

PERFIL DE AÇÚCARES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLO EM PROCESSO DE BIORREMEDIAÇÃO DO HERBICIDA CLOMAZONA

Karina Farias de Oliveira⁽¹⁾; Maria Laura Turino Mattos⁽²⁾; Ricardo Alexandre Valgas⁽³⁾; Liane Aldrighi Galarz⁽⁴⁾

(1) Estudante; Instituto Federal Sul Rio Grandense; (2) Pesquisador; Embrapa Clima Temperado; Pelotas, Rio Grande do Sul; maria.laura@embrapa.br; (3) Pesquisador; Embrapa Clima Temperado; (4) Assistente; Embrapa Clima Temperado.

INTRODUÇÃO

A necessidade de remediar efeitos de contaminação de solos com resíduos de agrotóxicos levou ao desenvolvimento de tecnologias que enfatizam o uso de bactérias degradadoras de herbicidas em processo de biorremediação, associado a plantas fitorremediadoras. Um exemplo dessa situação é o emprego continuado do herbicida clomazona ou uma maior flexibilidade de doses que podem acumular resíduos no solo e provocar efeitos em diferentes espécies vegetais utilizadas em rotação com o arroz irrigado (MATTOS et al., 2007). Porém, clomazona pode ser degradado no solo, principalmente, por microrganismos, ocorrendo, conseqüentemente, o seu desaparecimento e/ou detoxificação (MATTOS et al., 2005). Estudos demonstram que, em solos hidromórficos, existem bactérias com capacidade para degradar o clomazona como *Pseudomonas fluorescens* CMM1 (MATTOS; THOMAS, 1996). *Pseudomonas* têm a capacidade de utilizar um grande número de compostos orgânicos complexos e raros como fonte de carbono e energia (BARBIERI, 1990), sendo capazes de rapidamente desenvolver novas atividades metabólicas em resposta a mudanças nas condições edafoclimáticas. No entanto, ainda são poucos os estudos que utilizam tecnologias de biorremediação *in situ* para mitigação de residuais de clomazona no solo, necessitando de pesquisas para avaliação do uso de bactérias biodegradadoras encapsuladas, como *P. fluorescens* CMM1, associados às plantas fitorremediadoras, como o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.), para biorrecuperação de solos com residuais de clomazona.

O objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de açúcares de bactérias isoladas de solo em processo de biorremediação do herbicida clomazona, visando à identificação de espécies de *Pseudomonas* e do acesso *P. fluorescens* CMM1 encapsulado.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado em condições de laboratório e campo, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Amostras de solo e de plantas de azevém foram coletadas de uma área experimental (120 m²) sob processo de biorremediação do herbicida clomazona com *P. fluorescens* CMM1 encapsulada, em Planossolo Háplico da Estação Experimental Terras Baixas. Os tratamentos compreenderam: (T1) *P. fluorescens* encapsulada; (T2) *P. fluorescens* encapsulada + azevém, dispostos em duas parcelas subdivididas em quatro faixas. Coletou-se uma amostra de solo composta por dez amostras simples, em uma área de 1m² a partir do ponto principal de cada faixa, à profundidade de 0-5 cm. Para o isolamento das bactérias, as amostras de solo (10g) foram diluídas (10⁻² a 10⁻⁴) em 90 mL de água destilada estéril e 100µl de cada diluição foram semeadas em três placas de Petri, por meio da técnica de espalhamento com a alça de *Drigaski*, utilizando-se o meio de cultura *Thorton's*. As placas foram incubadas a 28 °C por 24h. Para o isolamento das bactérias da rizosfera do azevém, coletaram-se dez plantas inteiras (parte área + raízes com o solo rizosférico aderido) aleatoriamente na área de 1m² de cada faixa. Amostras simples da rizosfera (100g) das plantas foram homogeneizadas, resultando em quatro amostras compostas (1kg faixa⁻¹). Após, o isolamento das bactérias do solo rizosférico foi o mesmo descrito acima para o solo. Todas as bactérias isoladas do solo e da rizosfera do azevém que apresentaram características morfológicas das colônias (cor, borda, elevação, forma, superfície e caracteres ópticos) típicas do acesso CMM1 de *P. fluorescentes* (acesso de referência), foram selecionadas, purificadas em meio Agar Nutriente. Após, foram repicadas para meio King A e King B visando avaliação do crescimento e fluorescência (KING et al., 1954). Os isolados que apresentaram fluorescência visualizada sob luz UV (366 nm) foram submetidos aos seguintes testes de açúcares para detecção da fermentação de carboidratos: *Hugh e Leifson*, Agar Triplo Açúcar Ferro (TSI), Vermelho de Metila (VM) e crescimento em Agar Cetrimide e Ácido Nalidíxico (ACAN), visando à diferenciação de gêneros e identificação de espécies bacterianas.

