

OBTENÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE HERBICIDAS NO SISTEMA PLANTIO DIRETO DE ARROZ IRRIGADO

Mattos, M.L.T.¹; Thomas, R.W.S.P.²; Peralba, M.C.²; Ayres, S.S.³ 1. Embrapa Clima Temperado. Cx. P. 403. CEP 96001-970, Pelotas-RS. Email: mattos@cpact.embrapa.br 2. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Cx. P. 776. CEP: 90001-970, Pelotas-RS 3. Bolsista FAPERGS.-Embrapa Clima Temperado.

Herbicidas, pós-emergentes, são utilizados, rotineiramente, no sistema de cultivo plantio direto de arroz irrigado. Clomazone [2-(2-clorofenil)metil-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona] e Quinclorac [3-7dichloroquinoline-8-carboxylicacid] são herbicidas aplicados em pós-emergência, que apresentam características toxicológicas distintas, o que pode causar diferentes impactos sobre a biodiversidade dos solos. A perda da diversidade microbiana dos solos é prejudicial para a conservação do ambiente, pois os microrganismos, além da capacidade de mineralizar compostos organoclorados, provêem um recurso genético que pode ser usado para biorremediação ou biorrecuperação de solos contaminados por pesticidas.

A melhoria do solo com a incorporação de materiais orgânicos, estimula a capacidade degradadora dos microrganismos do solo, especialmente quando eles requerem outras fontes de carbono para a degradação (Alexander, 1994). Muitas bactérias e fungos tem sido citadas como degradadoras de herbicidas (Brown, 1978). Ambos os grupos de microrganismos podem contribuir para a degradação de herbicidas no solo (Levanon, 1993). Contudo, não tem sido determinados quais os grupos de microrganismos que estão sendo estimulados nos solos com manejo conservacionista.

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de obter bactérias com capacidade para degradar os herbicidas clomazone e quinclorac, no sistema plantio direto de arroz irrigado.

As amostras de solo foram coletadas na Granja Bretanhas, situada no município de Jaguarão (RS), na profundidade de 0-10cm. Cada amostra foi composta de 10 subamostras. O solo foi classificado como Planossolo, textura franco arenosa, relevo plano e substrato granito (Brasil, 1973). A área é sistematizada e cultivada com arroz irrigado em rotação com outras culturas no sistema plantio direto. Ambas as formulações herbicidas, clomazone e quinclorac, estão sendo utilizadas nesta área. O solo apresenta as seguintes características químicas: pH, 5,6; M.O.(%), 2,20; P(mg.L⁻¹), 16,2; K(mg.L⁻¹), 114; Ca (cmole_c.L⁻¹), 3,9; Mg (cmole_c.L⁻¹), 1,9. A amostragem foi realizada durante a fase de pousio da lavoura, em setembro de 1998.

As formulações comerciais de clomazone (concentrado emulsionável - 50% p/v) e quinclorac (pó molhável - 50% p/v), utilizadas neste trabalho, foram fornecidas pela FMC do Brasil e BASF Agro, respectivamente. Todos os produtos foram esterilizados em filtro Millipore de 0,22µ.

Quando microrganismos utilizam o herbicida como fonte de carbono e de energia, não é necessário acrescentar uma fonte de carbono ao meio (Skipper *et al.*, 1986). Neste trabalho, formulações comerciais dos herbicidas clomazone e quinclorac, foram utilizadas como fonte de carbono para o crescimento microbiano. Um volume de 100 mL de caldo sais minerais (CSM) (Kaufman & Kearney, 1970) foi transferido para frascos erlenmeyers de 500 mL. Após a autoclavagem dos frascos e esfriamento à temperatura ambiente, foram adicionados os herbicidas como única fonte de carbono, nas concentrações de 200 mg/L (CSM200), e 1,0 g de solo em cada frasco. Frascos com CSM e com caldo de Thornton's (CT) (Parkinson *et al.*, 1971) foram utilizados como padrão. Os frascos foram incubados em um agitador orbital (180 rpm) a 28°C (±0,1). Após dez dias de incubação, foi transferido 1,0 mL dessas culturas para um novo caldo com o herbicida. Essas culturas foram incubadas por dez dias e o

procedimento foi repetido. Ao final dos dez dias de incubação, observou-se culturas turvas, indicando que alguns microrganismos estão degradando o herbicida.

Bactérias foram isoladas dessas culturas pelo método de espalhamento em placas com meio sais minerais (SM), meio sais minerais suplementado com 200 mg/L de clomazone (SMC) e quinclorac (SMQ) como fontes de carbono e meio de Thornton's (MT). Para cada frasco, foram feitas quatro repetições de placas, que foram incubadas por 72 horas a 30^oC.

Houve recuperação de bactérias em placas com SM, SMC, SMQ e MT. No entanto, observou-se maior diversidade de bactérias nas placas com MT, SM, SC e SQ, respectivamente. O número de bactérias, com características coloniais distintas, foi maior na presença de manitol como fonte de carbono em MT do que na presença dos herbicidas. Considerando, que clomazone e quinclorac foram seletivos para determinados grupos de bactérias, possivelmente sejam fontes de carbono de difícil assimilação pelas mesmas.

