacidade desses microrganismos usarem o agrotóxico como única fonte de carbono. Foram utilizados os meios de cultura nutriente-ágar (NA), Sabouraud e meio mínimo (MM). No experimento 1 constatou-se a presença de microrganismos no tanque de descarte. No experimento 2 foram isolados microrganismos do interior dos dois frascos de herbicida testados. Ainda nesse experimento, observou-se a capacidade de utilização do herbicida pelos microrganismos. As cepas isoladas neste trabalho foram purificadas e direcionadas para testes de resistência e/ou degradação de outros agrotóxicos.

Termos para indexação: pesticidas, biodegradação, resistência a herbicidas.

Bioprospection of herbicide-resistant microorganisms

Abstract – Herbicides are efficient tools for controlling weeds in crops; however there are many environmental concerns associated with their use. Scientists are developing strategies to better understand the relationships between herbicide use and damage to the environment. The present work aimed to isolate microorganisms with genes for resistance to, or degradation of the herbicides utilized in rice fields. Two experiments were carried out: 1) to verify the presence of microorganisms in a tank where herbicides, insecticides and other agricultural products are discharged; 2) to verify the presence of microorganisms in flasks of the herbicide Nominee[®]. In this last experiment, the capacity of the microorganisms to use the herbicide as their only carbon source was also tested. The culture media nutrient-agar (NA), Sabouraud and minimal medium (MM) were used. In experiment 1, the presence of microorganisms was verified in the discard tank. In experiment 2, microorganisms were isolated from a new and a used flask of the herbicide. The capacity of the microorganisms to use the herbicide as a source of carbon was proven. The strains isolated in this work were purified and addressed for experiments to test their resistance to other herbicides, as well as the capacity to degrade them.

Index terms: pesticides, biodegradation, herbicide resistance.

Introdução

A presença de plantas daninhas infestando áreas de arroz irrigado traz contratempos a essa atividade

agrícola, porém a evolução tecnológica vem facilitando o seu controle, que pode ser feito através de métodos preventivos, culturais, biológicos, ou químicos, de forma

isolada ou integrada. No tocante ao impacto ao ambiente, esses métodos variam desde aquele em que tende a ser pequeno ou nulo, como o controle biológico, até

Aceito para publicação em 16/8/05.

¹Biólogo, Esp., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, C.P. 277, 88301-970 Itajaí, SC, fone: (47) 3341-5241, fax: (47) 3341-5255, e-mail: ferreirabiotec@epagri.rct-sc.br.

²Eng. agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: tcacenco@epagri.rct-sc.br.

³Eng. agr., Ph.D., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: noldin@epagri.rct-sc.br.

⁴Eng. agr., M.Sc., Epagri/Estação Experimental de Itajaí, e-mail: savio@epagri.rct-sc.br.

aquele em que tende a ser mais severo, como é o caso do controle químico. A maior eficiência do controle químico em relação aos demais métodos e a sua praticidade são os principais motivos pelos quais ele é utilizado com intensidade. No entanto, isso ocasiona problemas à agricultura pelo surgimento de plantas daninhas resistentes (Noldin et al., 2002), persistência dos herbicidas na água e na lavoura (Noldin et al., 2003), redução de organismos do zooplâncton em lavouras (Resgalla Jr. et al., 2002) e toxicidade de herbicidas a alguns vertebrados de água doce (Della Penna et al., 2004), não se descartando também toxicidade ao homem.

Esses problemas estão instigando cientistas a realizar pesquisas no intuito de diminuir as doses aplicadas, melhorar as práticas de manejo e substituir produtos com alto poder de persistência por outros passíveis de biodegradação (Noldin et al., 2003). De acordo com Melo & Azevedo (1997), alguns fatores podem favorecer a persistência dos agrotóxicos no meio: perda do potencial degradativo por parte dos microrganismos, concentração do produto, forma inacessível da molécula ao ataque de microrganismos, toxidez e insolubilidade. Os microrganismos podem ser capazes de degradar moléculas complexas de pesticidas e auxiliar nos processos de descontaminação de áreas impactadas (Melo, 2002). Em estudos exploratórios para verificar a ocorrência de microrganismos em solos cuja cultura de arroz irrigado recebeu aplicação de herbicidas, bem como a ocorrência de bactérias endofíticas nessas plantas (Ferreira et al., 2003; 2004), tem-se observado grande diversidade de microrganismos, principalmente no solo, os quais provavelmente conseguem utilizar os herbicidas como fonte de carbono.

