

## CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DA RIZOSFERA DO AZEVÉM EM SOLO SOB PROCESSO DE BIORREMEDIÇÃO DO HERBICIDA CLOMAZONA

KARINA FARIAS DE OLIVEIRA<sup>1</sup>; LIANE ALDRIGHI GALARZ<sup>2</sup>; RICARDO ALEXANDRE VALGAS<sup>3</sup>; MARIA LAURA TURINO MATTOS<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal Sul Rio-Grandense – kariiloliveira@gmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Clima Temperado – liane.galarz@embrapa.br

<sup>3</sup>Embrapa Clima Temperado – ricardo.valgas@embrapa.br

<sup>4</sup>Embrapa Clima Temperado – maria.laura@embrapa.br

### 1. INTRODUÇÃO

O herbicida clomazona, do grupo químico das isoxazolidinonas, destaca-se como o mais usado na pré-emergência do arroz irrigado para o controle de plantas daninhas ou na pós-emergência de *Fimbristylis* (Capim-arroz), sendo uma das tecnologias empregadas na lavoura orizícola do Rio Grande do Sul (RS) (MATTOS et al., 2002). No solo, clomazona pode ser degradado, principalmente, por microrganismos, ocorrendo, consequentemente, o seu desaparecimento e/ou detoxificação (MATTOS et al., 2005). Por outro lado, o emprego continuado desse herbicida ou uma maior flexibilidade de doses podem acumular resíduos no solo e provocar efeitos em diferentes espécies vegetais utilizadas em rotação com o arroz irrigado (MATTOS et al., 2007). A necessidade de remediar esses efeitos levou ao desenvolvimento de tecnologias que enfatizam o uso de bactérias degradadoras de agrotóxicos em processo de biorremediação, associado a plantas fitorremediadoras.

Em solos hidromórficos foram identificadas bactérias com capacidade para degradar o clomazona (MATTOS et al., 2003), como *Pseudomonas fluorescens* CMM1 (MATTOS & THOMAS, 1996), preservada na Coleção de Microrganismos Multifuncionais de Clima Temperado (CMMCT), apresentando potencial para reduzir ou eliminar níveis residuais do clomazona no solo por meio da fitorremediação com espécies forrageiras. As bactérias do gênero *Pseudomonas* ocorrem comumente na água e no solo, são aeróbias, Gram-negativos, bacilos não esporulantes móveis, usualmente oxidase positiva, usam glicose oxidativamente e não produzem gás, apresentam variabilidade quanto à capacidade de liquefação da gelatina e crescem entre +4 °C e +42 °C. Algumas espécies produzem pigmentos fluorescentes, como *Pseudomonas aeruginosa*, *P. fluorescens* e *P. putida* (COLLINS; LYNE'S 2004). As *Pseudomonas*, muito comuns em solos rizosféricos, parecem ser bem adaptadas aos exsudados de raízes e utilizam prontamente substâncias liberadas pelas plantas (MELO, 2001).

Uma das espécies forrageiras mais cultivadas no RS é o azevém (*Lolium multiflorum* Lam.) que apresenta sistema radicular altamente ramificado e denso e que pode conter muitas bactérias associadas. Essa espécie foi usada pela equipe desse trabalho em um processo de biorremediação do herbicida clomazona com *P. fluorescens* CMM1 encapsulada, realizado em Planossolo Háplico da Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a caracterização fenotípica de bactérias isoladas da rizosfera do azevém e de solo sob processo de biorremediação do herbicida clomazona, preservadas na CMMCT, visando à identificação de espécies de *Pseudomonas* e *P. fluorescens* CMM1.

## 2. METODOLOGIA

O experimento foi realizado em condições de laboratório, na Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS. Utilizaram-se 35 acessos bacterianos que foram isolados da rizosfera (29) do azevém e do solo (6) sob processo de biorremediação do herbicida clomazona, o qual foi aplicado no cultivo de arroz irrigado por inundação. Recuperaram-se esses acessos da CMMCT, preservados por liofilização, em placas de Petri, em triplicata, contendo meio Agar Nutritivo (AN) para verificação da viabilidade e da pureza. A caracterização fenotípica englobou as características celulares, por meio do teste da coloração de Gram, quanto das colônias, bem como as bioquímicas e fisiológicas. A caracterização morfológica das colônias incluiu: cor, borda, elevação, forma, superfície e caracteres ópticos. As caracterizações bioquímicas e fisiológicas foram realizadas, em triplicata, por meio das análises: aerobiose, catalase, endósporo, crescimento e fluorescência em King A e King B, crescimento a 4°C e 41°C, oxidase e utilização de citrato. *P. fluorescens* (CMM1) foi utilizada como acesso de referência.

