

# ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS TRIAZÍNICOS

## Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil

Luciane Maria Colla<sup>1</sup>, Andreiza Lazzarotto Primaz<sup>2</sup>, Marieli de Lima<sup>2</sup>,  
Telma Elita Bertolin<sup>3</sup>, Jorge Alberto Vieira Costa<sup>4</sup>

### RESUMO

A biorremediação é uma tecnologia que utiliza o metabolismo de microrganismos para eliminação ou redução, a níveis aceitáveis, de poluentes presentes no ambiente. Os herbicidas triazínicos são usados intensivamente no controle de ervas daninhas, principalmente na cultura de milho. Objetivou-se, neste trabalho, isolar fungos filamentosos de solos contaminados com herbicidas triazínicos (atrazine e simazine) e selecionar os microrganismos isolados quanto à capacidade de crescimento em meio adicionado de atrazine. Os microrganismos foram isolados, cultivados em meio Ágar-Batata-Dextrose (BDA) acidificado com ácido tartárico 10%, adicionado de 50 mg.Kg<sup>-1</sup> de atrazine e incubados por 5 dias a 25°C. Foi realizada a medida diária do crescimento fúngico e calculada a velocidade de crescimento radial através de regressão linear dos raios das colônias utilizando-se a equação  $r(t) = a + VCR \cdot t$  (r:raio; t: tempo; VCR: velocidade de crescimento radial). Os resultados de VCR foram analisados através de Anova simples e do teste de Tukey, para comparação de médias. Foram isolados 15 fungos, pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. As maiores VCRs foram obtidas com fungos *Aspergillus* (A1) e *Penicillium* (AS1), isolados de solo contaminado com atrazine e atrazine adicionado de simazine, respectivamente, que apresentaram VCRs de 1,57 mm.d<sup>-1</sup> e 1,28 mm.d<sup>-1</sup>. O crescimento dos fungos em meio contaminado com a atrazine indica a possibilidade de utilização desses fungos em estudos de biorremediação de solos contaminados com herbicidas triazínicos.

**Termos para indexação:** Atrazine, simazine, isolamento, fungos filamentosos.

### ABSTRACT

Bioremediation is a technology that uses microorganism metabolism to quickly eliminate or reduce pollutants to acceptable levels into the environment. The triazine herbicides are intensively used to control harmful grass in the culture of maize. The aim of this work was to isolate filamentous fungi from soil contaminated with triazine herbicides and screening these fungi due to their ability of growth in a medium added by atrazine. The fungi were isolated, cultivated in potato-dextrose-agar plus 50 mg.Kg<sup>-1</sup> of atrazine and incubated for 5 days at 25°C. The measure of the rays of the colonies was carried out daily and the radial growth rate (RGR) through linear regression of colonies rays using the equation:  $r(t) = a + RGR \cdot t$  (r:ray; t: time; RGR: radial growth rate). The RGR results were analyzed through analysis of variance and Tukey test for comparison of averages. Fifteen filamentous fungi from genus *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* were isolated. The highest RGRs were obtained with the fungi *Aspergillus* and *Penicillium*, when isolated from contaminated soil with atrazine and atrazine + simazine, respectively, showing RGR of 1.57 mm.d<sup>-1</sup> and 1.28 mm.d<sup>-1</sup>. The growth of these fungi in atrazine contaminated meas indicates a possible of use of them in bioremediation experiments with contaminated soil containing triazine herbicides.

**Index terms:** Atrazine, simazine, isolation, filamentous fungi.

(Recebido em 5 de junho de 2007 e aprovado em 5 de novembro de 2007)

### INTRODUÇÃO

A biorremediação vem sendo desenvolvida visando explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes, em produtos menos tóxicos, que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (UETA et al., 1999).

Entretanto, a biorremediação de substratos imiscíveis em água é limitada, pela dificuldade da sua utilização pelos microrganismos (PARASZKIEWICZ et al., 2002).

Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da formação de grandes quantidades de resíduos, nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em se conhecer o comportamento

<sup>1</sup>Mestre em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – Campus I, Br 285, Km 171 – São José – Cx. P. 611 – 99001-970 – Passo Fundo, RS – lmcolla@upf.br

<sup>2</sup>Graduandas em Engenharia de Alimentos – Faculdade de Engenharia e Arquitetura/FEAR – Universidade de Passo Fundo/UPF – Campus I, Br 285, Km 171 – São José – Cx. P. 611 – 99001-970 – Passo Fundo, RS – 63209@lci.upf.br; marielidelima@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Doutora em Tecnologia Bioquímica – Instituto de Ciências Biológicas – Universidade de Passo Fundo/UPF – Campus I, Br 285, Km 171 – São José – Cx. P. 611 – 99001-970 – Passo Fundo, RS – telma@upf.br

<sup>4</sup>Doutor em Engenharia de Alimentos – Departamento de Química/DQ – Fundação Universidade Federal do Rio Grande/FURG – Rua Alfredo Huch, 475 – Cx. P. 474 – 96201-900 – Rio Grande, RS – jorgealbertovc@terra.com.br

e destino dos pesticidas, nos diversos ecossistemas (ARAÚJO, 2002).

Os pesticidas são produtos utilizados na agricultura para o controle de insetos, microrganismos e plantas daninhas, com as possíveis finalidades de aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento. Embora os pesticidas possam ter um efeito benéfico sobre a produtividade agrícola, deve-se considerar o risco potencial desses compostos químicos no ambiente, o que tem despertado o interesse científico para a biodegradação de pesticidas e compostos relacionados (ARAÚJO, 2002; SANINO et al., 1999).

Os resultados de inúmeros trabalhos revelaram a presença de níveis elevados de agroquímicos e seus produtos de degradação em solos, águas superficiais e subterrâneas. Em estudos realizados nos EUA, os relatos iniciaram-se nos anos 70 e desde então, com o aprimoramento das técnicas analíticas, mostraram que metade dos estados americanos possuía águas subterrâneas contaminadas (PARSONS & WITT, 1989). O uso indiscriminado de agroquímicos levou à contaminação de solos, em índices acima de 5000 mg.Kg<sup>-1</sup> de atrazine, 3000 mg.Kg<sup>-1</sup> de clorpirifos, 3900 mg.Kg<sup>-1</sup> de diuron e 1900 mg.Kg<sup>-1</sup> de paration (WINTERLIN et al., citados por UETA et al., 1999).

Os herbicidas do grupo das triazinas vêm sendo empregados na agricultura para o controle de ervas daninhas, em razão da capacidade desses compostos de inibir a fotossíntese. A atrazine representa 12% dos pesticidas usados nos EUA. No Brasil, das 150000 t de pesticidas consumidas anualmente, 33% são herbicidas (UETA et al., 1999).

A atrazine (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) - ATZ é um herbicida da classe dos triazínicos, usada intensivamente no controle de ervas daninhas. Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. A atrazine é um contaminante potencial da água em virtude de características como alto potencial de escoamento, elevada persistência em solos, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade baixa para moderada em água, adsorção moderada à matéria orgânica e argila (HALLBERG, 1989). No Canadá, estudos constataram a presença de atrazine em poços, sendo que alguns apresentam índices da ordem de 10 µg.L<sup>-1</sup> de atrazine (BELLUCK et al., 1991). As atrazinas possuem baixa biodegradabilidade e elevado potencial de contaminação de águas superficiais e de profundidade (CHAN & CHU, 2005). A simazine (2 cloro -

4,6 bis-etilamina - 1,3,5 triazine) é um herbicida triazínico que tem sido utilizado desde 1955 como controlador da germinação de pestes nas culturas de milho, soja, batata, alho, entre outras. A simazine tem se acumulado extensivamente no ambiente em virtude de seu uso por mais de 40 anos e de sua estrutura dificilmente biodegradável (KODAMA et al., 2001).

Algumas espécies microbianas isoladas de solo são capazes de metabolizar parcialmente os compostos triazínicos, tais como *Pseudomonas*, *Nocardia*, *Rhodococcus* NI86/21, TE1 e B-30, *Aspergillus fumigatus* e *Rhizopus stolonifer* (BEKHI & KHAN, 1986; BEKHI et al., 1993). A mineralização total desses compostos pode ser realizada por consórcios microbianos ou culturas mistas com 2 ou mais microrganismos (LEVANON, 1993).

