

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**  
**FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**  
**ÁREA DE CONCENTRAÇÃO:**  
**DESENVOLVIMENTO DE PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE MICRORGANISMOS**  
**ENVOLVIDOS NA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DICLOSULAM**

Autora: Nadia Regina Rodrigues

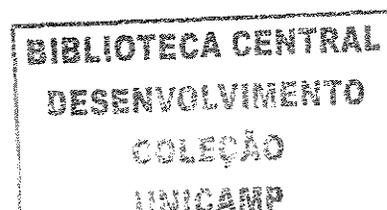
Orientador: Dr. Silvio Roberto Andrietta

Co-orientadora: Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Engenharia Química  
como parte dos requisitos exigidos para a obtenção  
do título de doutora em Engenharia Química.

Campinas – São Paulo

Julho de 2005



UNIDADE	BC
Nº CHAMADA	TUMCAMP
	R618i
V	EX
TOMBO BC/	66968
PROC.	16. 23-06
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	1,00
DATA	13/02/06
Nº CPD	

Bib. id. 374852

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA - BAE - UNICAMP

R618i Rodrigues, Nadia Regina  
Isolamento e seleção de microrganismos envolvidos na degradação do herbicida diclosulam / Nadia Regina Rodrigues.--Campinas, SP: [s.n.], 2005.

Orientadores: Silvio Roberto Andrietta, Maria da Graça Stupiello Andrietta  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Biodegradação. 2. Resíduos herbicidas. I. Andrietta, Silvio Roberto. II. Andrietta, Maria da Graça Stupiello. II. Andrietta, Maria da Graça Stupiello. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Título em Inglês: Microorganisms isolation and selection comprised in the degradation of herbicide diclosulam

Palavras-chave em Inglês: Biodegradation, Herbicide, Diclosulam, Biocatalyser production

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

Titulação: Doutora em Engenharia Química

Banca examinadora: Maria Helena Andrade Santana, Regina Tereza Rossim Monteiro, Itamar Soares de Melo e Glyn Mara Figueira

Data da defesa: 29/07/2005

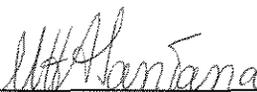
---

Tese de Doutorado defendida e aprovada em 29 de julho de 2005 pela banca constituída pelos professores e doutores:



---

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta



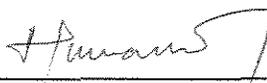
---

Prof. Dra. Maria Helena Andrade Santana



---

Dra. Regina Tereza Rossim Monteiro



---

Dr. Itamar Soares de Melo



---

Dra. Glyn Mara Figueira

20060405

---

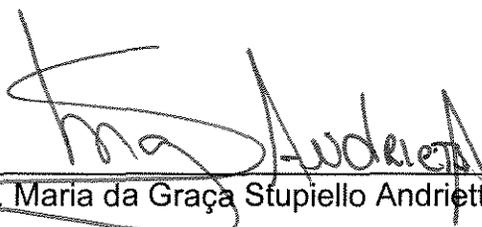
Essa versão corresponde à redação final da Tese de Doutorado em Engenharia Química defendida por Nadia Regina Rodrigues e aprovada pela banca examinadora em 29/07/2005.



---

Prof. Dr. Silvio Roberto Andrietta

Orientador



---

Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta

Co-Orientadora

---

## DEDICATÓRIA

À minha querida filha  
Priscilla

---

*A ciência pode ser o falso espelho em que vaidade e pretensão do homem se contemplam, esquecido de seu Criador. O verdadeiro espelho, porém, é o próprio Deus, a cuja imagem e semelhança foi o homem criado. Só os dons do Espírito iluminam o labor científico.*

Quinita Ribeiro Sampaio

---

## AGRADECIMENTOS

- Ao professor Dr. Silvio Roberto Andrietta, pela orientação, paciência, dedicação e amizade.
- À Dra. Maria da Graça Stupiello Andrietta, pela co-orientação, amizade e ensinamentos valiosos.
- À Dow AgroSciences Indústria Ltda., pela colaboração.
- Ao Curso de Pós Graduação da área de concentração de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos da Faculdade de Engenharia Química da UNICAMP e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas Biológicas e Agrícolas da UNICAMP, pela oportunidade da realização deste trabalho.
- À toda equipe de trabalho das Divisões Resíduos e Biotecnologia e Processos do CPQBA/UNICAMP, em especial à Evani, Milene e Alex, pela colaboração nos trabalhos experimentais.
- À José Lima, pelo amor e paciência.

