

**Caracterização de Bactérias e
Fungos envolvidos na Degradação
de Sulfentrazona em Solos**

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 51

Caracterização de Bactérias e Fungos envolvidos na Degradação de Sulfentrazona em Solos

Camila Ortiz Martinez
Célia Maria Maganhotto de Souza Silva
Elisabeth Francisconi Fay

Exemplares dessa publicação podem ser solicitados à:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000, Jaguariúna, SP
Fone: (19) 3311-2700 Fax: (19) 3311-2640
sac@cnpma.embrapa.br
www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicação da Unidade

Presidente: *Ariovaldo Luchiarí Júnior*

Secretário-Executivo: *Luiz Antônio S. Melo*

Secretário: *Sandro Freitas Nunes*

Bibliotecária: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Membros: *Ladislau Araújo Skorupa, Heloisa Ferreira Filizola,
Adriana M. M. Pires, Emília Hamada e Cláudio M. Jonsson*

Normalização Bibliográfica: *Maria Amélia de Toledo Leme*

Editoração Eletrônica: *Alexandre Rita da Conceição*

1ª edição eletrônica
(2008)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no seu todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Caracterização de bactérias e fungos envolvidos na degradação de sulfentrazona em solos/ Camila Ortiz Martinez, Célia Maria Maganhotto de Souza Silva e Elisabeth Francisconi Fay. – Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2008.

22 p. – (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento; 51).

1. Microbiologia do solo. 2. Biodegradação. 3. Biorremediação. I. Martinez, Camila Ortiz. II. Silva, Célia Maria Maganhotto de Souza. III. Fay, Elisabeth Francisconi. VI. Título. VII. Série.

CDD 576.15

© Embrapa 2008

Sumário

Resumo	05
Abstract	07
Introdução	08
Material e Métodos	08
Resultados e Discussão	10
Conclusão	17
Referências	18

Caracterização de Bactérias e Fungos envolvidos na Degradação de Sulfentrazona em Solos

Camila Ortiz Martinez¹

Célia Maria Manganhotto de Souza Silva²

Elisabeth Francisconi Fay³

Resumo

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 sulfentrazona. Esse herbicida destaca-se como um dos mais utilizados nas principais culturas do Brasil. Alguns estudos relacionados a sua dissipação são importantes para que seus efeitos no ambiente sejam melhores compreendidos. Entre esses estudos está o envolvimento de microrganismos capazes de metabolizar esta molécula. Solos sem histórico da aplicação do herbicida foram suplementados com 0,7 μg de sulfentrazona g^{-1} solo. Após 255 dias de incubação foram retiradas amostras para o isolamento dos microrganismos resistentes e/ou degradadores do herbicida. O solo foi submetido à diluição em série e alíquotas foram plaqueadas em meio de cultura mínimo suplementado com o herbicida, na mesma concentração. As colônias que cresceram foram então isoladas e cultivadas em meio de cultura mínimo

¹Bolsista CNPq, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP.

²Bióloga, Doutora em Ciências Biológicas, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. celia@cnpmma.embrapa.br

³Farmacêutica-bioquímica, M. Sc. em Ciências Biológicas, Embrapa Meio Ambiente, Rod. SP 340, km 127,5 - Caixa Postal 69, Tanquinho Velho, 13.820-000 Jaguariúna, SP. bethfay@cnpmma.embrapa.br

líquido suplementado com concentrações crescentes de sulfentrazona. Após três repicagens, os microrganismos foram plaqueados e purificados em meio mínimo sólido. As bactérias e actinobactérias foram identificadas 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 potenciais degradadoras de sulfentrazona foram identificadas como *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* e *Methylobacterium radiotolerans*. Os fungos isolados e identificados como potenciais degradadores deste herbicida pertencem aos gêneros *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

Palavras-chave: ácidos graxos, dissipação, herbicida, microrganismos.

