

## BACTÉRIAS DEGRADADORAS EM SOLO TRATADO COM CARBOFURAN NO ECOSISTEMA DE ARROZ IRRIGADO

Maria Laura Turino Mattos<sup>(1)</sup>, José Francisco da Silva Martins<sup>(1)</sup>, Fabiana Oliveira dos Santos<sup>(1)</sup>. 1. Embrapa Clima Temperado, Caixa Postal 403, CEP 96001-970-Pelotas-RS, Email: mattos@cpact.embrapa.br

Carbofuran (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil metil carbamato) é um inseticida usado no controle do gorgulho aquático *Oryzophagus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) na cultura do arroz irrigado. É um potente inibidor da colinesterase e, como resultado, é altamente tóxico para mamíferos, com uma DL<sub>50</sub> oral de 2 mg kg<sup>-1</sup> em ratos (Fahmy et al., 1970). O carbofuran é quimicamente hidrolisado sob condições alcalinas, mas os microrganismos têm sido implicados na sua degradação em condições ambientais neutras do solo e da água (Rajagopal et al., 1984). Uma simples aplicação da dose recomendada de carbofuran, e de outros inseticidas metil-carbamatos, é suficiente para reduzir a eficácia de tratamentos subseqüentes (Suett & Jukes, 1993). A degradação microbiana acelerada de carbofuran tem sido citada por vários autores (Harris et al., 1984; Read, 1983, citados por Parekh et al., 1994). Ramanand et al. (1988) observaram que, sob condições aeróbias, carbofuran desapareceu rapidamente em 72 h de inoculação com uma bactéria isolada de solo alagado (*Arthrobacter* sp.), com concomitante evolução de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>. Contudo, sob condições anaeróbias, não houve degradação considerável, mesmo após 144 h. É possível, que as condições aeróbias, que prevalecem na camada superficial de solos alagados suportem a multiplicação e atividade desta bactéria degradadora de carbofuran. Microrganismos do solo, adaptados, são responsáveis pela rápida degradação de pesticidas nele aplicados seguido de repetidos tratamentos com os mesmos ou compostos similares (Racke & Coats, 1990, citados por Parekh et al., 1994). O isolamento e caracterização de fungos, actinomicetos e diferentes gêneros de bactérias degradadoras de carbofuran tem sido citado por muitos autores (Ramanand et al., 1988; Head et al., 1992; Parekh et al., 1994).

O objetivo deste estudo foi avaliar para dois solos, com e sem histórico de aplicação de carbofuran, a capacidade para degradar o inseticida. Ensaio de enriquecimento do solo foi realizado para confirmar se seus microrganismos contribuem para a degradação do carbofuran. Bactérias degradadoras foram isoladas e caracterizadas por meio de testes taxonômicos e bioquímicos.

Amostras de solos (200 g) foram coletadas da rizosfera de plantas de arroz, na profundidade de 0-10 cm, de área experimental de cultivo de arroz irrigado (parcelas inundadas) tratada com carbofuran, e de área testemunha (sem aplicação do inseticida), pertencente à Estação Experimental Terras Baixas da Embrapa Clima Temperado, localizada no município de Capão do Leão, RS. O solo da área experimental é classificado como PLANOSSOLO HIDROMÓRFICO Eutrófico típico (Embrapa, 1999).

Um meio líquido básico livre de nitrogênio (MLN) foi usado para o isolamento de bactérias com a técnica do enriquecimento do solo. Este caldo mínimo continha: (g L<sup>-1</sup> em água ultrapura padrão Ω 18): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O, 5,97; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,27; NaCl, 1,0; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,5; MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,02; CaCl<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O, 0,01; FeSO<sub>4</sub>, 0,005; pH 6,8 ±0,2. O meio líquido básico foi suplementado (meio B1) com soluções de glicose (1 g L<sup>-1</sup>) e NH<sub>4</sub>Cl (1 g L<sup>-1</sup>, substituindo NaCl) como fontes de carbono e nitrogênio, respectivamente. Os caldos foram esterilizados a 121°C (pressão de 105 kPa) por 15 minutos. Carbofuran (dissolvido em etanol) e a solução de glicose foram esterilizados em filtro 0,22μ e, após, adicionados aos meios para permitir as concentrações finais indicadas.

Carbofuran (10 mg L<sup>-1</sup>) foi adicionado em todos os meios líquidos e sólidos para as bactérias degradadoras de carbofuran selecionadas no enriquecimento. Frascos erlenmeyers em duplicata (250 mL), contendo 50 mL de meio B<sub>1</sub> estéril, foram inoculados com 1g de solo de cada tratamento, ou seja, solo tratado e não tratado com carbofuran. Os frascos foram incubados em um agitador orbital, a 22° C e 150 rpm, por 20 dias. Após incubação, foi retirada alíquota de 1,0 mL dessa cultura para o plaqueamento em meio

sólido MLN suplementado com extrato de levedura ( $1 \text{ g L}^{-1}$ ) e carbofuran, utilizando o método de espalhamento. As placas foram incubadas a  $25^{\circ}\text{C}$  durante três dias. As colônias de bactérias isoladas foram purificadas e armazenadas em tubos de ensaio com MLN suplementado com carbofuran, sob refrigeração ( $+ 4^{\circ}\text{C}$ ).

