

# ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE UM MICRORGANISMO DEGRADADOR DO FUNGICIDA OPERA<sup>®</sup>

**LOPES, Flavio Marques e FERNANDES, Kátia Flávia**

Instituto de Ciências Biológicas – DBBM – LQP

[kátia@icb.ufg.br](mailto:kátia@icb.ufg.br)

## PALAVRAS-CHAVE

Biorremediação, Biodegradação, Caracterização Bioquímica

## INTRODUÇÃO

A soja é uma oleaginosa originária da China e introduzida no território brasileiro no ano de 1882, em terras baianas. Em 1940 a soja começou a ganhar importância na agricultura, tornando-se o maior destaque do agronegócio brasileiro no ano de 2004. Assumindo a liderança no mercado internacional do complexo soja - grãos, farelo e óleo – com exportações chegando a US\$ 8,1 bilhões (Conab, 2002). Segundo a estimativa do IBGE referente a produção agrícola 2006, a soja representa em termos de área plantada 22,00 milhões de hectares cultivados. Para o combate às pragas que acometem as plantações vários produtos abrangendo um grande número de moléculas químicas com diferentes modos de ação e toxicidade, sendo divididos em três grandes classes: inseticidas, herbicidas e fungicidas (Silva, 2004).

Os fungicidas são substâncias que são utilizadas com o intuito de atuar sobre uma doença fúngica que são mais difíceis de serem tratadas quando comparadas ao controle de insetos, visto que os fungos parasitas possuem uma íntima relação com a planta hospedeira e sua erradicação pode prejudicar as associações benéficas (Ghini, 2000).

O OPERA é um fungicida cadastrado na ANVISA como sendo um produto de classificação toxicológica nível II – produto altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente, pois trata-se de um composto altamente persistente – Segundo o Ibama, 1990 a classificação dos compostos químicos, quanto a sua persistência, é dada pela porcentagem de desprendimento de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> em 28 dias. O OPERA segundo estas definições é classificado como agrotóxico de alta persistência com meia vida acima de 180 dias - e altamente tóxico para organismos aquáticos. Características estas que alertam as autoridades quanto ao risco de um acidente ambiental envolvendo estes compostos.

O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar bioquimicamente um microrganismo com capacidade de degradar o fungicida OPERA<sup>®</sup>

## METODOLOGIA

### COLETA DO SOLO

O solo foi coletado em uma área produtiva de soja que utilizou o OPERA como o principal fungicida nos últimos dois anos. A coleta foi realizada em três pontos da área plantada segundo as coordenadas discriminadas na tabela 01, nas profundidades de 20 e 80 cm. O solo coletado foi armazenado em sacos

plásticos e acondicionados a 4 °C, cada grama de solo será resuspendido em 10 mL de solução salina homogeneizado por 30 min. A solução obtida foi diluída em solução salina e aplicado em meio de cultura nutritivo e meio seletivo contendo o fungicida na composição.

Tabela 01 – Coordenadas dos pontos de coleta

Pontos	Coordenadas
Ponto 01	S 16 <sup>o</sup> 55' 52,2''
	W 048 <sup>o</sup> 40' 39,8''
Ponto 02	S 16 <sup>o</sup> 56'13,5''
	W 048 <sup>o</sup> 40'44,8''
Ponto 03	S 16 <sup>o</sup> 56'16,5''
	W 048 <sup>o</sup> 40'18,2''

## SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

As suspensões obtidas com solução salina foram plaqueadas em meios mínimos contendo OPERA em concentrações crescentes (4,06; 16,25; 28,44 µg de ativo por placa). O microrganismo que apresentou crescimento neste meio foi identificado bioquimicamente. A identificação numérica das placas foi feita segundo o ponto da coleta (1, 2 e 3), seguido pela profundidade (20 e 80 cm) e a concentração do fungicida (1 = 4,06 µg; 3 = 16,25 µg e 05 = 28,44 µg).

## ELETROFORESE

A eletroforese foi realizada utilizando gel de poliacrilamida, em sistema SDS-PAGE, sendo empregado gel separador de 12% e gel concentrador 4%. A coloração do gel foi realizada com nitrato de prata.

## CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

Os testes bioquímicos foram realizados utilizando o Kit de caracterização bioquímica Bactray<sup>®</sup>. Os ensaios que foram realizados estão relacionados na tabela 02.

Tabela 02 – Relação dos ensaios bioquímicos realizados e suas respectivas siglas.

Sigla	TESTE	Sigla	TESTE	Sigla	TESTE
ONPG	ONPG	MAL	Malonato	CET	Cetrimide
ADH	Arginina Deshidrolase	RHA	Raminose	MAL	Malonato
LDC	Lisina Descarboxilase	ADO	Adontol	CIT	Citrato
ODC	Ornitina Descarboxilase	SAL	Salicina	MLT	Maltose
H <sub>2</sub> S	Ácido Sulfídrico	ARA	Arabinose	ESC	Esculina
URE	Uréia	INO	Inositol	CTL	Cont. descarboxilase
VP	Vogesproskauer	SOR	Sorbitol	ARG	Arginina
PD	Fenilalanina Desaminação	SAC	Sacarose	CIT	Citrato de Simmons
IND	Indol	MAN	Manitol	RAF	Rafinose

## RESULTADOS

Os microrganismos apresentaram diferentes sensibilidade como demonstrado na 03.