Outra área de aplicação desses microrganismos é o isolamento de genes bacterianos de resistência a herbicidas para a criação de plantas transgênicas em várias culturas, como soja, milho, algodão e canola. Dentre os exemplos de genes bacterianos usados em plantas

transgênicas, pode ser citado o caso da soja "Roundup Ready", que recebeu um gene oriundo de espécie bacteriana, o qual lhe conferiu característica de resistência à molécula de glyphosate. Segundo Brown (2003), com o uso da biologia molecular é possível identificar e selecionar genes de interesse, principalmente em microrganismos. As técnicas de introdução desses genes em plantas já são dominadas pelos cientistas, no entanto a busca por organismos doadores de genes é incessante. Sendo assim, fazem-se necessários estudos exploratórios visando à obtenção de organismos resistentes a herbicidas, visto que os mesmos podem ser usados como doadores de características importantes para organismos transgênicos.

O objetivo do presente trabalho foi isolar microrganismos de um tanque de descarte de agrotóxicos e de frascos do herbicida Bispyribac-sodium, que se estima ser aplicado em mais de 50 mil hectares de arroz irrigado em Santa Catarina, para utilizá-los como fonte de genes de resistência de plantas a herbicidas ou como degradadores de herbicidas no ambiente.

Material e métodos

O trabalho foi realizado no Laboratório de Biotecnologia Vegetal da Epagri/Estação Experimental de Itajaí, sendo conduzidos dois experimentos:

1) Ocorrência de microrganismos em um tanque de descarte de agrotóxicos: coletou-se uma amostra da água de um tanque no qual os restos de agrotóxicos (herbicidas, fungicidas, inseticidas e adjuvantes) da Estação Experimental de Itajaí vêm sendo descartados nos últimos dez anos. Aliquotas de 100µl foram inoculadas em placas de Petri com os meios de cultura nutriente-ágar (NA) e Sabouraud.

2) Ocorrência de microrganismos em frascos do herbicida Nominee 400 SC® (Bispyribac-sodium-400g/L): inicialmente inocularam-se alíquotas de 100µl do Nominee®. As alíquotas foram provenientes de dois frascos do herbicida, um novo e um já em uso há cerca de um ano, e as ino-

culações foram feitas em placas de Petri com meio NA. Posteriormente, repetiu-se a inoculação em placas de Petri com meio mínimo (MM) suplementado com 100µl de herbicida proveniente do frasco novo. A suplementação foi feita pela adição de 5µl de herbicida proveniente do frasco novo por mililitro de meio, sendo o herbicida adicionado após a autoclavagem do meio, quando a temperatura estava próxima dos 50°C. Adicionalmente, inoculou-se uma alíquota de 100µl do herbicida proveniente do frasco usado em MM sem suplementação. Como controles extras para este experimento, foram incubadas placas contendo meio NA inoculado com herbicida autoclavado. O frasco novo foi aberto em condições assépticas para garantir a ausência de contaminação decorrente do manuseio.

O delineamento experimental foi o completamente casualizado, com quatro repetições e quatro controles (placas sem inóculo) por meio de cultura. Os procedimentos foram realizados em condições assépticas e a temperatura de incubação foi de 32°C.

Nos dois experimentos, foi avaliada a presença de colônias fúngicas e bacterianas, sendo contados os números de unidades formadoras de colônia (UFCs) em cada tratamento. Os isolados foram também classificados quanto à sua morfologia e coloração e foram incorporados ao banco de cepas do laboratório. Sempre que pertinente, os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste Duncan a 5% de probabilidade de erro.

Resultados e discussão

Experimento 1 – observou-se crescimento de microrganismos nos dois meios de cultura utilizados. No meio de cultura NA, que não apresenta especificidade quanto aos microrganismos que nele se desenvolvem, cresceram somente bactérias. O número médio de UFCs foi de 1.023,0 ±54,4 por placa e apareceram dois tipos morfocromáticos: pequena/marrom e pequena/hialina. No meio de cultura Sabouraud, que apresenta especificidade para fungos, ►

criaram duas colônias fúngicas. Os controles de ambos os meios de cultura foram negativos.