O teste de aerobiose foi realizado em tubos contendo meio semi-sólido tioglicolato, inoculados com colônias de 24 h de crescimento (24HC) e incubados a 32 °C por 24h, observando-se o crescimento próximo à superfície do meio. O teste de catalase foi conforme Collins; Lyne's (2004). Para a reação Gram preparou-se um esfregaço da colônia em uma lâmina com 10µl de água destilada, fixando-se as células com o auxílio do calor de uma chama, submetendo-se à coloração com kit comercial (Merck®), observando-se as lâminas em microscópio óptico (100X). A verificação de bactérias formadoras de endósporo foi conforme Sneath (1986). O crescimento em meios King A e King B foi conforme King et al. (1954), observando-se a fluorescência sob luz UV (366 nm). Verificou-se o crescimento dos acessos em placas com meio AN incubadas nas temperaturas de +4 °C e +41°C por 120h. Para a reação de oxidase foram utilizadas tiras (Laborclin), observando-se o desenvolvimento de uma coloração violeta, indicativo da oxidase positiva. O teste da utilização de citrato foi realizado conforme Collins; Lyne's (2004).

Realizou-se análise de agrupamento por dendrograma, utilizando a ligação média e distância de *Mannhattan* para os dados da caracterização morfológica, e os métodos da matriz de similaridade: *Jaccard* e de agrupamento: *Ward* para os dados da caracterização bioquímica e fisiológica.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base na análise morfológica dos 35 acessos, selecionaram-se 30 isolados com características semelhantes ao gênero do acesso referência (*P. fluorescens* CMM1), os quais foram submetidos às análises bioquímicas e fisiológicas. Esses isolados foram agrupados em quatro grupos morfológicos, formados em um coeficiente de similaridade em torno de 80% para as variáveis: cor, borda, elevação, forma, superfície e caracteres ópticos (Figura 1). O grupo 1 foi o que apresentou a maior homogeneidade englobando 18 acessos, inclusive o acesso referência (CMM1). Este grupo tem como características colônias de coloração creme, forma circular, elevação convexa baixa, borda ondulada, superfície áspera e transparência, típicas do gênero *Pseudomonas*. Os acessos AR219 (Grupo 2) e AR31 e AR33 (Grupo 3), apresentaram similaridades próximas do Grupo 1. Os acessos do Grupo 4 (AR28, AR29, AR212, AR213, BR26, CR23, CR24, CR21,

CR33, DR214) revelaram heterogeneidade dos isolados avaliados Com base nas variáveis das caracterizações bioquímicas e fisiológicas, selecionaram-se 26 acessos, sendo quatro oxidase negativa, indicativo de bactérias de outras espécies, excluídos da análise de agrupamento por dendrograma. Na análise do agrupamento, observamos que todos os acessos apresentaram as mesmas características, exceto quatro acessos que formaram um grupo distinto (DR214, AR44, AP24, AR213) dos demais (Figura 2). A variável responsável por esse agrupamento foi presença de fluorescência em meio King A, podendo indicar a produção de pigmentos *phenazine* (SNEATH, 1986).