---

## RESUMO

Algumas variedades de milho usadas em rotação com a soja, são sensíveis ao composto diclosulam aplicado em solo para o controle de ervas daninhas. Esse trabalho teve como objetivo isolar microrganismos capazes de degradar esse composto. O estudo envolveu isolamento e seleção de microrganismo, otimização de meio para o cultivo desses microrganismos assim como teste para produção de biomassa em escala de fermentador. Foram coletadas amostras de solos de três localidades (Uberlândia, Rondonópolis e Londrina) em plantio de soja os quais receberam aplicação de diclosulam. As amostras foram coletadas em três diferentes parcelas do solo: entrelinhas, rizosfera e oriundo da mata de vegetação natural (mata virgem). As amostras foram diluídas até  $10^5$ , e semeadas em placas contendo os seguintes meios de cultivo: Mínimo, King's B e Rosa de Bengala suplementados com diclosulam  $10\mu\text{g/mL}$ . Os microrganismos foram incubados por 72 horas a  $32^\circ\text{C}$ .

As linhagens selecionadas, que apresentaram crescimento nos meios onde o diclosulam estava presente foram transferidas para os mesmos meios de origem, agora com  $100\mu\text{g/mL}$  de diclosulam. Os microrganismos capazes de crescer a essa concentração foram transferidos para meio Mínimo, agora suplementado com  $500\mu\text{g/mL}$  de diclosulam. Os resultados obtidos foram: 16 linhagens provenientes de Uberlândia, 3 de Rondonópolis. No caso de Londrina foi possível isolar 6 linhagens na concentração de  $100\mu\text{g/mL}$ .

Testes realizados mostraram que nenhuma das linhagens selecionadas foi capaz de utilizar o diclosulam como única fonte de carbono ou nitrogênio. No entanto foram capazes de degradá-lo por cometabolismo. Quando os atributos produção de biomassa e capacidade de degradar o diclosulam foram avaliados, 4 linhagens entre as 25 estudadas apresentaram resultados promissores. Essas foram identificadas se apresentando como linhagens de: *Klebsiella* sp. (UL3), *Sphingobacterium multivorum* (UL4), *Acinetobacter* sp.(LL2) e *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis* (RL2). Todos esses microrganismos foram capazes de crescer utilizando tanto sacarose como glicose e frutose como fontes de carbono.

A *Klebsiella* UL3, por apresentar o melhor desempenho entre as 4 selecionadas, foi utilizada nos ensaios em frascos agitados de otimização do meio de cultivo. Com isso se avaliou a melhor concentração de sacarose e extrato de levedura para produção de biomassa. A composição obtida para o meio otimizado foi:  $40\text{ g/L}$  de sacarose e  $7\text{ g/L}$  de extrato de levedura. A massa celular alcançada foi de  $0,69\text{ g/L}$ .

Estudos de aumento de escala mostraram que quando esse meio é transferido para fermentador de bancada a massa celular obtida ( $0,4\text{ g/L}$ ) é menor que a obtida em frascos. Quando a glicose foi usada como fonte de carbono, em ensaios conduzidos também em fermentador, houve um incremento de 45% na produção de biomassa comparado com a utilização da sacarose. A utilização de glicose parece também eliminar o fenômeno de autólise celular, fenômeno esse observado quando a sacarose é utilizada.

Palavras-chave: biodegradação; herbicida; diclosulam; produção de biocatalizador.

