

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS ENDOFÍTICAS EM PLÂNTULAS DE ARROZ CULTIVADAS EM SOLUÇÃO CONTENDO O HERBICIDA SIRIUS®

Anderson Ferreira⁽¹⁾, José Alberto Noldin⁽²⁾, Fátima Teresinha Rampelotti⁽¹⁾, Marcus A. Castro-Silva⁽¹⁾, André O. S. Lima⁽¹⁾. ⁽¹⁾Centro de Ciências Tecnológicas da Terra e do Mar - Univali, C.P. 360, CEP: 88302-202, Itajaí/SC. E-mail: ferreirabiotec@hotmail.com. ⁽²⁾Epagri / Estação Experimental de Itajaí/SC.

Palavras-chave: biodegradação, pirazosulfuron, *Oryza sativa*, *Enterobacter sakazakii*.

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma das principais culturas do Brasil, abrangendo cerca de 4 milhões de hectares cultivados. A região sul brasileira compreende aproximadamente 1 milhão de hectares cultivados, sendo Santa Catarina o estado com maior produtividade e o Rio Grande do Sul o maior produtor. No entanto, a busca por melhorias na qualidade e quantidade dos grãos produzido necessita de constantes estudos, visando alcançar cultivares melhor adaptadas aos fatores bióticos e abióticos. Nesse sentido, são empregadas técnicas de biologia clássica e de biologia molecular a fim de aumentar a produtividade e solucionar os diferentes problemas da cultura. Como exemplo, o uso de microrganismos no controle de biológico de pragas têm-se destacado como uma importante estratégia para a melhoria da produtividade sem comprometimento do meio ambiente.

Os microrganismos endofíticos formam um grupo microbiano que vêm sendo estudado em culturas de interesse econômico. Esses compreendem fungos e bactérias que, em pelo menos uma fase de seu ciclo de vida, colonizam o interior de tecidos vegetais aéreos sem causar dano aparente à planta hospedeira. Neste grupo, não são incluídas as bactérias fixadoras de nitrogênio e os fungos micorrízicos, que embora sejam por definição microrganismos endofíticos, são classificados de forma diferenciada pela literatura. O conhecimento da comunidade microbiana e das interações que ocorrem no hospedeiro podem viabilizar a utilização desses microrganismos na agricultura, promovendo aumento do crescimento vegetal e, em alguns casos, resistência contra patógenos de interesse, conseqüentemente reduzindo a utilização de agroquímicos e os custos da produção (LIMA et al., 2002; ARAÚJO et al., 2002).

A fim de avaliar os efeitos do herbicida Sirius® (pirazosulfuron-etil) sobre a população de bactérias endofíticas de *Oryza sativa* L., foi conduzido o presente trabalho visando o isolamento e a caracterização destes microrganismos.

O trabalho foi realizado em duas etapas. A primeira foi desenvolvida na Estação Experimental da Epagri de Itajaí. Nesse ensaio, o arroz (cv. Epagri 108) foi cultivado em substrato inerte sobre lâmina d'água (sistema *floating*) acrescida de diferentes concentrações (0; 20 e 1000 ppb) do herbicida Sirius®. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, em condições semicontroladas, sendo a temperatura e a umidade relativa do ar médias de 26 °C e 75%, respectivamente.

A segunda etapa foi desenvolvida no Laboratório da Universidade do Vale do Itajaí (Univali) e consistiu no isolamento de bactérias endofíticas, a partir das plântulas de arroz no estágio de 3-4 folhas, dos diferentes tratamentos com herbicida. Para tanto, a superfície das plântulas foram esterilizadas (70% álcool e 2,5% hipoclorito de sódio) e lavadas com água esterilizada. Em seguida, parte das folhas foram cortadas em fragmentos (1 cm de comprimento) e estes dispostos sobre meio de cultura TSA (Ágar Triptona de Soja – 0,15% triptona; 0,05% peptona de soja; 0,15% NaCl; 1,5% ágar; pH 7,3) e MEA (Ágar Extrato de Malte 3,36%; pH 6,5). A outra parte das folhas, juntamente com o restante da parte aérea da planta foram maceradas em tampão PBS (0,8% NaCl; 0,02% KCl; 0,144% K₂PO₄; pH 7,4) e o extrato obtido foi inoculado nos meios TSA e MEA. Foram realizadas duas repetições para cada tratamento (concentração do herbicida x método de isolamento x meio de cultura), os quais foram incubados a 32 °C, por 48 horas. As diferentes colônias presentes em cada tratamento foram agrupadas por tipo morfológico para posterior contagem.