A bioprospeção de microrganismos mostra-se como uma ferramenta eficiente para estudos investigatórios de locais aparentemente inóspitos, como os tanques de descarte de agrotóxicos. Desta forma, os resultados obtidos neste experimento, embora inesperados, indicam que os microrganismos encontrados são candidatos a apresentarem resistência ou a serem degradadores de agrotóxicos, condições essas que garantiriam sua sobrevivência em um local adverso.

Experimento 2 – houve crescimento de colônias fúngicas e bacterianas nas placas contendo o meio NA, com diferenças entre os tratamentos. O número de colônias fúngicas foi superior no frasco usado, mas o inverso aconteceu para o número de colônias bacterianas de coloração creme; já o número das colônias bacterianas de coloração amarela não diferiu entre os tratamentos (Tabela 1). Não houve crescimento nas placas-controle do experimento e nem nas placas-controle com herbicida autoclavado. Como no experimento anterior, estes resultados também contrariam as expectativas iniciais, pois o inóculo neste caso foi o próprio Nominee® e se observou crescimento de diferentes morfologias fúngicas e bacterianas.

Nas placas com meio MM, houve crescimento apenas de colônias fúngicas. A quantidade de UFCs foi significativamente maior para os inóculos provenientes do frasco usado, independentemente da suplementação adicional de herbicida no meio de cultura (Tabela 2). Não houve crescimento de colônias nas placas-controle do experimento e nem nas placas-controle com herbicida autoclavado. Alguns exemplos representativos das morfologias fúngicas que se desenvolveram no meio MM encontram-se na Figura 1.

No meio de cultura NA testado no experimento 2 todos os microrganismos presentes no inóculo, que eram resistentes a Nominee®, cresceram; já no meio de cultura MM desse experimento, só cresceram os microrganismos

Tabela 1. *Influência da origem do inóculo (frasco novo ou usado) sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) fúngicas e bacterianas em inóculos de 100µl do herbicida Nominee 400 SC® inoculados em meio nutriente-ágar (NA)*⁽¹⁾

Origem do inóculo	UFC por tipo de organismo			Soma
	Fungos	Bactérias		
		Coloração amarela	Coloração creme	
n ^o			
Frasco novo	8,5 a	999,0 a	16,8 b	1.024,3
Frasco usado	82,5 b	1.002,0 a	0,5 a	1.085,7
C.V. (%)	19,3	4,6	51,4	

⁽¹⁾Médias unidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Tabela 2. *Influência da origem do inóculo (frasco novo ou usado) e da suplementação do meio de cultura mineral (MM) com 5µl de herbicida por mililitro de meio de cultura sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFCs) fúngicas em inóculos de 100µl do herbicida Nominee 400 SC®*⁽¹⁾

Origem do inóculo e suplementação do meio	UFC
	n ^o
Frasco novo, meio com suplementação	5,5 a
Frasco usado, meio com suplementação	87,3 b
Frasco usado, meio sem suplementação	87,0 b
C.V.(%)	10,1

⁽¹⁾Médias unidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Duncan a 5% de probabilidade.

Nota: C.V. = coeficiente de variação.

que, além de resistentes a Nominee®, também conseguem utilizá-lo, já que o meio MM é desprovido de fontes de carbono. Além disso, a maior quantidade de colônias fúngicas no inóculo proveniente do frasco usado provavelmente seja devida à maior exposição do herbicida ao ambiente externo, posto que o mesmo se encontrava em uso havia cerca de um ano. A suplementação do meio com herbicida não causou maior crescimento de colônias fúngicas (Tabela 2), contrariando a expectativa de que a maior disponibilidade de herbicida poderia favorecer o desenvolvimento dos fungos.