Mattos & Thomas (1996) isolaram uma *Pseudomonas fluorescens* (cepa CLZG1) de um Planossolo cultivado com arroz irrigado em sistema convencional, em Pelotas-RS, que degrada o herbicida clomazone. A degradação do clomazone por uma espécie de *Pseudomonas* isolada neste agroecossistema pode, inicialmente, indicar que outros componentes da microflora também possam degradar este herbicida.

Nestes meios, os isolados bacterianos foram selecionados de acordo com as características morfológicas da colônia. As cepas denominadas de SMC1, SMC4, SMC6, SMC7, SMC9, SMC11, SMC12, SMC13, SMQ2, SMQ3, SMQ4, SMQ5, SMQ6, SMQ7, SM1, SM2, SM3, SM4, SM5, SM6, SM7, SM8, SM9 e SM10, apresentaram distintas características e foram selecionadas para o estudo.

As colônias de bactérias isoladas, foram purificadas nos respectivos meios de isolamento. As colônias puras, após as repetidas subculturas, foram armazenadas em tubos de ensaio com SM, SMC, SMQ e MT, sob refrigeração (+4^oC), para restringir o crescimento.

Testes taxonômicos foram realizados para a caracterização dos grupos bacterianos, a fim de compor parâmetros para enquadramento no Manual Bergey's (Holt *et al.*, 1994) de classificação sistemática para bactérias: reação catalase, aerobiose, endosporos, utilização de citrato, crescimento em agar nutritivo pH 4,5.

Na Tabela 1, observam-se características de grupos taxonômicos distintos. A maioria das cepas não produziu esporos em caldo nutritivo, com exceção da SMC7 e SMQ5. Somente as cepas SM3, SM5 e SM6, isoladas em caldo mineral, apresentaram catalase negativa. Verificou-se bactérias com diferentes respostas ao oxigênio livre, aeróbias e anaeróbias. Os resultados indicam que, existem mais de um grupo de bactérias degradadoras. Testes bioquímicos complementares serão realizados para a caracterização das bactérias a nível de gênero.

Os resultados mostram que, existem bactérias degradadoras dos herbicidas clomazone e quinclorac no sistema de produção de arroz irrigado com uso frequente dos mesmos, indicando a necessidade de investigações posteriores quanto à cinética de degradação microbiana.

Tabela 1 - Características taxonômicas dos isolados bacterianos. Jaguarão, RS

ISOLADO	TESTE TAXONÔMICO*				
	Reação Catalase	Aerobiose	Endosporos	Utilização de Citrato	Crescimento em Agar Nutritivo pH 4,5
SMC1	+	+	-	+	+
SMC4	+	+	-	+	-
SMC6	+	-	-	+	+
SMC7	+	-	+	+	+
SMC9	+	+	-	-	-
SMC11	+	-	-	+	+
SMC12	+	-	-	+	+
SMC13	+	-	-	+	+
SMQ2	+	+	-	-	+
SMQ3	+	-	-	+	+
SMQ4	+	-	-	+	+
SMQ5	+	+	+	+	+
SMQ6	+	-	-	+	+
SMQ7	+	-	-	+	+
SM1	+	+	-	+	+
SM2	+	+	-	+	-
SM3	-	+	-	-	+
SM4	+	+	-	+	+
SM5	-	+	-	-	+
SM6	-	-	-	-	+
SM7	+	+	-	-	-
SM8	+	+	-	+	-
SM9	+	+	-	+	+
SM10	+	+	-	+	+

+ Positivo

- Negativo

* Resultados de três repetições

ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. Academic Press, San Diego, 1994. 302p.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Pesquisa Agropecuária. 1973. Divisão de Pesquisa Pedológica. *Levantamento de reconhecimento dos solos do Estado do Rio Grande do Sul*. Recife, 1973. 431p. (Boletim Técnico, 30).

BROWN, A. W. A. *Ecology of pesticides*. New York, J. Wiley, 1978. 525p.

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.

KAUFMAN, D. D.; KEARNEY, P. C. Microbial degradation of isopropyl N-3-chlorophenyl-carbamate and 2-chloroethyl N-3-chlorophenylcarbamate. *Appl. Microbiol.*, Washington, v.13, 443-446. 1965.

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. *Soil Biol. Biochem.*, Elmford, v. 25, 1097-1105, 1993.

- MATTOS, M. L. T.; THOMAS, R. W. S. P. **Degradation of herbicide clomazone by *Pseudomonas fluorescens***. In: 10th International Symposium on Biodeterioration and Biodegradation, Hamburg, 1996. Anais. DECHEMA, Hamburg, 1996. p. 623-628.
- PARKINSON, D. T.; GRAY, R. G.; WILLIAMS, S. T.; **Methods for studying the ecology of soil microorganisms**. Oxford, Blackwell Scientific, 1971. 465p.
- SKIPPER, H. D.; MUELLER, J. G.; WARD, V. L.; WAGNER, S. C.. Microbial degradation of herbicides. In: CAMPER, N. D. **Research methods in weed science**, Champaign, Southern Weed Science Society, 1986. 486p.