

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO DE CULTIVO DE VIDEIRAS CONTAMINADO COM DICARBAMATO PARA BIORREMEDIAÇÃO

Maiara Zipperer*

Elisandra Minotto**

Jane Mary L. Neves Gelinski**

César Milton Barato**

Rodrigo Geremias**

Resumo

A pulverização com fungicidas é um dos métodos mais recomendados para manejo de doenças presentes na vitivinicultura. Muitos fatores afetam a ecologia do solo, dentre eles o uso excessivo de fungicidas e outros agrotóxicos utilizados na agricultura. Os microrganismos são capazes de degradar uma grande variedade de compostos químicos sintetizados pelo homem. O presente trabalho teve como objetivo isolar fungos filamentosos de solos contaminados com fungicidas dicarbamatos e selecionar os microrganismos com potencial biorremediação. O isolamento se deu através da metodologia de diluições seriada, sendo a seleção dos micro-organismos realizada através inoculação pontual do fungo em meio BDA, suplementado com concentrações de 0, 1000, 2000, 3000 e 4000 ppm de mancozeb. Os isolados fúngicos foram submetidos a teste de velocidade de crescimento em substrato composto por solo, turfa e palha, para verificação de capacidade de desenvolvimento. Com a metodologia de microcultivo, foi possível realizar a indentificação macroscópica e microscópica das culturas dos fungos isolados de solo de vinhedos, destacam-se os *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp., sendo *Aspergillus* sp. o gênero que apresentou mais capacidade de degradação.

Palavras-chave: Biorremediação. Biobed. Fungos.

1 INTRODUÇÃO

A produção de vinhos no Brasil se desenvolveu a partir do século XIX, quando os imigrantes italianos iniciaram a fabricação da bebida principalmente na região Sul. A vitivinicultura brasileira, principalmente a do estado de Santa Catarina, está passando por uma transformação que trata-se de uma atividade importante para a sustentabilidade da pequena propriedade no Brasil, que tem se tornado igualmente relevante no que se refere ao desenvolvimento de algumas regiões, com a geração de emprego em grandes empreendimentos, que produzem uvas de mesa e uvas para processamento (MELLO, 2013).

Dentre os fatores que podem afetar negativamente à produção da vitivinicultura, destacam-se os ligados às doenças. A aplicação intensiva de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) pela agricultura convencional é uma importante fonte de contaminação do ecossistema edáfico, compromete a atividade da biodiversidade microbiana do solo e representa perigo toxicológico para a população humana em geral.

Dentre as inúmeras tecnologias para remediação, destaca-se a biorremediação, como uma opção para promover a destoxificação do local ou a remoção de elementos contaminantes. A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos, que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes (JACQUES, 2010).

De modo especial, os fungos são considerados biodegradadores eficientes pois possuem características como a bioatividade e o crescimento morfológico, que os tornam potencialmente melhores degradadores do que as bactérias. Além disso, os fungos são capazes de crescer sob condições ambientais de estresse como meios com baixos valores de pH, pobres em

nutrientes e com baixa atividade de água, favorecendo o seu desenvolvimento diante de outros microrganismos (DAVIS;WESTLAKE, 1978).Uma alternativa para tratamento in loco dos resíduos da lavação dos pulverizadores com compostos metabólitos de mancozeb é utilizando-se reatores biológicos, conhecidos como Biobeds cuja principal função é reduzir as concentrações dos pesticidas presentes nos efluentes através da sua adsorção no substrato do reator e sua biodegradação pela população microbiana presente no meio.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 METODOLOGIA

2.1.1 Local da pesquisa

Para o desenvolvimento da pesquisa, foram coletados amostras de solos contaminados de diferentes propriedades rurais de Videira- SC. A análises microbiológicas foram realizadas nos laboratórios de pesquisa de microbiologia, instalados nas dependências da Universidade do Oeste de Santa Catarina, campus Videira.

2.1.2 Coleta de amostras de solo

As amostras foram coletadas em três áreas diferentes de plantio de videiras, com utilização intensiva de fungicidas dicarbamatos, no município de Videira- SC. A coleta pontual foi realizada na área contaminada, com uma profundidade de até 1m, utilizando um coletor manual com 50 mm de diâmetro. Após as amostras foram acondicionadas em plásticos e levados em temperatura ambiente até a universidade. As mesmas passaram por um processo de secagem ao ar, por um período de 5 dias.