A caracterização das bactérias degradadoras de carbofuran foi realizada por intermédio dos seguintes testes taxonômicos e bioquímicos: a) morfologia colonial: examinada em placas com MLN suplementado com carbofuran (MLNC) e agar nutritivo; b) reação Gram e morfologia celular foram determinadas pela observação das células coloridas em microscópio óptico; c) produção de pigmento fluorescente: examinada em placas com meio King's B; d) reação catalase, fermentação de carboidratos, utilização de citrato, aerobiose, e endósporos foram examinados como descrito por Gerhardt et al. (1981).

Um total de dez isolados, dos dois tratamentos, foram recuperados na presença de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de carbofuran. Bactérias isoladas do solo tratado com carbofuran foram denominadas de STC1, STC2, STC3, STC4, STC5, STC6, enquanto que, do solo não tratado, de SNT1, SNT2, SNT3 e SNT4.

Todos os isolados foram Gram-negativos, catalase positiva, não formadores de endosporos, bactérias que não fermentam glicose, lactose ou sacarose. As bactérias degradadoras de carbofuran foram divididas em dois grupos: A) 90% Aeróbias, Gram-negativas (STC2, STC3, STC4, STC5, STC6, SNT1, SNT2, SNT3 e SNT4 ) e B) 10% Anaeróbias Facultativas, Gram-negativas (STC1). Todos os isolados produziram pigmento fluorescente em meio King's B. Isolados do grupo A e B utilizaram citrato, com exceção do SNT4. As bactérias degradadoras de carbofuran do grupo A podem ser agrupadas na seção 4 do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Holt et al., 1994), onde estão listadas as famílias *Pseudomonaceae*, *Azotobacteraceae*, *Rhizobiaceae*, *Methylococcaceae*, *Halobacteriaceae*, *Acetobacteriaceae* e *Legionellaceae*, *Neisseriaceae*. O isolado STC1 é um membro da família Enterobacteriaceae. Resultados similares já haviam sido obtidos por vários autores. Parekh et al. (1994) também isolaram bactérias aeróbias Gram-negativas, degradadoras de carbofuran, as quais hidrolisaram o inseticida para carbofuran fenol. Head et al. (1992) isolaram uma bactéria Gram-negativa, do gênero *Flavobacterium*, obtida pelo enriquecimento de um solo onde a degradação acelerada havia ocorrido, com a capacidade para degradar carbofuran. Chaudhry et al. (1988) isolaram uma *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, bactérias Gram-negativas e catalase positivas, degradadoras de carbofuran.

O ensaio de enriquecimento do solo indicou que existem bactérias com capacidade para degradar carbofuran, em PLANOSSOLO HIDROMÓRFICO Eutrófico típico, com e sem histórico de sua aplicação. De acordo com os resultados dos testes fenotípicos, a capacidade para degradar carbofuran está presente em diferentes tipos de bactérias Gram-negativas, indicando que solos expostos ao inseticida, por um determinado tempo, podem promover a evolução de microrganismos capazes de degradá-lo rapidamente. Esses microrganismos também podem ser usados para a detoxificação de solos agricultáveis ou de outros ambientes contaminados com altas concentrações de carbofuran e pesticidas carbamatos similares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAUDHRY, G.R.; ALI, A.N. Bacterial metabolism of carbofuran. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, n.6., p.1414-1419, 1988.
- EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos (Rio de Janeiro, RJ). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. – Brasília: Embrapa Produção de Informação; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412p.
- FAHMY, M.A.; FUKUTO, T.R.; MYERS, R.O.; MARCH, R.B. The selective toxicity of N-phosphorothioylcarbamate esters. **J. Agric. Food Chem.**, v.18, p.793-796, 1970.
- GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; COSTILOW, R.N.; NESTER, E.W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N.R.; PHILLIPS, B. **Manual of methods for general bacteriology**. Washington: American Society for Microbiology, 1981. 520p.
- HEAD, I.M.; CAIN, R.B.; SUETT, D.L. Characterization of a carbofuran-degrading bacterium and investigation of the role of plasmids in catabolism of the insecticide carbofuran. **Arch. Microbiol.**, Berlin, v.158, p.302-308, 1992.
- HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; SNEATH, P.H.A.; STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994. 824p.
- PAREKH, N.R.; SUETT, D.L.; ROBERTS, S.J.; McKEOWN, t.; SHAW, E.D.; JUKES, A.A. Carbofuran-degrading bacteria from previously treated field soils. **J. Appl. Bacteriol.**, Oxford, v.76, p.559-567, 1994.
- RAJAGOPAL, B.S.; BRAHMAPRAKASH, G.P.; SETHUNATHAN, N. Degradation of carbofuran by enrichment cultures and pure cultures of bacteria from flooded soils. **Environ. Pollut**, v.36, p.61-73, 1984.
- RAMANAND, K.; SHARMILA, M.; SETHUNATHAN, N. Mineralization of carbofuran by a soil bacterium. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.54, n.8, p.2129-2133, 1988.
- SUETT, D.L.; JUKES, A.A. Accelerated degradation of soil insecticides: comparison of field performance and laboratory behaviour. In: **Fate and prediction of environmental chemicals in soils, plants and aquatic systems** ed. Mansour, M., Boca Raton, Lewis Publishers, p.31-41, 1993.

Apoio Financeiro: FAPERGS e FMC do Brasil