

Caracterização da microbiota da rizosfera resistentes ao agrotóxico carbendazim em culturas de coentro na Comunidade Nova Esperança em Manaus/AM

Santos J.C.¹, Lima J.M.S.¹, Telles Y.V.¹, Araújo S.P.¹, Costa Neto P.Q.¹, Mota A.J.¹;
Peixoto J.C.C.¹, Batista I.H.², Pereira J.O.¹

¹Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Manaus-AM, Brasil.; ²Universidade Estadual do Amazonas (UEA), Manaus-AM, Brasil. Emails: jucileuzasantos@hotmail.com, jlma873@gmail.com; ydrielly@hotmail.com; spiresdearaujo@gmail.com; senaneto16@yahoo.com.br; adolfo.mot@gmail.com; jean.metagenoma@gmail.com; joseodairpereira@yahoo.com.br; iedahbatista@gmail.com

Resumo

Os agrotóxicos são comumente utilizados na produção agrícola. No entanto, devido à sua toxicidade e persistência, têm afetado severamente o ambiente, trazendo graves riscos à saúde e à manutenção da qualidade de vida. Assim, o objetivo principal deste trabalho foi isolar microrganismos envolvidos na degradação de carbendazim, a partir da rizosfera de culturas de Coentro em Manaus, realizando ensaios de sensibilidade a este agrotóxico pelos isolados, em diferentes concentrações. Foi feita análise de solos coletados em diferentes áreas, buscando-se detectar resíduos do fungicida a ser utilizado neste estudo. Realizou-se ainda a caracterização físico-química do solo rizosférico coletado para o isolamento. Três áreas agrícolas com histórico de uso intensivo de agrotóxicos, localizadas no Município de Manaus, Careiro da Várzea e Manacapuru foram escolhidas para o presente trabalho. Após análises de amostras de solo desses municípios, os resultados mostraram que embora tenha uso intensivo de agrotóxico nessas áreas, em Manacapuru e Careiro da Várzea o limite de quantificação não foi detectado. Somente em Manaus foi possível detectar a presença do analito carbendazim. Foram isolados dessa área 97 microrganismos resistentes a este fungicida, sendo 80 bactérias e 17 fungos. Dentre estes microrganismos 53 bactérias e os 17 fungos foram tolerantes nas cinco concentrações testadas. Há possibilidade destes microrganismos estarem envolvidos em processos de biodegradação, o que reflete a necessidade de estudos posteriores para avaliar este potencial.

Palavras-chave: microrganismos; agrotóxico; carbendazim; biodegradação.

Introdução

Os agrotóxicos são, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, de culturas florestais e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

No estado do Amazonas a proporção de agricultores dos diferentes municípios do Estado que cultivam frutas e legumes com uso de agrotóxico varia entre 64% e 96,7% (IBGE, 1998).

A biorremediação envolve o uso de microrganismos ou plantas para tratamento de ambientes contaminados e surge como alternativa para amenizar os efeitos deletérios do largo uso dos pesticidas (Chowdhury, 2008). Os microrganismos degradadores de agrotóxicos são encontrados no mundo microbiano e estes compostos podem ser mineralizados por um conjunto de microrganismos. A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos (Alexander, 1999).

O solo rizosférico contém uma grande biomassa e alta atividade microbiana, quando comparada com solo não-rizosférico. O número de microrganismos na rizosfera pode ser até 30 vezes maior que em solo livre de raízes (Bodelier et al.,1997). O estudo da comunidade microbiana de solo rizosférico é de grande importância, não só por entender o papel ecológico destes microrganismos na interação com as plantas, mas também para possíveis aplicações biotecnológicas.

Assim, o objetivo principal deste trabalho foi isolar microrganismos envolvidos na degradação de carbendazim, a partir da rizosfera de culturas de Coentro em Manaus, realizando ensaios de sensibilidade a este agrotóxico pelos isolados, em diferentes concentrações. Foi feita análise de solos coletados em diferentes áreas, buscando-se detectar resíduos do fungicida a ser utilizado neste estudo. Realizou-se ainda a caracterização físico-química do solo rizosférico coletado para o isolamento.

Materiais e Métodos

O estudo foi realizado nos Municípios de Manaus (Comunidade Nova Esperança), Careiro da Várzea (Comunidade São Francisco, Costa da Terra Nova) e em Manacapuru (comunidade de São Francisco, no ramal do Arapapá), que constituem regiões agrícolas onde agrotóxicos são intensamente utilizados. Destas áreas foram coletadas amostras de solo de culturas de Coentro (*Coriandrum sativum L.*), Chicória (*Cichorium endívia*) e berinjela (*Solanum melongena*) em Manaus, Careiro da Várzea e Manacapuru, respectivamente.

