

DINÂMICA DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ENDÓSPOROS, EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE ECOSISTEMAS ORIZÍCOLAS, AO LONGO DO CICLO DA CULTURA

Michele Pittol¹; Talita de Moura Lutz²; Vera Regina Mussoi Macedo³, Victor Hugo Valiati⁴, Lidia Mariana Fiuza⁵

Palavras-chave: ambientes aquáticos, micro-organismos, esporos,

INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul (RS), responde por aproximadamente 63% da produção nacional de arroz (IRGA, 2011). Nesse contexto, destaca-se a importância econômica e social da orizicultura. Sendo os ecossistemas aquáticos naturais, em grande maioria, fonte de água para a produção deste cereal justificam-se estudos que promovam a caracterização da comunidade microbiana em amostras de águas de irrigação e drenagem de lavouras orizícolas.

Na orizicultura, durante o ciclo de desenvolvimento, as plantas passam basicamente por três fases: vegetativa, reprodutiva e maturação (BAMBARADENIYA e AMERASINGHE, 2003), sendo o período de entressafra correspondente a pós-colheita. Assim, os estágios fenológicos da planta somado às variáveis ambientais são relevantes para contextualizar o universo dinâmico presente nos micro-habitats das lavouras (BAMBARADENIYA e AMERASINGHE, 2003). Sendo que condições de temperatura, luminosidade, pH e nutrientes influenciam as variações bióticas determinando o tipo de micro-organismo presente e a habilidade destas populações em superar alterações ambientais (RIKHVANOV et al., 1999; FISCHER et al., 2000; BERNHARD et al., 2005). No sistema orizícola, as bactérias produtoras de endósporos destacam-se em frequência e diversidade, pois, os endósporos bacterianos apresentam-se dormentes e resistentes às variações ambientais inerentes a lavoura. Portanto, entender como a rede alimentar microbiana trabalha, requer considerações sobre a dinâmica sazonal dessas comunidades (COMTE et al., 2006; ZILLI et al., 2003).

Desta forma, este estudo objetivou verificar a abundância de bactérias produtoras de endósporos em águas de irrigação (entrada) e drenagem (saída) das lavouras, ao longo do ciclo da cultura do arroz irrigado, em duas regiões orizícolas do RS.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de água foram coletadas no período de outubro a setembro, do ciclo agrícola 2007/08, em duas regiões produtoras de arroz irrigado do RS. Na região da Planície Costeira Externa na Estação Experimental do Arroz do Instituto Rio Grandense do Arroz (EEA/IRGA), município de Cachoeirinha, RS, as amostras de água foram coletadas no canal de entrada (CE), 29°56'59,9"S 51°07'23"W, proveniente do rio Gravataí, e no canal de saída (CS), a 29°57'14,2"S 51°06'53,2"W. Na região da Planície Costeira Interna, no município de Camaquã, RS, os pontos de coleta foram: na estação de bombeamento do Rio Camaquã (R) e no Dreno 2. Na EEA, em Cachoeirinha, cada amostra de água,

¹ Mestre em Biologia, PPG em Biologia - Unisinos, Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS, e-mail: mipittol@ibest.com.br

² Estudante de Biologia, Unisinos, e-mail: talitinha.lutz@hotmail.com

³ Mestre em Agronomia, Instituto Rio Grandense do Arroz - IRGA, Cachoeirinha, RS, e-mail: vera-macedo@irga.rs.gov.br

⁴ Doutor em Genética e Biologia Molecular, PPG em Biologia - Unisinos - Av. Unisinos, 950, São Leopoldo, RS, e-mail: valiati@unisinos.br