2.1.3 Isolamento de fungos de solos contaminados

Para isolamento dos fungos, análises foram realizadas a partir de solo contaminado com fungicidas dicarbamatos, através da técnica de diluições seriadas, onde 25 g de amostra de solo foram homogeneizadas em 225 ml de água peptonada 0,1% (diluição 10-1). Foram realizadas três diluições para cada amostra. As mesmas posteriormente foram semeadas (0,1 ml) em placas de petri contendo meio PDA (potato-dextrose-ágar) acidificado, com auxílio de uma alça de drigalsky. As placas passaram por incubação a 28°C, durante 3 dias para desenvolvimento dos microorganismos.

2.1.4 Seleção dos microrganismos para biorremediação

A seleção dos micro-organismos foi realizada através inoculação pontual do fungo em meio BDA, suplementado com diferentes concentrações de mancozeb: 0, 1000, 2000, 3000 e 4000 ppm. Para tanto foi inoculado pontualmente no centro da placa de petri, uma amostra de 1m² do fungo, sobre a superfície do meio de cultivo.

Os cultivos foram mantidos em estufa a 30°C por 5 dias, sendo medido o diâmetro da área recoberta pelo fungo, em quatro direções, a cada 24 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata.

2.1.5 Teste de velocidade de crescimento em substrato

Para o teste de crescimento em substrato, foram avaliados os isolados fúngicos que mostraram maior potencial de biorremediação a fungicidas nos testes anteriores. Como substratos foram utilizados solos coletados de locais contaminados com dicarbamato, de solos sem histórico de contaminação por esses fungicidas e substrato de utilizado como leito para biobed, constituído de palha, solo e turfa.

Os substratos foram esterilizados duas vezes, por uma hora, com intervalo de 24h, após receberão diferentes concentrações de mancozeb (0, 1000, 2000, 3000 e 4000 ppm). Os mesmos foram acondicionados em tubos de ensaio e inoculados um disco de cultura dos fungos com maior potencial para

degradação de fungicidas dos testes anteriores. Os frascos foram submetidos a uma temperatura de 28°C. O crescimento fúngico foi avaliado a cada 24h, por 30 dias.

2.1.6 Identificação fúngica

A identificação de fungos filamentosos tem, como fundamento, a observação da morfologia da colônia e aspectos microscópicos. A análise da colônia visou observar cor, textura e estruturas microscópicas..

Foram avaliados 4 fungos que obtiveram melhor desempenho na degradação de mancozeb. Para início do teste foi utilizada a técnica de microcultivo para identificação de aspectos microscópicos.

Colocado sobre uma sobre uma lâmina esterilizada, contida em uma placa de Petri estéril, um cubo de ágar BDA. A lâmina esteve sobre um suporte, formado por dois palitos. Semeado o fungo escolhido já cultivado em repique recente após foi recoberto com com uma lamínula esterilizada. Para conservação de umidade, um pequeno chumaço de algodão estéril úmido em água destilada, foi colado na placa de Petri, evitando assim a dessecação do meio de cultura, durante o crescimento do fungo.

Após 4 dias de crescimento em temperatura de 28°C, foi retirado a lamínula para análise microscópica. Pingado uma gota de corante azul de algodão e observado em microscópio óptico, anotando assim suas características.

2.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.2.1 Isolamento de fungos de solos contaminados

Após 3 dias de incubação, as placas foram retiradas da estufa, para análise de crescimento de colônias. O isolamento foi realizado pela técnica de esgotamento por estrias. Após isolamento, os fungos foram mantidos preservados em tudo inclinado contendo meio de cultura PDA.

2.2.2 Seleção dos microrganismos para biorremediação

A análise do desenvolvimento fúngico nas placas de petri com meio de cultura contendo diferentes concentrações de mancozeb, foi feita com 8 microrganismos diferentes. Foi avaliado o crescimento por 7 dias.

Através da observação macroscópica, foram selecionados 4 fungos considerados com bom desempenho de crescimento durante tempo determinado de incubação. A escolha foi dada através do critério de alto desenvolvimento em placas contendo 4000ppm de mancozeb, maior concentração dada neste experimento.

Como mostra o Gráfico 1, os fungos que mostraram melhor desenvolvimento em alta concentração, são nomeados como 2P,2M,3V e 3 respectivamente.

Nas placas contendo os fungos 1S,ET,2-01, o crescimento se deu de maneira mais lenta, mostrando dificuldade de desenvolvimento em tratamentos contendo 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungicida. Já na placa contendo o microrganismo denominado 2-0 não houve crescimento, podendo desconsiderar a análise, sendo o fungo inibido totalmente na presença de Mancozeb.

