



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO AMAZONAS
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS DA AMAZÔNIA

LILIAN DE OLIVEIRA CORRÊA

DEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-FOSFONOMETIL-GLICINA) POR
FUNGOS ISOLADOS DE SOLO DA FLORESTA AMAZÔNICA.

MANAUS
2013

LILIAN DE OLIVEIRA CORRÊA

**DEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-FOSFONOMETIL-GLICINA) POR
FUNGOS ISOLADOS DA FLORESTA AMAZÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Universidade do Estado do
Amazonas-UEA, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e
Recursos Naturais.

Orientadora : Prof^a. Dr^a. Érica Simplício de Souza

Co-orientador : Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza

**MANAUS
2013**

LILIAN DE OLIVEIRA CORRÊA

**DEGRADAÇÃO DE GLIFOSATO (N-FOSFONOMETIL-GLICINA) POR
FUNGOS ISOLADOS DA FLORESTA AMAZÔNICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação da Universidade do Estado do
Amazonas-UEA, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e
Recursos Naturais.

Data ____/____/____

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Érica Simplício de Souza-UEA

Prof^a. Dr^a. Patrícia Melchionna Albuquerque-UEA

Prof. Dr. José Renato Pereira Cavallazzi-UFAM

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores, especialmente, Mestres e Doutores, que conhecem as dificuldades da realização de uma pesquisa e a satisfação de um objetivo alcançado.

“Pela Graça, Sois Salvos”.

EF2-8

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me presenteado com conhecimento, paciência e sorte.

À CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia da UEA.

À Orientadora Prof^a. Dr^a. Érica Simplício de Souza e ao Co-orientador Prof. Dr. João Vicente Braga de Souza, pelas orientações e correções.

À Sheila Caetano pela compreensão e paciência.

À Colaboradora Adriana da Fonseca de Souza por ter iniciado as pesquisas com o glifosato e ensinamentos da realização da cromatografia de camada delgada.

À Colaboradora Prof^a. Ana Cláudia Cortez –INPA, na identificação dos fungos isolados.

Aos Colaboradores Prof. Felipe Araújo Moura e Prof. Diego Rabelo (Química-UFAM) na realização do HPLC-MS, pelas explicações, paciência e compreensão.

Ao Colaborador Prof. Ronildo Oliveira Figueiredo na realização das estatísticas da pesquisa.

Aos colegas do laboratório de Micologia-INPA que ajudaram na realização da pesquisa.

LISTA DE TABELA

Tabela 1: Fungos isolados de solo contaminado com glifosato.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Crescimento de isolados fúngicos (*Aspergillus*-2B112, *Penicillium*-4A21 e *Penicillium*-4A211) em meios czapeks com baixa concentração de sacarose (2,35g/l).

Figura 2: Degradação do glifosato por isolados fúngicos.

Figura 3: Espectro de massa resultante de CLAE-MS do mix (solução contendo os padrões de AMPA e Sarcosina e Round-up (glifosato) nas concentrações de 2,5 mg/ml).

Figura 4: Espectro de massa resultante de CLAE-MS da solução inicial antes do inóculo (meio czapek com 2,35g/l de glifosato).

Figura 5: Espectro de massa resultante de CLAE-MS do filtrado do isolado *Penicillium* 4A 211.

Figura 6: Curva de calibração do Glifosato no CLAE-MS.

Figura 7: Curva de calibração do AMPA no CLAE-MS.

Figura 8: Curva de calibração do Sarcosina no CLAE-MS.

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA -Hormônio Indol Acético

AMPA- Acido aminometilfosfônico

EPSP- 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato

EPSPS- -enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase

CCD- Cromatografia de camada delgada

CZ-meio de cultura Czapek

GLP- glifosato

CLAE-EM-Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao espectro de massa

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	11
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.2.1.Microrganismos do Solo degradadores de Glifosato.....	14
2.2.2.Biodegradação do Glifosato no solo e Metabólitos.....	15
2.2.3. Impacto ambiental e Toxicidade do Glifosato.....	17
2.2.4. Métodos de detecção do Herbicida Glifosato.....	19
3.OBJETIVO.....	21
3.1.OBJETIVO GERAL.....	21
3.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4.MATERIAL E MÉTODOS.....	22
4.1 Universo de estudo.....	22
4.2.Procedimentos.....	22
4.2.1 Isolamento de fungos.....	22
4.2.2.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.....	23
4.2.3.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono.....	23
4.2.4.Avaliação da degradação do glifosato : Colorimetria e Cromatografias.....	24
4.2.4.1. Colorimetria.....	24
4.2.4.2.Cromatografia de Camada Delgada.....	24
4.3.Cromatografia líquida de alta eficiência: CLAE-MS.....	25
4.4 Análise dos resultados.....	25
5.RESULTADO.....	25
ARTIGO.....	26
1.Introdução.....	27
2.Material e Métodos.....	29
2.1.Herbicida Glifosato.....	29
2.2.Padrões para estudo do metabolismo do herbicida.....	29
2.3. Amostra de Solo Amazônico.....	29
2.4.Isolamento e identificação de fungos tolerantes ao herbicida Glifosato.....	29
2.5.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.....	30

2.6.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono.....	30
2.7.Degradação do glifosato : Colorimetria e Cromatografias.....	31
2.7.1.Colorimetria.....	31
2.7.2.Cromatografia de Camada Delgada.....	31
2.8.Cromatografia líquida de alta eficiência-CLAE-MS.....	32
3.RESULTADOS	
3.1.Isolamento e identificação de fungos tolerantes ao herbicida Glifosato.....	32
3.2.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.....	32
3.3.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono.....	34
3.4.Avaliação da degradação do glifosato pelos isolados selecionados.....	35
3.5.Cromatografia em Camada Delgada.....	35
3.6.Avaliação do Glifosato e seus metabólitos no filtrado do isolado <i>Penicillium</i> 4A211-CLAE-MS.....	36
4.DISSCUSSÃO.....	39
5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
6.CONCLUSÃO.....	44
7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8.APÊNDICE	51

1.INTRODUÇÃO

A agricultura brasileira encontra-se em desenvolvimento considerando que a produção de alimentos no país é feita em mais de 280 milhões de hectares de terra distribuídos em culturas anuais e perenes. Assim, com o aumento da população, está ocorrendo também aumento de áreas cultivadas e a utilização de produtos como agrotóxicos, incluindo herbicidas e pesticidas que garantem desenvolvimento e sucesso do plantio.

Os agrotóxicos são produtos que têm o objetivo de destruir pragas e eliminar doenças que podem atacar as plantações. São classificados como pesticidas, fungicidas e herbicidas. Tais produtos quando utilizados de forma exagerada, indiscriminada, produzem impacto ambiental, não somente em relação à contaminação dos alimentos consumidos pela população, como também contaminação do solo, ar e água dos rios e subterrâneas (Sanches, 2003).

Além da contaminação ambiental, os herbicidas podem atuar no surgimento de ervas daninhas resistentes, causar morte de larvas e animais aquáticos e ser tóxico ao homem provocando doenças respiratórias, dermatites e até mesmo mutações celulares resultando em câncer (Rank, 2003) e alterações endócrinas (Romano et al., 2009). Os agrotóxicos também podem influenciar na reciclagem da matéria orgânica realizada por microrganismos presentes no solo, se destacando os fungos como os principais decompositores.

Dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo se destaca o Glifosato, um agrotóxico patenteado pela Monsanto e vendido como Round-up, possuindo apresentação no estado líquido e sólido granulado. Apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m. = 169,1 g/mol), em condições ambientais, é sólido cristalino, muito solúveis em água (12 g/L a 25°C) e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol. Apresenta ponto de fusão de 200°C, possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (Galli, 2005).

De acordo com Prata (2000), quanto menor a solubilidade em água de uma molécula, maior é a capacidade de sorção desta no solo. O glifosato se comporta de modo contrário, ou seja, é uma molécula altamente solúvel em água e extremamente sorvida. Esta sorção no solo explica-se pelas forças de van der Waals, ligações de

hidrogênio com a matéria orgânica do solo e ligação covalente com átomos metálicos dos óxidos do solo.

O herbicida Glifosato é utilizado em lavouras por meio de pulverização com o objetivo de destruir ervas daninhas invasoras, as quais podem ameaçar o desenvolvimento das plantações.

O Glifosato é o único herbicida do qual o mecanismo de ação resume-se na inibição da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), a qual catalisa a condensação do ácido shiquímico e do fosfato piruvato, evitando, assim, a síntese de três aminoácidos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina. Estes três aminoácidos são utilizados pela planta para produção de proteínas e também na síntese de metabólitos secundários. São afetadas nas plantas a síntese de AIA e de outros hormônios vegetais, a síntese de clorofila, a síntese de fitoalexina e de lignina, a fotossíntese, a respiração, a transpiração e a permeabilidade de membrana celular (Amarantes, 2002). Das características externas das ervas daninhas após o contato com glifosato, é notável o amarelamento, necrose e morte dos tecidos vegetais (Toni et al., 2006).

O herbicida é degradado pelos microrganismos do solo, principalmente pelos fungos que produzem enzimas como a C-P liase responsável pela clivagem da ligação carbono-fosforo do glifosato. Com a degradação do glifosato, elementos como fósforo, carbono e nitrogênio servem de substrato para serem utilizados pelos microrganismos. Além disso, com a degradação do herbicida são formados metabólitos: AMPA (ácido amino metil fosfônico) e Sarcosina (Galli, 2005).

Dos degradadores ambientais mais eficazes de pesticidas e herbicidas, destacam-se os fungos, microrganismos eucariontes, geralmente multicelulares, heterotróficos presentes no ar, água e principalmente no solo, decompondo matéria orgânica e participando de ciclagens de nutrientes no ambiente. Dos estudos envolvendo herbicidas como o glifosato e fungos degradadores de herbicidas no solo, foram encontradas espécies de fungos que além de sobreviverem na presença de glifosato, utilizam-no como fonte de nutrientes, carbono, nitrogênio ou fósforo. Destacam-se *Nigrospora sphaerica*, *Cochiliobolus heterostrophus*, *Fusarium anthophilum*, *Penicillium* sp e *Aspergillus niger* (Mattos, 2002).

O solo da Floresta Amazônica por ser rico em matéria orgânica em sua parte superficial, no chamado horizonte O (orgânico), matéria orgânica vinda da decomposição de folhas das grandes e exuberantes árvores da floresta, possui uma

grande potencial biotecnológico pela grande diversidade de microrganismos. Tais microrganismos, em especial os fungos podem ser capazes de realizar a biodegradação de contaminantes como herbicidas tanto do próprio solo, como também da água que por ventura poderão estar contaminados por herbicidas como o glifosato.

Atualmente apesar de haver muitos estudos envolvendo a Amazônia pela sua importância mundial, ainda não existem estudos aprofundados relacionando a biorremediação e a biodegradação de herbicidas por fungos isolados do solo da Floresta Amazônica.

Portanto, o estudo em questão visou encontrar fungos do solo da Floresta Amazônica capazes de degradar o herbicida Glifosato (Round-up), de grande utilização mundial, de modo a contribuir com pesquisas futuras que promova a biorremediação do solo, descontaminando-o e fazendo com que o herbicida não provoque ações indesejáveis como toxicidade e morte de organismos aquáticos e terrestres.

2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1.Microrganismos do Solo degradadores de Glifosato:

O herbicida glifosato pode influenciar no ciclo de vida de microrganismos causando aumento da população, servindo como alimento a estes microrganismos e por outro lado, o herbicida pode reduzir a população de microrganismos e animais superiores pela sua ação.

Segundo Cox (1995), o herbicida Glifosato reduz a atividade de bactérias que fixam nitrogênio. Estas bactérias transformam o nitrogênio, nutriente essencial para as plantas, em uma forma que a planta utiliza. Além disso, também aumenta a suscetibilidade de plantas a doenças.

Aproximadamente 50% da molécula de glifosato original pode ser metabolizada em 28 dias chegando a 90% em 90 dias. Por essa razão, os metabólitos ou produtos da degradação do herbicida têm sido identificados (Rodrigues e Almeida, 1995).

Para Pepper et al, 1996, os fungos filamentosos são os envolvidos na degradação de substratos orgânicos e, por sua vez, no comportamento e mitigação de poluição. Com uma diversidade de sistemas enzimáticos, são importantes biodegradadores de agrotóxicos. No solo, a população de fungos, medida pela contagem em placas, está na ordem de 10^6 g^{-1} .

O metabolismo do glifosato pelos microrganismos é a maior rota de degradação no solo, ocorrendo tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas no perfil do solo (Franz et al., 1997).

Segundo Thorn (2000), em muitos solos, a biomassa dos fungos pode exceder a de outros organismos juntos (excluindo as raízes de plantas) por um fator de 10:1. Evidenciando sua importância no processo de decomposição de matéria orgânica.

Giesy et al., 2000, verificaram que o glifosato quando utilizado nas doses recomendadas não causa alterações sobre a microbiologia do solo.

