

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DO SULFENTRAZONE

MELO, C. A. D. (UFV, Viçosa/MG - christiane.melo@ufv.br); DIAZ, S. A. (UFV, Viçosa/MG - sergio.diaz89@gmail.com); PASSOS, A. B. R. J. (UFV, Viçosa/MG - anabiapassos@yahoo.com.br); MASSENSINI, A. M. (UFV, Viçosa/MG - ammassensini@gmail.com); CARVALHO, F. P. (UFV, Viçosa/MG - felipepaolinelli@yahoo.com.br); COSTA, M. D. (UFV, Viçosa/MG - mdcosta@ufv.br); SILVA, A. A. (UFV, Viçosa/MG - aasilva@ufv.br).

RESUMO: Nesta pesquisa, objetivou-se isolar e caracterizar bactérias capazes de utilizar o sulfentrazone como única fonte de carbono. Foram realizados o isolamento de bactérias potencialmente degradadoras do sulfentrazone a partir de amostras de solo com histórico de aplicação do herbicida e a identificação dos isolados com base no sequenciamento de rDNA. Posteriormente, avaliou-se a capacidade de degradação do sulfentrazone pelos isolados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram obtidos 26 isolados bacterianos, em cultura pura, potencialmente degradadores do sulfentrazone. Por meio da análise das sequências de rDNA, constatou-se a predominância de espécies de bactérias do gênero *Pseudomonas*. Os isolados apresentaram capacidade diferenciada de degradação do sulfentrazone na presença da formulação comercial ou do padrão técnico. Espécies do gênero *Pseudomonas*, além de *Burkholderia cepacia*, isoladas do solo, são tolerantes e potencialmente degradadoras do herbicida sulfentrazone. *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas lutea*, *Pseudomonas plecoglossicida*, mais três isolados de *Pseudomonas sp.* apresentaram maior capacidade de degradação do sulfentrazone na formulação comercial. A degradação do ingrediente ativo, na presença do padrão técnico, pelos seis isolados variou de 4 a 15% após dez dias de incubação. Os isolados obtidos apresentam potencial de uso em programas de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

Palavras-chave: herbicida, atividade residual, *Pseudomonas*, biodegradação

INTRODUÇÃO

A aplicação de herbicidas que apresentam elevado efeito residual no solo, a exemplo do sulfentrazone, embora seja eficiente por estender o período de controle, apresenta problemas de intoxicação de espécies suscetíveis (*carryover*), inviabilizando o cultivo nessas áreas em decorrência da presença de resíduos em níveis tóxicos. Ademais, a

elevada persistência aumenta os riscos de lixiviação e contaminação de águas subterrâneas, o que gera grande preocupação ambiental.

A principal via de degradação do sulfentrazone é a microbiana (RODRIGUES; ALMEIDA, 2011), determinante para a persistência desse herbicida no solo. Como forma de descontaminação de solos submetidos a aplicações de herbicidas, técnicas de biorremediação têm sido utilizadas. A biorremediação consiste no emprego de organismos vivos e suas enzimas na degradação de compostos tóxicos, visando à sua erradicação, redução ou transformação em substâncias menos tóxicas (LEONEL et al., 2010).

Os micro-organismos do solo, pela sua capacidade degradadora, participam ativamente e significativamente da biodegradação de muitos pesticidas utilizados na agricultura. Contudo, são escassas informações na literatura a cerca da eficiência de bactérias do solo na degradação do sulfentrazone. Assim, objetivou-se com este trabalho isolar e caracterizar bactérias capazes de utilizar o sulfentrazone como única fonte de carbono.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras compostas de solo com histórico de aplicação do herbicida sulfentrazone foram coletadas na profundidade de 0-10 cm. Quinze gramas de solo foram inoculadas em 150 mL de meio mínimo (1 L água; 3 g NaNO₃; 1 g K₂HPO₄; 0,5 g MgSO₄.7H₂O; 0,5 g KCl; 0,01 g FeSO₄.7H₂O; pH=6,8) suplementado com a formulação comercial do sulfentrazone Boral[®] (1000 µg i.a. mL⁻¹) como única fonte de carbono e energia. Os frascos foram mantidos a 30°C, 150 rpm. Após 1, 3, 7 e 15 dias de incubação realizaram-se diluições seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶, em solução salina (NaCl 0,85%). De cada diluição foram retiradas 5 alíquotas de 0,1 mL para o plaqueamento em meio de cultura mínimo sólido (acrescido de 15 g L⁻¹) de ágar suplementado com Boral[®] (1000 µg i.a. mL⁻¹). As placas de petri foram incubadas a 30°C e as colônias de bactérias repicadas para isolamento em cultura pura.

