TOLERÂNCIA AO HERBICIDA DICAMBA POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE ÁGUA E BIOFILME

Paloma Nathane Nunes de Freitas (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Marcos Pileggi (Orientador), e-mail: pileggimarcos@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética (DEBIOGEM)

Grande Área: Ciências Biológicas
Área do Conhecimento: Microbiologia
Subárea: Microbiologia Aplicada - 21202001

Palavras-chave: Biorremediação, Sistemas de respostas, Linhagens bacterianas.

Resumo

Dicamba é um agente de ação foliar, indicado para culturas de milho, sorgo, pastagens e gramados. Apesar do uso de agroquímicos ter um impacto positivo sobre a produtividade, há preocupações sobre os efeitos adversos. O objetivo deste trabalho foi investigar se linhagens de biofilme e de ambiente aquático apresentam um sistema de respostas para tolerar altas doses do herbicida Dicamba e que possam ser utilizadas em programas de biorremediação. Foram utilizados 25 isolados bacterianos que foram incubados em microplacas de 96 poços nos meios Caldo Luria e Meio Mineral, com e sem glucose, e com as doses de 1x, 10x e 40x a concentração do herbicida Dicamba utilizado na agricultura. Os resultados mostraram que os isolados de biofilme apresentaram maiores níveis de tolerância ao herbicida do que os isolados de ambiente aquático. A organização em biofilmes possivelmente aumenta a capacidade de adaptação ao ambiente tóxico por meio de um sistema de respostas não específicas, uma vez que o Dicamba não foi um dos contaminantes da água utilizada para isolamento de bactérias. Destas, as mais tolerantes estão sendo identificadas por sequenciamento do gene ribossomal 16S.

Introdução

Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento, a estimativa para produção de grãos no Brasil na safra 2016/2017 será de aproximadamente 222,91 milhões de toneladas, associado com um aumento na utilização de herbicidas (CONAB, 2017).

Apesar do uso de defensivos agrícolas ter um impacto positivo sobre a produtividade, há preocupações sobre as reações adversas destes agroquímicos. A quantidade de resíduos que permanecem no ambiente pode alterar a estrutura de microbiotas de solo e de água, os quais precisam lidar com diferentes componentes tóxicos (PILEGGI et al., 2012; OLCHANHESKI et al., 2014). O Dicamba é um agente de ação foliar, utilizado em culturas de milho, sorgo, pastagens e gramados (AMBROSE, 2013), sendo ainda considerado um herbicida experimental, cuja atuação sobre microbiotas de solo e água deve ser estudada.

Neste contexto, a biorremediação é uma das alternativas para a descontaminação ambiental de xenobióticos, os quais podem ser transformados em

moléculas menos nocivas por meio da atividade metabólica de microrganismos (NITI et al., 2013; VIANA, 2009).

Em termos ambientais, biofilmes são definidos como comunidades de microrganismos que estão incorporados em uma matriz autoproduzida de substâncias poliméricas extracelulares (SPE), podendo estar aderidas entre si e/ou à uma superfície (NADELL et al., 2016; FLEMMING et al., 2016). Essa formação representa uma forma de adaptação a diferentes condições ambientais (VIANA, 2009).

O objetivo deste trabalho foi investigar se linhagens de biofilme e de ambiente aquático, sem prévia seleção pelo herbicida Dicamba, apresentam estratégias adaptativas para tolerar altas doses deste xenobiótico.