Veiga et al., 2001, falam que horizontes superficiais do solo rico em matéria orgânica apresentam atividade biológica mais ativa, promovendo a decomposição rápida do herbicida glifosato, enquanto que em horizontes mais profundos a degradação da molécula é mais lenta em função da menor atividade microbiológica nas camadas mais profundas do solo.

Os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação do glifosato (Mattos et al., 2002).

Quando o glifosato é aplicado, parte do produto é diretamente absorvida, ficando nas plantas daninhas, e parte é encaminhada para o solo. Quando presente nos tecidos vegetais, contribui para reduzir sua disponibilidade no ambiente. Quando no solo, é biodegradado por organismos heterotróficos (Andréa et al., 2004).

A presença do herbicida nos solos florestais pode favorecer a microbiota, que consegue degradar o glifosato ou AMPA e, por outro lado, suprimir outros microrganismos, inclusive os benéficos, alterando assim o equilíbrio da microfauna desses ambientes (Santos et al., 2005).

Arantes et al.(2007) constataram que o glifosato reduziu a atividade microbiana em dois tipos de solo avaliados (Neossolo quartzarênico e Latossolo vermelho), independente ou não do uso de calagem.

Como resultado da pesquisa de Mattos em 2002, os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum* degradaram o glifosato e exibiram diferentes sensibilidades ao herbicida. *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum* apresentam maior potencial para degradar o glifosato e biorremediar solos contaminados por este herbicida. Segundo Mattos et al., 2002, dos organismos do solo, os fungos são os organotróficos primariamente responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos (celulose, hemicelulose, lignina e quitina). Em termos de processos e biomassa, os fungos são também os organismos dominantes no solo.

Estudos recentes, realizados por Zobiole et al (2010), demonstraram que o glifosato reduz os microrganismos presentes em solo cultivado com soja geneticamente resistente ao herbicida, refletindo conseqüentemente na produtividade da cultura.

2.2.Biodegradação do Glifosato no solo e Metabólitos formados:

A biodegradação do glifosato pode variar de acordo com o tipo de solo, presença de matéria orgânica e principalmente presença de microrganismos capazes de promover tal degradação. Dos metabólitos produzidos da degradação do glifosato se destaca o AMPA e a Sarcosina.

Wauchope et al., 1992, relatam que a meia-vida do glifosato pode chegar a 174 dias. A degradação do glifosato no solo é muito rápida e realizada por grande variedade de microrganismos que utilizam o produto como fonte de energia, fósforo, nitrogênio e carbono, por meio de duas rotas catabólicas, produzindo o AMPA como o principal metabólito, e Sarcosina como metabólito intermediário na rota alternativa (Dick e Quinn, 1995).

O glifosato é fortemente adsorvido pela maioria dos solos, ocorrendo rapidamente, nas primeiras quatro horas após a aplicação (Franz et al., 1997).

Giesy et al (2000) relatam que a meia-vida do glifosato em solo varia de dois a 197 dias e AMPA, um dos seus metabólitos, 76 a 240 dias.

Em outro estudo do destino do glifosato nos solos, demonstrou uma dissipação rápida, na qual era quase total um mês depois da aplicação (Veiga et al., 2001).

A sorção do glifosato no solo ocorre em duas fases, sendo a primeira delas praticamente instantânea, contribuindo com a retenção de mais de 90% do total aplicado, e a segunda um pouco mais lenta. Todavia, a fase lenta foi quantificada por Prata (2002) em aproximadamente 10 minutos, tanto no solo sob plantio direto como sob plantio convencional.

Araujo et al (2003), avaliaram a biodegradação de Glifosato em amostras de dois solos brasileiros, ambos com e sem histórico de uso prévio do herbicida. Os resultados mostraram que o Glifosato foi degradado pelos microrganismos do solo, com formação de seu metabólito ácido aminometilfosfônico (AMPA). A degradação mostrou-se ligeiramente superior em Argissolo que em Latossolo.

O glifosato, na maioria dos solos, é essencialmente imóvel, mas a mobilidade varia conforme o pH do solo. O AMPA se decompõe rapidamente, e resulta na lixiviação de quantidades mínimas nos solos (Solomon e Thompson, 2003).

O glifosato tem sido metabolizado por plantas via duas rotas semelhantes e presentes em microrganismos. Uma destas rotas envolve a divisão oxidativa da união carbono-nitrogênio (C-N) para produção de AMPA e a outra, quebra a união do (C-P) por uma C-P liase para gerar Sarcosina (Reddy et al., 2004).

Quando um herbicida é utilizado, se espera que apresente um tempo determinado de ação, após o qual deverá desaparecer rápido do ambiente (Gebler e Spadotto, 2004).

O AMPA é o produto da biodegradação do glifosato em sistemas naturais antes da mineralização final e a quebra do produto em complexos fosfonados (Barja e Afonso, 2005).

Devido as suas propriedades físico-químicas específicas, o glifosato é imóvel ou ligeiramente móvel no solo (Many e Barriuso, 2005).

O glifosato sofrendo adsorção, reduz a concentração do herbicida na fração solubilizada do solo, removendo parte de sua ação potencial. O resultado é observado pelo decréscimo da disponibilidade biológica, na aceleração da velocidade de degradação química ou, simplesmente, devido ao retardamento do movimento de lixiviação. A meia-vida do glifosato no solo varia de menos de uma semana até alguns meses, dependendo dos teores de argila e matéria orgânica e do nível de atividade microbiana (Toni et al., 2006).

A sorção de glifosato no solo é um fator chave, contribuindo para a vulnerabilidade deste durante a degradação e o transporte (Locke et al., 2008). O glifosato é um importante herbicida por apresentar grande capacidade de translocação na planta (Shaner, 2009).

A sorção de herbicidas no solo é um processo importante, uma vez que determina quanto do herbicida ficará retido no solo e quanto estará disponível na solução do solo (Kraemer et al., 2009). Para estes autores, esta proporção vem afetar a sorção pelas plantas, a degradação microbiana, fotólise, lixiviação e transporte.

2.3. Impacto ambiental e Toxicidade do Glifosato:

A toxicidade do herbicida glifosato está em estudo, pelo grau de sua importância em causar prejuízo, não somente aos microrganismos (bactérias e fungos) e macrorganismos (artrópodes e anelídeos) presentes no solo e plantas, mas principalmente, a toxicidade relacionada ao dano à saúde humana de quem manipula tal herbicida ou está presente em áreas de sua utilização.

Gomez e Sagardoy, 1985, observaram que a aplicação de glifosato no dobro da dose recomendada, não apresentou nenhum efeito direto nos microartrópodos do solo. Porém, as composições e as densidades das espécies de plantas daninhas foram diretamente afetadas pelo glifosato, enquanto os microartrópodes tiveram efeitos indiretos.

De acordo com os estudos de Rank et al. (1993), a exposição humana ao glifosato pode causar a degradação das células do fígado, mutações genéticas e alterações estruturais nos cromossomos.

O AMPA é considerado um produto de toxicidade menor que o glifosato (Giesy et al., 2000). Para Busse et al., 2001, grande parte dos organismos vivos, excluindo as plantas, não apresentam a rota do ácido shiquímico e estes não são afetados diretamente pelo glifosato.

De acordo com Amarante Júnior et al., 2002, o herbicida apresenta efetivo controle contra ervas daninhas, rápida inativação no solo, baixa toxicidade a animais e a quem manipula o produto.

Os agrotóxicos são compostos biologicamente ativos, sua persistência no solo pode afetar a viabilidade da microbiota, estimulando ou inibindo seu crescimento de algumas espécies. Em seus estudos, Andréa et al., 2004, verificaram que a presença de minhocas no solo não influenciou na dissipação do herbicida glifosato, mas houve bioacumulação nas minhocas, conforme maior foi o período de permanência das mesmas em solo tratado.

Entretanto, em outro estudo com minhocas, observou-se que o glifosato não foi diretamente tóxico para tais anelídeos (Verrell e Van, 2004).

Segundo (Jackson e Pitre, 2004), algumas populações de insetos adultos como *Cerotona trifurcata*, *Spissistilus festinus* e larvas de *Plathypena scabra* e *Anticarsia gemmatalis*, não foram afetadas pelo uso de glifosato. Em outro estudo, foi verificado que a fecundidade e mortalidade de *Geocoris punctipes*, exposto ao glifosato na soja, não mostram efeito no período de 10 dias depois do tratamento (Jackson e Pitre, 2004). Este autores relatam ainda que alguma redução no número desta espécie, três semanas depois do tratamento, provavelmente é consequência da remoção das plantas daninhas, isto é, alteração do habitat.

O impacto ambiental produzidos por agrotóxicos sobre o ambiente é amplamente discutido pela comunidade científica. O impacto sobre o microbiota do solo e os processos biológicos são dificilmente determinados com precisão, devido a natureza, heterogeneidade, dinâmica e resposta adaptativa da comunidade microbiana. (Fortes et al., 2007).

A exposição ao glifosato pode alterar os ecossistemas naturais, afetando diferentes componentes da comunidade microbiana do solo. Este composto inibe o crescimento e diminui o número de diferentes microrganismos do solo: bactérias e fungos (Protasova et al., 2008).

2.4. Métodos de detecção do Herbicida Glifosato

O herbicida glifosato pode estar presente não somente no solo contaminado-o, como também em águas superficiais e subterrâneas, os chamados lençóis d'água, como também em alimentos. O Ministério da Saúde através da portaria 518/04 estabelece o VMP (valor máximo permitido) de glifosato em água potável de 0,5 mg/L.

Em 1996, Andrade e colaboradores, determinaram a presença de glifosato e AMPA em maçãs, em Campinas-SP, comparando dois métodos de detecção do glifosato, a extração em fase sólida e a CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) com a detecção por resina realizada pela EMBRAPA, o primeiro, com tempo de análise de 24 minutos e extração de 1 hora, o da EMBRAPA, análise em 60 minutos e extração de 10 horas. O método desenvolvido para a determinação de glifosato e AMPA mostrou-se bastante seletivo, linear numa ampla faixa de concentração e mais rápido quando comparado ao método empregado na Embrapa.

De acordo com a Amarante Júnior et al.(2002), a molécula do glifosato apresenta elevada polaridade e ausência de cromóforo. Por estes motivos, a determinação do glifosato por cromatografia necessita de adaptações que permitam sua detecção. Tais adaptações incluem, basicamente, reações de derivação ou, ainda, alteração de alguma propriedade física que possa ser relacionada à quantidade de glifosato na amostra.

Das tecnologias para detecção do glifosato, se destacam as cromatografias: líquida de alta eficiência, a mais utilizada para este tipo de estudo, por detecção por UV, fluorescência e detecção colorimétrica, cromatografia por camada delgada, cromatografia gasosa, além da determinação do glifosato por espectrofotometria, espectrometria de massa e RMN (ressonância magnética nuclear).

Em uma pesquisa realizada por Chalom et al., 2005, ocorreu a detecção direta do glifosato e AMPA em águas superficiais pelo método de cromatografia de íons, sem a necessidade de qualquer tipo de derivação da molécula de glifosato.

Marques (2008) analisou a degradação do glifosato presente em água e solo através de espectrofotometria com utilização de ninidrina na derivação do glifosato, voltametria de onda quadrada, titulação oscilopolarográfica de corrente alternada, por HPLC, por cromatografia gasosa, eletroforese e eletroforese capilar e RMN³¹ P.

3.OBJETIVOS

3.1.Objetivo Geral:

-Avaliar a degradação do glifosato (N-fosfometil-glicina) por fungos isolados de uma amostra do solo da Floresta Amazônica.

3.2.Objetivos Específicos:

-Isolar os gêneros fúngicos de uma porção do solo amazônico contaminado com glifosato.

-Avaliar quais dos isolados promovem a maior degradação do glifosato.

-Investigar os metabólitos extracelulares produzidos durante a degradação do glifosato pelos fungos isolados.

4.MATERIAL E MÉTODOS

4.1.Universo de estudo:

-O estudo foi conduzido no Laboratório de Micologia do Instituto nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA.

-Herbicida: Glifosato (N-fosfometil-glicina) - fornecido por Monsanto Agricultural Products, St. Louis, Missouri.

-Solo contaminado com o herbicida: Em 500 g de solo (coletado no INPA a 8 cm de profundidade) de acordo com LIU, 1991, e foram colocados 0,1g do herbicida Glifosato. Esse solo foi mantido a temperatura ambiente por 7 dias e, em seguida, foi submetido ao isolamento dos fungos.

4.2. Procedimentos:

4.2.1 Isolamento de fungos:

O isolamento dos fungos foi realizado pela metodologia de diluição sucessiva, utilizando 6 tubos de ensaio com 9 ml de água destilada cada um. No primeiro tubo foi colocado 1g de solo contaminado com glifosato, e deste tubo de ensaio foi retirado 1ml de solução que foi rediluído no próximo tubo, sucessivamente até o sexto tubo, em diluições respectivas de 10^{-1} g/l, 10^{-2} g/l, 10^{-3} g/l, 10^{-4} g/l, 10^{-5} g/l, 10^{-6} g/l, e posterior plaqueamento, 100 µl de solução de cada tubo de ensaio, em placas de Petri contendo Meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com 2,35 g/l de glifosato. Os fungos isolados foram purificados através de estrias de esgotamento em placas de Petri e identificados taxonomicamente por metodologia convencional (microscopia).

