

# RELAÇÃO DE PARÂMETROS ABIÓTICOS E A ABUNDÂNCIA DE *Bacillus* spp., EM ÁGUAS DE LAVOURAS ORIZÍCOLAS DO RIO GRANDE DO SUL

Michele Pittol<sup>1</sup>, Talita de Moura Lutz<sup>2</sup>, Vera Regina Mussoi Macedo<sup>3</sup>, Victor Hugo Valiati<sup>4</sup>, Lidia Mariana Fiuza<sup>5</sup>

Palavras-chave: macronutrientes, arroz irrigado, micro-organismos,

## INTRODUÇÃO

Comunidades bacterianas ocupam ambientes variados, tais como: solo, água, ar, plantas e animais (ANDREOTE et al., 2009). Nos micro-habitats da lavoura, a ocorrência de diferentes espécies microbianas pode variar em função da disponibilidade de recursos. Nesse contexto, a ocorrência de grupos microbianos, pode ser favorecida ou inibida de acordo com a disponibilidade de substrato e fonte de alimento, que irá diferir de acordo com as práticas de manejo e de componentes abióticos, os quais podem ser potencializados com os agroquímicos utilizados na lavoura e o descarte de águas residuais, ricas em nutrientes (CASTRO e PRADO, 1993).

No caso de ecossistemas impactados por agroquímicos, as bactérias produtoras de endósporos tendem a proliferação, pois estes organismos transformam diversas substâncias em fontes de carbono para a produção de energia. Nesse sentido, a água doce utilizada na irrigação de lavouras orizícolas, pode ser um ambiente favorável para estudos que objetivam acrescentar informações referentes aos fatores que direcionam a estrutura das comunidades microbianas.

Como representantes das bactérias produtoras de endósporos estão às espécies *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* e *B. weihenstephanensis*, as quais constituem um cluster homogêneo dentro do gênero *Bacillus*, denominado de grupo *Bacillus cereus* (MINNAARD et al., 2007).

Sendo assim, este estudo teve como objetivo estimar a abundância de bactérias produtoras de endósporos, presentes em águas de irrigação e drenagem das lavouras, em duas regiões orizícolas do RS, e sua relação com os nutrientes: nitrogênio, fósforo e potássio.

## 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, correspondente a 100 mL, foi coletada da lâmina superficial, até 40 cm de profundidade. Na

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

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

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

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

<sup>5</sup> 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

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 estéril, 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). Os nutrientes analisados foram: nitrogênio, fósforo e potássio, conforme Tedesco et al. (1995). Estes parâmetros foram fornecidos pela equipe de agronomia da EEA/IRGA. A análise de regressão linear foi efetuada para avaliar a influência dos parâmetros físico-químicos na abundância dos táxons bacterianos nas águas de irrigação e drenagem, utilizando o programa Systat 12 (2007). Para comparações, os táxons bacterianos identificados foram subdivididos em 3 grupos: bactérias esporulantes, grupo *Bacillus cereus* e *Bacillus* spp.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo foram identificadas as seguintes espécies do gênero *Bacillus*: *B. cereus*, *B. koreensis*, *B. licheniformis*, *B. marisflavi*, *B. megaterium*, *B. mycoides*, *B. pumilus* e *B. thuringiensis*.

Em Cachoeirinha, na análise de regressão simples, utilizando as médias dos parâmetros abióticos e a abundância das espécies de *Bacillus*, foi verificada a relação significativa com a variável fósforo ( $Y = 1,807 + 0,863X$ ,  $R^2 = 0,400$ ,  $F_{1,10} = 6,654$ ,  $p = 0,027$ ), conforme ilustra a Figura 1. Desse modo, 40% da variação na abundância de *Bacillus* spp. foi influenciada pelo fósforo na água proveniente do rio Gravataí, na EEA/IRGA, durante o período desse estudo (2007/08). Na água de saída, não foi verificada influência estatisticamente significativa do teor de nutrientes em relação aos grupos microbianos.

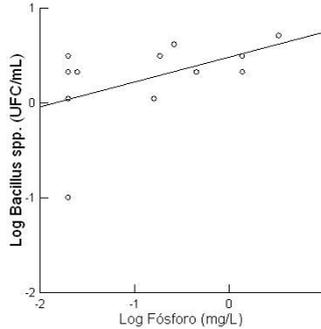


Figura 1. Relação linear entre a abundância de *Bacillus* spp. e a variável fósforo, em amostras de água do rio Gravataí, município de Cachoeirinha, RS, ciclo agrícola 2007/08.

No estudo realizado por Azambuja (2006), em solos de cultivo da Estação Experimental do Arroz foi observado que a presença dos compostos fósforo, alumínio ácido e cálcio favoreceram a abundância de *B. thuringiensis*. Sendo que o rio Gravataí, em condições normais de precipitação pode contribuir para as necessidades nutritivas das plantas com, aproximadamente, 50% da quantidade de nitrogênio, 25% de fósforo e 100% de potássio (ANGHINONI et al., 2005).