⁵ Doutora em Agronomia, PPG em Biologia - Unisinos - Av. Unisinos, 950, São Leopoldo e Instituto Rio Grandense do Arroz - IRGA, Cachoeirinha, RS, e-mail: fiuza@unisinos.br

correspondente a 100 mL, foi coletada da lâmina superficial, até 40 cm de profundidade. Na região de Camaquã, as amostras foram coletadas com profundidade superior aos 40 cm. Posteriormente a coleta, as amostras foram catalogadas e conservadas a 4°C, até serem enviadas ao Laboratório de Microbiologia e Toxicologia da UNISINOS, onde foram filtradas em membranas de nitrocelulose estétil, de 0,22 µm de porosidade, e conservadas a -20°C. Aliquotas de 0,2 mL do material eluído dos filtros foram semeadas em Ágar Nutriente e Ágar Soja Triptona, sendo incubadas a 30°C de 18-24 horas (MORAES et al., 1999). As colônias isoladas foram submetidas ao processo de pasteurização e posteriormente inoculadas em Meio Usual Glicosado (MUG), com a adição de Penicilina-G (0,6 mg/L - SIGMA®) ou Estreptomicina (0,15 mg/L - SIGMA®), sendo em seguida cultivadas a 30°C, 180 rpm, durante 72 horas.

Os isolados bacterianos que tiveram crescimento positivo nos meios seletivos foram analisados em microscopia de contraste de fase (1000x) para a diferenciação de algumas espécies. Para a caracterização molecular bacteriana, o material genético das colônias de bactérias cultivadas foi extraído, de acordo com o método adaptado de extração salina, e após foi realizada a amplificação do gene ribossomal 16S, através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). As amostras amplificadas foram purificadas e enviadas a *Advancing Through Genomics* (MACROGEN), para sequenciamento automático. As sequências parciais do gene ribossomal 16S foram comparadas com um banco de sequências de DNA bacteriano disponíveis na base de dados *GenBank* utilizando a ferramenta BLAST do NCBI. As múltiplas sequências foram alinhadas utilizando o programa Clustal X e editadas manualmente no Bioedit. O método geométrico *Neighbor Joining* foi utilizado na recuperação da filogenia, com o auxílio do programa MEGA 3.1 (KUMAR et al., 2005). O grau de confiabilidade da árvore filogenética obtida foi testado através da reamostragem por *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). As análises de ANOVA com médias comparadas por *Tukey* a 5% e teste t foram aplicados para testar a diferenciação dos grupos bacterianos entre as fases da cultura e diferentes fontes de água, utilizando o programa Systat 12 (2007) (ZAR, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificados os seguintes táxons de bactérias produtoras de endósporos: *Bacillus* spp., *Brevibacillus brevis*, *Lysinibacillus sphaericus*, *Paenibacillus barcinonensis* e *Sporosarcina* sp.

Na região da Planície Costeira Externa na EEA/IRGA, os resultados demonstraram que a abundância de bactérias produtoras de endósporos diferiu significativamente entre as fases da cultura ($F= 6,590$, $gl=3,8$, $p<0,05$) nas águas que entram na lavoura, provenientes do rio Gravataí (Figura 1). Porém, nas águas de saída da lavoura não houve diferença significativa, da abundância de bactérias produtoras de endósporos, entre as fases fenológicas da cultura. Por outro lado, destaca-se que a abundância de *Bacillus* spp. não diferiu entre as fases da cultura ($p>0,05$), nem entre as águas de entrada e saída ($p>0,05$).

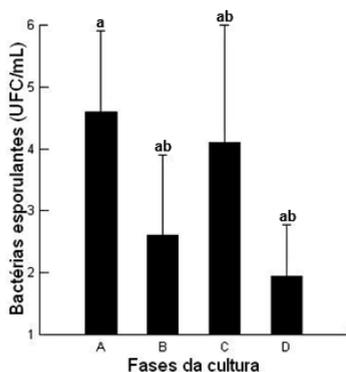


Figura 1. Abundância de bactérias esporulantes, em amostras de água de entrada, ao longo do ciclo 2007/08 da cultura do arroz irrigado, na EEA, município de Cachoeirinha, RS. Fases fenológicas: A (vegetativa), B (reprodutiva), C (maturação) e D (entressafra).

Ao longo do ciclo da cultura alternam-se períodos secos e chuvosos, modificando a concentração de nutrientes na água. O que pode causar a variação da abundância de bactérias produtoras de endósporos nas águas de entrada da lavoura.

Como referido anteriormente, nas águas de saída da lavoura esta diferença não foi significativa indicando que o manejo da cultura de arroz irrigado não promoveu alterações relevantes na abundância destes organismos. Salienta-se que este grupo microbiano possui a capacidade de sobreviver em diversos ambientes permanecendo em latência quando as condições ambientais tornam-se adversas (RIKHVANOV et al., 1999).