---

## ABSTRACT

Some corn varieties used in crop rotation with soybean are sensitive to diclosulam compound applied on soil for weed control. The purpose of this work was to isolate microorganisms able to degrade this compound. The study comprised microorganism isolation and selection, medium optimization for cultivation of these microorganisms, as well as a test for biomass production at fermentor scale. Soil sampling has been taken from three locations (Uberlândia, Rondonópolis and Londrina), where diclosulam had been applied. The samplings were collected in three different soil plots: interlines, rhizosphere and from natural vegetation woods. Samplings were diluted up to  $10^5$ , and seeded in plaques containing the following cultivation media: Minimum, King's B and Bengale Rose supplemented with  $10\mu\text{g/mL}$  diclosulam. The microorganisms were incubated for 72 hours at  $32^\circ\text{C}$ .

The selected strains, which presented growth in the media containing diclosulam were transferred to the same original media, now with  $100\mu\text{g/mL}$  of diclosulam. The microorganisms able to grow at this concentration were transferred to the minimum medium, now supplemented with  $500\mu\text{g/mL}$  of diclosulam. The results obtained were: 16 strains from Uberlândia, 4 from Rondonópolis. In the case of Londrina, no strain was possible to be isolated (6 strains were isolated only at concentration of  $100\mu\text{g/mL}$ ).

Tests carried out have shown that none of the selected strains were able to use diclosulam as the only source of carbon or nitrogen. However, they were able of degrading it through cometabolism. When evaluating biomass production attributes and ability to degrade diclosulam, 4 strains among the 25 studied presented promising results. These were identified as strains of: *Klebsiella* sp. (UL3), *Sphingobacterium multivorum* (UL4), *Acinetobacter* sp.(LL2) *Staphylococcus capitis*, subsp. *capitis* (RL2). All of these microorganisms were able to grow by using both sucrose and glucose and fructose as carbon sources.

Since the UL3 strain presented the best performance among the 4 selected ones, it was used in agitated flasks in the trials of optimization of the cultivation medium. This evaluated the best sucrose and yeast extract concentration for biomass production. The composition obtained for the optimized medium was: 40 g/L of sucrose and 7 g/L of yeast extract. Cellular mass was 0.69 g/L.

Increasing scale studies have shown that when this medium is transferred to the bench fermentor, the cellular mass obtained (0.4 g/L) is lower than the one obtained in flasks. When glucose was used as carbon source in trials also carried out in fermentor, there was an increment of 45% in biomass production when compared with sucrose use. Glucose use also seems to eliminate the cellular autolysis phenomenon, observed when sucrose is used.

Keywords: biodegradation; herbicide; diclosulam; biocatalyser production.

---

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>3</b>
2.1. O solo.....	3
2.2. Disponibilidade do pesticida no solo.....	4
2.3. Degradabilidade de herbicidas em solo.....	5
2.4. Utilização de pesticida nas práticas agrícolas.....	7
2.5. Controle no uso de pesticidas.....	10
2.6. Biodegradação.....	11
2.7. Microrganismos com capacidade de degradar pesticidas.....	15
2.8. Isolamento de microrganismos biodegradadores.....	18
2.9. O diclosulam.....	20
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
3.1. Composto estudado.....	24
3.2. Solos amostrados.....	24
3.3. Isolamento dos microrganismos.....	27
3.4. Seleção dos microrganismos potencialmente degradadores do diclosulam.....	27
3.5. Utilização do diclosulam como única fonte de carbono e nitrogênio pelas linhagens selecionadas.....	28
3.6. Avaliação da degradação do diclosulam através de cometabolismo.....	29

---

3.7.	Crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono.....	31
3.8.	Otimização do meio de produção de biomassa.....	31
3.9.	Teste em reator de bancada.....	33
3.10.	Identificação das linhagens.....	34
3.11.	Metodologia analítica.....	34
3.11.1.	Dosagem de diclosulam.....	34
3.11.2.	Dosagem de açúcar.....	35
3.11.3.	Massa celular.....	36
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
4.1.	Isolamento dos microrganismos .....	37
4.2.	Seleção dos microrganismos potencialmente degradadores do diclosulam.....	39
4.3.	Teste de assimilação do diclosulam.....	42
4.3.1.	Diclosulam como única fonte de carbono.....	42
4.3.2.	Diclosulam como única fonte de nitrogênio.....	44
4.4.	Avaliação de desempenho das linhagens na biodegradação de diclosulam através de cometabolismo.....	45
4.5.	Identificação de bactérias.....	53
4.6.	Testes de crescimento das linhagens selecionadas em diferentes fontes de carbono.....	54
4.6.1.	Frutose.....	54
4.6.2.	Sacarose.....	55