Para cada ponto de coleta foi usado como padrão 0-10 cm de profundidade. No Município de Manaus, foram coletadas 9 amostras de solo de culturas Coentro (*Coriandrum sativum L.*). Já no Careiro da Varzea foram coletadas 6 amostras de solo de culturas de Chicória (*Cichorium endívia*), por fim em Manacapuru foram coletadas 6 amostras de solo de culturas berinjela (*Solanum melongena*). Cada amostra continha aproximadamente 250 g, armazenada em frascos estéreis. A refrigeração foi feita através de gelo seco artificial e enviado para análise no laboratório Agrosafety através do método LC/MS para os analitos acefato, aldicarbe, carbendazim, etoprofós, imazalil, metamidofós, tiofanato-metílico, triclorfom e GC/MS para os analitos alacloro, aldrin, aletrina, ametrina, atrazina, azinfos etílico, azinfos metílico, azoxistrobina, bifentrina, bioaletrina, bromopropilato, captana, carbaril, carbofenotiona, carbofurano, carbosulfano, ciflutrininas totais, cipermetrininas totais, ciproconazol, clorfenvinfos, Clorotalonil, clorpirifós, clorpirifós metílico, deltametrina, diazinona, dicofol, dieldrin, difenoconazol, dimetoato, dissulfotom, dodecacloro, endossulfam, endrin, esfenvalerato, Etion, fenamifós, fenitrotiona, fenpropratrina, fentiona, fentoato, fenvalerato, fipronil, folpete, Forato, fosfamidom, fosmete, gama-BHC, hexaclorobenzeno, iprodiona, lambda-cialotrina, Malationa, metidationa, metoxicloro, mevinfós, monocrotofós, ometoato, parationa, parationa metílica, permetrina, pirazofos, pirimifos metílico, pirimifós etílico, procimidona, procloraz, profenofós, propanil, propargite, tebuconazol, terbufós, tetradifona, triazofós, trifluralina, vinclozolina.

O solo utilizado nesta pesquisa para o isolamento dos microrganismos foi obtido do Município de Manaus na Comunidade Nova Esperança. Foram coletadas amostras da região rizosférica de cultura de coentro, 5 amostras a 0-10 cm e 5 amostras e 10-20cm de profundidade e acondicionadas em sacos plásticos estéreis. As amostras de solo foram secas em local ventilado e peneiradas em peneira de 2 milímetros. Foram realizadas as análises de extração de Cálcio, magnésio, alumínio trocável, enxofre, Boro, fósforo e fósforo remanescente, potássio, pH em água, e pH cloreto de potássio (KCl), acidez potencial,

granulometria de acordo com o manual de análises químicas de solos, plantas e fertilizantes (Silva 2009).

O isolamento seletivo foi realizado em meio de cultura mínimo, solução de vitaminas, tendo como única fonte de carbono o fungicida carbendazim a 250µg/mL. A incubação foi a 28°C por 7 dias. Após esse período, 100mL do meio fermentado foi retirado e inoculado novamente em 500mL do mesmo meio e incubado por mais 7 dias. Após 2 repetições, se procedeu à diluição em série da última fermentação e semeadura no mesmo meio de cultivo, porém sólido e contendo carbendazim. Os métodos utilizados para preservação dos microrganismos foram: repiques contínuos, preservação em óleo mineral, água destilada ou método de Castellani somente para fungos e em glicerol a 50% somente para bactérias. Para a caracterização morfológica, foi realizada coloração utilizando-se a técnica de Gram e posterior visualização por microscopia óptica. Os testes de sensibilidade foram realizados através da técnica de difusão em poços (Pinto et al., 2003). A suspensão continha a espécie bacteriana crescida em caldo LB a 30°C, 125rpm por 24h na escala de McFarland a 0,5. Cada placa de Petri com meio Lurian Bertani (LB) foi semeada com a suspensão bacteriana. Em seguida foram perfurados 05 poços de 05 mm de diâmetro, preenchido com 40µl de carbendazim em 05 concentrações decrescentes: 1000µg/mL, 500µg/mL, 250µg/mL, 125µg/mL e 62,5µg/mL. As placas foram incubadas a 30°C por 24 horas.