Objetivou-se isolar fungos filamentosos de solos contaminados com herbicidas triazínicos (atrazine e simazine) e selecionar os microrganismos isolados quanto à capacidade de crescimento em meio de cultivo adicionado de atrazine.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Isolamento e manutenção dos microrganismos

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de solo contaminado com atrazine ou atrazine+simazine, através da técnica de diluições seriadas, onde 25 g de amostra de solo foram homogeneizadas em 225 mL de água peptonada 0,1% (diluição 10<sup>-1</sup>). A segunda diluição (10<sup>-2</sup>) foi realizada transferindo-se 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> para tubo de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1%, e assim sucessivamente até a diluição 10<sup>-3</sup>. As amostras foram plaqueadas em placas de Petri contendo meio PDA (potato-dextrose-ágar) acidificado. De cada diluição foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e realizada a inoculação na superfície do meio solidificado, realizando-se o espalhamento com uma alça de Drigalsky. As placas foram incubadas a 30°C, durante 5 dias. A seqüência do isolamento foi realizada através da técnica de esgotamento por estrias.

Os microrganismos isolados foram mantidos a 4°C, em tubos de ensaio com ágar inclinado contendo o meio PDA.

### Identificação microscópica dos microrganismos

Os microrganismos isolados foram identificados quanto ao gênero pelas características microscópicas das colônias, após o preparo de microcultivos em lâminas.

### Seleção dos microrganismos para biorremediação

Os microrganismos isolados na etapa anterior foram testados quanto à sua habilidade de crescer em PDA acidificado, adicionado de 50 ppm de atrazine.

A seleção dos microrganismos foi realizada através de plaqueamento em PDA adicionado de atrazine fazendo-se uma inoculação pontual no centro da placa de Petri contendo o meio de cultivo. Foi preparada uma suspensão de esporos em ágar 0,1% e realizada a inoculação com um micropipetador, para evitar-se espalhamento de esporos sobre a superfície. Os cultivos foram mantidos em estufa a 30°C por 5 dias, sendo medido o diâmetro da área recoberta pelo fungo, a cada 24 horas.

As placas de Petri foram marcadas com três raias, com a finalidade de se medir o crescimento radial dos fungos a cada 24 horas. Foram medidos seis raios em cada placa, diariamente. Os experimentos foram realizados em triplicata.

A velocidade de crescimento radial foi calculada através de regressão linear dos raios das colônias, utilizando-se a Equação 1, onde  $r$  é o raio (mm),  $t$  é o tempo (d) e VCR é a velocidade de crescimento radial ( $\text{cm}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

$$r(t) = a + \text{VCR}\cdot t \quad (1)$$

Os resultados de VCR dos fungos foram avaliados através de Análise de Variância e Teste de Tukey, para comparação de médias.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi realizado o isolamento de quinze fungos, cinco a partir do solo contaminado com atrazine (denominados fungos A1, A2, A3, A4 e A5) e dez a partir do solo contaminado com atrazine + simazine, (denominados fungos AS1, AS2, AS3, AS4, AS5, AS6, AS7, AS8, AS9 e AS10). A realização dos microcultivos possibilitou identificar os fungos isolados através da análise microscópica dos micélios. Os fungos A1, A2, A4 e AS10 foram identificados como do gênero *Aspergillus*; os fungos A3, AS1, AS3, AS4, AS5, AS6, AS7 e AS9 como *Penicillium* e os fungos A5, AS2 e AS8 como *Trichoderma*.

As velocidades de crescimento radial (VCRs) são o coeficiente angular da reta obtida da regressão linear dos raios das colônias em função do tempo, portanto, quanto maior a inclinação da reta, maior é a velocidade de crescimento radial e maior o potencial de crescimento do fungo. Observam-se na Tabela 1, as velocidades de crescimento radial para os fungos isolados de solos contaminados com atrazine ou atrazine + simazine, cultivados em PDA adicionado de 50 ppm de atrazine.