---

4.6.3. Seleção da fonte de carbono a ser utilizada no meio de produção de biomassa .....	57
4.6.4. Seleção da fonte de nitrogênio do meio.....	57
4.6.5. Seleção da linhagem para testes de produção.....	57
4.7. Otimização do meio de produção de biomassa.....	58
4.8. Produção de biomassa em biorreator.....	61
<b>5. PROPOSTA PARA UMA PLANTA DE PRODUÇÃO.....</b>	<b>65</b>
5.1. Preparo do meio.....	65
5.2. Propagação.....	65
5.3. Separação e conservação.....	66
5.4. Estimativa de produção.....	67
5.5. Avaliação prévia.....	68
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>7. SUGESTÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>79</b>

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Classificação de pesticidas.....	9
<b>FIGURA 2:</b> Fórmula estrutural do diclosulam.....	21
<b>FIGURA 3:</b> Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.....	46
<b>FIGURA 4:</b> Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.....	46
<b>FIGURA 5:</b> Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.....	46
<b>FIGURA 6:</b> Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.....	48
<b>FIGURA 7:</b> Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.....	48
<b>FIGURA 8:</b> Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.....	48
<b>FIGURA 9:</b> Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis....	50
<b>FIGURA 10:</b> Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis.....	50
<b>FIGURA 11:</b> Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis.....	50
<b>FIGURA 12:</b> Perfis da concentração de Frutose em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas.....	54

---

<b>Figura 13.</b> Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas.....	54
<b>FIGURA 14:</b> Perfis da concentração de sacarose em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas.....	55
<b>FIGURA 15:</b> Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas.....	55
<b>FIGURA 16:</b> Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as quatro linhagens selecionadas.	56
<b>FIGURA 17.</b> Perfis da concentração de frutose em função do tempo de fermentação para as quatro linhagens selecionadas.	56
<b>FIGURA 18:</b> Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático codificado, relacionando a concentração de sacarose e extrato de levedura no meio utilizado na obtenção de massa celular.....	60
<b>FIGURA 19:</b> Perfil da concentração de sacarose em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando sacarose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. = 32°C.....	61
<b>FIGURA 20:</b> Perfil da concentração de glicose em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando sacarose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. = 32°C.....	61
<b>FIGURA 21:</b> Perfil da concentração de frutose em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando sacarose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. = 32°C.....	61
<b>FIGURA 22:</b> Perfil da concentração de massa celular em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando sacarose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. = 32°C.....	62
<b>FIGURA 23:</b> Perfil da concentração de glicose em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando glicose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. = 32°C.....	63

---

---

<b>FIGURA 24:</b> Perfil da concentração de massa celular em biorreator no cultivo de <i>enterobacteriaceae</i> utilizando glicose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temp. =32°C.....	63
<b>FIGURA 25:</b> Fluxograma esquemático da planta de produção de biocatalisadores.....	66

---

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Principais Actinomicetos e os pesticidas degradados por eles.....	17
<b>TABELA 2:</b> Resultados analíticos das concentrações de resíduos de diclosulam nas amostras de solo.....	25
<b>TABELA 3:</b> Características dos solos utilizados no estudo.....	26
<b>TABELA 4:</b> Definições dos parâmetros de desempenho das linhagens estudadas.....	30
<b>TABELA 5:</b> Faixa das variáveis estudadas.....	32
<b>TABELA 6:</b> Descrição dos ensaios segundo metodologia de planejamento fatorial de dois níveis: completo e configuração estrela.....	32
<b>TABELA 7:</b> Contagem microbiana (UFC/g solo) nas amostras de solo coletadas na localidade de Uberlândia, nos meios de cultivo com (10µg/mL) e sem adição de diclosulam.....	37
<b>TABELA 8:</b> Contagem microbiana (UFC/g solo) nas amostras de solo coletadas na localidade de Londrina, nos meios de cultivo com (10µg/mL) e sem adição de diclosulam.....	37
<b>TABELA 9:</b> Contagem microbiana (UFC/g solo) nas amostras de solo coletadas na localidade de Rondonópolis, nos meios de cultivo com (10µg/mL) e sem adição de diclosulam.....	38
<b>TABELA 10:</b> Número de colônias selecionadas das amostras provenientes de Uberlândia, capazes de crescer nas concentrações de 10, 100 µg/mL para os três meios e 500 µg/mL para o meio mínimo de diclosulam.....	39