Verifica-se que embora o Mancozeb seja um fungicida eficiente no controle de pragas fúngicas na macieira e tenha ação deletéria no solo, os fungos estudados foram capazes de se desenvolverem na presença do mesmo em algumas concentrações conforme Figura 1.

2.2.3 Teste de velocidade de crescimento em substrato

Foram escolhidos os quatro fungos com melhores desenvolvimento de crescimento já mencionados no teste anterior, sendo eles denominados como 2P,2M, 3V E 3. Deste modo, o crescimento em tubos de ensaio com o mesmo substrato utilizado no leito do Biobed, foi acompanhado durante 30 dias.

O desenvolvimento no tratamento controle com ausência de mancozeb começou a ser verificado apenas após quarto dia de incubação.

No último dia de tratamento a amostra em que mais demonstrou desenvolvimento foi a qual continha o fungo denominado de 3, podendo ser visualizado um crescimento de 2/3 do tubo contendo concentração de 4.000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. O fungo 2P demonstrou crescimento médio de 3cm no tratamento com maior concentração de fungicida ao fim da análise. Na amostra com aplicação de 4.000 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de mancozeb, o fungo 3V se desenvolveu de modo mais lento, atingindo somente 1,5 cm de substrato. Na presença da maior concentração, foi observado um crescimento final de 1cm na amostra contendo o fungo 2M.

Embora todos os fungos utilizados tenham se desenvolvido de forma considerável no substrato do biobed contaminado com fungicida, o fungo 3 ganhou destaque devido sua alta capacidade de crescimento.

2.2.4 Identificação Fúngica

A identificação foi dada através de avaliação macroscópicas e microscópicas das culturas, observando a morfologia das colônias. As características macromorfológicas avaliadas consistiram no tamanho da colônia, características dos bordos, textura e pigmentação.

Dentre os fungos filamentosos isolados de solo de vinhedos, foram identificados os seguintes: *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. e *Fusarium* sp.. Fungos de podridão-branca são os mais conhecidos capazes de transformar compostos orgânicos (SUTHERLAND, 1992). No entanto outros organismos como *Cunninghamella* sp., *Penicillium* sp. e *Aspergillus* vem mostrando sua capacidade de degradar (LAUNEN et al., 1995).

O fungo 3 que apresentou maior desenvolvimento no teste de crescimento em substrato, foi identificado como gênero *Aspergillus*. Essa espécie apresenta conidióforo, presença de hifas septadas hialinas com ramificação em ângulo agudo, conforme figura 2. Já as características macroscópicas apresentaram coloração branca, lisa e com textura algodonosa.

A identificação dos micro-organismos presentes contribui para com seu uso futuro a fim de atender as exigências para o conhecimento da

biodiversidade e aproveitamento dos recursos genéticos. Com a grande variedade de fungo, torna-se muito difícil distingui-las suas espécies, devido à alta similaridade das características morfológicas. Os métodos moleculares mais tradicionais para detecção detalhadas de fungos dependem de análise diretas de PCR.

O uso das técnicas moleculares se tornou importante ferramenta na identificação de fungos filamentosos. Estas técnicas possuem a vantagem de apresentar um processo rápido e de alta sensibilidade e não estão sujeitas aos vários fatores que podem afetar a caracterização morfológica dos fungos, de tal forma que podem ser utilizadas para uma abordagem complementar e mais abrangente, possibilitando solucionar dúvidas taxonômicas (Mello et al., 2011).

A técnica de extração e sequenciamento de DNA para identificação de fungos filamentosos não foi realizado neste trabalho, devido a alguns inconvenientes ocorridos no cronograma de estudo. Deste modo, fica necessário a realização do método, em uma futura pesquisa, para obtenção de maiores detalhes sobre os fungos isolados neste estudo.

3 CONCLUSÃO

Com os métodos *In vitro*, foi possível estudar a degradação do fungicida pelos fungos. Apesar da presença de substância tóxica alguns fungos conseguiram se desenvolver, mesmo de forma lenta em solos contaminados. Estes resultados trazem o indicativo que, os quatro isolados apresentaram um desenvolvimento satisfatório nos meios contendo 1000, 2000, 3000 e 4000 ppm do fungicida. Desta forma apontando a possibilidade do uso destes na biorremediação de solos contaminados pelo mancozeb em concentrações de até 4000 µg.mL.