Tabela 03 - Isolamento de microrganismos resistente ao OPERA

Identificação	Número de UFC's	Identificação	Número de UFC's
1:20:___ Controle	427	1:80:___ Controle	165
1:20:01 - FSG	349	1:80:01 - FSG	41
1:20:03 - FSG	257	1:80:03 - FSG	25
1:20:05 - FSG	218	1:80:05 - FSG	17
2:20:___ Controle	220	2:80:___ Controle	222
2:20:01 - FSG	185	2:80:01 - FSG	127
2:20:03 - FSG	159	2:80:03 - FSG	27
2:20:05 - FSG	118	2:80:05 - FSG	25
3:20:___ Controle	440	3:80:___ Controle	218
3:20:01 - FSG	209	3:80:01 - FSG	160
3:20:03 - FSG	182	3:80:03 - FSG	32
3:20:05 - FSG	143	3:80:05 - FSG	23

Das colônias formadas foram escolhidas as colônias morfologicamente diferentes, estas foram repicadas e posteriormente realizado o crescimento em meio mineral contendo apenas o OPERA como fonte de carbono. Destes obtivemos 5 microrganismos dos quais determinamos a quantidade de proteína excretada para o meio. Os resultados podem ser observados na tabela 04.

Tabela 04 – Teor de proteína excretada pelos microrganismos em meio mineral.

Microrganismo	Quantidade de proteína excretada ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
1805	111,0
2801	80,0
2805	27,5
3803	130,5
3805	47,0

Após verificar a presença de proteína excretada, realizamos uma eletroforese das amostras. Observamos que os microrganismos 1805, 2801, e 3803 apresentaram bandas na eletroforese (figura 01), enquanto os demais produziram quantidade muito baixas não sendo possível detectar pelo método de coloração por prata.

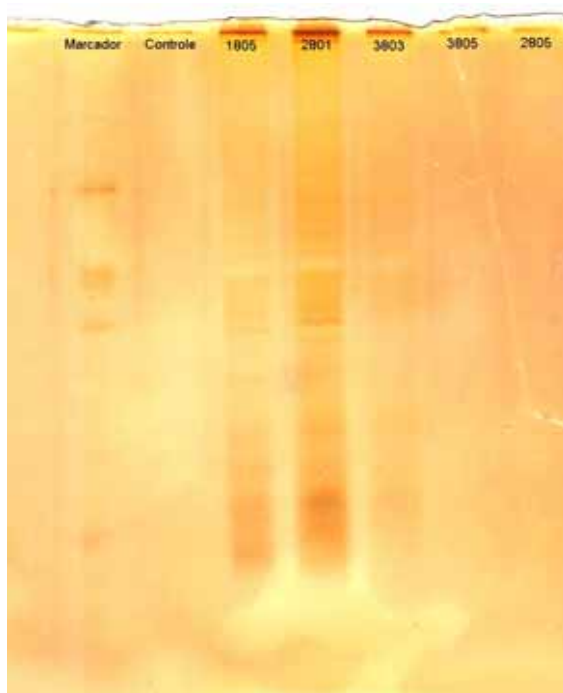


Figura 01 – Eletroforese do padrão protéico das exoproteínas liberadas pelos microrganismos em meio mineral contendo Opera como única fonte de carbono.

Os microrganismos que apresentaram bandas na eletroforese apresentam um perfil protéico semelhante e para possível diferenciação fora realizado testes bioquímicos (tabela 04).

Tabela 04 – Ensaio bioquímicos realizados nos microrganismos selecionados.

Testes	Microrganismos		
	1805	2801	3803
ONPG	-	-	-
ADH	-	-	-
LDC	+	+	+
ODC	-	-	-
H <sub>2</sub> S	-	-	-
URE	+	+	+
VP	+	-	+
PD	-	-	+
IND	-	-	-
CIT	-	+	+
MAL	+	+	+
RHA	+	+	+
ADO	-	-	-
SAL	+	+	+
ARA	+	+	+
INO	+	+	+
SOR	+	+	+
SAC	+	+	+
MAN	+	+	+

RAF	+	+	+
CET	-	-	-
MALT	+	+	+
CIT	-	-	-
MLT	+	+	+
ESC	+	+	+
CTL	+	+	+
ARG	+	+	+
IND	-	-	+

## CONCLUSÃO

O microrganismo 1805 apresenta fortes indícios de ser um bom biodegradador do fungicida OPERA®.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Lavouras. Capturado em 14 de Janeiro de 2002. Online. <http://www.conab.gov.br>.

GHINI, R & KIMATI, H. Resistências de fungos a fungicidas. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2000.

SILVA, C. M. M. de S. & FAY, E. F. Agrotóxico e Ambiente. Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2004.