---

<b>TABELA 11:</b> Número de colônias selecionadas das amostras provenientes de Londrina, capazes de crescer nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL de diclosulam.....	40
<b>TABELA 12:</b> Número de colônias selecionadas das amostras provenientes de Rondonópolis, capazes de crescer nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL de diclosulam.....	41
<b>TABELA 13:</b> Resultados médios de crescimento microbiano em meios contendo diclosulam como única fonte de carbono.....	42
<b>TABELA 14:</b> Concentração de diclosulam nos tempos 0, 48 e 96 horas de ensaio para o teste de degradação com a cepa UL1 em meios com e sem adição de glicose.....	43
<b>TABELA 15:</b> Resultados de crescimento microbiano em meios contendo diclosulam como única fonte de nitrogênio .....	44
<b>TABELA 16:</b> Valores dos parâmetros MCP (massa de células produzidas), MGC (massa de glicose consumida), MDD (massa de diclosulam degradado) , $Y_{XS}$ (rendimento em célula) VCD (velocidade de degradação do diclosulam) e DED (degradação específica do diclosulam) para as 10 linhagens estudadas.....	51
<b>TABELA 17:</b> Identificação dos microrganismos selecionados.....	53
<b>TABELA 18:</b> Resultados obtidos das concentrações de massa celular dos microrganismos selecionados.....	58
<b>TABELA 19:</b> Análise de variância.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

Com o aumento da demanda mundial por alimentos, torna-se necessário o aumento da produtividade, que nas últimas décadas vem sendo alcançado pela utilização de pesticidas. Segundo BRITTO (2000) o aumento de produtividade para as 20 maiores culturas atingiu 47,5% entre os anos de 1990 e 1998. De acordo com MONTEIRO (1996), o mercado de pesticida movimentou 27 bilhões de dólares em 1991 e o Brasil era o quinto país em consumo deste produto. Em 1999, o Brasil passou a ocupar a quarta posição mundial em consumo de pesticidas, sendo que do total 50% foi herbicida (BRITTO, 2000). Atualmente (2005) o Brasil ocupa o segundo lugar. O uso crescente destes produtos faz com que uma maior concentração dos mesmos seja encontrada nos solos cultiváveis.

O efeito residual de alguns herbicidas em solos pode ou não trazer benefícios para futuros cultivos. Quando se trata de áreas onde não existe rotação de cultura como, por exemplo, áreas canavieiras, o residual do composto traz um efeito economicamente positivo, uma vez que diminui o montante de herbicidas a ser aplicado no ano subsequente. No caso de cultura com ciclos curtos, como a soja, esse residual pode não ser desejado, caso inviabilize a utilização do mesmo para outras culturas. Em casos onde o residual não é desejável, torna-se necessário a utilização de técnicas que acelerem a degradação da molécula. Uma dessas técnicas é a biodegradação que, segundo ALEXANDER (1981), pode ser definida como sendo o processo de mineralização de uma molécula orgânica na água ou no solo por uma seqüência de atividades microbianas. Segundo SCRAMIN *et al.* (1998), o emprego de microrganismos ou enzimas para a degradação de pesticidas não é novo, sendo esse uso amparado pelo fato da degradação ocorrer de forma natural no ambiente devido em grande parte a processos mediados por habitantes naturais do solo. Vários trabalhos vem sendo desenvolvidos com o objetivo de se isolar microrganismos com capacidade de biodegradar pesticidas; no entanto, pouco tem sido utilizado nas práticas agrícolas.