As lâminas contendo os diferentes fungos foram elaboradas através da técnica de microcultivo, utilizando a Técnica de Ridell (Mattos, 2002): Transferência em um bloco do BDA com o auxílio de uma pinça estéril para a lâmina montada sobre o suporte de vidro (Tubo em L ou lâmina) contido dentro de uma placa de Petri, sob condições de assepsia, retirou-se pequenas porções da colônia e semeou-se nos quatro lados do bloco de meio, cobriu o bloco com uma lamínula estéril, com cuidado, molhou-se o algodão com água destilada estéril (cerca de 2 ml). A placa funcionou como uma câmara úmida, as placas foram incubadas a temperatura ambiente até a observação do crescimento da cultura. Quando houve desenvolvimento, submeteu-se à ação do formol (0,5 ml durante

1 hora), a lamínula foi retirada do microcultivo, transferindo-a para uma nova lâmina contendo o corante lactofenol azul de algodão em quantidade suficiente para corar o material fúngico aderido na lamínula). Observou-se no microscópio óptico.

4.2.2.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.

A análise da degradação do glifosato foi realizada de forma indireta pela metodologia similar a de Krzysko et al.(1997). Foi avaliada a capacidade dos microrganismos isolados utilizarem o glifosato como fonte de fósforo e produzirem biomassa como resposta.

Todos os estudos de crescimento foram realizados em meio líquido Czapek, que consiste em: sacarose (30 g/L), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), $NaNO_3$ (3 g/L), $FeSO_4$ (0,01 g/L) e KH_2PO_4 (1g/L). Uma mesma linhagem fúngica foi submetida ao crescimento no: a) meio Czapek, b) meio Czapek sem KH_2PO_4 e c) meio Czapek sem KH_2PO_4 e suplementado com 2,35 g/L de glifosato. O pH inicial foi ajustado para 6,0, pH ideal para crescimento fúngico, principalmente dos gêneros fúngicos esperados do isolamento e identificação da amostra do solo. Esses estudos de crescimento cinéticos foram realizados em Erlenmeyers de 150 ml contendo 50 ml de meio de cultura Czapek.

As culturas foram inoculadas com uma suspensão de esporos (2×10^7 esporos/mL) 100 μ L e mantidas à temperatura ambiente. Após 14 dias, foi verificado o crescimento fúngico nos 3 diferentes meios de Czapek, as culturas foram filtradas por meio de filtros de papel de 15 cm de diâmetro e secas em estufa a 60°C por 12 horas e a biomassa fúngica foi quantificada.

4.2.3.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono

As linhagens que se destacaram no ensaio anterior por utilizarem o glifosato como fonte de fósforo, foram submetidas a um ensaio com menor influência da sacarose (Krzysko et al.,1997). Os isolados fúngicos foram submetidos ao crescimento no a) meio czapek contendo somente 2,35 g/l de sacarose, b) meio contendo somente 2,35 g/l de sacarose sem KH_2PO_4 e c) meio czapek contendo somente 2,35 g/l de sacarose, sem KH_2PO_4 e suplementado com 2,35 g/l de glifosato.

Após 14 dias, foi verificado o crescimento fúngico nos 3 diferentes meios de czapek, as culturas foram filtradas por meio de filtros de papel de 15 cm de diâmetro, o filtrado foi analisado pelas metodologias analíticas (Espectrometria e Cromatografias) descritas a seguir.

4.2.4. Avaliação da degradação do glifosato : Colorimetria e Cromatografias

4.2.4.1. Colorimetria

Para quantificação do glifosato nos filtrados fúngicos, foi utilizada a metodologia descrita por Nagaraja et al.(2006), na qual utiliza a ninidrina para derivatizar o glifosato em um composto de cor púrpura quantificável por colorimetria.

Colocou-se em um tubo de ensaio, 980 µl de água destilada, mais 20 µl de filtrado fúngico, 1 ml de ninidrina a 5% (preparada no laboratório: 5g para 100 ml de água destilada), e 1 ml de Molibdato de Sódio a 5% (5g para 100 ml de água destilada), catalizador da reação ninidrina-glifosato. A reação química entre o glifosato e ninidrina, resultando em cor púrpura ocorreu em 100°C em 10 minutos. As amostras foram analisadas pelo espectrofotômetro a 570 nm.

4.2.4.2. Cromatografia de Camada Delgada.

Os filtrados fúngicos, foram examinados por cromatografia em camada delgada utilizando-se placas de CCD de 10x10 cm pré- revestidas com gel de sílica 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando etanol /acetona / água (1:1:1) como solventes de arraste, de acordo com Liu et al.(1991).

Nas placas de sílica foram colocadas 20µl de cada solução: solução padrão de glifosato, solução padrão da Sarcosina e solução padrão do AMPA, ambas na concentração de 2,35g/l. Também foram colocadas solução controle de glifosato correspondente ao dia zero (2,35g/l) de glifosato, meio czapek com glifosato sem inóculo fúngico e as soluções dos filtrados de acordo com os isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211. As amostras das soluções correram em placa de sílica em 10 minutos e posteriormente as placas receberam “banho” de solução de ninidrina com acetona (0,05g de ninidrina em 10 ml de acetona). As placas foram

colocadas em estufa a 100°C durante 10 minutos. Nas placas ocorreram reações entre ninidrina e glifosato, resultando em coloração roxa, evidenciando o glifosato.

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência: CLAE-EM.

Para análise da presença e quantificação das substâncias de interesse, Glifosato, AMPA e Sarcosina, foi utilizada metodologia descrita por Amarante Júnioiret al., 2002. Foi utilizado um sistema LC-APCI-MS constituído por: um cromatógrafo modelo Surveyor™ (LC Pump Plus, Autosample Plus) (Thermo Scientific) equipado com uma coluna C18 (Luna), 5 µ, tamanho 150 x 4,60 mm (Phenomenex). Utilizou-se na corrida cromatográfica o modo isocrático de eluição com MeOH/H₂O (7:3) como fase móvel durante 15 min; um espectrômetro de massas TSQ™ Quantum Acess™ (Thermo Scientific) acoplado ao cromatógrafo por meio de uma fonte APCI e ajustado para os seguintes parâmetros de operação: corrente de descarga: 3 µA; temperatura de vaporização: 350 °C; temperatura do capilar: 270 °C; bainha a gás: 30 psi; gás: 5 arb. Os padrões foram diluídos em água miliq nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/ml. Os resultados foram processados por meio do software Xcalibur 2.07.

4.4 Análise dos resultados:

Todos os ensaios foram realizados em triplicata com a finalidade de calcular média e desvio padrão. A análise de variância ONE WAY ANOVA, suplementada de teste Tukey e teste (t), foi utilizada quando foi necessário.

5.RESULTADOS

Os resultados da presente dissertação serão apresentados na forma de artigo que será encaminhado a revista:

JOURNAL OF MICROBIOLOGY and BIOTECHNOLOGY

(site: <http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/10061>).

Degradação de Glifosato (n-fosfometil-glicina) por fungos isolados de Solo da Floresta Amazônica.

Lilian de O. Corrêa, Adriana da F. Souza, Sheila K. Caetano, Felipe Moura A. da Silva, Diego Rabelo, Ana C. Cortez, João V. S. Souza, Érica S. Souza.

RESUMO

O aumento das áreas cultivadas promove o aumento sucessivo da utilização de agrotóxicos, se destacando os pesticidas, fungicidas e herbicidas, esses provocam impacto ambiental e males aos animais inclusive ao homem. Dentre os herbicidas, o Glifosato é o mais utilizado do mundo. Entendendo que a biorremediação é uma alternativa de controle para esse herbicida, o presente estudo teve como objetivo, avaliar a degradação do glifosato por meio da utilização de isolados de fungos de uma amostra do solo da Floresta Amazônica. Para tanto foi: a) realizado o isolamento e identificação de fungos de uma amostra de solo amazônico contaminado com glifosato, b) avaliada a capacidade dos isolados fúngicos de utilizarem o glifosato como fonte de fósforo e carbono e c) utilizados métodos analíticos (espectrometria, TLC e HPLC-MS) para analisar a degradação e a metabolização do glifosato pelos isolados. Como resultados, observou-se que os fungos isolados de uma amostra de solo da Floresta Amazônica, pertenciam ao Filo Ascomycota especificamente aos gêneros *Penicillium* (60%), *Aspergillus* (26%) e *Trichoderma* (8%). Os isolados que apresentaram maior biomassa e utilizaram o glifosato como possível fonte de fósforo, foram os isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21, *Penicillium* 4A211, *Penicillium* 6B221 e *Penicillium* 6B112. O isolado que possivelmente melhor utilizou o glifosato como possível fonte de carbono foi *Aspergillus* 2B112. O método colorimétrico/espectrofotométrico demonstrou que os isolados *Penicillium* 4A211, *Aspergillus* 2B112 e *Penicillium* 4A21 degradaram o glifosato em 42,7%, 36,4% e 34,91%, respectivamente em 14 dias. A cromatografia de camada delgada (TLC) demonstrou a presença de glifosato nos filtrados das culturas e a HPLC-MS demonstrou que *Penicillium* 4A 211 produz os metabólitos AMPA e Sarcosina a partir do catabolismo do glifosato.

Palavras chave: Herbicida, Fungos do solo, Biorremediação.

1.Introdução

A utilização indiscriminada de agrotóxicos, se destacando os pesticidas e herbicidas, não somente na agricultura como também nas áreas urbanas do Brasil e do mundo é atualmente um problema de grande margem.

Os agrotóxicos são produtos que têm o objetivo de destruir pragas e eliminar doenças que podem atacar as plantações. São classificados como pesticidas, fungicidas e herbicidas. Os herbicidas são responsáveis por eliminar vegetais que competem por nutrientes com os vegetais de interesse no plantio. Tais produtos quando utilizados de forma indiscriminada podem resultar em impacto ambiental, não somente em relação à contaminação dos alimentos consumidos pela população, como também contaminação do solo, ar e água dos rios e subterrâneas (Sanches, 2003).

Além da contaminação ambiental, os herbicidas podem atuar no surgimento de ervas daninhas resistentes, causar morte à larvas e animais aquáticos e ser tóxico ao homem provocando doenças respiratórias, dermatites e até mesmo mutações celulares resultando em câncer (Rank,1993) e alterações endócrinas.(Romano et al., 2009).

Dentre os herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo se destaca o Glifosato, um agrotóxico patenteado pela Empresa Monsanto e vendido com o nome de Round-up. Esse possui apresentação no estado líquido (1L, 5L e 20 litros) e sólido (granulado de coloração amarelo claro). O glifosato apresenta fórmula molecular $C_3H_8NO_5P$ (m.m. = 169,1 g/mol), em condições ambientais, é sólido cristalino, muito solúveis em água (12 g/L a 25°C) e quase insolúvel em solventes orgânicos comuns, tais como acetona e etanol, apresenta ponto de fusão de 200°C, possui densidade aparente de 0,5 g/cm³ e se apresenta bastante estável em presença de luz, inclusive em temperaturas superiores a 60°C (Galli, 2005).

O herbicida Glifosato é utilizado em mais de uma centena de culturas, como soja, trigo, milho, algodão, feijão e arroz. É o único herbicida, o qual, o mecanismo de ação resume-se na inibição da enzima 5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato-sintase (EPSPS), a qual catalisa a condensação do ácido shiquímico e do fosfato piruvato, evitando, assim, a síntese de três aminoácidos essenciais: triptofano, fenilalanina e tirosina. (Toni et al., 2006).

Estes três aminoácidos são utilizados pela planta para produção de proteínas e também na síntese de metabólitos secundários. Na presença do glifosato as plantas deixam de realizar a síntese de AIA (hormônio Indol Acético), a síntese de clorofila, a

síntese de fitoalexina e de lignina. Portanto, afeta a fotossíntese, a respiração, a transpiração e a permeabilidade da membrana celular vegetal. Das características externas das ervas daninhas após o contato com glifosato, é notável o amarelamento, necrose e morte dos tecidos vegetais (Toni et al., 2006).

Os agrotóxicos também podem influenciar na reciclagem da matéria orgânica realizada por microrganismos presentes no solo. Os elementos químicos formadores dos agrotóxicos como nitrogênio, carbono e fósforo, podem servir de suplemento alimentar para microrganismos do solo, resultando em aumento desta população. Os fungos são os principais decompositores da matéria orgânica (Mattos., 2002)

Dos degradadores ambientais mais eficazes de pesticidas e herbicidas, destacam-se os fungos, microrganismos eucariontes, multicelulares, heterotróficos, presentes no ar, água e principalmente no solo, decompondo matéria orgânica e participando de ciclagens de nutrientes no ambiente.