As VCRs obtidas pelos fungos isolados de solos contaminados com atrazine ou atrazine + simazine, crescendo em meio PDA adicionado de 50 ppm de atrazine, foram analisadas através de Anova, sendo observadas diferenças significativas entre os resultados obtidos pelos

diferentes fungos ( $p < 0,001$ ). Através da comparação de médias dos resultados de VCR, pelo teste de Tukey (Tabela 1), verifica-se que os fungos A<sub>1</sub> (*Aspergillus*) e AS<sub>1</sub> (*Penicillium*) apresentaram as maiores velocidades de crescimento radial, seguidos dos fungos AS<sub>8</sub>, A<sub>5</sub>, AS<sub>2</sub> (*Trichoderma*) e A<sub>2</sub> (*Aspergillus*). O fungo A<sub>1</sub> apresentou VCR significativamente diferente das demais VCRs ( $p = 0,000148$ ). As VCRs dos fungos AS<sub>8</sub>, A<sub>5</sub> e AS<sub>2</sub> não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p > 0,05$ ).

As elevadas velocidades de crescimento radial obtidas para os fungos A<sub>1</sub>, AS<sub>1</sub>, AS<sub>8</sub>, A<sub>5</sub>, AS<sub>2</sub> e A<sub>2</sub> indicam a habilidade desses fungos de crescerem em meios contendo 50 ppm de triazinas, podendo ser utilizados em estudos de biorremediação de herbicidas triazínicos, através do uso das técnicas de bioaumento ou bioestimulação.

Em alguns casos, os fungos produzem enzimas responsáveis pela degradação dos pesticidas, como demonstrado por Qing et al. (2003), que realizaram a purificação e a caracterização de uma hidrolase do fungo filamentosso *A. niger* PY 168, responsável pela degradação de carbamatos, que são inseticidas desenvolvidos com o objetivo de substituição de pesticidas organoclorados. Similarmente, Liu et al. (2004) realizaram a purificação e caracterização de uma enzima responsável pela degradação de pesticidas organofosforados, a partir do *Penicillium lilacinum* BP303.

Kodama et al. (2001) realizaram o isolamento de uma cepa de *P. steckii* DS6F de solo contaminado com o herbicida simazine e testaram o crescimento do fungo, em meio de cultivo contendo somente simazine como fonte de carbono e nitrogênio. O fungo foi capaz de crescer no meio de cultivo contendo somente a simazine como fonte de carbono e nitrogênio, entretanto, a adição de extrato de levedura ao meio de cultivo possibilitou maior crescimento do fungo. Os autores demonstraram que a maior degradação da simazine ocorre em pHs em torno de 6-8, a 30°C. A degradação da simazine pelo fungo em solo também foi estudada, sendo obtida 45,5% de degradação em cinco semanas, quando comparado com a amostra de solo-controle, que não foi incubada com o fungo, demonstrando a capacidade de degradação da simazine pelo fungo e a possibilidade de biorremediação de solos contaminados.

Bordjiba et al. (2001) realizaram o isolamento de fungos a partir de amostras de solos contaminados e não contaminados com pesticidas. As espécies mais frequentes foram os fungos *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Absidia corymbifera* e *Rhizopus microsporus*, que não apresentaram sensibilidade aos pesticidas. O crescimento do gênero *Trichoderma* foi inibido na presença de

Tabela 1 – Velocidades de crescimento radial para os fungos isolados de solos contaminados com atrazine e atrazine + simazine, cultivados em Ágar Batata Dextrose, adicionado de 50 ppm de atrazine.

Fungo	Local de isolamento	VCR <sup>1,2</sup> (cm/d)
A <sub>1</sub>	Solo Contaminado com Atrazine	1,568 ± 0,009 <sup>i</sup>
A <sub>2</sub>		1,059 ± 0,006 <sup>h</sup>
A <sub>3</sub>		0,419 ± 0,004 <sup>g</sup>
A <sub>4</sub>		0,175 ± 0,023 <sup>a</sup>
A <sub>5</sub>		1,163 ± 0,027 <sup>i</sup>
AS <sub>1</sub>	Solo Contaminado com Atrazine e Simazine	1,280 ± 0,004 <sup>j</sup>
AS <sub>2</sub>		1,148 ± 0,022 <sup>i</sup>
AS <sub>3</sub>		0,281 ± 0,003 <sup>bcd</sup>
AS <sub>4</sub>		0,285 ± 0,021 <sup>cde</sup>
AS <sub>5</sub>		0,245 ± 0,008 <sup>b</sup>
AS <sub>6</sub>		0,307 ± 0,000 <sup>de</sup>
AS <sub>7</sub>		0,251 ± 0,030 <sup>bc</sup>
AS <sub>8</sub>		1,174 ± 0,012 <sup>i</sup>
AS <sub>9</sub>		0,322 ± 0,010 <sup>e</sup>
AS <sub>10</sub>		0,379 ± 0,020 <sup>f</sup>