Tendo em vista esses fatos, o uso do herbicida com princípio ativo diclosulam em soja é um caso típico em que a biodegração é uma alternativa viável para o uso subsequente do solo. Sendo algumas variedades de milho cultivadas após a colheita da soja, sensíveis a esta molécula, o plantio da mesma depende da redução do resíduo de diclosulam no solo.

Visando tornar possível o cultivo de variedades de milho sensíveis ao diclosulam em solos onde este foi aplicado, realizou-se este trabalho cujo objetivo foi selecionar microrganismos, isolados de solo de rizosfera de áreas de cultivo de soja cujo herbicida utilizado foi o diclosulam, para atuar como biocatalisador que ao ser adicionado à semente do milho no plantio possa se desenvolver protegendo-a da ação desta molécula, sem no entanto reduzir a concentração do princípio ativo nas entrelinhas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O solo

O solo é um habitat muito peculiar em relação a outros devido sua natureza heterogênea complexa e dinâmica. Estas características permitem que organismos com metabolismos díspares possam conviver lado a lado, interagindo em estado de equilíbrio dinâmico e, muitas vezes, com relações de dependência essenciais para sua sobrevivência, proporcionando, assim, condições ideais para uma biodiversidade bastante elevada. Por outro lado, essas mesmas características são o principal impedimento para a introdução de tecnologias de manejo biológico, cujo efeito no solo é, em muitos casos, impossível de se prever. Nesse sentido, muitos esforços têm sido feitos para o desenvolvimento de técnicas que possibilitem estudos visando identificar seus componentes abióticos e bióticos, além da interação entre estes e sua participação nos processos do solo (MOREIRA & SIQUEIRA, 2002).

O solo é o componente alvo no estudo do comportamento de herbicidas no meio ambiente porque ele é, inevitavelmente, o receptáculo final dos herbicidas aplicados na agricultura. O solo é um sistema dinâmico e heterogêneo que consiste de três fases distintas – uma fase sólida (cerca de 50%) constituída tanto de sólidos orgânicos e inorgânicos; uma fase líquida (cerca de 25%); e uma fase gasosa (cerca de 25%). As fases líquida e gasosa servem como principais meios de transportes dos herbicidas solúveis e voláteis no solo. A fase sólida é a parcela onde ocorrem as retenções e transformações químicas. Tanto os sólidos orgânicos como os inorgânicos podem atuar como superfícies de adsorção. Para efeitos de interação do solo com os herbicidas, as partículas sólidas coloidais são de absoluta importância e, dentre estas, são destacados a fração mineral argila, os óxidos/hidróxidos metálicos e a fração matéria orgânica, sendo esta última apenas uma pequena porcentagem em relação ao total (LAVORENTI, 1996).

A rizosfera é a região da parte sólida do solo onde se encontram as raízes das plantas. O que diferencia essa região do solo é o acúmulo de nutrientes

orgânicos e conseqüentemente uma maior presença de microrganismos. De uma maneira geral, o número de microrganismos encontrados no solo não rizosférico é muito menor que o encontrado na rizosfera (CARDOSO & FREITAS, 1992).

Segundo COUTINHO (1999), a atividade agrícola no Brasil quase sempre leva a uma redução da biodiversidade, resultado da transição da área natural (com muitas espécies de plantas e animais convivendo em equilíbrio ecológico dinâmico) para área agrícola (com reduzido número de espécies que convive em desequilíbrio). A perda de espécies vegetais muito provavelmente causa também alterações na biodiversidade dos solos, já que suas raízes são fonte de energia para microrganismos específicos da rizosfera. Em sistemas de monocultura, alterações na biodiversidade podem ser bastante acentuadas com uso intensivo de pesticidas. Uma maneira de se realizar estudos sobre os impactos à biodiversidade do solo e a sustentabilidade da agricultura é através da avaliação da diversidade de microrganismos do solo.

## **2.2. Disponibilidade do pesticida no solo**

A disponibilidade de um pesticida no solo para as plantas, animais ou microrganismos é determinada, principalmente, pela extensão de adsorção das partículas sólidas presentes. Essas propriedades são dadas pela estrutura molecular do pesticida, sua concentração no solo, além da temperatura, umidade e características físico-químicas do solo (ANDERSON, 1984).