Dos estudos envolvendo herbicidas como o glifosato e fungos degradadores de herbicidas em solo, foram encontradas espécies de fungos que além de sobreviverem na presença de glifosato, utilizam-no como fonte de nutrientes, carbono, nitrogênio ou fósforo. Destacam-se *Nigrosporasphaerica*, *Cochiliobolus heterostrophus*, *Fusarium anthophilum*, *Penicillium sp* e *Aspergillus niger* (Mattos., 2002).

Pela importância dos fungos no processo de decomposição da matéria orgânica, evidenciou-se o interesse de estudar o solo da Floresta Amazônica. Atualmente apesar de haver muitos estudos envolvendo a Amazônia pela sua importância mundial, ainda não existem estudos aprofundados relacionando a biorremediação e a biodegradação de herbicidas.

O presente trabalho teve como objetivo investigar a degradação do Glifosato por meio da utilização de isolados de fungos de uma amostra do solo Amazônico.

2.MATERIAL E MÉTODOS

2.1.Herbicida Glifosato

ROUNDUP WG-Glifosato (N-fosfometil-glicina) - fornecido por Monsanto Agricultural Products, St. Louis, Missouri. Sal de Amônio de Glifosato 792,5 g/kg (720 g/kg equivalente ácido).

2.2.Padrões para estudo do metabolismo do herbicida

Os padrões utilizados para análise da concentração de glifosato e seus metabólitos, Sarcosina e AMPA foram: **Padrão Glyphosate**, Referência do Produto: 45521, Marca:Fluka. Outros meios de identificação: N-(Phosphonomethyl) glycine Glyphosate. **Padrão AMINOMETHYL-PHOSPHONIC ACID-99%**, Referência do Produto: 324817, Marca: Aldrich e **Padrão SARCOSINA 98%**, Referência do Produto: 131776, Marca: Aldrich.

2.3. Amostra de Solo Amazônico

A amostra de solo foi coletada no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, localizado na cidade de Manaus-AM. As coordenadas geográficas do local da coleta foram: 59° 59' 16'' Oeste de longitude e 3° 5' 36'' Sul de latitude. O solo foi classificado como Organossolo, por apresentar na sua superfície, matéria orgânica, resultantes de folhas das árvores da Floresta Amazônica. A coleta foi realizada a 8 cm de profundidade, parte superficial do solo correspondente ao horizonte orgânico onde se encontra maior quantidade de microrganismo.

2.4.Isolamento e identificação de fungos tolerantes ao herbicida Glifosato:

À amostra do solo coletada (500g) foi acrescentado 0,1g (200 ppm) do herbicida glifosato (Round-up) cedido pela Monsanto Agricultural Products, St. Louis, Missouri. O solo foi mantido a temperatura ambiente por 7 dias. O isolamento dos fungos foi realizado pela metodologia de diluições sucessivas, plaqueamento, em placas de Petri

contendo Meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) suplementado com 2,35g/L de glifosato, metodologia realizada por Mattos, 2002.

Após 7 dias de crescimento, os fungos isolados foram purificados através de estrias de esgotamento longitudinal em placas de Petri contendo BDA e glifosato, 2,35g/L. Os fungos foram identificados por gênero, taxonomicamente por metodologia convencional, microscopia.

2.5.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.

A análise da utilização do glifosato como fonte de fósforo, foi realizada de forma indireta, correspondente a metodologia de Krzysko et al.,1997. Foi avaliada a capacidade dos microrganismos isolados utilizarem o glifosato como fonte de fósforo e produzirem biomassa como resposta.

Todos os estudos de crescimento foram realizados em meio líquido Czapek, que consiste em: sacarose (30 g/L), $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ (0,5 g/L), KCl (0,5 g/L), $NaNO_3$ (3 g/L), $FeSO_4$ (0,01 g/L) e KH_2PO_4 (1g/L). Uma mesma linhagem fúngica foi submetida ao crescimento no: a) meio Czapek, b) meio Czapek sem KH_2PO_4 e c) meio Czapek sem KH_2PO_4 e suplementado com 2,35 g/l de glifosato. Esses estudos de crescimento cinéticos foram realizados em Erlenmeyers de 150 ml contendo 50 ml de meio de cultura Czapek.

As culturas foram inoculadas com uma suspensão de esporos (2×10^7 esporos/mL) e mantidas a temperatura ambiente. Após 14 dias, foi verificado o crescimento fúngico nos 3 diferentes meios de Czapek, as culturas foram filtradas por meio de filtros de papel de 15 cm de diâmetro e secas em estufa a 60°C por 12 horas e a biomassa fúngica foi quantificada.

2.6.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono

As linhagens que se destacaram no ensaio anterior foram submetidas a um ensaio com menor influência da concentração da sacarose, comumente presente no meio Czapek, correspondente a metodologia de Krzysko et al.(1997). Os isolados fúngicos foram submetidos ao crescimento no a) meio czapek contendo somente 2,35 g/l de sacarose, b) meio contendo somente 2,35 g/l de sacarose sem KH_2PO_4 e c) meio czapek contendo somente 2,35 g/l de sacarose, sem KH_2PO_4 e suplementado com 2,35 g/l de

glifosato. O pH inicial foi ajustado para 6,0, pH ideal para o crescimento fúngico, principalmente dos gêneros fúngicos esperados do isolamento e identificação da amostra do solo em estudo.

Após 14 dias, foi verificado o crescimento fúngico nos 3 diferentes meios de Czapek, as culturas foram filtradas por meio de filtros de papel de 15 cm de diâmetro, o filtrado foi analisado pelas metodologias analíticas (Espectrometria e Cromatografias) descritas a seguir.

2.7.Avaliação da degradação do glifosato : Colorimetria e Cromatografias

2.7.1. Colorimetria

Para quantificação do glifosato nos filtrados fúngicos, foi utilizada a metodologia descrita por Nagaraja et al., 2006, na qual utiliza a ninidrina para derivatizar o glifosato em um composto de cor púrpura quantificável por colorimetria.

Colocou-se em um tubo de ensaio, 980 µl de água destilada, mais 20 µl de filtrado fúngico, 1 ml de ninidrina a 5% (preparada no laboratório: 5g para 100 ml de água destilada), e 1 ml de Molibdato de Sódio a 5% (5g para 100 ml de água destilada), catalizador da reação ninidrina-glifosato. A reação química entre o glifosato e ninidrina, resultando em cor púrpura ocorreu em 100°C em 10 minutos. As amostras foram analisadas pelo espectrofotômetro a 570 nm.

2.7.2.Cromatografia de Camada Delgada.

Os filtrados fúngicos, foram examinados por cromatografia em camada delgada utilizando-se placas de CCD de 10x10 cm pré- revestidas com gel de sílica 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha).

Os cromatogramas foram desenvolvidos utilizando etanol /acetona / água (1:1:1) como solventes de arraste, de acordo com Liu et al., 1991).

Nas placas de sílica foram colocadas 20 µl de cada solução: solução padrão de glifosato, solução padrão da Sarcosina e solução padrão do AMPA, ambas na concentração de 2,35g/L. Também foram colocadas solução controle de glifosato correspondente ao dia zero (2,35g/L) de glifosato, meio Czapek com glifosato sem inóculo fúngico e as soluções dos filtrados de acordo com os isolados *Aspergillus*

2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211. As amostras das soluções correram em placa de sílica em 10 minutos e posteriormente as placas receberam “banho” de solução de ninidrina com acetona (0,05g de ninidrina em 10 ml de acetona). As placas foram colocadas em estufa a 100°C durante 10 minutos. Nas placas ocorreram reações entre ninidrina e glifosato, resultando em coloração roxa, evidenciando o glifosato.

2.8.Cromatografia líquida de alta eficiência: CLAE-EM.

Para análise da presença e quantificação das substâncias de interesse, Glifosato, AMPA e Sarcosina. Pela metodologia de Amarantes Junior et al.,2002. foi utilizado um sistema LC-APCI-MS constituído por: um cromatógrafo modelo Surveyor™ (LC Pump Plus, Autosample Plus) (Thermo Scientific) equipado com uma coluna C18 (Luna), 5 µ, tamanho 150 x 4,60 mm (Phenomenex). Utilizou-se na corrida cromatográfica o modo isocrático de eluição com MeOH/H₂O (7:3) como fase móvel durante 15 min; um espectrômetro de massas TSQ™ Quantum Acess™ (Thermo Scientific) acoplado ao cromatógrafo por meio de uma fonte APCI e ajustado para os seguintes parâmetros de operação: corrente de descarga: 3 µA; temperatura de vaporização: 350 °C; temperatura do capilar: 270 °C; bainha a gás: 30 psi; gás: 5 arb. Os padrões foram diluídos em água miliq nas concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg/ml. Os resultados foram processados por meio do software Xcalibur 2.07.

3.RESULTADOS

3.1.Isolamento e identificação de fungos tolerantes ao herbicida Glifosato.

Com o objetivo de isolar fungos tolerantes ao glifosato, foi realizado o isolamento de fungos de uma amostra de solo contendo 200 ppm do herbicida. Os microrganismos isolados pertenceram ao Filo Ascomycota especificamente aos gêneros *Penicillium* (60,0%), *Aspergillus* (26%) e *Trichoderma* (8%). Não foi possível identificar micromorfológicamente 6% dos isolados (Tabela 1).

3.2.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de fósforo.

Com a finalidade de avaliar a degradação do glifosato e sua utilização como fonte de fósforo, os 50 isolados fúngicos foram desenvolvidos em três meios de cultivo

diferentes como descrito por (Krzysko-Lupica, 1997): Czapek, Czapek sem a presença de KH_2PO_4 (fonte de fósforo) e Czapek sem KH_2PO_4 , porém, suplementado com glifosato (2,35 g/l). (Tabela 1).

Isolados	Biomassa (g/l)			Isolados	Biomassa (g/l)		
	Meio CZ	Meio CZ sem KH_2PO_4	Meio CZ sem KH_2PO_4 suplementado com glifosato		Meio CZ	Meio CZ sem KH_2PO_4	Meio CZ sem KH_2PO_4 suplementado com glifosato
* <i>Aspergillus</i> 2B112	5,7±0,3	4,1±0,5	7,1±0,1	<i>Penicillium</i> 2B21	5,61±0,05	4,1±0,2	5,5±0,8
* <i>Penicillium</i> 4A21	5,7±0,1	4,4±0,4	7,9±0,6	4B12	7,6±0,4	4,5±0,4	6,2±0,1
* <i>Penicillium</i> 4A211	6,91±0,02	3,6±0,4	7,1±0,4	<i>Penicillium</i> 4A212	6,7±0,1	4,31±0,07	6,5±0,1
* <i>Penicillium</i> 6B221	6,6±1,4	4,6±0,6	7,6±0,8	<i>Penicillium</i> 4A31	5,8±0,3	2,8±0,3	6,3±0,4
* <i>Penicillium</i> 6B112	4,7±0,6	4,2±0,3	5,2±0,4	<i>Penicillium</i> 4C12	6,9±0,6	3,6±1,1	6,1±0,3
<i>Aspergillus</i> 3B13	8,3±2,3	5,3±0,2	7,5±0,3	<i>Penicillium</i> 4B23	8,2±0,4	4,3±0,1	6,3±0,2
<i>Penicillium</i> 2B311	6,8±0,3	3,6±0,3	6,1±0,6	<i>Penicillium</i> 4A213	6,5±0,1	4,2±0,1	5,6±0,1
<i>Aspergillus</i> 2B51	6,9±0,1	3,9±0,6	6,3±0,8	<i>Aspergillus</i> 5B12	6,6±1,1	4,8±1,1	6,1±0,8
<i>Aspergillus</i> 3B23	4,61±0,02	3,4±0,3	4±1	<i>Penicillium</i> 5B221	6,5±0,2	4,2±0,2	6,2±0,2
<i>Penicillium</i> 2A3	6,4±0,9	5,2±0,8	6,4±0,4	<i>Aspergillus</i> 5B123	6,3±0,3	4,2±1,4	5,9±0,5
<i>Trichoderma</i> 3C2	7,7±0,7	5,9±0,9	6,1±1,4	<i>Penicillium</i> 5A11	6,5±0,2	4,2±1,2	6,1±1,5
<i>Aspergillus</i> 3B32	6,6±0,3	6,3±1,4	6,4±1,4	<i>Penicillium</i> 5B2	6,9±0,4	3,3±0,6	5,55±0,05
<i>Trichoderma</i> 3C12	6,6±0,6	4,1±0,4	5,6±0,2	<i>Aspergillus</i> 5B31	6,5±0,2	4,3±0,3	4,6±0,1
<i>Penicillium</i> 3B41	5,8±0,3	4,6±0,6	4,9±0,4	<i>Penicillium</i> 5B114	6,6±0,1	2,9±0,5	6,3±0,3
<i>Penicillium</i> 3C11	6,1±0,3	4,5±0,9	4,8±0,3	<i>Aspergillus</i> 5B21	6,4±0,4	4,2±0,3	6,2±0,1
<i>Trichoderma</i> 3C21	7,3±0,8	3,3±0,7	5,7±0,5	<i>Penicillium</i> 5C21	6,5±0,3	4,4±0,1	4,9±0,3
<i>Aspergillus</i> 3B231	6,4±1,5	2,7±0,6	5,3±0,6	<i>Penicillium</i> 5C211	8,7±2,8	6,4±1,8	6,5±0,8
<i>Aspergillus</i> 3B42	6,2±0,2	4,8±0,1	5,6±0,1	<i>Penicillium</i> 5B23	6,1±0,4	4,2±0,2	5,2±0,2
3C112	6,3±0,5	3,1±0,4	3,9±0,6	<i>Penicillium</i> 5B112	6,7±0,1	4,4±0,2	6,2±1,1
<i>Aspergillus</i> 3B411	6,3±0,8	4,3±0,3	6,1±0,2	<i>Penicillium</i> 2A31	5,2±1,2	4,4±0,4	6,2±0,1
<i>Penicillium</i> 3B21	5,6±0,4	4,3±0,5	5,4±0,2	6B11	6,6±0,1	4,5±0,2	6,2±0,3
<i>Penicillium</i> 3C113	6,5±0,2	3,8±0,4	4,8±1,3	<i>Penicillium</i> 6C221	8,1±0,5	3,9±0,5	6,1±0,4
<i>Penicillium</i> 3B22	7,4±0,5	4,2±0,2	6,1±0,1	<i>Penicillium</i> 6B21	4,9±0,3	3,9±0,4	4,8±0,4
<i>Aspergillus</i> 3A53	6,6±1,1	4±1	6±1	<i>Penicillium</i> 6B1	4,8±0,7	2,8±0,4	4,3±0,2
<i>Penicillium</i> 2B41	6,4±0,4	3±1	5,9±0,7	<i>Trichoderma</i> 2B11	6,6±0,1	4±1	6,3±0,4