<sup>1</sup>Resultados de média ± desvio padrão

<sup>2</sup>Médias seguidas de letras diferentes indicam diferença significativa (p<0,05)

pesticidas, enquanto os gêneros *Absidia* e *Fusarium* foram estimulados.

Em nosso trabalho, fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meios contendo 50 ppm de atrazine, indicando a possibilidade desses fungos serem usados em outros estudos de biorremediação em solos contaminados com pesticidas triazínicos. Este trabalho também demonstra que os locais contaminados com poluentes consistem em uma boa fonte de microrganismos para estudos de biorremediação desses mesmos poluentes, uma vez que o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo para os microrganismos, sendo que os que permanecem presentes nesses locais tornam-se adaptados ao poluente, que por sua vez, pode ser utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento dos microrganismos.

### CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram o isolamento de dez fungos em solo contaminado com atrazine + simazine e cinco fungos em solo contaminado com atrazine. Os gêneros identificados foram *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*. Os fungos com maior velocidade de crescimento radial foram os fungos A<sub>1</sub> (*Aspergillus*) a partir

de solo contaminado com atrazine e AS<sub>1</sub> (*Penicillium*) proveniente de solo contaminado com atrazine + simazine, indicando a possibilidade desses fungos de serem utilizados em estudo de biorremediação de solos contaminados com herbicidas triazínicos.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosado em dois tipos de solos**. 2002. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura de Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2002.
- BEHKI, R. M.; KHAN, S. U. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 34, p. 746-749, 1986.
- BEHKI, R. M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 42, p. 1237-1241, 1993.
- BELLUCK, D. A.; BENJAMIN, S. L.; DAWSON, T. Groundwater contamination by atrazine and its metabolites: risk assessment, policy, and legal implications. In:

- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J. R. (Eds.). **Pesticide transformation products: fate and significance in the environment**. Washington, DC: American Chemical Society, 1991.
- BORDJIBA, O.; STEIMAN, R.; KADRI, M.; SEMADI, A.; GUIRAUD, P. Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, [S.l.], v. 30, p. 418-426, 2001.
- CHAN, K. H.; CHU, W. Effect of humic acid on the photolysis of the pesticide atrazine in a surfactant-aded soil-washing system in acidic condition. **Water Research**, [S.l.], v. 39, p. 2154-2166, 2005.
- HALLBERG, G. R. Pesticides pollution of groundwater in the humid United States. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, [S.l.], v. 26, n. 3/4, p. 299-367, 1989.
- KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. **Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic**, [S.l.], v. 11, n. 4/6, p. 1073-1078, 2001.
- LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, Elmsford, v. 25, p. 1097-1105, 1993.
- LIU, Y. H.; LIU, Y.; CHEN, Z. S.; LIAN, J.; HUANG, X.; CHUNG, Y. C. Purification and characterization of a novel organophosphorus pesticide hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP303. **Enzyme and Microbial Technology**, [S.l.], v. 34, p. 297-303, 2004.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata*. growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 92, p. 287-294, 2002.
- PARSONS, B.; WITT, J. M. **Pesticides in groundwater in the USA: a report of a 1988 survey of US States**. Washington, DC: Oregon State University Extension Service, 1989.
- QING, Z.; YANG, L.; YU-HUAN, L. Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from *Aspergillus niger* PY168. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 228, p. 39-44, 2003.
- SANINO, F.; FILAZZOLA, M. T.; VIOLANTE, A. Fate of herbicides influenced by biotic and abiotic interactions. **Chemosphere**, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 333-341, 1999.
- UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.