Para identificação dos isolados bacterianos foi realizada a extração de DNA, utilizando-se o kit Wizard[®] Genomic DNA Purification. O gene rDNA 16S foi amplificado pela reação em cadeia da polimerase (PCR) e o produto da reação de PCR sequenciado pela empresa Macrogen (Korea). Para análise das sequências de bases utilizou-se o programa "blastN" e o banco de dados do Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

Os isolados bacterianos obtidos e identificados foram testados quanto à capacidade de degradação do sulfentrazone na formulação comercial. Frascos com 50 mL de meio mínimo líquido, suplementado com 1000 µg i.a. mL⁻¹ de sulfentrazone, foram inoculados com 1 mL de inóculo com densidade óptica (DO)=0,6 e incubados a 30°C, 150 rpm, por 10 dias. Posteriormente, alíquotas de 2 mL foram coletadas, acondicionadas em eppendorfs e imediatamente congeladas. A concentração final do ingrediente ativo na solução foi estimada por CLAE, segundo metodologia descrita por Silva et al. (2007) e adaptada para o

sulfentrazone (fase móvel: 50:50 ACN/H₂O (v/v) + 0,1% de H₃PO₄; coluna C18 25 cm; fluxo de 1 mL min⁻¹ e comprimento de onda 214 nm). O experimento foi montado em delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 3 repetições. Após a triagem e seleção dos isolados mais eficientes, realizou-se outro ensaio seguindo as mesmas condições descritas acima utilizando o padrão técnico sulfentrazone 92% de pureza, na concentração de 0,7 µg i.a. mL⁻¹ (dose de campo). O experimento foi montado em DIC com 4 repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Tukey ou agrupadas pelo critério de Scott-Knott ($P \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidos 26 isolados bacterianos, em cultura pura, capazes de crescer na presença da formulação comercial do sulfentrazone. Foi possível identificar, em nível de espécie, 9 dos 26 isolados bacterianos (Tabela 1). Com exceção do isolado 21, identificado como *Burkholderia cepacia*, as demais bactérias pertencem ao gênero *Pseudomonas* (Tabela 1). O meio de enriquecimento utilizado para o isolamento pode ter favorecido os micro-organismos mais tolerantes ao herbicida, selecionando-os e inviabilizando o crescimento daqueles sensíveis aos possíveis ingredientes tóxicos presentes na formulação.

A família Pseudomonadaceae apresenta espécies amplamente distribuídas no solo e comumente encontradas em associação com as plantas (DESHWAL; KUMAR, 2013). Bactérias desse gênero também apresentam capacidade de biodegradar xenobióticos em ambientes aquáticos ou solos contaminados, com destaque para *P. putida* que é bastante estudada (ABUHAMED et al., 2004; OTENIO et al., 2005). A capacidade de degradação do sulfentrazone representa grande potencial de uso desses micro-organismos na biorremediação de solos agrícolas contaminados com o composto. Ademais, a associação desses com plantas fitorremediadoras pode potencializar a atividade degradadora no solo.

Na avaliação da capacidade de degradação do sulfentrazone pelos isolados, na formulação comercial, verificaram-se habilidades distintas quanto à metabolização da molécula e a redução da concentração inicial do princípio ativo em meio de cultura (Tabela 1). Os 26 isolados foram agrupados em 4 grupos, sendo a máxima degradação observada pelos isolados 4 (*Pseudomonas plecoglossicida*), 3 (*Pseudomonas lutea*), 5 (*Pseudomonas putida*), 17, 22 e 15 (*Pseudomonas sp.*), com redução média de 5% da concentração inicial (Tabela 1). Somente 8 isolados não apresentaram a capacidade de degradá-lo nas condições experimentais avaliadas (Tabela 1).

Martinez et al. (2008) isolaram bactérias com potencial de degradação do sulfentrazone identificadas como *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia picketti* e *Methylobacterium radiotolerans*, contudo, a capacidade de degradação dessas bactérias não foi investigada.

Tabela 1. Isolados bacterianos identificados pelo sequenciamento do gene rDNA 16S e concentração final do sulfentrazone em meio mínimo líquido após o cultivo de isolados bacterianos, na presença do produto comercial Boral® (1000 µg i.a. mL⁻¹), por 10 dias de incubação a 30°C e 150 rpm.