As amostras de solos foram coletadas em três áreas agrícolas para análise de resíduos de agrotóxicos, nas coordenadas de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1 Lista dos locais de coleta das amostras de solo

Local de Coleta	Sequência das amostras	Latitude (W)	Longitude (S)
<i>Manaus</i>	1	3°00'56".5	59°55'14.0"
	2	3°00'56.9"	59°55'13.7"
	3	3°00'57.7"	59°55'13.5"
	4	3°00'57.7"	59°55'14.2"
	5	3°00'57.3"	59°55'14.1"
	6	3°00'56.7"	59°55'14.1"
	7	3°00'56.7"	59°55'14.3"
	8	3°00'57.2"	59°55'14.3"
	9	3°00'57.5"	59°55'14.5"
<i>Careiro da Várzea</i>	10	3°06'41.6"	59°50'37.2"
	11	3°06'41.5"	59°50'36.7"

	12	3°06'41.7"	59°50'36.7"
	13	3°06'41.6"	59°50'37.0"
	14	3°06'59.8"	59°51'29.8"
	15	3°06'59.8"	59°51'30.1"
	16	3°17'07.6"	60°23'259"
	17	3°17'08.0"	60°23'260"
	18	3°17'07".0	60°23'26.2"
<i>Manacapuru</i>	19	3°17'08.7"	60°23'25.2"
	20	3°17'10.5"	60°23'26.0"
	21	3°17'10.1"	60°23'25.2"

Resultados e Discussão

Embora tenha uso intensivo de agrotóxico nas três áreas, em Manacapuru e Careiro da Várzea o limite de quantificação não foi detectado. Somente em Manaus foi possível detectar a presença do analito carbendazim (0,189µg/Kg). A ausência de resíduos nas amostras pode estar associada, segundo Chaim (2004), ao fato de 32% dos agrotóxicos pulverizados retidos ficarem nas plantas, 19% irem pelo ar para outras áreas circunvizinhas da aplicação e 49%, apesar de irem para o solo, após algum tempo, parte se evaporar, parte lixiviar para o lençol freático e outra parte se degradar. Considera-se ainda o fato de ambientes de clima tropical apresentarem taxas de degradação de herbicidas mais rápidas, devido ao aumento de populações de microrganismos e as modificações nas condições ambientais, como resultado do aumento das temperaturas do solo (Laabs *et al.*, 2002). Regiões tropicais apresentam temperaturas mais elevadas nas camadas superficiais do solo, o que resulta em maior decomposição da matéria orgânica e uma maior atividade microbiana (Silva *et al.*, 1998), razões pelas quais podem não ter sido detectado os resíduos de agrotóxico, já que segundo o produtor de Manacapuru, a aplicação de deltametrina foi realizada três dias antes.

Somente no solo que apresentou resíduo de agrotóxico foi realizada análise físico química. As amostras foram coletadas no período da manhã, no dia 23 de maio de 2013, foram obtidas conforme metodologia descritas no item 4.2.2, nas seguintes coordenadas geográficas (amostra 1: S03°00'57.0" W059°55'14.4"; amostra 2: S03°00'56.6" W059°55'14.5"; amostra 3 S03°00'57".0 W059°55'14.8"; amostra 4 S03°00'57.0" W059°55'14.8"; amostras 5: S03°00'56.6" W059°55'14.9").

A análise do solo é o instrumento que o técnico utiliza para recomendar as necessidades de calagem e fertilizantes, melhorando as condições de fertilidade de um solo, para que as plantas encontrem os nutrientes que elas precisam para responder com altas produtividades. No entanto as análises foram realizadas para se verificar em quais condições de solo, os microrganismos se encontravam quando foram isolados.

Tabela 2 Resultados da análise física do solo da Comunidade Nova Esperança, Manaus-AM

PERFIL Prof. (cm)	Areia	Silte	Argila	V%	(CTC _{EFETIVA})	m%	M.O	P-rem	V%
	-----dag kg ⁻¹ -----				-----cmol dm ⁻³ -----	%	dag kg ⁻¹	mg L ⁻¹	
0-10	92,2	7,3	0,4	38,9	2,8	0	0,5	54,3	
10-20	93,5	5,9	0,5	97,5	3,2	0	1,1	54,3	

saturação por bases; CTC_{EFETIVA} capacidade de troca catiônica; m% Saturação por Alumínio; P-rem fosforo remanescente.

O solo analisado apresentou classe textural arenosa (Tabela 2). A matéria orgânica (M.O) na profundidade de 0-10 foi determinada como muito baixa (0,5dagKg⁻¹), na profundidade 10-20 foi determinada como baixa. A saturação por bases (V%), na profundidade de 0-10, caracterizou o solo como de baixa fertilidade, já na profundidade de 10-20, com saturação bem maior que 50%, a caracterização é de solo fértil. A capacidade de troca catiônica efetiva foi determinada como média, o nível de fósforo remanescente foi muito bom, apresentando os valores de 54,28 mgL⁻¹ e 54,36mgL⁻¹ nas profundidades de 0-10 e 10-20, respectivamente. A Saturação por Alumínio (m) foi classificado como muito baixa.