Characterization of bacteria and fungi involved in sulfentrazone degradation in soil

Abstract

The isolation, characterization, and identification of microorganisms capable of metabolize potentially toxic compounds have great importance in bioremediation. There are no records in the literature about sulfentrazone degrading microorganisms. This herbicide is one of the most used in Brazilian main crops. Some studies related to its dissipation are importante to understand environment effects. For that is necessary to determine which microorganisms can be involved in its degradation. Soil without the herbicide application were supplemented with 0,7 μg sulfentrazone g^{-1} . Samples were taken after 255 days of incubation, for the isolation of herbicide resistant and/or degrading microorganisms. After dilution, aliquots were plated in a minimum culture media supplemented with the herbicide in the same concentration. The colonies that have grown were then isolated and selected in a liquid minimum culture media supplemented with higher concentrations of sulfentrazone. After three transplantations, the microorganisms were plated and purified in a solid minimum media. The bacteria and actinomycetes were identified by the profile of the fatty acids from the cellular membrane. The fungi were isolated and identified by scanning electron microscopy, using an identification manual. The sulfentrazone potential degraders bacteria were identified as: *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* e *Methylobacterium radiotolerans*. The fungi isolated and identified as potential degraders of this herbicide belong to the genera *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

Keywords: fatty acids, dissipation, herbicide, microorganisms.

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 sulfentrazone 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 escorrimento 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 (EPA, 2003; AGROFIT, 2004).

Já há informações sobre o envolvimento dos microrganismos na degradação da sulfentrazone (HATZIOS, 1998; OHMES et al., 2000), porém, não há relatos sobre as espécies envolvidas nesse processo. O conhecimento das linhagens potencialmente degradadoras facilitaria o desenvolvimento de futuros estudos em biorremediação de locais contaminados com este herbicida. O objetivo desse trabalho foi isolar e identificar microrganismos potencialmente degradadores do herbicida sulfentrazone.

Material e Métodos

Três solos representativos das regiões de uso da sulfentrazone no Brasil: Latossolo vermelho escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA) (LASTA et al., 2008; KLEIN & CAMARA, 2007; BORKERT et al., 2006), foram utilizados neste estudo. Para cada tipo de solo, sem histórico de aplicação do herbicida, foram

retiradas dez sub-amostras ao acaso, à profundidade de 0-10 cm, as quais foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma amostra composta para cada solo. Em laboratório, as amostras foram peneiradas em malha de 2 mm e mantidas em câmara fria a 4°C até sua utilização. De cada amostra composta foram retiradas sub-amostras (150 g cada) que foram acondicionadas em frascos Erlenmeyer com a umidade corrigida para 70 % da capacidade de campo (CC), 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). O herbicida foi aplicado por meio de uma suspensão aquosa, na mesma concentração usada em campo ($0,7 \mu\text{g g}^{-1}$). Para enriquecimento dos microrganismos, as culturas foram incubadas a 27°C com a umidade mantida constante, por meio de pesagens efetuadas periodicamente. As amostras controle constaram de solo sem aplicação do herbicida.

Após 255 dias procedeu-se o isolamento dos microrganismos, tendo cada solo amostras diluídas em 90 mL de água destilada autoclavada. Após agitação manual, procedeu-se as diluições em série e plaqueamento de 0,1 mL das diluições 10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4} para o isolamento de bactérias, fungos e actinobactérias em meio de cultura mínimo sólido (1 L água; 3 g NaNO_3 ; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g 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 de cultivo sem o herbicida foi usado como controle. Após 2, 7 e 17 dias foram isoladas as colônias de bactérias, actinobactérias e fungos que cresceram apenas na presença de sulfentrazona.

Os fungos isolados foram mantidos em meio Sabouraud (TUIITE, 1969) até a identificação, enquanto as colônias de actinobactérias e de bactérias foram, então, cultivadas em meio mínimo líquido (1 L água; 3 g NaNO_3 ; 1 g K_2HPO_4 ; 0,5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5 g KCl; 0,01 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), suplementado com diferentes concentrações de sulfentrazona (2,13; 4,22 e $7,0 \mu\text{g i.a. mL}^{-1}$), para seleção dos microrganismos potenciais 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}) para um tubo de ensaio contendo 9mL de água destilada esterilizada 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 e mantidas sob incubação a 27°C por 4 dias. Após

esse período foi feita a contagem das colônias formadas e isolamento de acordo com o padrão de crescimento no substrato utilizado e também observando-se o padrão morfológico das mesmas.