O teste *Hugh e Leifson* foi realizado conforme Collins; Lyne's (2004), com as fontes de carboidratos glicose e lactose, observando-se que bactérias que apresentam metabolismo oxidativo produzem ácidos somente em tubos aeróbios e, aquelas com metabolismo fermentativo, produzem ácidos em ambos os tubos (aeróbios e anaeróbios). Para o teste TSI empregou-se a metodologia descrita em Cappuccino e Sherman (1983), observando-se a coloração vermelha no ápice e base dos tubos sem produção de gás, indicativo de isolado não fermentador de glicose, sacarose e lactose. O teste VM foi conforme Merck (1996), observando-se a coloração amarela do caldo (meio alcalino), indicativo de que não são bactérias da família *Enterobacteriaceae*. Para o teste ACAN o meio foi preparado descrito em Merck (1996), observando-se o crescimento com formação de pigmento fluorescente que indica a presença de bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Realizou-se uma análise de agrupamento hierárquica utilizando a distância de *Mannhattan* e o método da Ligação Média para os dados da análise dos açúcares.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na etapa do isolamento de bactérias do solo, foram obtidos 180 isolados e selecionados 35 com características morfológicas das colônias semelhantes ao gênero *Pseudomonas*. Espécies de *Pseudomonas* (*P. mandelii*, *P. monteilii*, *P. putida*, *P. veronii*,) têm sido associadas com a rizosfera do arroz (RANGARAJAN et al., 2002). Com base no crescimento em meio King B com produção de pigmento fluorescente, selecionaram-se 30 isolados (AP23, AP24, AR21, AR22, AR23, AR24, AR27, AR28, AR29, AR210, AR211, AR212, AR213, AR214, AR219, AR226, AR227, AR31, AR33, AR34, AR35, AR44, BR26, BR34, CR21, CR23, CR24, CR33, CP22, DR214), enquanto que no meio King A cinco isolados produziram esse pigmento (AP24, AR44, AR213, CR33, DR214), podendo indicar a produção de pigmentos *phenazine* (SNEATH, 1986). *P. aeruginosa* tem ampla distribuição sendo competitiva para colonizar vários ambientes, incluindo solo e raízes de plantas (STENDLEIR et al., 2009). O perfil de açúcares desses isolados refletiu o metabolismo fermentativo ou oxidativo de carboidratos, sendo obtida similaridade em torno de 80% e a formação de três grupos somente pela variável crescimento em ACAN (Figura 1), que indica espécies do gênero *Pseudomonas*. Porém, quando colônias produzem o pigmento verde-azulado (piocianina) no ACAN, evidencia provável *P. aeruginosa* (GOTO; ENOMOTO, 1970). O grupo 1 foi o que apresentou a maior homogeneidade englobando 26 acessos, inclusive o acesso referência (CMM1), com crescimento sem produção de pigmento. Os acessos AR34, BR26 e CR23 (Grupo 2) apresentaram crescimento com produção de pigmento castanho avermelhado, necessitando de provas de confirmação para *P. aeruginosa*. Os acessos AP23 e AR28 (Grupo 3) não apresentaram crescimento em ACAN. Considerando-se que o maior número de acessos que formaram grupo com CMM1 apresentaram metabolismo oxidativo, ou seja, não fermentaram nem glicose, lactose e sacarose, característico do gênero *Pseudomonas*, pôde-se inferir que a bactéria encapsulada colonizou a rizosfera do azevém e estabeleceu uma população no solo.