A identificação e o isolamentos de fungos, auxiliam no estudo da técnica de biorremediação através de micro-organismos para eliminação de pesticidas do solo. O trabalho demonstra que os locais contaminados com

dicarbamatos, consistem em uma boa fonte de microrganismos para estudos de biorremediação desses mesmos poluentes.

Com a inoculação de um fungo é possível ter uma maior eficiência da degradação dos pesticidas no Biobed, porém, será necessário o estudo sobre o gênero e capacidade do microrganismo. Vários fatores influenciaram nos resultados das análises, sendo assim, teste com diferentes tipos de substratos para desenvolvimento do micélio, seria uma alternativa para verificar se haveria desenvolvimento do fungo mesmo na presença de concentrações maiores.

A tecnologia ainda vem sendo testada e adaptada. Com os resultados desta pesquisa, é possível compreender a rota metabólica utilizada pelos microrganismos, realizar estudos de toxicidade e biodegradação dos metabólitos formados. Assim, haverá a implementação de sistemas de produção mais seguros e ambientalmente mais corretos, de modo que solo, atmosfera e água tenham sua contaminação significativamente reduzida, em benefício das atuais e futuras gerações.

REFERÊNCIAS

CASTILLO, M. D. P.; TORSTENSSON, L.; STENSTRÖM, J. Biobeds for environmental protection from pesticide use – a review. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 56, n. 15, p. 6206-6219, Aug. 2008.

DAVIS, J.S.; WESTLAKE, D.W.S. Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* V.25 p. 146-156, 1978..

JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J. da; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p.280-287, 2010. online.

LAUNEN, L.; PINTO, L.; WIEBE, C.; KIEHLMANN, E.; MOORE, M. The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 477-488, 1995.

MELLO, C.S.M.; REIS, A.; SILVA, J.T.B.; Manual de curadores de germoplasma - Micro-organismos: Fungos filamentosos. Documentos,134. Brasília, DF: Embrapa recursos genéticos e Biotecnologia, 2011. 25p.

MELLO, L.M.R. Viticultura Brasileira: Panorama 2012. Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/comunicado/cot137.pdf> >. Acesso em: 20 Julho. 2020

SUTHERLAND, J.B. Detoxification of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungi. *Journal of Industrial Microbiology*, v.9, p.53–62, 1992.

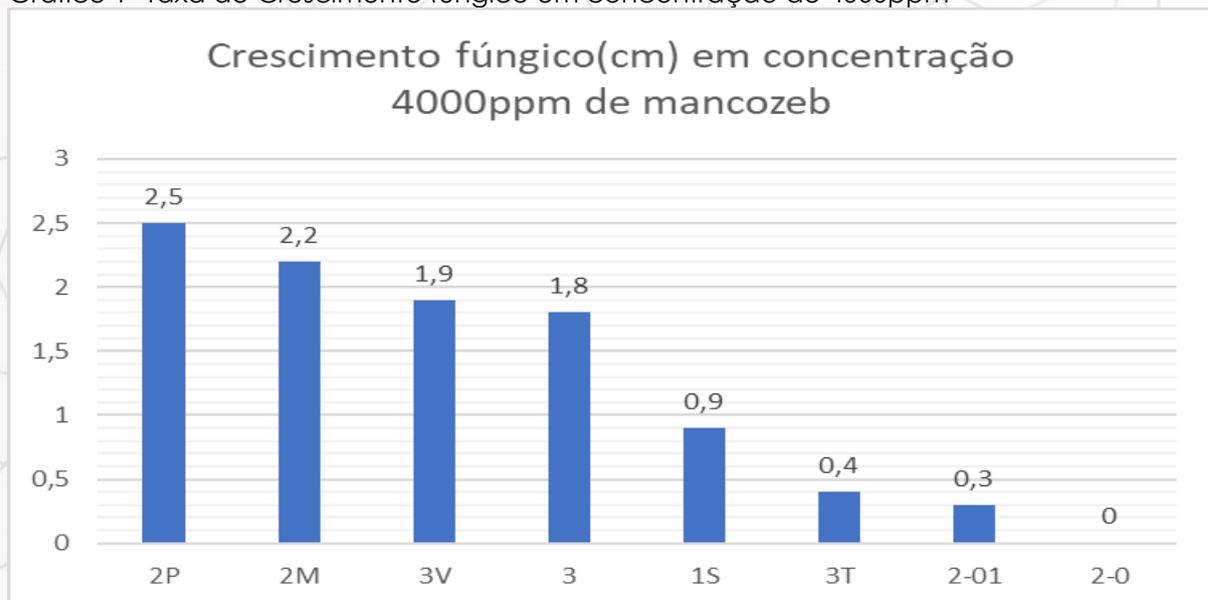
Sobre o(s) autor(es)

*Acadêmica do curso de Bacharelado em Engenharia Química pela Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira-SC.

**Professores Orientadores Programa de Bolsa de Iniciação Científica UNIEDU Art.170.

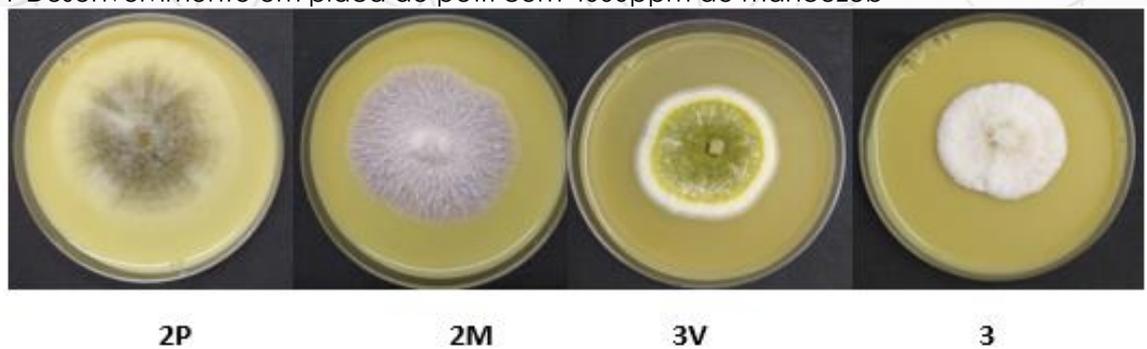
Email:maira.zipperer@unoesc.edu.br

Gráfico 1- Taxa de Crescimento fúngico em concentração de 4000ppm



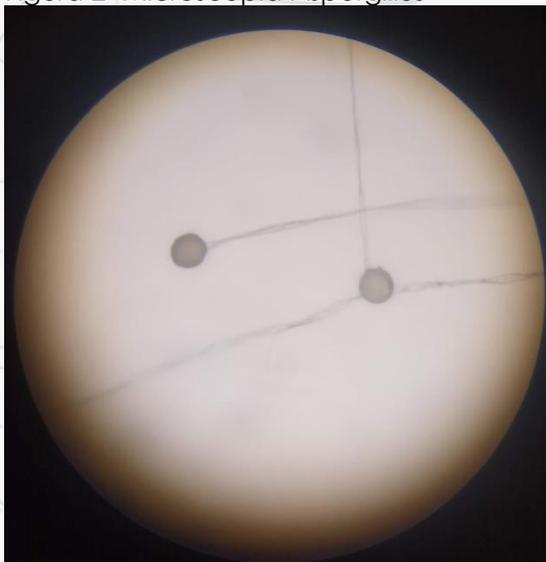
Fonte: A autora(2020)

Figura 01-Desenvolvimento em placa de petri com 4000ppm de mancozeb

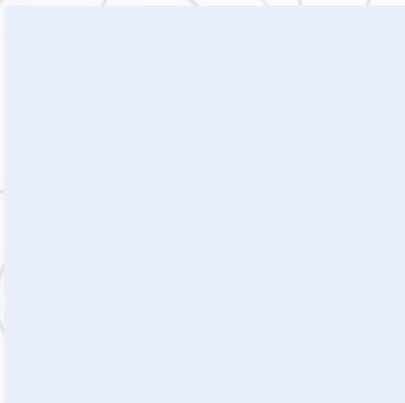


Fonte: A autora(2020)

Figura 2- Microscopia Aspergillus

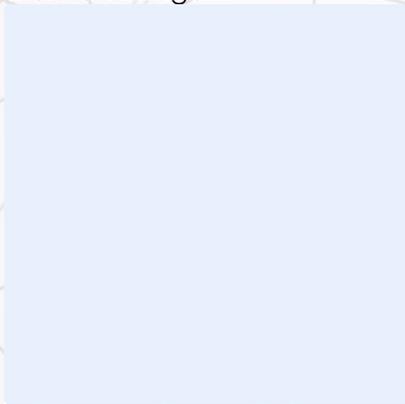


Fonte: A autora(2020)



Fonte: Fonte da imagem

Título da imagem



Fonte: Fonte da imagem



Fonte: Fonte da imagem