Identificação dos microrganismos

As bactérias tolerantes às doses elevadas do herbicida (4,22 e 7,0 μg i.a. mL^{-1}) foram identificadas 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 contêm 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).

A identificação dos fungos baseou-se em características intraestruturais (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. A identificação dos fungos até o nível de gênero foi realizado utilizando-se o manual de identificação (BARNETT & HUNTER, 1972).

Resultados e Discussão

Houve efeito da ausência ou presença do herbicida sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de actinobactérias nos três solos estudados. Para o crescimento de bactérias, houve efeito negativo do herbicida para o solo LVE, enquanto para os solos AVA e LVA este efeito não foi significativo para a comunidade fúngica ($P > 0,14$).

Conforme os resultados da análise estatística (Teste t de Student; Tabela 1), baseada nos microrganismos cultiváveis em meio de cultura (1% de 100 milhões 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 ($P = 0,01410$), provavelmente devido a toxicidade do herbicida sobre alguns grupos bacterianos ou pode ter sido consequência da competição por nutrientes, por causa do crescimento da comunidade fúngica. No solo LVA não se observou diferença no crescimento fúngico nos solos com e sem herbicida ($P = 0,1846$), no entanto, foi favorecido pelo herbicida no solo LVE ($P = 0,00069$). O crescimento de actinobactérias foi estimulado na presença do herbicida em todos os solos ($P < = 0,02$). As bactérias isoladas do solo AVA e LVA foram capazes de crescer nos meios contendo 7,0 µg mL⁻¹ de sulfentrazona. Para o solo LVE, houve crescimento de poucas UFC (< 25 UFC placa⁻¹, em diluição 10⁻²) nas doses 2, 13 e 7,0 µg mL⁻¹.

Outros trabalhos já relataram a influência dos herbicidas sobre a comunidade microbiana do solo. Por exemplo, Chang et al. (2001) demonstraram que a aplicação conjunta dos herbicidas atrazina, dicamba, fluometuron, metolaclor e sulfentrazona causou impacto na estrutura da população microbiana oxidante de amônia, e em sua abundância no solo. O tratamento de 10 ppm induziu o aumento da comunidade microbiana, devido provavelmente à provisão de substratos para o crescimento dos microrganismos. Já na dose de 100 ppm houve rápida diminuição do número de bactérias oxidantes de amônia, sendo que na presença de 1000 ppm a população caiu abaixo do limite do método de detecção (reação de cadeia da polimerase com alvo no gene *amoA*). No entanto, não há relatos sobre o efeito da sulfentrazona, isoladamente, sobre a comunidade microbiana.

Várias bactérias crescem sob doses elevadas de herbicidas. Sette et al. (2005) demonstraram que 6 linhagens do gênero *Streptomyces* foram capazes de crescer em altas concentrações de alaclor (72 mg L⁻¹), degradando mais de 50% do herbicida em 7 dias. Dentre essas, somente as linhagens *Streptomyces* sp. LS166, LS177, e LS182 foram capazes de crescer em 144 mg L⁻¹ do herbicida.

No presente trabalho foi observado que altas concentrações de sulfentrazona não inibiram algumas linhagens bacterianas nos solos AVA e LVA, indicando um alto potencial degradativo das mesmas, em relação a esse herbicida (Tabela 2). Martinez et al. (2008 a e b) relataram que a meia-vida da sulfentrazona nos solos AVA e LVA é de 172,4 e 146,5 dias, respectivamente.

Tabela 1. Avaliação do efeito do herbicida sulfentrazona no número médio de unidades formadoras de colônias microbianas isoladas dos solos Latossolo vermelho escuro (LVE); latossolo vermelho-amarelo (LVA) e podzólico vermelho-amarelo (AVA), mediante aplicação do Teste t de Student.