Tabela 3 Resultados da análise química do solo da Comunidade Nova Esperança, Manaus-AM

PERFIL P Prof. (cm)	pH	P	K	Ca	Mg	B	Al	H+Al	SB	SO ₄ ²⁻	CTC
		mg dm ⁻³	-----				cmol dm ⁻³ -----				
f 0-10	7.5	824.7	14	2.6	0.2	0.4	0	4.53	2.9	0.15	7.4
ó 10-20	7.6	745.5	25	2.5	0.6	0.5	0	0.08	3.2	0.21	3.3

s
foro; K potássio M.O matéria orgânica; Mg magnésio; B boro, Al Alumínio; H+Al acidez potencial; SB soma de bases; (CTC capacidade de troca de cátions.

Segundo Furtini Neto et al (2001), geralmente a acidez aumenta com a profundidade. Os resultados mostraram que em ambas profundidades (0-10 e 10-20cm) o pH do solo não apresentou diferença significativa (Tabela 3). De acordo com a classificação de Ribeiro A.

(1999) para o pH em água, relação 1:2,5 TFSA, o solo apresentou alcalinidade fraca, apresentando valores na faixa entre 7.5 e 7.6 respectivamente. Segundo a classe de valores utilizadas na agronomia quando o pH se encontra maior que 6,0, é classificado como muito alto (Sobral, et al, 2007). O solo foi classificado como arenoso e o nível de fósforo para este tipo de solo foi muito alto para ambas profundidades. O nível de potássio trocável quando o valor é menor que 30 é considerado baixo (14 - 25). O nível do Cálcio é classificado como médio (2.6 - 2.5), o magnésio e o boro em profundidade de 0-10 cm apresentaram níveis baixos e em 10-20 cm, níveis médios. O alumínio foi detectado em níveis muito baixos e a acidez potencial (H+Al) na profundidade de 0-10 cm apresentou nível médio e em 10-20 cm foi detectado em nível baixo. A soma de bases (SB) foi classificada com níveis médio, e a capacidade de troca de cátions (CTC) pH 7 na profundidade de 0-10 cm foi considerada baixa e em 10-20, foi média.

Em geral, os solos arenosos retêm pouca umidade e são pouco férteis, no entanto por se tratar de uma área utilizada para cultivo de hortaliças, os agricultores realizam adubação periodicamente, ocasionando níveis de nutrientes considerados suficientes para suprir as necessidades das plantas. Segundo Oliveira (2010) em solo arenoso, plantas e microrganismos vivem com mais dificuldade, devido à pouca umidade. Mesmo esta área sendo arenosa e apresentando resíduos de agrotóxico, foi possível isolar 80 bactérias e 17 fungos degradadores de carbendazim.

Na coleta de solo foram isolados 97 microrganismos, dos quais 80 são bactérias e 17 são fungos. Dessas 80 bactérias 52 (65%) são gram-negativas e 28 (35%) são gram-positivas. A maioria são bacilos 65 (81%), 12 (15%) são cocos, 2 (3%) são diplococos e 1 estafilococos (1%). Dos 17 fungos, 13 são filamentosos e 4 são leveduriformes.

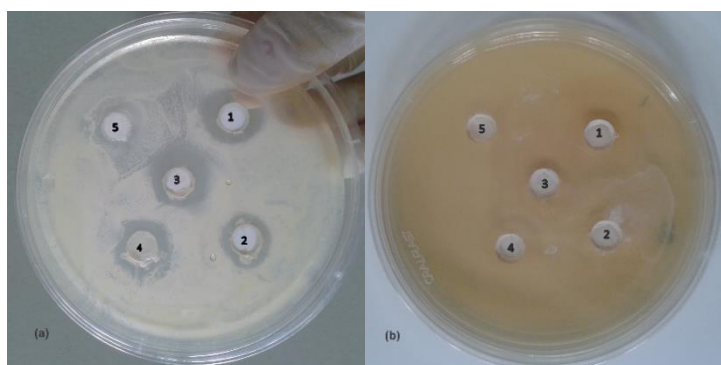


Figura 1 Teste de Sensibilidade (a) Halo de inibição
(b) Crescimento ao redor do poço

No teste de sensibilidade dos 97 microrganismos na presença do fungicida carbendazim, observou-se que 53 bactérias e 17 fungos apresentaram crescimento ao redor do poço (Figura 1) em todas as concentrações testadas (1(1000µg/ml), 2 (500µg/mL), 3 (250µg/mL), 4 (125µg/mL) e 5(62,5µg/mL)).

De acordo com Yarden *et al.* (1990) as bactérias exercem maior influência na biodegradação do fungicida carbendazim, quando comparado ao fungo *A. alternata*. Em solos sem prévio tratamento, somente a inoculação bacteriana resultou em biodegradação acelerada do fungicida. Tal fato sugere que enquanto o fungo contribui para a dissipação de carbendazim no solo, as bactérias exercem maior influência na biodegradação desse fungicida. Observaram ainda degradação mais rápida por culturas bacterianas originadas de solos previamente tratados com carbendazim do que daquelas provenientes de solos sem prévio tratamento. Dessa forma, nossos resultados foram bastante satisfatórios, pois dos 97 microrganismos isolados de solos tratados com carbendazim, 70 apresentaram-se resistentes na presença do fungicida, o que sugere a possibilidade desses microrganismos possuírem potencial na degradação do referido fungicida.

Conclusões

Os solos agrícolas da região pesquisada apesar do uso intensivo de agrotóxicos têm retido pouco agrotóxico. Foi possível, no entanto isolar bactérias tolerantes ao Carbendazim em variadas concentrações. Espera-se ainda que estes isolados apresentem potencial de biodegradabilidade de carbendazim podendo ser utilizados como uma alternativa eficaz no tratamento de áreas contaminadas por este composto. Acredita-se que seja possível obter bioprodutos para remediação de áreas impactadas com agrotóxico. Desta forma, espera-se que a proteção dos ecossistemas, possa ter um elemento a mais na sua efetivação.

Referências

ANVISA. (2003). AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Distribuição de resíduos de agrotóxicos em frutas e verduras entre julho de 2001 e dezembro 2002. Brasília. p. 72.

Alvarez VVH, Novais RF, Barros NF, Cantarutti RB, Lopes, AS (1999). Interpretação dos resultados das análises de solos. In: Ribeiro AC, Guimarães PTG, Alvarez VVH. (Ed.). Recomendação para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais: 5. Aproximação. Viçosa: Comissão de Fertilidade do Solo do Estado de Minas Gerais. p.25-32.

Alexander, M (1999). *Biodegradation and bioremediation*. 2. ed. New York: Academic, p. 453.

Bodelier, PLE, Wijlhuizen, AG, Blom CWPM, Laanbroek, HJ (1997). Effects of photoperiod on growth of and denitrification by *Pseudomonas chlororaphis* in the root zone of *Glyceria maxima*, studied in a gnotobiotic microcosm. *Plant Soil*, 190:91–103.

Chowdhury A, Pradhan S, Saha M, Sanyal N. (2008). Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*; 48(1):114-127. doi:10.1007/s12088-008-0011-8.

Chaim A (2004). Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: Silva CMMS e Fay EF. Agrotóxicos e ambiente. Brasília: Embrapa; p. 289-317.

Furtini Neto, A. E.; Vale, F. R.; Resende, A. V.; Guilherme, L. R. G.; Guedes, G.A.A (2001). Fertilidade do solo. 252f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Solos e Meio Ambiente) – Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) 1998. Censo Agropecuário, 1995-1996. Rio de Janeiro.

Oliveira, DL (2010). Solos uma Questão de Sustentabilidade. Gestão & Tecnologia - Faculdade Delta - ISSN 2176-2449. Edição III janeiro/fevereiro.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325.

Laabs, V.; Amelung, W.; Pinto, A.; Zech, W (2002). Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, Madison-WI, 31(1): 256-268.

Pinto TJA, Kaneko TM, Ohara MT (2003). Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, 325 p.

Silva F (2009). Manual de análise química de solos, plantas e fertilizantes 2 ed. rev. Ampl. 627 p. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica.

Silva, A. A., Oliveira Jr, R. S., Castro Filho, J. E (1998). Avaliação da atividade residual no solo de imazaquin e trifuralin através de bioensaios com milho. *Acta Scientiarum*, Maringá-PR, v. 20, n. 3, p. 291–295.

Sobral, L; Viegas, P.R.A., Siqueira, O.J.W. De; Anjos, J.L. Dos; Barreto, M.C De V.; Gomes, J.B.V (2007). Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes no Estado de Sergipe. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, p. 251

Yarden O, Salomon, R, Katan J, Aharonson N (1990). Involvement of fungi and bacteria in enhanced and nonenhanced biodegradation of carbendazim and other benzimidazole in soil. *Can. J. Microbiol.*, v. 36, p. 15-36,.