Em trabalhos recentes, como os realizados por Ferreira et al. (2004) e Tcacenco et al. (2004), foram isolados microrganismos de diferentes ambientes, inclusive endofíticos em arroz irrigado, com potencial biotecnológico relacionado à tolerância e à degradação de herbicidas aplicados em lavouras. No entanto, não se podem relegar a um segundo plano as possíveis consequências negativas da presença de microrganismos dentro de uma embalagem de herbicida antes mesmo de ser aberta. Uma das consequências da biodegradação de herbicidas no próprio frasco é a aplicação de subdoses na lavoura. Além dos problemas

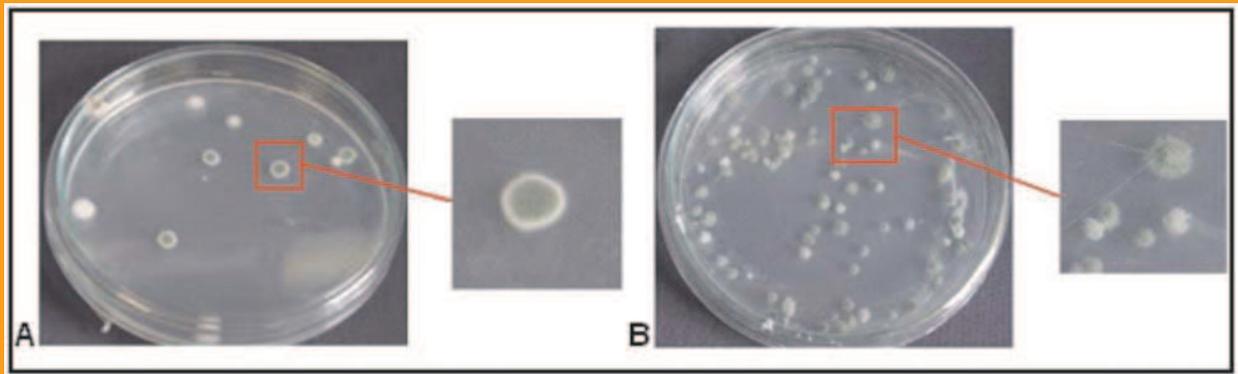


Figura 1. Crescimento de fungos em inóculos de 100µl do herbicida Nominee 400 SC® proveniente de (A) um frasco lacrado, aberto em condições assépticas e de (B) um frasco usado sobre o meio de cultura MM suplementado com herbicida; os insertos apresentam detalhes do crescimento de colônias fúngicas em cada um dos inóculos

biológicos advindos de subdoses, poderia estar havendo prejuízo econômico quando da compra do herbicida, já que parte de seu princípio ativo poderia estar degradada, ou poderia estar havendo alterações das características físico-químicas do produto, caso haja degradação dos adjuvantes.

Do ponto de vista biológico, a eficiência do produto poderia estar sendo comprometida porque a aplicação de doses abaixo da recomendada não controlaria indivíduos que toleram essas subdoses. Esse controle parcial poderia também gerar falsos diagnósticos da ocorrência de plantas daninhas resistentes a herbicidas. De acordo com Christoffoleti et al. (2004), a resistência de plantas daninhas a herbicidas pode advir, dentre outros mecanismos, por metabolização ou desintoxicação do herbicida em substâncias menos fitotóxicas ou por redução da concentração no local de ação, absorção e/ou translocação pelo biótipo resistente.

No tocante ao desenvolvimento de resistência em populações de plantas daninhas, muito permanece ainda a ser estudado, mas algumas inferências podem ser feitas a partir de estudos com mutações em microrganismos. Acreditava-se que fatores ambientais poderiam ser a causa de mutações adaptativas em bactérias, gerando a assim chamada

“hipótese adaptativa” para o surgimento de mutações. De acordo com revisão feita por Klug & Cummings (2000), pelo menos em *Escherichia coli* a hipótese adaptativa não se aplicou. No entanto, essa hipótese vem de longo prazo intrigando os cientistas, e de fato alguns experimentos conduzidos mais recentemente demonstraram que algumas bactérias poderiam selecionar mutações adaptativas quando submetidas à pressão seletiva por um determinado agente. Ainda não há informações científicas se tais mutações adaptativas poderiam estar surgindo em plantas sob estresse causado pela aplicação de herbicidas.