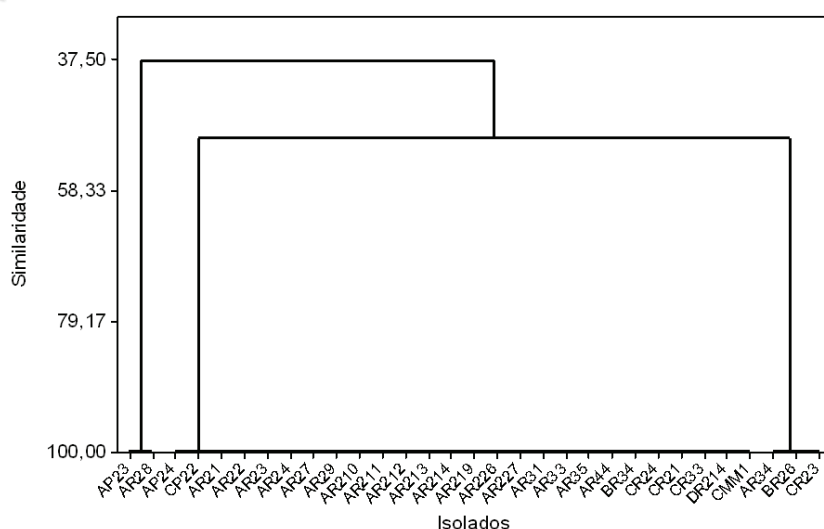


Figura 1. Dendrograma de similaridade com base na análise do crescimento em Agar Cetrimide e Ácido Nalidíxico de 30 isolados de bactérias. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

CONCLUSÕES

Distintas espécies do gênero *Pseudomonas* com metabolismo oxidativo colonizam a rizosfera do azevém.

Pseudomonas fluorescens CMM1 encapsulada tem potencial de colonizar o solo e a rizosfera do azevém

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos assistentes do laboratório de Microbiologia Agrícola e Ambiental da Embrapa Clima Temperado.

REFERÊNCIAS

- BARBIERI, S.M. Regulation and expression of degradative plasmids in *Pseudomonas*. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 42, n. 5/6, p. 317-24, 1990.
- CAPPUCCINO, J. G.; SHERMAN, N. **Microbiology: a laboratory manual**. Massachusetts, Wesley Publishing Company, p. 155-58. 1983.
- COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M.; FALKINHAM III, J. O. (Ed.). **Microbiological methods**. 8. ed. London: Arnold, 2004. 456 p.
- GOTO, S.; ENOMOTO, S. Nalidixic acid cetrimide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*. **Japam Journal Microbiology**, Tokio, v. 14, p. 65-72. 1970.
- KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, Minneapolis, v. 44, p. 301-307, 1954.
- MERCK. **Microbiology manual**. Darmstadt: Merck KGaA, 2000. 407 p.
- MATTOS, M. L. T. & THOMAS, R. W. S. P. Degradation of the herbicide clomazone by *Pseudomonas fluorescens*. In: **INTERNATIONAL BIODETERIORATION AND BIODEGRADATION SYMPOSIUM**, 10., 1996, Hamburg. Anais... Hamburg: Dechema, 1996. p. 623-630.
- MATTOS, M. L. T.; ANDRES, A.; SANTOS, I. M. B. dos Dissipação do herbicida clomazone em solo, água e sedimento de lavoura de arroz irrigado, no Rio Grande do Sul. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, 4., 2005, Santa Maria. Anais... Santa Maria: Editora Orium, 2005, p.508-510.
- MATTOS, M. L. T.; ANDRES, A.; SANTOS, I. M. B. dos; ANSELMO, J. Comportamento ambiental do herbicida clomazone na tecnologia Permit em lavoura de arroz irrigado. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ARROZ IRRIGADO**, 5., 2007, Pelotas. Anais... Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2007, p.471-473.
- RANGARAJAN, S. ; SALEENA, L. M. ; NAIR, S. Diversity of *Pseudomonas* spp. isolated from rice rhizosphere populations grown along a salinity gradient. **Microbial Ecology**, v. 43, n. 2 p. 280 -290. 2002.
- SNEATH, P. H.A. (Ed.); MAIR, N. S.; SHARPE, M. E. (Ed. Assoc.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. v. 2. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1986. 1599.
- STEINDLER L.; BERTANI I.; DE SORDI L.; SCHWAGER S.; EBERL L.; VENTURI V. LasI/R and RhII/R quorum sensing in a strain of *Pseudomonas aeruginosa* beneficial to plants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 15, p. 5131–5140, 2009.