A fim de avaliar se os isolados dos diferentes tratamentos apresentavam a mesma tolerância para o herbicida Sirius®, foram selecionados cinco isolados que apresentavam a

mesma morfologia. Primeiramente, esses foram identificados por meio de testes bioquímicos e morfológicos, como descritos por SMIBERT e KRIEG (1994) e os resultados obtidos foram comparados aos descritos por MURRAY et al. (1999). Em seguida, os isolados foram repicados (quatro repetições) em meio de cultura NA (Ágar Nutriente - 0,5% peptona; 1,5% ágar; pH 6,8) acrescido de diferentes concentrações do herbicida (0, 20, 100, 1000 e 10000 ppb) e avaliados quanto ao diâmetro da colônia.

O isolamento dos microrganismos endofíticos foi eficiente, sendo possível isolar diferentes tipos morfológicos bacterianos. Porém, somente um tipo bacteriano (Tipo A) pôde ser isolado nas três concentrações do herbicida (Tabela 1). Dessa forma, diferentes isolados do tipo A foram selecionados para avaliação de sua tolerância ao herbicida Sirius®.

Tabela 1. Número de bactérias endofíticas isoladas de plântulas de arroz, cv. Epagri 108 cultivadas em água com diferentes concentrações do herbicidas Sirius®.

Técnicas	Meios de cultura	Concentração do herbicida (ppb)					
		0		20		1000	
		Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 1	Rep. 2
Maceração	TSA	A ^{1/} -96 B ^{1/} -424 D ^{1/} -4	A ^{1/} -172 B ^{1/} -300 C ^{1/} -8	A ^{1/} -68 E ^{1/} -176	Nr ^{2/}	A ^{1/} -28 C ^{1/} -212 E ^{1/} -236	C ^{1/} -320 E ^{1/} -236
	MEA	Nr ^{2/}		A ^{1/} -140 E ^{1/} -92	A ^{1/} -152 E ^{1/} -220	0 ^{3/}	
Fragmentação	TSA	F ^{1/} -1	F ^{1/} -1	0 ^{3/}		0 ^{3/}	
	MEA	F ^{1/} -1	F ^{1/} -1	Nr ^{2/}		F ^{1/} -7	F ^{1/} -7

^{1/}As bactérias foram agrupadas de acordo com a sua morfologia, como segue: A - amarela; B - branca transparente; C - levemente rosada; D - amarelo forte; E - branca opaca/pequena; F - branca opaca/grande; ^{2/} Nr - não realizado; ^{3/} 0- nenhum isolado; Os números representam a quantidade de colônias.

Os resultados dos testes bioquímicos e morfológicos realizados para caracterizar e identificar os cinco isolados selecionados, são apresentados na Tabela 2. Foi possível identificar com 100% de probabilidade que os isolados pertencem à espécie *Enterobacter sakazakii*.

Tabela 2. Resultados dos testes bioquímicos e morfológicos dos cinco isolados selecionados para realização do teste de resistência ao herbicida Sirius®.

Morfologia	Bacilo	Produção de ácido a partir de:	
Reação de Gram	-	Arabinose	+
Oxidase	-	Frutose	+
Catalase	+	Glicerol	-
Meio O ^{1/} /F ^{2/}	F ^{2/}	Lactose	+
Motilidade	+	Maltose	+
Arginina Diidrolase	+	Manitol	+
Ornitina Descarboxilase	-	Manose	+
Lisina Descarboxilase	-	Sucrose	+
Produção de H ₂ S	-	Utilização como única fonte de carbono:	
Meio TSI:		Arabinose	+
Fundo	A ^{3/}	Arginina	-
Bisel	A ^{3/}	Glicerol	-
H ₂ S	-	Glucose	+
Gás	-	Manitol	+
Indol	(-) ^{4/}	Meio MacConkey:	
Citrato de Simmons	+	Crescimento	+
		Fermentação da lactose	+

^{1/}Oxidativo; ^{2/}Fermentativo; ^{3/}Ácido; ^{4/}Uma das linhagens apresentou produção de indol.