Essas são algumas das possibilidades para um fato, no mínimo intrigante, que foi a constatação da presença desses microrganismos dentro de embalagens do herbicida Nominee® e também no tanque de descarte de agrotóxicos testado. Porém, experimentos adicionais poderão ser realizados para quantificar a biodegradação do princípio ativo e/ou dos adjuvantes que ocorre ainda dentro dos frascos, e, caso a mesma ocorra, verificar a sua significância, pois os microrganismos ali presentes podem consumir quantidades pequenas e não afetar o produto a ponto de causar problemas de subdoses ou de modificações físico-químicas. De qualquer forma, fica o alerta para

os cuidados necessários a fim de minimizar esses problemas, os quais poderiam estar diretamente ligados à aplicação de subdoses no campo.

Conclusões

- Há ocorrência de bactérias e fungos no interior do tanque de descarte de agrotóxicos amostrado, bem como em frascos do herbicida Nominee®.
- Dos microrganismos isolados nos frascos do herbicida, somente colônias fúngicas conseguem utilizar o agrotóxico como única fonte de carbono, podendo vir a ser utilizadas como agente descontaminante.
- Por apresentarem resistência a moléculas tóxicas e complexas, os microrganismos isolados no trabalho podem ser utilizados na seleção de genes de interesse biotecnológico.

Literatura citada

1. BROWN, T.A. *Clonagem gênica e análise de DNA: uma introdução*. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 376p.
2. CHRISTOFFOLETI, P.J.; OVEJERO, R.F.L.; CARVALHO, J.C. *Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas*. 2.ed. Campinas: Associação Brasileira de Ação de Resistência de Plantas aos Herbicidas (HRAC-BR), 2004. 100p. ▶

3. DELLA PENNA, A.B.; COCHÓN, A.; VERRENGIA GUERRERO, N. Toxicidad aguda del herbicida Paraquat en los invertebrados de agua dulce. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. *Anais...* São Paulo: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2004. 1 CD-ROM.
4. FERREIRA, A.; RAMPELOTTI, F.T.; CONZATTI, A.; SAAR, J.H. Isolamento de bactérias degradadoras de herbicidas em áreas de cultivo do arroz irrigado em Santa Catarina. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ENGENHARIA AMBIENTAL, 2., 2003, Itajaí, SC. *Anais...* Itajaí, 2003, p.491.
5. FERREIRA, A.; TCACENCO, F.A.; NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S. Isolamento de microrganismos endofíticos em plantas de arroz irrigado com aplicação de herbicidas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. *Anais...* São Paulo, 2004. 1 CD-ROM.
6. KLUG, W.S.; CUMMINGS, M.R. *Concepts of Genetics*. 6.ed. New Jersey: Prentice Hall, 2000. cap. 17, p.456-458.
7. MELO, I.S. de; AZEVEDO, J.L. de. *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 1997. 438p.
8. MELO, I.S. de. Recursos Genéticos Microbianos. In: MELO, I.S. et al. (Ed.). *Recursos Genéticos e Melhoramento – Microrganismos*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2002. cap.1, p.1-48.
9. NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; PRANDO, H.F. et al. *Algumas recomendações para a produção de arroz irrigado com baixo impacto ambiental*. Florianópolis: Epagri, 2003. 22p. (Epagri. Boletim Didático, 52).
10. NOLDIN, J.A.; EBERHARDT, D.S.; RAMPELOTTI, F.T. *Fimbristyllis miliacea* (L.) Vahl resistente a herbicidas inibidores da ALS em Santa Catarina. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2002, Gramado, RS. *Anais...* Londrina: Sociedade Brasileira das Ciências das Plantas Daninhas/Embrapa Clima Temperado, 2002, p.199.
11. RESGALLA Jr., C.; LAITANO, K.S.; TAMANAHA, A.M.S. et al. Impacto de herbicidas sobre a comunidade zooplancônica na água de irrigação da cultura do arroz irrigado. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 23., 2002, Gramado, RS. *Anais...* Londrina: Sociedade Brasileira das Ciências das Plantas Daninhas/Embrapa Clima Temperado, 2002, p.181.
12. TCACENCO, F.A.; FERREIRA, A.; NOLDIN, J.A. et al. Microrganismos endofíticos em plantas de arroz irrigado provenientes de sistemas de cultivo orgânico e convencional. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 24., 2004, São Pedro, SP. *Anais...* São Paulo, 2004. 1 CD-ROM. ■



*Estado celebra 50 anos de Extensão Rural
e 30 anos de Pesquisa Institucional
genuinamente catarinense.*