Uma preocupação para os pesquisadores que trabalham com pesticidas é determinar de que maneira esses compostos se depositam no solo. De modo geral os compostos podem se distribuir de duas maneiras distintas no solo: na forma livre ou ligada. Na primeira, esse composto pode ser facilmente extraído do solo sem que sua estrutura seja alterada. A forma ligada diz respeito a produtos que apresentam resistência na sua extração. Entretanto, a distinção entre essas duas frações não é bem definida, uma vez que resíduos livres podem se apresentar em algum momento propriedades atribuídas a resíduos encontrados na forma ligada. A "extratibilidade" de um composto é definida em função da natureza

do extrator assim como das condições de operação da extração (GEVAO et al., 2000).

No que diz respeito ao meio ambiente, o termo *ligado* não depende da extrabilidade do pesticida em questão mas sim da sua biodisponibilidade. O resíduo ligado biodisponível é aquele que pode ser usado por plantas e/ou animais habitantes do solo.

Em 1996 foi proposta uma nova definição para resíduo ligado: compostos presentes no solo, planta ou animais que persistem em sua matriz na sua forma original ou metabolizada, mesmo após a sua extração. O tempo de contato do solo com o pesticida também tem influência na biodisponibilidade da molécula. Quanto maior for a idade do pesticida no solo menor será sua disponibilidade (GEVAO et al., 2000).

### **2.3. Degradabilidade de herbicidas em solo**

O solo é um ecossistema complexo e, do ponto de vista físico, sua composição implica material mineral (argila e areia), poros contendo ar ou água e matéria orgânica. O solo possui a habilidade de se autodesintoxicar dos produtos químicos adicionados a ele.

Entre os compostos que atingem o solo em decorrência da intervenção humana, os pesticidas merecem redobrada atenção. Estes são compostos xenobióticos, isto é, de origem não natural; portanto, de ação poluente. Se por um lado, a permanência destes compostos no solo é requerida como agente de proteção da cultura, por outro, apresentam perigo potencial para a microbiota, a qualidade do ambiente e a vida no planeta. Atualmente existem mais de 1.000 xenobióticos registrados como pesticidas, com uma grande variação na estrutura química das moléculas. Dos xenobióticos empregados como pesticidas 65% são herbicidas, 25% inseticidas e 7% fungicidas. Os restantes 3% incluem nematicidas, acaricidas, rodenticidas, moluscicidas e outros (FAY et al., 1997).

A modificação dos produtos presentes no solo se faz, basicamente, pela ação da microbiota habitante desse ecossistema. De modo geral, a mineralização do produto só é possível pela ação sucessiva ou simultânea de uma população

mista de microrganismo. Dentro da comunidade dos microrganismos as bactérias e os fungos têm sido apontados como os maiores agentes de transformação ou degradação dos pesticidas presentes no solo (KUMAR et al., 1996).

Muitas vezes há um conflito entre a necessidade de manter um nível de atividade de um xenobiótico no ambiente e o desejo de degradar esse composto químico para moléculas menos tóxicas e menos prejudiciais ao ambiente. No que diz respeito às práticas agrícolas, a permanência dos pesticidas no solo ou mesmo na água é, na maioria das vezes, interessante, uma vez que traz benefícios de ordem econômica ao produtor (MELO & AZEVEDO, 1997).

Segundo LAVORENTI (1996) o estudo do comportamento dos herbicidas no meio ambiente procura: compreender todos os fatores do meio ambiente (além do próprio herbicida) que, direta ou indiretamente, afetam a eficiência no controle de uma planta invasora; avaliar as interações do herbicida com os componentes do ambiente, de tal modo a minimizar os efeitos maléficos que sua presença possa causar. Esse mesmo autor afirma, também que hoje o estudo do comportamento de herbicidas no meio ambiente tem sido realizado através de estimativas das tendências a que os mesmos estão sujeitos em função dos três processos principais: retenção, transformação e transporte.