Tabela 1: Fungos isolados de solo contaminado com glifosato e biomassas (g/L) produzida por esses isolados em meios de cultura diferentes: czapek, czapek sem KH_2PO_4 e czapek sem KH_2PO_4 suplementado com glifosato (2,35 g/l). Destaque (*) para os principais produtores de biomassa no meio contendo glifosato como fonte de fósforo.

Todos os 50 isolados fúngicos, foram capazes de utilizar o glifosato como fonte de fósforo (Tabela1). Cinco isolados destacaram-se por produzirem mais biomassa no meio Czapek suplementado com glifosato do que no Czapek convencional: *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21, *Penicillium* 4A211, *Penicillium* 6B221 e *Penicillium* 6B112. Parte desses isolados foram utilizados nos ensaios posteriores para avaliação da degradação e metabolismo do glifosato.

3.3.Avaliação de isolados quanto a utilização de glifosato como fonte de carbono.

Com a finalidade de avaliar a degradação do glifosato e sua possível utilização como fonte de carbono, foram selecionados 3 isolados fúngicos (*Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211) que foram cultivados em três diferentes meios czapek: a) czapek com baixa concentração de sacarose (2,35 g/L), b) czapek com baixa concentração de sacarose (2,35 g/L), sem KH_2PO_4 e c) czapek com baixa concentração de sacarose (2,35 g/L), sem KH_2PO_4 e suplementado com (2,35 g/L) de glifosato. Os resultados são apresentados na Figura 1.

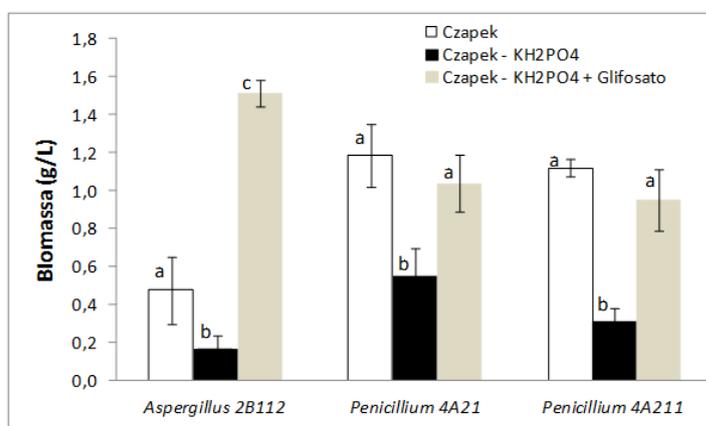


Figura 1: Crescimento de isolados fúngicos (*Aspergillus*-2B112, *Penicillium*-4A21 e *Penicillium*-4A211) em meios czapeks com baixa concentração de sacarose (2,35 g/l). Nos ensaios realizados com o mesmo isolado, as médias aritméticas de três repetições e desvio padrão, seguidas de mesma letra minúscula, não diferem entre si, pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Todos os três isolados apresentaram crescimento fúngico, no meio czapek com baixa concentração de sacarose, sem o KH_2PO_4 e suplementado com o glifosato, sendo que, o isolado *Aspergillus* 2B112 apresentou uma produção de biomassa três vezes superior nesse último do que no meio Czapek com baixa concentração de sacarose.

3.4. Avaliação da degradação do glifosato pelos isolados selecionados.

Com o objetivo de avaliar a degradação do glifosato pelos isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211, foi determinada a concentração de glifosato, após 14 dias no filtrado da cultura, por um método colorimétrico/espectrofotométrico que analisou a presença de um cromóforo formado pela complexação de ninidrina com glifosato. Os isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211 promoveram redução de glifosato (%) de $36,48 \pm 0,01$; $34,91 \pm 0,02$ e $42,72 \pm 0,02$, respectivamente (Figura 2).

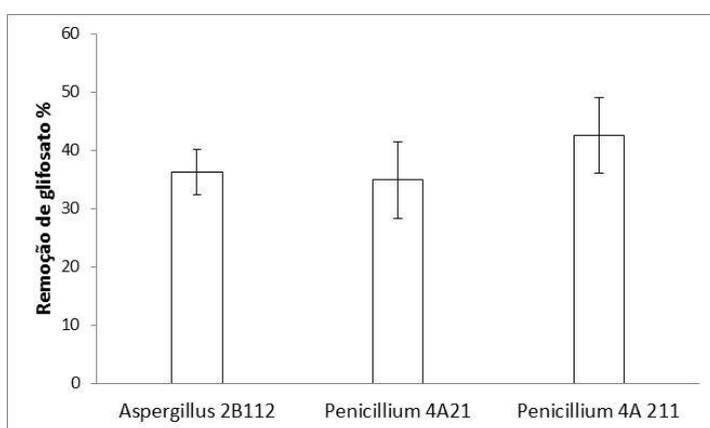


Figura 2: Degradação do glifosato por isolados fúngicos.

3.5. Cromatografia em Camada Delgada.

Com a finalidade de investigar a degradação do herbicida glifosato e a produção de metabólitos pelos isolados, os filtrados dos ensaios dos isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211 foram submetidos a cromatografia de camada delgada utilizando fase fixa placas de CCD de 10x10 cm pré-revestidas com gel de sílica 60 (Merck, Darmstadt, Alemanha) e como sistema eluidor acetona/ etanol / água (1:1:1). Ninidrina 5% em acetona foi utilizada para revelação do glifosato.

Na cromatografia de camada delgada os padrões de glifosato, Sarcosina e AMPA apresentaram R_f de 0,5; 0,45 e 0,42, respectivamente. As amostras dos filtrados das culturas de *Aspergillus* 2B 112, *Penicillium* 4A 21 e *Penicillium* 4A 211 apresentaram R_f de aproximadamente 0,5. Não foi possível fazer uma análise conclusiva sobre a

presença dos metabólitos Sarcosina e AMPA nas amostras oriundas das culturas fúngicas, devido à proximidade de Rfs das substâncias estudadas.

3.6. Avaliação do Glifosato e seus metabólitos no filtrado do isolado *Penicillium* 4A211- CLAE-EM:

Com a finalidade de conhecer os possíveis metabólitos produzidos pelos fungos, foram realizados ensaios de CLAE-MS da solução contendo os padrões AMPA, Sarcosina e Glifosato (Figura 3), do meio czapek contendo o glifosato (Figura 4) e filtrado da cultura do isolado *Penicillium* 4A211, após 14 dias de exposição ao glifosato (Figura 5). Nesse ensaio foi possível verificar a possível presença do Glifosato, AMPA e Sarcosina no filtrado da cultura do fungo, de acordo com suas massas moleculares (Figura 5).

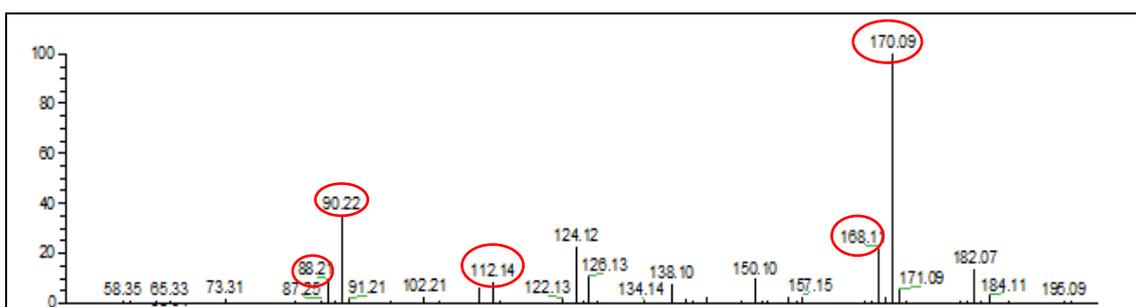


Figura 3: Espectro de massa resultante de CLAE-EM do mix (solução contendo os padrões de AMPA e Sarcosina e Glifosato) nas concentrações de 2,5 mg/ml). A massa molecular do Glifosato é 169,1; do AMPA é 111; e Sarcosina 89.

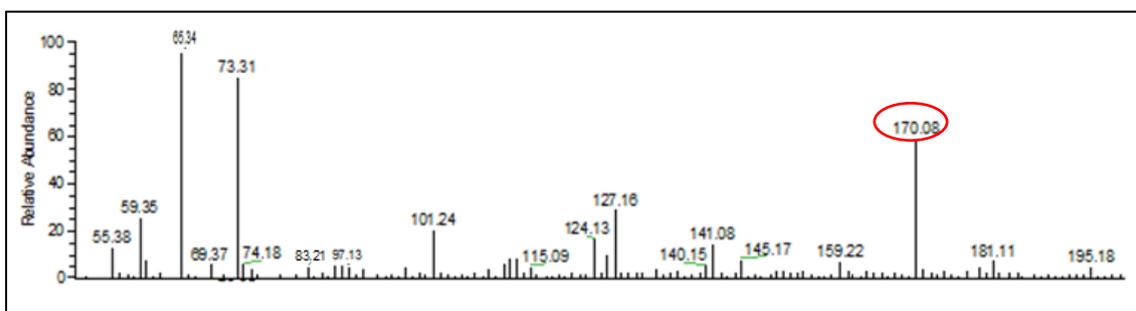


Figura 4: Espectro de massa resultante de CLAE-EM da solução inicial antes do inóculo (meio czapek com 2,35g/l de glifosato).

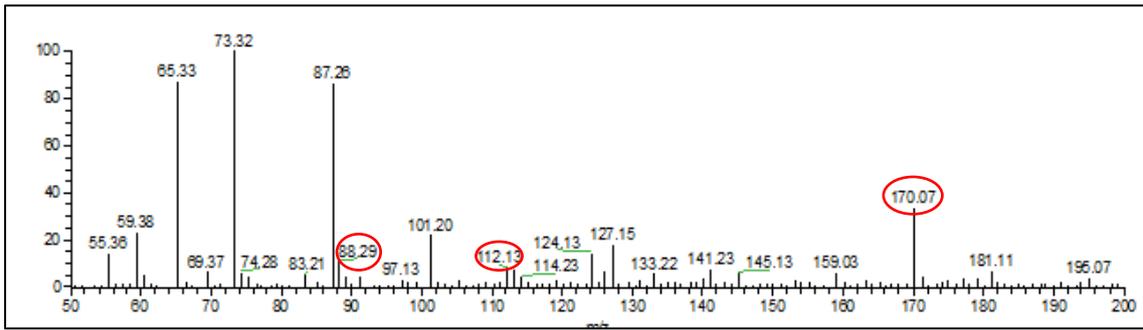


Figura 5: Espectro de massa resultante de CLAE-EM do filtrado do isolado *Penicillium* 4A 211. O filtrado apresenta possíveis picos do glifosato, AMPA e Sarcosina.

Depois de elaboradas as curvas de calibração (Figuras 6, 7 e 8), foi quantificado o Glifosato, AMPA e Sarcosina na amostra do filtrado da cultura do isolado *Penicillium* 4A211 as concentrações de 1,4; 0,33 e 0,28 mg/ml de Glifosato, AMPA e Sarcosina, respectivamente. Isso representou uma degradação do glifosato (40%), resultado similar ao apresentado pelo método espectrofotométrico (colorimétrico).