Diferentemente da EEA/IRGA os resultados na região da Planície Costeira Interna, em Camaquã, demonstraram que a abundância de bactérias produtoras de endósporos diferiu significativamente entre as águas de entrada e saída da lavoura ($t = 2.289$, $gl = 20.963$, $p < 0,05$) (Figura 2) e que os grupos bacterianos apresentaram-se homogêneos entre as fases da cultura, tanto nas águas de entrada quanto nas águas de saída ($p > 0,05$).

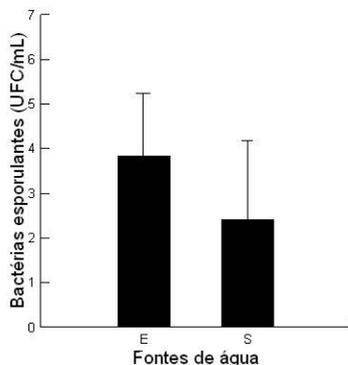


Figura 2. Abundância de bactérias esporulantes, em amostras de água de entrada (E) e saída (S), ao longo do ciclo 2007/08 da cultura do arroz irrigado, na AUD, município de Camaquã, RS.

A diferença de frequência dos grupos microbianos entre as águas de entrada e saída verificada em Camaquã, com predomínio das bactérias esporulantes nas águas de entrada pode estar associada ao aporte de nutrientes oriundos dos ecossistemas aquáticos, que possuem altos teores de matéria orgânica. Esses resultados também foram mencionados em outros trabalhos, que atribuem às variações da diversidade microbiana ao regime hídrico, ao clima da região, ao manejo do solo e aos resíduos aportados nos agroecossistemas (TORSVIK e OVREAS, 2002).

CONCLUSÃO

Nesse estudo, pode-se verificar que na água proveniente do rio Gravataí, região da Planície Costeira Externa, houve a variação na abundância de espécies bacterianas produtoras de endósporos ao longo do ciclo da cultura orizícola. No entanto, diferenças deste grupo bacteriano em relação as águas de entrada e saída só foram significativas na região da Planície Costeira Interna, Camaquã. Os táxons identificados neste estudo representam a comunidade bacteriana integrante do ecossistema orizícola, sendo sua abundância regulada pelas condições ambientais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAMBARADENIYA, C.N.B.; AMERASINGHE, F.P. **Biodiversity associated with the rice field agroecosystem in Asian countries: A brief review**. Colombo, Sri Lanka: International Water Management Institute, 2003. 24p.
- BERNHARD, A.E. et al. Microbial community dynamics based on 16S rRNA gene profiles in a Pacific Northwest estuary and its tributaries. **Microbial Ecology**, v. 52, p. 115-128, 2005.
- IRGA. Instituto Rio Grandense do Arroz. Setor Produtivo abre o Plantio do Arroz safra 2010/11. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br/index.php?principal=1&secao=1&id=2456>>. Acesso em: 2 maio 2011.
- COMTE, J. et al. Microbial community structure and dynamics in the largest natural french lake (Lake Bourget). **Microbial Ecology**, v. 52, p. 72-89, 2006.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the *bootstrap*. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FISCHER, M.M. et al. Effects of resources and trophic interactions on freshwater bacterioplankton diversity. **Microbial Ecology**, v.40, p.125-138, 2000.
- KUMAR, S.; TAMURA, K.; NEI, M. MEGA 3.1: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. **Briefings in Bioinformatics**, v. 5, p. 150-163, 2005.
- MORAES, J.C.; FONTOURA, M.M.C.; BENVENÚ, S.A. **Microbiologia: atividades práticas**. Passo Fundo: Pe. Beltier, 1999. 208p.
- RIKHVANOV, E.G. et al. Association of bacteria and yeasts in Hot Springs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4292-4293, 1999.
- TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- ZAR, J.H. 1999. **Bioestatistical Analysis**. 3.ed. Prentice-Hall International, New Jersey, USA. 1999. 879p.
- ZILLI, J.E. et al. Diversidade microbiana como indicador da qualidade do solo. **Caderno de Ciência e Tecnologia**, v. 20, p. 391-411, 2003