

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS RESISTENTES AO COBRE COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

Renata Machado Castro ¹

Rutylene Jacondino Roll ²

Resumo:

O cobre é um micronutriente que está presente naturalmente no solo, porém, em casos de desequilíbrio nos quais o solo apresenta elevadas concentrações de cobre, os efeitos sobre as diversas formas de vida seguem uma tendência negativa, causando poluição dos ecossistemas. Áreas de vitivinicultura e de mineração são potenciais propagadoras de cobre no solo, podendo ser precursoras de graves complicações à saúde dos seres humanos. O uso de microrganismos no tratamento de solos contaminados por metais pesados através da biorremediação, principalmente com bactérias, tem se destacado em relação a outros métodos tradicionais, uma vez que tais microrganismos apresentam maior resistência a esses metais, o que proporciona o seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm elevada concentração desses poluentes. Pelo exposto anteriormente, o presente trabalho tem como objetivo testar a resistência ao cobre de diferentes estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, com intuito de utilizá-las, posteriormente, na biorremediação de solos contaminados com o metal. Foram utilizadas estirpes das bactérias *Mesorhizobium loti* (SEMIA 806), *Sinorhizobium meliloti* (SEMIA 134-135) e de *Bradyrhizobium* spp. (SEMIA 5079-5080, SEMIA 6156-6158). As bactérias foram inoculadas em placas de Petri com meio Ágar Nutriente acrescido de 150, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de cobre (CuSO₄·5H₂O) e incubadas à 30° C, por 96 h. Decorrido o período de incubação, a *Bradyrhizobium japonicum*, apresentou crescimento em todas as concentrações de cobre testadas, mostrando-se apta a ser testada como agente de biorremediação. Com o uso desta bactéria, poderemos ter a diminuição de metais pesados do solo, ao mesmo tempo em que ela auxilia na fixação do nitrogênio e no desenvolvimento das plantas simbióticas.

Palavras-chave: Rizóbio; cobre; biorremediação; tolerância.

Modalidade de Participação: Iniciação Científica

SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS RESISTENTES AO COBRE COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

¹ Aluno de graduação. reodacham@gmail.com. Autor principal

² Técnico Administrativo em Educação. rutiroll@gmail.com. Orientador



SELEÇÃO DE ESTIRPES DE RIZÓBIOS RESISTENTES AO COBRE COM POTENCIAL PARA APLICAÇÃO EM BIORREMEDIAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O cobre é um micronutriente que está presente naturalmente no solo, porém, em casos de desequilíbrio nos quais o solo apresenta elevadas concentrações de cobre, os efeitos sobre as diversas formas de vida seguem uma tendência negativa, causando poluição dos ecossistemas. Áreas de vitivinicultura e de mineração são potenciais propagadoras de cobre no solo, podendo ser precursoras de graves complicações à saúde dos seres humanos. Além disso, há também a probabilidade da contaminação de áreas adjacentes. No entanto, para plantas, fungos e bactérias, altas concentrações de cobre promovem uma pressão de seleção, mantendo somente os organismos resistentes nesse local contaminado. Essa pressão de seleção pode ser utilizada para selecionar organismos resistentes à essas condições e testá-los posteriormente quanto ao seu potencial uso para a biorremediação (ANDREAZZA, 2009).

O uso de microrganismos no tratamento de solos contaminados por metais pesados através da biorremediação, principalmente com bactérias, tem se destacado em relação a outros métodos tradicionais, uma vez que tais microrganismos apresentam maior resistência a esses metais, o que proporciona o seu crescimento e desenvolvimento em meios que contêm elevada concentração desses poluentes. As células procarióticas possuem mecanismos que permitem a homeostase do cobre, conferindo maior tolerância se expostas a elevadas concentrações do metal no meio. Essas bactérias que podem desenvolver vários mecanismos de resistência de detoxificação, podem vir a ser úteis quando testadas em espécies vegetais que crescem em áreas contaminadas com cobre (REIS, 2013; ANDREAZZA, 2009).

Bactérias do solo, como *Rhizobium* e *Bradyrhizobium*, são conhecidas por sua ação fixadora de nitrogênio no solo, após a formação de nódulos em raízes de plantas leguminosas. Essa característica, por sua vez, as torna alvos de interesse para experimentos visando a biorremediação de solos contaminados com metais pesados, em associação com a produção de espécies vegetais (VIEIRA et al, 2016).