Materiais e Métodos

Teste de Tolerância em Microplacas

Foram avaliados 25 isolados bacterianos, sendo 4 de ambiente aquático e 21 de biofilme, obtidos na Fazenda Escola Capão da Onça da Universidade Estadual de Ponta Grossa - PR. Os isolados foram obtidos em tanques de armazenamento de água utilizada na lavagem de embalagens de herbicidas, fungicidas, inseticidas, adjuvantes e reguladores de crescimento. Os isolados foram incubados em microplacas de 96 poços nos seguintes meios: Caldo Luria (LB: 10 g/L triptona; 5 g/L NaCl; 5 g/L extrato de levedura) e Meio Mineral (MM: 3 g/L $NaNO_3$; 0,5 g/L $MgSO_4$; 0,5 g/L KCl; 0,01 g/L $FeSO_4$; 0,04 g/L $CaCl_2$; 0,001 g/L $MnSO_4$; 27,2 g/L KH_2PO_4 e 45,6 g/L K_2HPO_4), com e sem a adição de 20 g/L de glucose, e com as doses de 1x (concentração correspondente a dose de campo), 10x e 40x do herbicida Dicamba. As placas foram incubadas à 30 °C, durante 48h. A densidade óptica foi avaliada através de leitor de microplacas a 600 nm.

Identificação molecular por sequenciamento do gene ribossomal 16S

Os isolados foram cultivados em placas contendo Ágar Luria (LA: LB com adição de 15 g/L ágar bacteriológico). Após incubação por 48h a 30 ºC, colônias isoladas foram coletadas para identificação molecular. Foram utilizados os *primers* 8F (5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3') e 1492R (5' - GGTTACCTTGTTACGACTT - 3') para se fazer a amplificação do gene ribossomal 16S. Após purificação dos produtos de PCR e análise de integridade de bandas por meio de eletroforese, o material obtido foi enviado para sequenciamento na Ludwig Biotec (Alvorada, Brasil). As sequências serão analisadas usando-se os recursos do sítio "*Ribosomal Database Projec*t".

Resultados e Discussão

As análises mostraram que em LB (meio rico em nutrientes) e MM (meio de composição definida) os 21 isolados de biofilme apresentaram, de uma maneira geral, maiores níveis de tolerância ao herbicida Dicamba do que os 4 isolados planctônicos. A organização em biofilmes possivelmente aumenta a capacidade de adaptação ao ambiente tóxico por meio de um sistema de respostas não específicas, uma vez que o Dicamba não foi um dos contaminantes da água

utilizada para isolamento de bactérias. Conforme Nadell et al (2016) e Flemming et al (2016) a formação da substância polimérica extracelular é um processo dinâmico e depende da disponibilidade de nutrientes, das condições locais e do estresse ambiental, como resposta a contaminantes. Os isolados mais tolerantes estão sendo identificados por sequenciamento do gene ribossomal 16S.

Conclusões

Os dados obtidos neste projeto indicam que a estrutura e organização de comunidades bacterianas em biofilmes aumentam os níveis de tolerância ao herbicida Dicamba, mesmo sem prévia pressão seletiva por este xenobiótico.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária pela bolsa concedida.

Referências

AMBROSE, S. **The evaluation of 2,4-D ester and dicamba on winter canola in Oklahoma**. 2011, 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciência) – Oklahoma State University, Oklahoma, 2013.

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira grãos**. v. 4, Safra 2016/2017 – Sexto levantamento, n. 6, p. 1-176, mar. 2017.

FLEMMING, H. et al. Biofilms: an emergent form of bacterial life. **Nature Reviews**, v. 14, p. 563-575, set. 2016. Doi: 10.1038/nrmicro.2016.94.

NADELL, C. D.; DRESCHER, K.; FOSTER, K. R. Spatial structure, cooperation and competition in biofilms. **Nature Reviews**, v. 14, p. 589-600, set. 2016. Doi: 10.1038/nrmicro2016.84.

NITI, C. et al. Bioremediation: an emerging technology for remediation of pesticides. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 17, n. 4, p. 88-105, abr. 2013.

OLCHANHESKI, L. R. et al. Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by Escherichia coli strain DH5-α. **Plos One**, v. 9, p. 1-8, jun. 2014.

PILEGGI, M. et al. Isolation of mesotrione-degrading bacteria from aquatic environments in Brazil. **Chemosphere**, v. 86, n. 11, p. 1127-1132, jan. 2012.

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009, 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.