Organismos	Solo	Sulfentrazona (0,7 g g ⁻¹)	Média ^B (UFC)	Limite inferior ^b	Limite superior ^b	Valor p ^c
Actinobactéria	AVA	Ausente	303,33	116,885	489,78	
Actinobactéria	AVA	Presente	696,67	341,571	1051,76	
Actinobactéria	AVA	Diferença ^a	393,33			0,02393
Actinobactéria	LVA	Ausente	203,33	119,923	526,59	
Actinobactéria	LVA	Presente	753,33	414,239	1092,43	
Actinobactéria	LVA	Diferença	550,00			0,00727
Actinobactéria	LVE	Ausente	233,33	175,965	290,70	
Actinobactéria	LVE	Presente	523,33	312,060	734,61	
Actinobactéria	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 sulfentrazona.

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

c) Valor P relativo ao teste t.

Ao comparar as linhagens crescidas nos solos controles (sem sulfentrazona) com as dos solos suplementados com o herbicida foi possível inferir as potenciais linhagens microbianas degradadoras do herbicida. Entre as linhagens bacterianas selecionadas como potenciais degradadoras, pelo seu crescimento em dose do herbicida de até 10 vezes superior à dose de campo, estão as espécie *Ralstonia pickettii* e *Rhizobium radiobacter* (tolerante a dose $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o solo LVA, *Nocardia brasiliensis* (tolerante a dose $4,22 \mu\text{g mL}^{-1}$) isolada no solo LVE e *Acinetobacter calcoaceticus* (tolerante a dose $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$) para o solo AVA (Tabela 2).

Os fungos isolados (tolerantes a dose $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$) e identificados como possíveis degradadores do herbicida, foram *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. (Fig. 1) para o solo LVA, enquanto *Penicillium* sp foi o único fungo isolado do solo LVE (Fig. 2). Para o solo AVA foram isoladas e identificadas linhagens fúngicas de *Chrysosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Metarrhizium* sp. e *Paecilomyces* sp. (Fig. 3).

Outros autores já demonstraram a participação de bactérias do gênero *Nocardia* na degradação do herbicida atrazina, revelando novas rotas metabólicas para mineralização desse composto (MULBRY et al., 2002); enquanto *Methylobacterium organophilum* e *Methylobacterium radiotolerans* apresentaram capacidade para degradar tebutiuron e *Rhodococcus equi* para degradar o herbicida hexazinona (MOSTAFA & HELLING, 2003). Também um consórcio bacteriano composto de oito linhagens, entre elas, *Nocardia* sp. e *Rhizobium* sp., foi responsável pela mineralização de atrazina em apenas 4 dias, porém, não foi observado a mineralização na ausência de *Nocardia* sp, confirmando assim, o papel essencial desta linhagem na decloração deste herbicida, para posterior uso pelas demais bactérias (SMITH et al., 2005).

Outras linhagens bacterianas como *Ralstonia pickettii* (SEFFERNICK et al., 2000) e *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) (HAWKINS & HARWOOD, 2002), também foram envolvidas na degradação de atrazina. No entanto, entre cinco linhagens de *Acinetobacter*, apenas uma foi capaz de crescer na presença de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ deste herbicida, utilizando-o como fonte de carbono e como fonte secundária de nitrogênio. A mesma linhagem foi capaz de utilizar cianazina, prometom, simazina, diuron e terbutrin como fontes de energia (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2004; SINGH et al., 2004; ROQUE & MELO, 2000), demonstrando que contém a maquinaria enzimática necessária para mineralizar muitos compostos orgânicos.



Fig. 1. Linhagem fúngica, não identificada, isolada em latossolo vermelho-amarelo (LVA) suplementado com sulfentrazona, aos 10 dias de crescimento, em meio Ágar Sabouraud. A foto mostra a ultraestrutura de conídios do fungo. A imagem foi obtida por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (Leo 928).