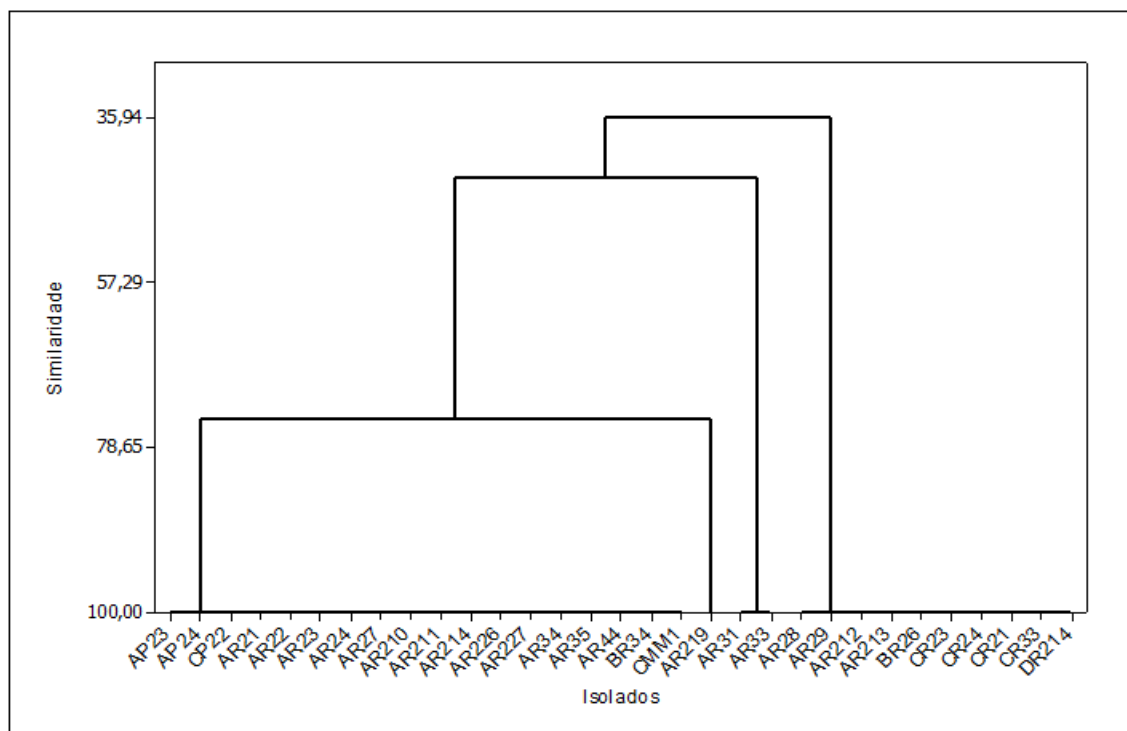


Figura 1. Dendrograma de similaridade com base em características morfológicas de 30 isolados de bactérias. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

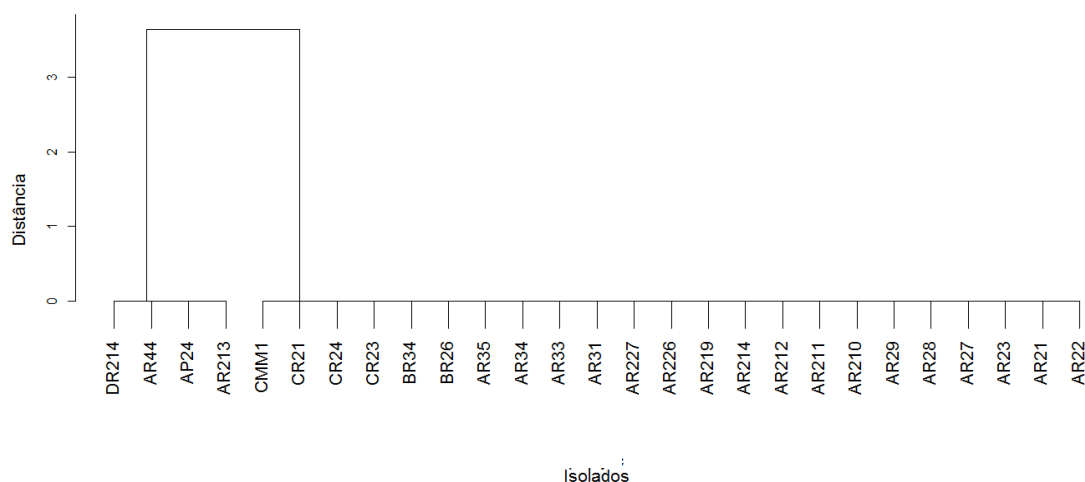


Figura 2. Dendrograma de similaridade com base em características bioquímicas e morfológicas de 26 isolados de bactérias. Embrapa Clima Temperado, Pelotas, RS, 2016.

#### 4. CONCLUSÕES

Os acessos AR21, AR22, AR23, AR27, AR34, AR35, AR210, AR211, AR214, AR226, AR227, BR34 isolados da rizosfera do azevém, apresentam características fenotípicas de *P. fluorescens* CMM1.

Há acessos associados à rizosfera do azevém (AR24, AR44 e AR213) e ao solo (DR214) com residual de clomazona, com características fenotípicas de espécies de *Pseudomonas* produtoras de pigmentos fluorescentes.

A rizosfera do azevém é colonizada por uma diversidade de isolados do gênero *Pseudomonas* com alto grau de similaridade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLLINS, C. H.; LYNE, P. M.; GRANGE, J. M.; FALKINHAM III, J. O. (Ed.). **Microbiological methods**. 8. ed. London: Arnold, 2004. 456 p.

KING, E.O.; WARD, M.K. & RANEY, D.E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clinical Med., Minneapolis, v. 44, p. 301-307, 1954.

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

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 clomazona 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.

MELO, S. I; SILVA, C. M. M. de S.; SACRAMIN, S.; SPESSOTO, A. (Ed.). **Biodegradação**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 440p.

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.