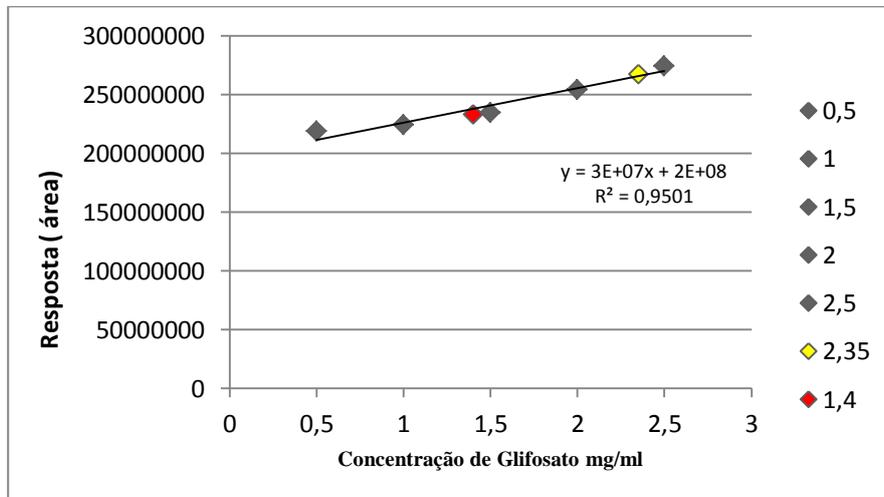


Figura 6: Curva de calibração do Glifosato no HPLC-MS. Em destaque em amarelo a solução de referência, dia zero (czapek com 2,35 mg/ml de glifosato) e em vermelho o filtrado do isolado *Penicillium* 4A211.

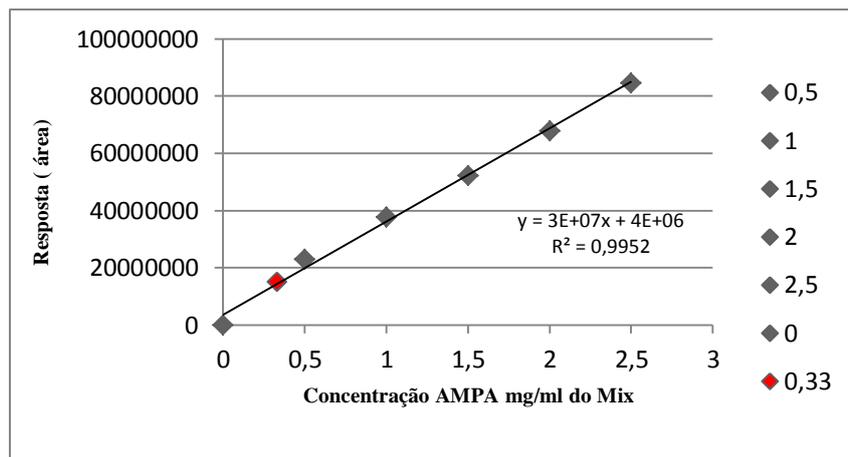


Figura 7: Curva de calibração do AMPA no CLAE-EM. Em destaque em vermelho o filtrado do isolado *Penicillium* 4A211.

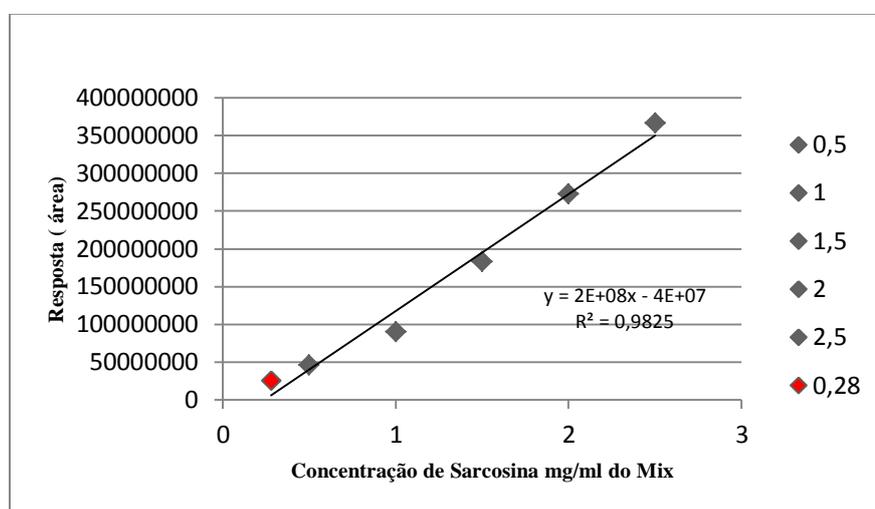


Figura 8: Curva de calibração do Sarcosina no CLAE-EM. Em destaque em vermelho o filtrado do isolado *Penicillium* 4A211.

4.DISSCUSSÃO

O estudo em questão destaca-se pela descoberta de fungos do solo Amazônico capazes de degradar o herbicida Glifosato (Round-up), de modo a contribuir com pesquisas futuras que promovam a biorremediação dos solos contaminados por esse herbicida, fazendo com que, esse não provoque ações indesejáveis como toxicidade, morte de organismos aquáticos e terrestres, e até mesmo, mal á saúde humana.

O estudo realizado proporcionou a identificação de gêneros fúngicos isolados de uma amostra do solo amazônico contaminado com Glifosato na proporção de: *Penicillium sp* de 60,0%, *Aspergillus sp* de 26%, *Trichoderma sp* de 8% e 6% não foram identificados. Trabalhos de isolamento de microrganismos de solo contendo glifosato foram realizados anteriormente. Castro (2007), isolou do solo a 30 cm de profundidade bactérias e cepas de *Fusarium sp*. Mattos (2002), isolou do solo os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum* que degradaram o glifosato. Em 2011, Scariot e Laguna estudaram isolados bacterianos do solo da região sul brasileira, Caxias do Sul, as bactérias isoladas foram gram negativas e pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Andrighetti em 2011, estudou a biodegradação do glifosato por bactérias isoladas do solo cultivado com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida.

Do ensaio envolvendo meios czapeks na presença ou ausência de fonte de fósforo e a presença de glifosato, verificou-se que 50 isolados fúngicos apresentaram maior produção de biomassa no meio Czapek contendo glifosato como única fonte de fósforo do que no meio czapek sem fonte de fósforo (KH_2PO_4). Cinco isolados fúngicos se destacaram por crescerem mais em meio czapek contendo glifosato, utilizando-o como fonte de fósforo. Os gêneros dos cinco isolados foram *Aspergillus* e *Penicillium*. Sendo que o *Penicillium* 4A21 e o *Penicillium* 6B 112, foram os isolados que mais se desenvolveram no meio czapek contendo glifosato. Esses resultados evidenciam a utilização do glifosato pelos isolados. Todos os isolados foram capazes de romper ligações químicas do glifosato (C-P) e utilizar o fósforo como substrato. Neste mesmo sentido, Castro (2007), testou a habilidade de cepas de *Fusarium* (91148,130 e 132), de degradar glifosato e demonstrou que *Fusarium* 91148 utilizou glifosato como fonte de nitrogênio e fósforo. Resultados semelhantes, foram encontrados por Mattos em 2002, observou que *Cochliobolus heterostrophus* e *Fusarium anthophilum* apresentaram potencial para degradar o glifosato utilizando-o como fonte de fósforo.

Do ensaio envolvendo meios czapeks com baixa concentração de sacarose e presença de glifosato, os três isolados testados (*Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211) apresentaram crescimento em biomassa fúngica tanto em meio czapek com reduzida quantidade de sacarose (2,35 g/l), quanto em meio czapek com reduzida quantidade de sacarose e suplemento de glifosato (2,35g/l). Verificou-se maior crescimento do isolado *Aspergillus* 2B112 em meio czapek contendo glifosato comparado ao meio czapek sem glifosato. Foi possível observar que os isolados possivelmente utilizaram o glifosato como fonte de carbono para promoção de seu desenvolvimento. Resultados por meio de isolamento de bactérias foram encontrados por Andrighetti em 2011, ele observou que os isolados foram capazes de utilizar o glifosato como fonte de carbono, sem ocasionar incremento na respiração microbiana, mediada pelo desprendimento de CO₂ dos solos analisados. Também, segundo Mattos et al., 2002, (cepas bacterianas MG1, MG2 e MG3, e os fungos *Nigrospora sphaerica*, *Cochliobolus heterostrophus*, *Fusarium anthophilum* foram capazes de degradar o herbicida Glifosato, tendo-o também, como única fonte de carbono.

Por meios colorimétrico/espectrofotométrico e cromatográficos (de camada delgada TLC e líquida de alta eficiência-CLAE-EM) foram analisados a degradação do glifosato e investigação da sua presença e de seus metabólitos AMPA e Sarcosina nos filtrados fúngicos.

Na realização da CCD dos padrões de glifosato, AMPA, Sarcosina, e soluções dos isolados fúngicos, utilizando o banho de ninidrina e acetona, observou-se que a revelação do AMPA após o contato com ninidrina ocorreu em temperatura ambiente, e Sarcosina a 100°C em tempo inferior a 1 minuto, e os outros componentes, padrão de glifosato e filtrados dos isolados, presentes na placa de sílica, ocorreram a 100°C de 5 a 10 minutos. Tal fato fez com que otimizássemos o experimento fazendo a CCD dos padrões de AMPA e Sarcosina em placas diferentes para não resultarem em manchas difusas pela placa de sílica. O fator de retenção do glifosato e filtrados foram $R_f=0,50$, Sarcosina $R_f=0,45$ e AMPA $R_f= 0,42$. No entanto, as amostras dos filtrados das culturas de *Aspergillus* 2B 112, *Penicillium* 4A21 e *Penicillium* 4A211 apresentaram R_f de aproximadamente 0,5 e não foi possível uma análise conclusiva sobre a presença dos metabólitos Sarcosina e AMPA, devido à proximidade de R_f das substâncias estudadas. Resultados mais satisfatórios foram obtidos por Amarante Junior et al., 2002 que também realizou a determinação de glifosato quantitativamente por cromatografia em camada delgada (CCD), usando placas de Fixiona 50-X8 (forma Na⁺), operadas a 50 °C

e utilizando solução de $Ba_2B_4O_7$ como fase móvel. A detecção foi realizada com ninhidrina. Segundo o autor, a relação entre a área da mancha e a concentração foi linear de 0,5 a 30 μg e 0,1 a 20 μg de glifosato e AMPA, respectivamente.

Em relação ao CLAE-EM, analisamos as amostras do dia zero (meio czapek com glifosato) e a amostra do filtrado do isolado *Penicillium* 4A211. Com o encaixe das amostras nas curvas de calibração obtivemos as concentrações de glifosato no dia zero e glifosato, AMPA e Sarcosina da amostra do filtrado do isolado *Penicillium* 4A211, evidenciando a degradação do glifosato e obtenção de seus metabólitos AMPA e Sarcosina. O isolado *Penicillium* 4A211 degradou o herbicida glifosato em mais de 42% em apenas 14 dias. Wauchope et al.,1992 verificou que a meia vida do glifosato pode ir até 174 dias. Rodrigues e Almeida, 1995 relatam que 50% do glifosato é degradado em 28 dias e 90% em 90 dias. Giesy et al.,2000 relata que meia vida do glifosato é de 197 dias e AMPA de 76 a 240 dias. Toni et al.,2006 concluiu em seus estudos que a meia vida do glifosato pode variar conforme o tipo de solo, menos de 7 dias até meses. Amarantes, 2002 realizou um estudo com 47 diferentes tipos de solo e concluiu que a meia vida do glifosato é em média 32 dias.

Abordando a literatura atual não foi possível encontrar artigos que mencionassem outros metabólitos da degradação microbiana do glifosato que não fossem o AMPA e a Sarcosina. Segundo Galli et al., 2005 o glifosato é degradado pelos microrganismos que produzem enzimas como a C-P liase responsável pela clivagem da ligação carbono-fósforo do glifosato, resultando na metabólito Sarcosina e a enzima glifosato desidrogenase que rompe a ligação química entre o carbono-nitrogênio resultando em outro metabólito, o AMPA (ácido amino metil fosfônico). Com a degradação do glifosato, elementos como fósforo, carbono e nitrogênio servem de substrato.No presente trabalho o isolado *Penicillium* 4A211 demonstrou ser um provável produtor de ambas enzimas.

O estudo realizado apresenta grande importância biotecnológica por apresentar fungos isolados e identificados do solo Amazônico com grande potencial de degradação do herbicida glifosato. Assim, em pesquisas futuras, os isolados encontrados poderão promover a biorremediação do solo, evitando toxicidade, alteração na cadeia alimentar dos micro e macrorganismos do solo, consequências negativas para o ecossistema e recursos naturais e males a animais do solo e da água.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO,N.M.; RIBEIRO, M. L. 2002. Métodos de extração e determinação do herbicida glyphosate: breve revisão. Química Nova, São Paulo, v.25, n.3, p. 420-428.

ANDRIGHETTI, M.S. 2011. Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas do solo cultivado com macieira com diferente histórico de aplicação deste herbicida. Porto Alegre.