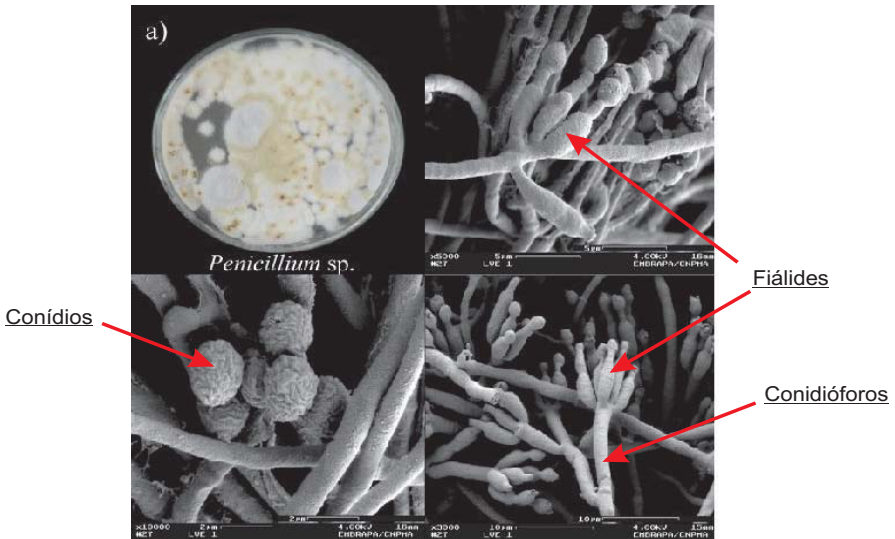


Fig. 2. Linhagem de *Penicillium* sp, isolado em latossolo vermelho-escuro (LVE), suplementado com sulfentrazona, aos 20 dias de crescimento (a), em meio Ágar Sabouraud. A foto mostra a ultraestrutura de conídios, fiáldes e conidióforos do fungo em questão. A imagem foi obtida por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (Leo 928).

Tabela 2. Identificação de linhagens bacterianas por MIS, presente nos solos Latossolo vermelho-escuro (LVE), latossolo vermelho-amarelo (LVA) e podzólico vermelho-amarelo (AVA), selecionadas em meios com concentrações crescentes de sulfentrazona, como única fonte de energia.

Sulfentrazona ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Solo de origem/ isolado	Identificação	Índice de similaridade
2,13	LVE 9	<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	0,521*
2,13	LVE 3	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,481*
2,13	LVE 4	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	0,283*
4,22	LVE 1	<i>Nocardia nova</i> ou <i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,634 / 0,614
2,13	LVE 8	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,546*
2,13	LVE 6	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,521*
4,22	LVE 2B	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,526*
2,13	LVE 7	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,497*
4,2	LVE 2	<i>Gordonia-amarae</i> GC subgrupo B	0,497*
2,13	LVE 5	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,378*
7,0	AVA3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,827
7,0	AVA 5	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,771
7,0	AVA 8	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,785
7,0	AVA 6	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,814
7,0	AVA 7	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,791
7,0	AVA 2 ^a	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ou <i>Acinetobacter radioresistens</i>	0,773 / 0,705
7,0	AVA 2B	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0,465*
7,0	AVA 4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,792
7,0	AVA 1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,795
2,13	LVA 7	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,623
2,13	LVA 5	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,572*
2,13	LVA 4	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,628
7,0	LVA 2	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,585*
7,0	LVA 10	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,560*
7,0	LVA 1B	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,750
7,0	LVA 12	<i>Methylobacterium-mesophilicum</i> / radiotolerans	0,732
7,0	LVA 1	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,855

*Índice de similaridade abaixo do índice confiável (0.6)



Fig. 3. Fungos isolados em solo Podzólico vermelho-amarelo (AVA) suplementado com sulfentrazona, aos 4 (a) e 7 (b, c, d) dias de crescimento, em meio Ágar Sabouraud. A foto mostra a ultraestrutura de conídios, fiáldes e conidióforos dos fungos identificados *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp e *Metarrhizium* sp. A imagem foi obtida por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (Leo 928).