Isolado	Espécie	Concentração sulfentrazone (µg mL ⁻¹)	
4	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	941,6798 (-5,83%)	d ¹
17	<i>Pseudomonas sp.</i>	943,9897 (-5,61%)	d
3	<i>Pseudomonas lutea</i>	952,2564 (-4,78%)	d
5	<i>Pseudomonas putida</i>	953,2818 (-4,68%)	d
22	<i>Pseudomonas sp.</i>	954,4537 (-4,56%)	d
15	<i>Pseudomonas sp.</i>	955,2790 (-4,47%)	d
8	<i>Pseudomonas lutea</i>	957,5155 (-4,25%)	c
7	<i>Pseudomonas putida</i>	960,3685 (-3,97%)	c
14	<i>Pseudomonas sp.</i>	960,7043 (-3,93%)	c
24	<i>Pseudomonas sp.</i>	961,6727 (-3,83%)	c
11	<i>Pseudomonas sp.</i>	965,4236 (-3,46%)	c
6	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	965,7633 (-3,42%)	c
1	<i>Pseudomonas sp.</i>	968,0413 (-3,20%)	c
23	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	973,5768 (-2,64%)	b
10	<i>Pseudomonas sp.</i>	974,3055 (-2,57%)	b
25	<i>Pseudomonas sp.</i>	975,0884 (-2,49%)	b
9	<i>Pseudomonas sp.</i>	975,5928 (-2,44%)	b
20	<i>Pseudomonas sp.</i>	979,4486 (-2,06%)	b
19	<i>Pseudomonas sp.</i>	985,0841 (-1,49%)	a
26	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	993,7920 (-0,63%)	a
2	<i>Pseudomonas sp.</i>	994,6529 (-0,53%)	a
13	<i>Pseudomonas sp.</i>	996,9870 (-0,30%)	a
18	<i>Pseudomonas sp.</i>	998,0056 (-0,20%)	a
16	<i>Pseudomonas sp.</i>	999,2301 (-0,08%)	a
12	<i>Pseudomonas sp.</i>	999,7382 (-0,03%)	a
21	<i>Burkholderia cepacia</i>	999,8726 (-0,01%)	a
Testemunha	Sem inoculação	1000,0000	a
CV		0,88%	

¹Médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo critério de agrupamento Scott-Knott (P≤0,05). Valores entre parêntesis referem-se ao percentual de redução em relação à testemunha.

Na presença do padrão técnico verificou-se redução de até 15% do ingrediente ativo pelo isolado 22 (*Pseudomonas sp.*), sendo as menores reduções observadas para *P. putida* e *P. lutea* (Tabela 2). A degradação de herbicidas pode ocorrer pelo metabolismo normal ou através do cometabolismo, que requer outra fonte de carbono e energia para suportar o crescimento microbiano. Assim, o potencial de degradação do herbicida no solo poderá ser maior pela indução do cometabolismo em virtude da existência de fontes de carbono prontamente oxidáveis nesse ambiente.

Tabela 2. Concentração final do sulfentrazone em meio mínimo suplementado com o padrão técnico (0,7 µg i.a. mL⁻¹), após o cultivo de isolados bacterianos por 10 dias.

Isolado	Espécie	Concentração sulfentrazone (µg mL ⁻¹)	
3	<i>Pseudomonas lutea</i>	0,6666(-4,77%)	ab ¹
5	<i>Pseudomonas putida</i>	0,6512(-6,97%)	abc
17	<i>Pseudomonas sp</i>	0,6357(-9,20%)	bcd
15	<i>Pseudomonas sp</i>	0,6139(-12,3%)	bcd
4	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i>	0,5983(-14,5%)	cd
22	<i>Pseudomonas sp</i>	0,5948(-15,0%)	d
Testemunha	Sem inoculação	0,7000	a
CV		3,60%	

¹Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem entre si pelo Teste de Tukey (P≤0,05). Valores entre parêntesis referem-se ao percentual de redução em relação à testemunha.

CONCLUSÕES

Os isolados bacterianos oriundos de solo com histórico de aplicação do sulfentrazone variaram quanto à capacidade de degradar o ingrediente ativo na formulação comercial ou no padrão técnico. Constatou-se que o gênero *Pseudomonas* foi predominante entre os isolados obtidos e que existe potencial desses isolados serem utilizados em programas de biorremediação de solos contaminados com o sulfentrazone.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e a FAPEMIG pela bolsa e apoio concedido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUHAMED T. et al. Kinetics model for growth of *Pseudomonas putida* F1 during benzene, toluene and phenol biodegradation. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 983–988. 2004.
- DESHWAL, V. K.; KUMAR, P. Plant growth promoting activity of *Pseudomonads* in Rice crop. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 2, n.11, p. 152-157, 2013.
- LEONEL, L. V. et al. Biorremediação do solo. **Terra e Cultura**, n. 51, ano 26, Julho a Dezembro de 2010.
- MARTINEZ, C. O. et al. Caracterização de bactérias e fungos envolvidos na degradação de sulfentrazona em solos. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento-Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, SP, n.51, dezembro, 2008.
- OTENIO, M. H. et al. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Braz. J. Microbiol.**, v. 36, p. 258-261, 2005.
- RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas. 6.ed. Londrina, PR, 2011. 697p.
- SILVA, T. M. et al. Degradation of 2,4-d herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, p.522-525. 2007.