Nos ensaios de resistência ao herbicida, realizados com os isolados de *E. sakazakii* (Figura 1) não foi observado variação significativa no crescimento dos isolados

quando avaliados individualmente. Entretanto, foi observada variação significativa no crescimento entre os isolados (Tabela 3) quando considerados em conjunto com o fator concentração do herbicida.

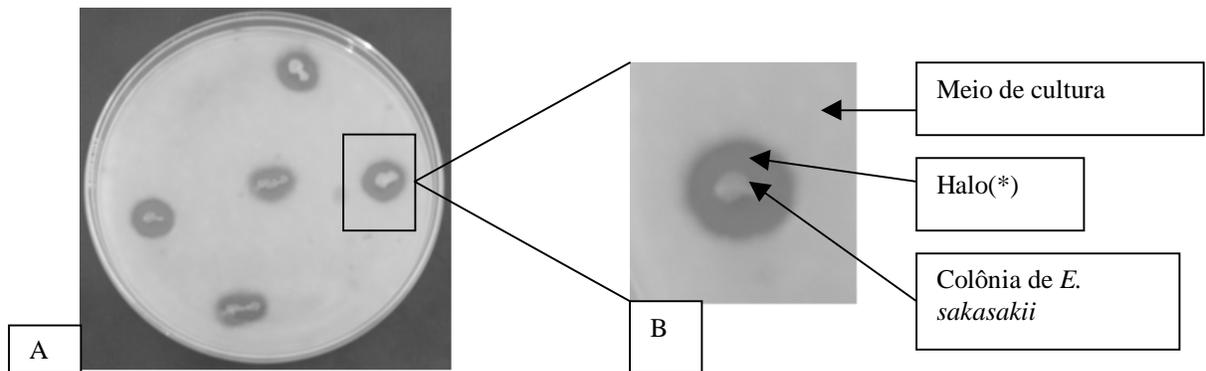


Figura 1. (A) - Isolados de *Enterobacter sakazakii* cultivados em meio de cultura NA (48 h, 32°C) acrescido do herbicida Sirius® na concentração de 10000 ppb; (B) - Detalhe de uma colônia de *E. sakazakii*; (*) Halo formado pela possível degradação do herbicida.

Tabela 3. Diâmetro médio das colônias dos isolados endofíticos de *E. sakazakii* quando cultivados em meio NA acrescido de diferentes concentrações do herbicida Sirius®.

Concentração (ppb)	Isolado 1	Isolado 2	Isolado 3	Isolado 4	Isolado 5
0	0,38125	0,325	0,48125	0,31875	0,45
20	0,3	0,3375	0,49375	0,38125	0,45625
100	0,35	0,3125	0,5	0,35	0,40625
1000	0,35	0,325	0,5125	0,35625	0,4
10000	0,3125	0,2875	0,4625	0,275	0,4125

O presente trabalho validou o emprego das técnicas de maceração e de fragmentos, modificadas a partir de ARAÚJO et al. (2002), como estratégia para o isolamento de bactérias endofíticas de arroz. Assim como já observado na maioria das culturas avaliadas quanto a presença de endofíticos, foi observada uma grande variabilidade morfológica nos isolados. Entre esses, foram identificadas bactérias da espécie *E. sakazakii* as quais ocorreram em todos tratamentos vegetais. Esse gênero bacteriano, já foi relatado como endofítico em diferentes plantas de interesse econômico, como exemplo em *Citrus* sp. (ARAÚJO, 1996). Foi verificado também que todos os isolados são insensíveis à concentração máxima empregada, indicando que essa característica pode ser intrínseca à espécie.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAÚJO, W.L. **Isolamento, identificação e caracterização genética de bactérias endofíticas de porta enxertos de citros**. 1996, 85f. Tese (Mestrado) ESALQ/USP.

ARAÚJO, W.L. de; LIMA, A.O.S.; AZEVEDO, J.L. de; MARCON, J.; KUKLINSKY-SOBRAL, J.; LACAVAL, P.T. **Manual: Isolamento de Microrganismos endofíticos**. Piracicaba: CALQ, 2002. p.86.

LIMA, A.O.S.; ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. de. **Curso de extensão: biotecnologia e biossegurança**. Piracicaba: CALQ, 2002. p.133.

MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R.H. **Manual of clinical microbiology**. Washington: ASM Press. 1999 p.1773.

SMIBERT, R.M.; KRIEG, N.R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for mineral and molecular bacteriology**. ASM Press. 1994. p.611-655.