Também tem sido foco de estudo, a influência dos herbicidas sobre grupos bacterianos com importante função no ciclo do nitrogênio do solo, no entanto, os resultados demonstraram pouca influência destes compostos sobre a amonificação ou sobre a nitrificação do solo (VIEIRA et al., 2007; DAS & MUKHERJEE, 1998; OLSON & LINDWALL, 1991). No presente estudo a bactéria *Rhizobium radiobacter*, no solo LVA, não foi afetada pelo herbicida sulfentrazona, crescendo em dose 10 vezes maior do que a dose de campo ($7,0 \mu\text{g g}^{-1}$ solo).

Apesar de não existir relatos sobre a influencia dos fungos na degradação de sulfentrazona, há relatos sobre a influencia deles na degradação de outros herbicidas. Por exemplo, *Penicillium steckii* degradou 53% do herbicida simazine (50 mg L^{-1}) em 5 dias de cultivo (KODAMA et al., 2001), enquanto

Penicillium cyclopium foi o mais ativo na degradação de fototiazuron, um fotoproduto do herbicida tidiazuron (BENEZET & KNOWLES, 1982). Fungos do gênero *Paecilomyces* também demonstram capacidade para metabolização de diferentes compostos orgânicos como herbicidas e lignina. Singh & Kulshrestha, (1991) relataram a degradação de pendimetalim para os metabólitos N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2-nitrobenzene-1,6-diamine e 3,4-dimetil-2,6-dinitroanilina por *Paecilomyces varioti* e *Fusarium oxysporum*. No entanto, não foram encontrados relatos sobre a capacidade de fungos *Metarhizium* sp. na metabolização de substâncias antropogênicas.

Conclusão

1. O método de enriquecimento foi eficiente para isolar microrganismos potenciais degradadores de sulfentrazone;
2. As linhagens bacterianas *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* e *Methylobacterium radiotolerans* e as fúngicas *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp. foram isoladas e identificadas em solos Latossolo vermelho escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA), como potenciais degradadores do herbicida sulfentrazone.

Referências

AGROFIT.Disponível: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Acesso em: 25 set. 2004.

BARNETT, H L; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd. ed. Minneapolis: Burges Publishing Company, 1972. 241 p.

BENEZET, H. J.; KNOWLES, C. O. Microbial degradation of thidiazuron and its photoproduct. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v. 11, p. 107-110, 1982.

BEULKE, S., BROWN, C. D., FRYER, C. J.; EINUM, W. van. Influence os kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere*, Oxford, v. 57, p. 481-490, 2004. DAS, A. C. ; MUKHERJEE, D. Persistence of phorate and ccarbofurano in relation to their effect on the mineralization of C, N and P in alluvial soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, California, v.61, p.709-715, 1998.

BORKERT, C.M.; KLEPKER, D.; ÁLVARES DE OLIVEIRA, F.; SFREDO, G. J.; CASTRO, C. de. T175 - Estimativa do teor crítico de cobre em solos do Paraná. IV Congresso Brasileiro de Soja, 2006. Londrina PR.. Disponível em <http://www.acsoja.org.ar/mercosoja2006/trabajos_pdf/T175.pdf> . Acesso: dez. /2008.

CHANG, Y-J.; ANWAR HUSSAIN, A. K. M.; STEPHEN, J. R.; MULLEN, M. D.; WHITE, D. C.; PEACOCK, A. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous –subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Elmsford-NY, v. 20, p. 2462-2468, 2001

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Isolation of diuron degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, Curitiba, v. 44, p. 999-1003, 2004.

EPA. Federal Register: Sulfentrazone; Pesticide Tolerances, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm>> Acesso em: 25 set. 2004.

FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam mercado. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos_agricolas.htm>. Acesso em: 03 mar. 2005.

FAY, E. F.; 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.; HANCOCK, H. G. Sulfentrazone adsorption and mobility affected by soil and pH. *Weed Science*, Ithaca-NY, v. 45, p. 733-738, 1997.