CASTRO, J.V; PERALBA, C.R. 2007. Biodegradation of the herbicide glyphosate by filamentous fungi in platform Shaker and bath bioreactor, J. Environ. Sci. Health Part B.v.42, p.883.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA; M. C. 2005. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura.

KRYSKO.L.T, ORLIK.A. 1997. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil borne fungal strains capable to degrade this herbicide.Chemosphere 34, 2601-2605.

LIU.C.M.; McLEAN.P. A.; SOOKDEO. C. C.; CONNON.F. C. 1991. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. BioTechnica International, Inc., 85 Bolton Street, Cambridge, Massachusetts.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P. PRATA, F.; CAMARGO, L. 2002. Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v.12, n. 1, p.145-154.

NAGARAJA, P. BHASKARA.B.L.N., P. 2006. Direct Sensitive Spectrophotometric Determination of Glyphosate by Using Ninhydrin as a Chromogenic Reagent in Formulations and Environmental Water Samples. *Helvetica Chimica Acta* 89:2686-2693.

RANK.J, J.A-G, SKOVS B, PEDERSEN LH, JESEN. K . 1993. Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, *Salmonella* mutagenicity test, and *Allium* anaphase-telophase test. *Mutat Res* 300:29–36.

ROMANO, R.M, ROMANO, M.A, OLIVEIRA, C.A. 2009. Glifosato como Desregulador Endócrino Químico. *Ver. Unicentro.v.5.n.2*.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. 2003. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-58.

SCARIOT, F. J, LAGUNA, S. E. 2011. Isolamento de bactérias degradadoras de glifosato visando a descontaminação do solo. XIX Encontro de Pesquisadores. I Mostra acadêmica de Inovação Tecnológica. Caxias do Sul.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. 2006. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. *Química Nova*, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833.

6.CONCLUSÃO

O isolamento e a identificação dos fungos de uma amostra do solo Amazônico resultou nos fungos do Filo Ascomycota especificamente do gênero, *Aspergillus*, *Trichoderma* e em sua maioria *Penicillium*.

Avaliado o potencial degradador dos isolados identificados em utilizar o herbicida glifosato como fonte de fósforo, se destacaram os isolados *Aspergillus* 2B112, *Penicillium* 4A21, *Penicillium* 4A211, *Penicillium* 6B221 e *Penicillium* 6B112 obtendo maior biomassa do que os isolados em meio czapek inalterado. Também avaliado o potencial degradador dos isolados identificados em utilizar o herbicida glifosato como fonte de carbono, se destacou o isolado *Aspergillus* 2B112, obtendo maior biomassa do que em meio czapek inalterado.

Os ensaios colorimétrico/espectofotométrico também foram reveladores apresentando a redução de glifosato ao longo dos dias de utilização como substrato. O isolado *Penicillium* 4A211, degradou 42% do herbicida glifosato em 14 dias.

A cromatografia de camada delgada apresentou em suas placas de sílica a presença dos padrões de glifosato e seus metabólitos, AMPA e Sarcosina, além da presença do glifosato nos filtrados fúngicos selecionados. As cromatografias de camada delgada realizadas não diferenciaram as manchas de glifosato e seus metabólitos por apresentar fatores de retenção próximos.

Os ensaios por meio do CLAE-EM possibilitou afirmar que *Penicillium* 4A211 degrada o herbicida glifosato e promove o surgimento dos metabólitos AMPA e Sarcosina.

O estudo realizado apresenta fungos isolados de uma amostra de solo Amazônico com potencial de degradação do herbicida glifosato, podendo em pesquisas futuras, promover a biorremediação do solo, evitando toxicidade e prejuízos a micro e macro animais e até mesmo aos humanos.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARANTE JÚNIOR, O. P.; SANTOS, T.C.R.; BRITO,N.M.; RIBEIRO, M. L. Métodos de extração e determinação do herbicida glyphosate: breve revisão. Química Nova, São Paulo, v.25, n.3, p. 420-428, 2002.

ANDRADE, J.A.; QUEIROZ, S.C.N.; JARDIM, I.C.S.F. Determinação de glifosato e AMPA em maçãs, empregado extração em fase sólida e CLAE. Química Nova, n 19, p 268.1996.

ANDRIGHETTI, M.S. Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas do solo cultivado com macieira com diferente histórico de aplicação deste herbicida. Porto Alegre.2011.

ANDRÉA, M.M.; PAPINI, S.; PERES, T. B.; BAZARIN, S.; SAVOY,V. L. T.; MATALLO, M. B. Glyphosate: influência na biota do solo e ação de minhocas sobre sua dissipação em terra agrícola. Planta Daninha, Viçosa, v.22, n.1, p.95-100, 2004.

ARANTES, S. A. C. M.; LOVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L. Efeito da calagem e do glyphosate na atividade microbiana de diferentes classes de solos. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v.17, n.0, p.19-28, 2007.

ARAUJO, A.S.; MONTEIRO, R.T.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. Chemosphere, Oxford, v.52, n.52, p.799-804, 2003.

ARAUJO, A.S.; MONTEIRO, R. T.; ABARKELI, R. B Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 157-164, jan./dez. 2003

BARJA, B. C.; AFONSO, M. S. Aminomethylphosphonic acid and glyphosate adsorption onto goethite: a comparative study. Environmental Science & Technology, Iowa, v.39, n.2, p.585-592, 2005.

BATTAGLIN, W.A.; KOLPIN, D.W.; SCRIBNER, E.A.; KUIVILA, K.M.; SANDSTROM, M.W. Glyphosate, other herbicides, and transformation products in Midwestern streams, 2002. Journal of the American Water Resources Association, v.41, n.2, p.323-332, 2005.

BUSSE, M. D.; RATCLIFF, A. W.; SHESTAK, C. J.; POWERS, R. F. Glyphosate toxicity and the effects of long-term vegetation control on soil microbial communities. Soil Biology & Biochemistry, Oxford, v.33, p.1777-1789, 2001.

CHALOM, M.Y.; VENCKUNAR, E.S.; DINIZ, S.; MORIBE, M. Determinação direta do glifosato e AMPA em águas superficiais e finais pela técnica de cromatografia de íons.

COX, C. Human exposure and ecological effects. Journal of Pesticide Reform, v.15, n.4, 1995.

DICK, R.E.; QUINN, J.P. Glyphosate-degrading isolates from environmental samples: occurrence and pathways of degradation. Applied Microbiology Biotechnology, Berlin, v.43, n.3, p.545-550, 1995.

FORTES, P.N. Microbiota do Solo como indicadores da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A.P.D.; FREITAS, S.S. Microbiota do solo e qualidade ambiental. Instituto Agrônomo. 312 p. 2007.

FRANZ, J. E.; MAO, M.K.; SIKORSKI, J.A. Glyphosate: A Unique Global Herbicide. American Chemical Society, Washington DC, 1997, p.653.

GALLI, A.J.B.; MONTEZUMA, M. C. Alguns aspectos da utilização do herbicida glifosato na agricultura. 2005.

GEBLER, L.; SPADOTTO, C. A. Comportamento ambiental dos herbicidas. In: Vargas, L. & Roman, E.S. (ed.). Manual de Manejo e Controle de Plantas Daninhas. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho, 2004. 652p.

GIESY.J.P.; DOBSON.S.; SOLOMON.K.R. Ecotoxicological risk assessment for roundup herbicide. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v.167, n.1, p.35-120, 2000.

JACKSON, R. E.; PITRE, H. N. Influence of Roundup Ready soybean production systems and glyphosate application on pest and beneficial insects in narrow-row soybean. *Journal of Entomological Science*, Kyoto, v.39, n.1, p.62-70, 2004.

KRAEMER, A. F.; MARCHESAN, E.; AVILA, L. A.; MACHADO, S. L. O; GROHS, M. Destino ambiental dos herbicidas do grupo das imidazolinonas. *Planta Daninha*, Viçosa, v.27, n.3, p.629-639, 2009.

KRYSKO, L.T, ORLIK, A. The use of glyphosate as the sole source of phosphorus or carbon for the selection of soil borne fungal strains capable to degrade this herbicide. *Chemosphere* 34, 2601-2605.1997.

LIU, C.M.; McLEAN, P. A.; SOOKDEO, C. C.; CONNON, F. C. Degradation of the Herbicide Glyphosate by Members of the Family Rhizobiaceae. *BioTechnica International, Inc.*, 85 Bolton Street, Cambridge, Massachusetts.1991.

LOCKE, M. A.; ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Integrating soil conservation practices and glyphosate-resistant crops: impacts on soil. *Pest Management Science*, New York, v.64, n. 4, p.457-469, 2008.

MANY, L.; BARRIUSO, E. Glyphosate adsorption in soil compared to herbicides replaced with the introduction of glyphosate resistant crops. *Chemosphere*, Oxford, v.61, n. 6, p.844-855, 2005.

MATTOS, M. L. T.; PERALBA, M. C. R.; DIAS, S. L. P. PRATA, F.; CAMARGO, L. Monitoramento ambiental do glyphosate e do seu metabólito (ácido aminometilfosfônico) na água de lavoura de arroz irrigado. *Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v.12, n. 1, p.145-154, 2002.

NAGARAJA, P. BHASKARA.B.L.N., P. 2006. Direct Sensitive Spectrophotometric Determination of Glyphosate by Using Ninhydrin as a Chromogenic Reagent in Formulations and Environmental Water Samples. *Helvetica Chimica Acta* 89:2686-2693.

PEPPER, I. L.; GERBA, C. P.; BRUSSEAU, M. L. (Ed). *Pollution science*. London: Academic Press.,397 p.1996.

PRATA, F. Comportamento do glifosato no solo e deslocamento miscível de atrazina. Tese de doutorado. Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba,149 p.2002.

PROTASOVA, L.D, LARINA, G.E, YUYA.S, RASKIN,M.S, ABUBIKEROV,V.A Phyto-sanitary monitoring of lea. Adaptation of weed plants to Roundup and Liberty. *Agrokhimia* 4:59–72 (in Russian).

RANK.J, J.A-G, SKOVS B, PEDERSENH, JESEN. K .Genotoxicity testing of the herbicide Roundup and its active ingredient glyphosate isopropylamine using the mouse bone marrow micronucleus test, Salmonella mutagenicity test, and Allium anaphase-telophase test. *Mutat Res* 300:29–36. 1993.

REDDY, K.N.; RIMANDO, A. M.; DUKE,Aminomethylphosphonic acid, a metabolite of glyphosate, causes injury in glyphosate-treated, glyphosate-resistant soybean. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, California*, v.52, n.16,p.5139-5143, 2004.

RODRIGUES, T. E. Solos da Amazônia. In: ALVAREZ .VENEGAS, H.; FONTES, L. E. F. O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira deCiência do Solo/UFV. p. 19-60. 1996.

ROMANO, R.M, ROMANO, M.A, OLIVEIRA, C.A. Glifosato como Desregulador Endócrino Químico. Ver. *Unicentro*.v.5.n.2, 2009.

RUEPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, T. T. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, California, v.25, n. 3, p.517-528, 1977.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. *Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, p. 53-58, 2003.

SCARIOT, F. J, LAGUNA, S. E. Isolamento de bactérias degradadoras de glifosato visando a descontaminação do solo. XIX Encontro de Pesquisadores. I Mostra acadêmica de Inovação Tecnológica. Caxias do Sul, 2011.

SOLOMON, K. R.; THOMPSON, D. G. Ecological risk assessment for aquatic organisms from over-water uses of glyphosate. *Journal of Toxicology and Environmental Health B*, Philadelphia, v.6, n.3, p.211-246, 2003.

SHANER, D. L. Role of translocation as a mechanism of resistance to glyphosate. *Weed Science*, Lawrence, v.57, n. 1, p.118-123, 2009.

TONI, L. R. M.; SANTANA, H.; ZAIA, D. A. M. Adsorção de glyphosate sobre solos e minerais. *Química Nova*, São Paulo, v.29, n.4, p.829-833, 2006.

THORN, R. G. Soil fungi. In: SUMMER, M. E. (Ed.). *Handbook of soil science*. Boca Raton, Florida: CRC PRESS, 2000. p. 22-23.

VEIGA, F.; ZAPATTA, J. M.; MARCOS, F.; ALVAREZ, E. Dynamics of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in a forest soil in Galicia, north-west Spain. *The Science of the Total Environment*, v. 271, n.1-3, p.135-144, 2001.