No rio Camaquã, a abundância das espécies representantes do grupo *Bacillus cereus* esteve relacionada com a variável nitrogênio ( $Y = 0.979 + 1.750X$ ,  $R^2 = 0.338$ ,  $F_{1,10} = 5.105$ ,  $p = 0.047$ ) (Figura 2). Desse modo, 33,8% da variação na abundância das espécies representantes do grupo *Bacillus cereus* foi influenciada pelo nitrogênio, nas águas de entrada.

Em relação à abundância de bactérias produtoras de endósporos, a variável potássio apresentou relação significativa ( $Y = 6.243 - 0.696X$ ,  $R^2 = 0.420$ ,  $F_{1,10} = 7.243$ ,  $p = 0.023$ ). Logo, 42% da variação na abundância de bactérias produtoras de endósporos foi influenciada pelo potássio, nas amostras de água de irrigação durante o ciclo da cultura (2007/08). Na água de drenagem não foi verificado influência estatisticamente significativa do teor de nutrientes em relação aos grupos microbianos.

Estudos em mesocosmos, têm demonstrado que a matéria orgânica dissolvida irá influenciar diferentes populações bacterianas, alterando a composição destas comunidades (VAN HANNEN et al., 1999; CRUMP et al., 2003).

A predominância de *Bacillus* sp. foi relatada em amostras de água doce utilizadas para a irrigação da cultura e nas parcelas de cultivo, em 5 regiões orizícolas do RS (RECHE e FIUZA, 2005). Na pesquisa realizada por Fritz et al. (2010), em solos sob diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado, em Cachoeirinha, foi observado que a abundância de *Bacillus* spp. é favorecida nos períodos em que a lavoura está com lâmina de água na superfície do solo em relação a períodos de solo seco. O que salienta a importância do subsídio orgânico, presente na água que irriga a lavoura, para a proliferação de comunidades de *Bacillus* e outros grupos bacterianos.

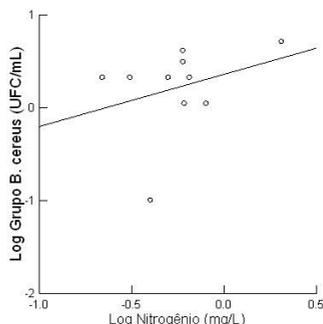


Figura 2. Relação linear entre a abundância de representantes do grupo *Bacillus cereus* e a variável nitrogênio em amostras de água do rio Camaquã, município de Camaquã, RS, ciclo agrícola 2007/08.

## CONCLUSÃO

De acordo com as análises de regressão, os elementos químicos fósforo, nitrogênio e potássio influenciaram a ocorrência de bactérias esporulantes nas águas de irrigação, em ambas as regiões orizícolas estudadas. Não sendo observada influência significativa, destes parâmetros, na abundância dos grupos bacterianos em amostras de drenagem das lavouras.

Nesse estudo, a associação de bactérias produtoras de endósporos com os nutrientes indica o favorecimento do aporte orgânico, proveniente de águas que atravessam regiões urbanizadas, para a proliferação e manutenção dos grupos bacterianos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTE, F. D.; AZEVEDO, J.L.; ARAÚJO, W. L. Assessing the diversity of bacterial communities associated with plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 417-432, 2009.
- ANGHINONI, I. et al. **Novas recomendações de adubação e de calagem para o arroz irrigado**. Boletim Técnico II. Cachoeirinha: IRGA/ Divisão de pesquisa, 2005. 32 p.
- AZAMBUJA, A.O.DE. **Ecologia de *Bacillus* spp. em solos orizícolas e o impacto dos tratamentos fitossanitários**. 2006. 66f. Dissertação (Mestrado em Biologia) Programa de Pós-Graduação em Biologia. Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, RS, 2006.
- CASTRO, O.M.; PRADO, H. Avaliação da atividade de microrganismos do solo em diferentes sistemas de manejo de soja. **Scientia Agricola**, v. 50, n. 2, p. 212-219, 1993.
- CRUMP, B.C. et al. Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2253-2268, 2003.
- FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.
- FRITZ, L.L. et al. Frequência de *Bacillus* spp. em solos de diferentes sistemas de cultivo de arroz irrigado em Cachoeirinha, RS. **Bragantia**, v. 69, n. 2, p. 405-412, 2010.
- 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.
- MINNAARD, J. et al. Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. **International Journal of Food Microbiology**, v. 10, n. 2, p. 197-206, 2007.
- MORAES, J.C.; FONTOURA, M.M.C.; BENVENÚ, S.A. **Microbiologia: atividades práticas**. Passo Fundo: Pe. Beltier, 1999. 208p.
- RECHE, M.H.L.R.; FIUZA, L.M. Bacterial diversity in rice-field water in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 253-257, 2005.
- TEDESCO, M.J. et al. **Análise de solo, plantas e outros materiais**. 2.ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1995.174p.
- VAN HANNEN, E.J. et al. Detritus-dependent development of the microbial community in an experimental system: qualitative analysis by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 2478-2484, 1999.