GREY, T. L., WALKER, R. H., DAYAN, F. E., WEETE, J. D., HANCOCK, H. G.; KWON, O. Behavior of sulfentrazone in ionic exchange resins, electrophoresis gels, and cation-saturated soils. *Weed Science*, Ithaca-NY, v. 48, p. 239-247, 2000.

HATZIOS, K.K., Supplement to herbicide handbook (7th ed.), Weed Science Society of America, Lawrence, 1996. p. 67-69,

HAWKINS, A. C.; HARWOOD, C. S. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 68, p. 968-972, 2002

KLEIN, V.A.; CAMARA, R.K. Rendimento da soja e intervalo hídrico ótimo em latossolo vermelho sob plantio direto escarificado Revista Brasileira da Ciência do Solo, Campinas, v. 31, p. 221-227, 2007

KODAMA, T., DING, L., YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, Amsterdam, NL, v. 11, p. 1073-1078, 2001.

LASTA, E.F.; GIRACCA, E.M.N.; ELTZ, F.L.F.; ANTONIOLLI, Z.I.; BENEDETTI, E.L.; WEBER, M.A. Meso e macro fauna em solo sob plantio direto com diferentes doses de calcário. Disponível em <<http://w3.ufsm.br/ppgcs/congressos/Fertbio2002/33.pdf>>. Acesso em dez. 2008.

MARTINEZ, C.O.; SILVA, C. M. M.S.; FAY, E. F.; MAIA, A. DE H. N.; ABAKERLI R. B.; DURRANT, L. R. Degradation of the herbicide sulfentrazone in a Brazilian Typic Hapludox soil. *Soil Biology and Biochemistry*, Oxford, v. 40, p. 879-888. 2008.

MARTINEZ, C.O.; SILVA, C. M. M.S.; FAY, E. F.; MAIA, A. DE H. N.; ABAKERLI R. B.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. *Geoderma* (2008), doi:10.1016/j.geoderma.2008.07.005.

MICROBIAL identification system operating manual. Newark: MIDI, Inc, 2001. 145 p.

MOSTAFA, F. I.; 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*, New York, v. 38, p. 783-797, 2003.

MULBRY, W. W., ZHU, H., NOUR, S. M.; TOPP, E. The triazine hydrolase gene atzN from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, Haren-Holanda, v. 206, p. 75-79, 2002.

NOGUEIRA, N. L.; 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.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. *Weed Technology*, Champaign-ND, v.14, p.100-105, 2000

OLSON, B. M.; LINDWALL, C. W. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effect of 2,4-D and glyphosate. *Soil Biology & Biochemistry*, Oxford, v. 23, p. 1071-1075, 1991.

ROQUE, M.R.A.; MELO, I.S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. *Scientia Agricola*, Piracicaba, v. 57, n.4, p. 723-728, 2000.

SEFFERNICK, J. L.; JOHNSON, G.; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. Substrate Specificity of Atrazine Chlorohydrolase and Atrazine-Catabolizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, v. 66, p. 4247-4252, 2000

SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, Delft-Holanda, v. 87, p. 81-89, 2005.

SINGH, P.; SURI, C. R.; CAMEOTRA, S. S. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, New York, v. 317, p. 697–702, 2004.

SINGH, S. B.; KULSHRESTHA, G. Microbial degradation of pendimethalin. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, New York, v. 26, p. 309-321, 1991.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Cooperative catabolic pathways within na atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, Haren-Holanda, v. 53, p.265-273, 2005.

TUITE, J., 1969. *Plant Pathology Methods: Fungi and Bacteria*. Burgess, Minneapolis, MD, 239pp.

TURPEINEN, B. K.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Berlin, v. 61, p. 374–379, 2001.

VIEIRA, R.F., SILVA, C.M.M.S.; SILVEIRA, A. P. D. da. Soil microbial biomass C and symbiotic processes associated with soybean after sulfentrazone herbicide application. *Plant and Soil*, The Hague-Holanda, v.300, n.1-2/november, p.95–103, 2007.



Meio Ambiente

Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento