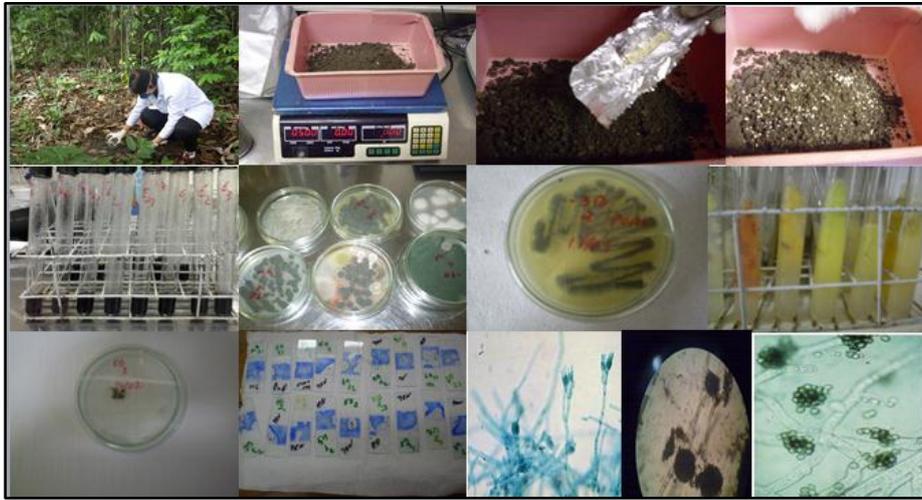
VERRELL, P.; VAN, B. E. As the worm turns: *Eisenia fetida* avoids soil contaminated by a glyphosate-based herbicide. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, New York, v.72, n.2, p.219-224, 2004.

WAUCHOPE, R. D.; BUTLER, T. M.; HORNSBY, A.G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P.W.M.; BURT, J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database: select values for environmental decision making. *Reviews of environmental contamination & toxicology*, New York, v.123, n.1, p.1-164, 1992.

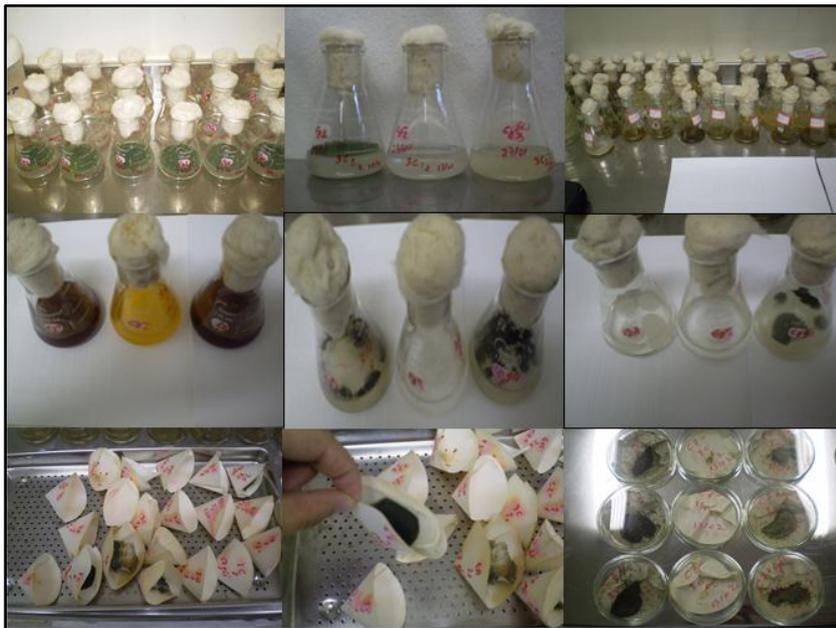
ZOBIOLE, L., KREMER, R., OLIVEIRA, R. AND CONSTANTIN, J. Glyphosate affects micro-organisms in rhizospheres of glyphosate-resistant soybeans. *Journal of Applied Microbiology*, no. doi: 10.1111/j.1365-2672, 2010.

8.APÊNDICE

8.1.Isolamento e Identificação de Fungos Isolados do Solo da Floresta Amazônica:



8.2.Avaliação da degradação de glifosato e utilização como fonte de Fósforo:



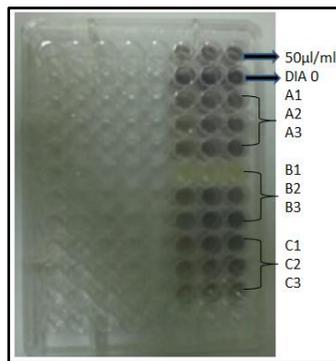
8.3.Avaliação da degradação de glifosato e utilização como fonte de Carbono:



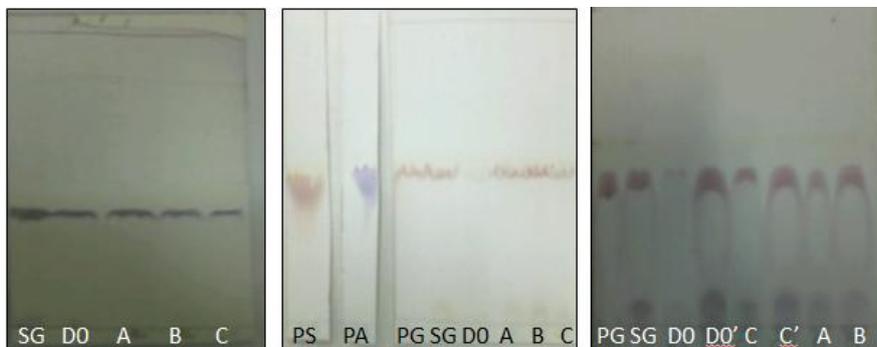
8.4. Colorimetria para Análise do glifosato:



8.5. Análise Espectrofotométrica: Degradação do glifosato por isolados e utilização como fonte de carbono.



8.6. Cromatografia de camada delgada dos Padrões de Glifosato, AMPA e Sarcosina e Filtrados dos Isolados selecionados.



8.7. Avaliação do Glifosato e seus metabólitos por HPLC-MS:



8.8. Instruction for/to authors da JOURNAL OF MICROBIOLOGY and BIOTECHNOLOGY.



The screenshot shows the Springer website interface. At the top left is the Springer logo. To the right, there are links for "Novo usuário" and "LOGIN". Below this is a navigation bar with links: HOME, MY SPRINGER, ASSUNTOS, SERVIÇOS, IMPRESSÕES E PUBLICAÇÕES, and SOBRE NÓS. A search bar with a "GO" button and "Advanced Search" link is also present. The main content area is titled "» Microbiology" and includes a breadcrumb trail: "Início > Ciências Biológicas > Microbiology". Below this, there are links for "SUBDISCIPLINAS", "PERIÓDICOS", "LIVROS", "SÉRIES DE LIVROS", "LIVROS DE TEXTO", and "REFERÊNCIA". The central focus is the "Journal of Microbiology and Biotechnology" section, which includes a cover image, the journal title, and the Editor-in-Chief's name: Ick-Dong Yoo. It also lists the ISSN: 1017-7825 (print version) and the Journal number: 10061. On the right side, there is a section titled "FOR AUTHORS AND EDITORS" with links for "Aims and Scope", "Open Choice - Your Way to Open Access", and "English Language Editing".

How to submit your manuscript

Online submission
For initial submission manuscripts should preferably be submitted online in the form of a pdf-file or in standard word processing format (e.g. Word or WordPerfect) including all figures and tables. Please click on "Submit online" in the "for authors and editors" link section in the frame on the right-hand side of this page. If you are transferred to Manuscript Central, follow these instructions. If not, please submit the following information:

Name of the corresponding author
E-mail address
Full postal address
Telephone and fax numbers
Title of the manuscript
Desired section or subfield as appropriate
Keywords

and attach your file(s). Your manuscript will be sent to the Editor or Editorial Office for this journal.

All Springer- or Birkhäuser Verlag journals are published using electronic production methods. Therefore we need to receive the electronic files of your article along with a pdf file of the accepted version. On acceptance of your manuscript you will therefore be asked to resubmit the original files for your manuscript and original files of all illustrations. For details on the preferred text and graphics formats please see the detailed Instructions for Authors.

Hardcopy submission
If you are unable to submit your manuscript online or if this journal does not accept online submissions please send your manuscript to the editor in charge of your particular geographic region or sub field as described in the Instructions for Authors. Mailing addresses of the Editors can be found on the Editorial Board page for this journal.

[Aims and Scope](#)

[Open Choice - Your Way to Open Access](#)

[English Language Editing](#)

[Author Academy: Training for Authors](#)

[Submission information](#)

SERVICES FOR THE JOURNAL

[Contacts](#)

[Download Product Flyer](#)

[Bulk Orders](#)

[Article Reprints](#)

ALERTS FOR THIS JOURNAL

Get the table of contents of every new issue published in Journal of Microbiology and Biotechnology.

Your E-Mail Address

Please send me information on new Springer publications in Microbiology.

RELATED BOOKS - SERIES - JOURNALS

Journal

Regular Articles

All portions of the manuscript must be typed one-half. The pages may not be numbered, those assigned Editorial office.

The Title should be a brief phrase describing the contents of the paper. The Title Page should include the authors' full names and affiliations, the name of the corresponding first author along with e-mail and phone number.

The Abstract should be informative and completely self-explanatory, briefly present the topic, state the scope of the experiments, indicate significant data, and point out major findings and conclusions. The abstract should be 100 to 250 words in length. Complete sentences, active verbs, and the third person should be used, and the abstract should be written in the past tense. Standard nomenclature should be used and abbreviations should be avoided. No literature should be cited.

Following the abstract, about 3 to 7 **key words** that will provide indexing references should be listed. A list of non-standard Abbreviations should be added. In general, non-standard abbreviations should be used only when the full term is very long and used often. Each abbreviation should be spelt out and introduced in parentheses the first time it is used in the text. Only recommended SI units should be used. Authors should use the solidus presentation (mg.ml⁻¹). Standard abbreviations (such as ATP and DNA) need not be defined.

The Introduction should provide a clear statement of the problem, the relevant literature on the subject, and the proposed approach or solution. It should be understandable to colleagues from a broad range of scientific disciplines.

Materials and Methods should be complete enough to allow experiments to be reproduced. However, only truly new procedures should be described in detail; previously published procedures should be cited, and important modifications of published procedures should be mentioned briefly. Capitalize trade names and include the manufacturer's name and address. Subheadings should be used. Methods in general use need not be described in detail.

Results should be presented with clarity and precision. The results should be written in the past tense when describing findings in the author(s)'s experiments. Previously published findings should be written in the present tense. Results should be explained, but largely without referring to the literature.

Discussion, speculation and detailed interpretation of data should not be included in the results but should be put into the discussion section. The Discussion should interpret the findings in view of the results obtained in this and in past studies on this topic. State the conclusions in a few sentences at the end of the paper. The Results and Discussion sections can include subheadings, and when appropriate, both sections can be combined.

Conclusion. The conclusion should include the most important idea of the experiment, the author's own findings, possible solutions to the problem, recommendations for further research, etc.

The Acknowledgments of people, grants, funds, etc should be brief.

Tables should be kept to a minimum and be designed to be as simple as possible. Tables are to be typed one-spaced throughout, including headings and footnotes. Tables should be prepared in Microsoft Word. Each table should be included directly in text and numbered consecutively in Arabic numerals and supplied with a heading and a legend. Tables should be self-explanatory without reference to the text. The details of the methods used in the experiments should preferably be described in the legend instead of in the text. The same data should not be presented in both table and graph forms or repeated in the text.

Figures should be numbered and are included directly in text. Graphics should be prepared using applications capable of generating high resolution GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint before pasting in the Microsoft Word manuscript file. Use Arabic numerals to designate figures and upper case letters for their parts (Fig 1). Begin each legend with a title and include sufficient description so that the figure is understandable without reading the text of the manuscript. Information given in legends should not be repeated in the text.

References: In the text, a reference identified by means of an author's name should be followed by the date of the reference in parentheses. When there are more than two authors, only the first author's name should be mentioned, followed by 'et al'. In the event that an author cited has had two or more works published during the same year, the reference, both in the text and in the reference list, should be identified by a lower case letter like 'a' and 'b' after the date to distinguish the works.

Examples: Davis (2007), Nijsten et al. (2008), (Hleba, 2011), (Kačániová and Haščík, 2006), (Buňka, 2003; Buňková, 2008a,b; Kmeť, 2004,2006), (Čuboň et al., 2009)

References should be listed at the end of the paper in alphabetical order. Articles in preparation or articles submitted for publication, unpublished observations, personal communications, etc. should not be included in the reference list but should only be mentioned in the article text. Authors are fully responsible for the accuracy of the references.

Examples:

BERGE, A.C.B., ATWILL, E.R., SISCHO, W.M. 2005. Animal and farm influences on the dynamic of antibiotic resistance in faecal *Escherichia coli* in young dairy calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 69, 25-38.

BÍREŠ, J. 2004. Current legislation in the field of milk hygiene. *The Dairy*, 35(1), 33-35.

LEVY, S.B. 2007. Antibiotic paradox: how the misuse of antibiotics destroys their curative powers. First edit. Praha : Academia, 312 p. ISBN 978-80-200-1485-6.

BUŇKOVÁ, L., BUŇKA, F., DOLEŽÁLKOVÁ, I., KRÁČMAR, S. 2009. Antibacterial effect of monocaprin, undecanoylglycerol and undecenoylglycerol. *Food Safety and control (Proceeding of the work of the International Scientific Conference)* Nitra : SUA, 45-48.

EUCAST. 2009. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Antimicrobial susceptibility testing – EUCAST disk diffusion method. Version 1.0, december 18.

We accept also journal abbreviations. Please follow dots, lines, spacing and italics type of journal titles.