Com base no exposto acima, o presente trabalho tem como objetivo testar a resistência ao cobre de diferentes estirpes de bactérias fixadoras de nitrogênio, com intuito de utilizá-las, posteriormente, na biorremediação de solos contaminados com o metal.

2. METODOLOGIA

As estirpes de bactérias foram obtidas do Laboratório de Microbiologia da UNIPAMPA - São Gabriel. Foram realizadas diluições seriadas das amostras de turfas de *Mesorhizobium loti* (SEMIA 806), *Sinorhizobium meliloti* (SEMIA 134-135) e de *Bradyrhizobium spp.* (SEMIA 5079-5080, SEMIA 6156-6158). As diluições 1:1000 respectivas de cada bactéria foram inoculadas em placas de Petri com meio Ágar Nutriente acrescido de 150, 200, 300 e 400 mg.L⁻¹ de cobre (CuSO₄.5H₂O) e incubadas à 30° C, por 96 h, sendo observado o crescimento bacteriano a cada 24 h. Todas as amostras foram testadas em triplicata, tendo meio sem adição de cobre como controle positivo para cada um dos isolados. A avaliação qualitativa do crescimento das bactérias em diferentes concentrações de cobre foi realizada por meio de contagem em placa (MARTENSSON, 1992).

Estirpes pertencentes ao gênero *Bradyrhizobium* testadas anteriormente cresceram em um meio nutritivo adicionado de 60 mg.L⁻¹ de cobre, indicando possível tolerância à maiores concentrações (MATSUDA et al, 2002).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Vários estudos já relataram as diferenças na tolerância a metais entre os rizóbios (BORGES & WOLLUM, 1980, 1981; KINKLE et al, 1987; ANGLE et al, 1993) e a possibilidade disso estar associado à densa cápsula polissacarídica ao redor das células, especialmente de *Bradyrhizobium*, que retém os metais, impedindo que sejam absorvidos (ANGLE et al, 1993). Além disso, *Bradyrhizobium* causa reação alcalina no meio, o que pode reduzir a solubilidade e atividade dos metais (ALEXANDER, 1977). Por tudo isso, pode-se inferir que a maior tolerância de *Bradyrhizobium*, quando comparada aos demais rizóbios (*Rhizobium*, *Mesorhizobium* e *Sinorhizobium*), pode ser atribuída à produção de EPS associada à sua capacidade de alcalinizar o meio.

Contrariando estudos anteriores, os quais referem-se ao crescimento de *Bradyrhizobium* como lento (BORGES & WOLLUM, 1980, 1981; KINKLE et al, 1987; ANGLE et al, 1993), a *Bradyrhizobium japonicum*, em decorridas 24h de incubação, já apresentava crescimento em todas as concentrações de cobre testadas: 150 mg.L⁻¹, 200 mg.L⁻¹, 300 mg.L⁻¹ e 400 mg.L⁻¹ (Tabela 1). Ao término do período de incubação e observação do crescimento, apenas a SEMIA 5079-5080 apresentou resistência à todas as concentrações de cobre (Figura 1), enquanto as demais não apresentaram resistência a nenhuma das concentrações.

De acordo com o mostrado abaixo, a SEMIA 5079-5080, utilizada amplamente em lavouras de soja, mostra-se apta a ser testada como agente de biorremediação.

Tabela 1. Crescimento das estirpes de rizóbios em meio Ágar Nutriente adicionado de cobre, à 30° C.

Rizóbio	Estirpe	[] Cu mg.L ⁻¹	Tempo de crescimento			
			24h	48h	72h	96h
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	SEMIA 5079-5080	150 200 300 400	+	+	+	+
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	SEMIA 6156-6158	150 200 300 400	-	-	-	-
<i>Sinorhizobium sp.</i>	SEMIA 134-135	150 200 300 400	-	-	-	-
<i>Mesorhizobium loti</i>	SEMIA 806	150 200 300 400	-	-	-	-



Figura 1. Crescimento da SEMIA 5079-5080 (*Bradyrhizobium japonicum*) em meio adicionado de 150 mg.L⁻¹ (A), 200 mg.L⁻¹ (B) e 400 mg.L⁻¹ (C) de Cu, após 96 h.

Segundo Cerezini et al (2015), diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* apresentam diferenças quanto à competitividade e eficiência da FBN sob condições adversas. Isto ocorre devido à mutações espontâneas nas estirpes, que fazem com que apresentem alterações de importantes características simbióticas, como infectividade, eficiência e potencial de competição (CARVALHO et al, 2005).

Uma limitação do uso de métodos *in vitro* é que as concentrações dos íons metálicos livres e, conseqüentemente, suas atividades reais, não são conhecidas (ANGLE & CHANEY, 1989). Além disso, alguns metais, como Cu, Pb e Ni, são, geralmente, menos tóxicos quando complexados com compostos orgânicos do que em forma livre (BABICH & STOTZKY, 1980, 1983; MATSUDA et al, 2002), por isso faz-se necessário testes *in vivo*, para corroborar tais resultados.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A capacidade de associação simbiótica com plantas leguminosas que os rizóbios possuem, pode ser explorada com finalidades relacionadas à biorremediação. Com o uso destas bactérias, poderemos ter a diminuição de metais pesados do solo, ao mesmo tempo em que elas auxiliam na fixação do nitrogênio e no desenvolvimento das plantas simbióticas.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Introduction to soil microbiology. New York: J. Wiley, 1977. 467 p.

ANDREAZZA, R. Potencial uso de bactérias e plantas para a remediação de cobre em áreas de vitivinicultura e de rejeito de mineração de cobre no Rio Grande do Sul. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2009.

ANGLE, J. S.; CHANEY, R. L. Cadmium resistance screening in nitrilotriacetate-buffered minimal media. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 55, n. 8, p. 2101-2104, Sept. 1989.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Environmental factors that influence the toxicity of heavy metal and gaseous pollutants to microorganisms. CRC Critical Reviews in Microbiology, Boca Raton, v. 8, p. 99-145, 1980.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Nickel toxicity to estuarine marine fungi and amelioration by magnesium in sea water. Water Air and Soil Pollution, Dordrecht, v. 19, n. 2, p. 193-202, 1983.

BORGES, A.; WOLLUM, A. A field study of a soil soybean plant-Rhizobium system amended with cadmium. Journal of Environmental Quality, Madison, v. 9, n. 3, p. 420-423, 1980.

BORGES, A.; WOLLUM, A. Effect of cadmium on symbiotic soybean plants. Journal of Environmental Quality, Madison, v. 10, n. 2, p. 216-221, 1981.

CARVALHO, F. G. de; SELBACH, P. A; BIZARRO, M. J. Eficiência e Competitividade de variantes espontâneos isolados de estirpes de *Bradyrhizobium spp.* recomendadas para a cultura da soja (*Glycine max*). Revista Brasileira de Ciências do Solo, 29, p. 883-891, 2005.

CEREZINI, P. ; PELAQUIM, J.A.P. ; KUWANO, B.H. ; GRUNVALD, A.K. ; PÍPOLO, A.E. ; HUNGRIA M. ; NOGUEIRA, M.A. Inoculação de diferentes estirpes de *Bradyrhizobium* em soja sob restrição hídrica. VII Congresso Brasileiro de Soja, 2015.

KINKLE, B. K.; ANGLE, J. S.; KEYSER, H. H. Long term effects of metal-rich sewage sludge application on soil population of *Bradyrhizobium japonicum*. Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 53, n. 2, p. 315-319, Feb. 1987.

MATSUDA, A; et al. Tolerância de rizóbios de diferentes procedências ao zinco, cobre e cádmio. Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 37, n. 3, p. 343-355. 2002.

MARTENSSON, A. M. Effects of agrochemicals and heavy metals on fast-growing rhizobia and their symbiosis with small-seeded legumes. Soil Biology and Biochemistry, Oxford, v. 24, n. 5, p. 435-445, May 1992.

REIS, K. C. dos; Seleção de bactérias resistentes ao Fe^{3+} com potencial aplicação em biorremediação. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras/MG, 2013.

VIEIRA, J.; ROLL, R. J.; ROSA, J. TRESBACH, R. H.; CASTRO, R. M.; STEFENON, V. M. Crescimento de *Rhizobium loti* e *Bradyrhizobium japonicum* em diferentes condições de pH. Anais da 13ª Mostra de Iniciação Científica - CONGREGA, Urcamp, 2016.