Ainda conforme LAVORENTI (1996), a degradação da molécula de herbicida pode ser abiótica, quando a molécula de herbicida é degradada pela ação de componentes físicos do meio ambiente. Assim, é possível observar fotodegradação (quando ocorre a ação da luz na estrutura da molécula do herbicida); degradação química (quando reações químicas tais como hidrólise, oxidação e descarboxilação se processam no meio ambiente em função da presença de certos reagentes do ambiente que interagem com o herbicida). Além da degradação abiótica temos também a degradação biótica – quando a maioria das moléculas de herbicidas é transformada pela ação do metabolismo de microrganismos, animais e plantas. Enzimas são secretadas por estes seres vivos, as quais, em contato com os herbicidas, originam uma série de reações tais como: oxidação, redução, hidrólise, dealquilação, descarboxilação, hidroxilação, metilação, beta-oxidação, dealcoilação etc. No caso dos microrganismos, esses fazem uso dos compostos como fonte de nutriente para o próprio crescimento.

Fatores do ambiente podem afetar a transformação dos herbicidas, tanto na água como no solo: temperatura, umidade, vento, luz solar, propriedades do solo, tais como pH, superfície mineral, nutrientes disponíveis, matéria orgânica, quantidade de oxigênio e a biota, flora e fauna, macro e micro. No solo as técnicas de aplicação, cultivo, irrigação, natureza das culturas, podem afetar a persistência do herbicida. As plantas também podem absorver e metabolizar herbicidas. Entretanto, esses produtos podem reentrar no solo na forma metabolizada, via exudação das raízes. Semelhantemente, herbicidas aplicados nas folhagens podem entrar no solo através da translocação e exudação das raízes em forma original ou transformados. A taxa de transformação dos herbicidas pode ainda ser modificada na presença de raízes das plantas e associação com a microflora.

#### **2.4. Utilização de pesticida nas praticas agrícolas**

O solo é utilizado para produzir mais de 90% do alimento consumido no mundo. Devido a presença de competidores nas culturas, a utilização de pesticidas tem se tornado comum no combate de plantas, insetos ou fungos que apresentam significativa perda econômica de culturas (ASPELIN et al., 1992).

Pesticida é definido por OLIVEIRA (1996) como produto e agente de processos físicos, químicos ou biológicos, destinado ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou cultivadas, e de outros ecossistemas.

Pesticidas também são usados em ambientes urbanos hídricos e industriais, com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa aos seres vivos.

Globalmente, a cada ano, são utilizados milhões de quilos de pesticidas, movimentando um mercado estimado em 27 bilhões de dólares. O maior consumidor são os Estados Unidos, com mais de 600 produtos registrados e 371 milhões de quilogramas aplicados em 1991. O Brasil representava o quinto mercado consumidor mundial de pesticidas em 1991, com cerca de 250 ingredientes ativos registrados no IBAMA (MONTEIRO, 1997)

Segundo BRITTO (2000), o Brasil passou a ocupar a quarta posição mundial em consumo de pesticidas em 1999, perdendo somente para os Estados Unidos, Japão e França. Este autor também afirma que desse total 50% são de produtos herbicidas.

Os herbicidas são compostos xenobióticos, pertencentes a diversos grupos químicos. Apresentam ação sobre plantas daninhas, cuja eficácia está relacionada às características físico-químicas e biológicas do solo em que ele é aplicado (ROQUE, 2000).

Segundo PAULINO (1997), lavouras brasileiras que mais consomem herbicidas são as de soja, citros, cana-de-açúcar, hortaliças (tomate e batata), arroz, algodão, cereais, café, milho e frutas.

BRITTO (2000) lembra que a cultura da soja é responsável por mais de 30% do consumo brasileiro de pesticidas. O autor ressalta que o aumento de uso de pesticidas acarretou o aumento da produtividade que, para as 20 maiores culturas, foi de 47,5% entre os anos de 1990 e 1998.

GEVAO et al. (2000) descrevem que existe uma gama enorme de pesticidas, de diferentes propriedades químicas, sendo utilizada nos solos. Esses autores fazem uma classificação desses produtos, apresentada a seguir.

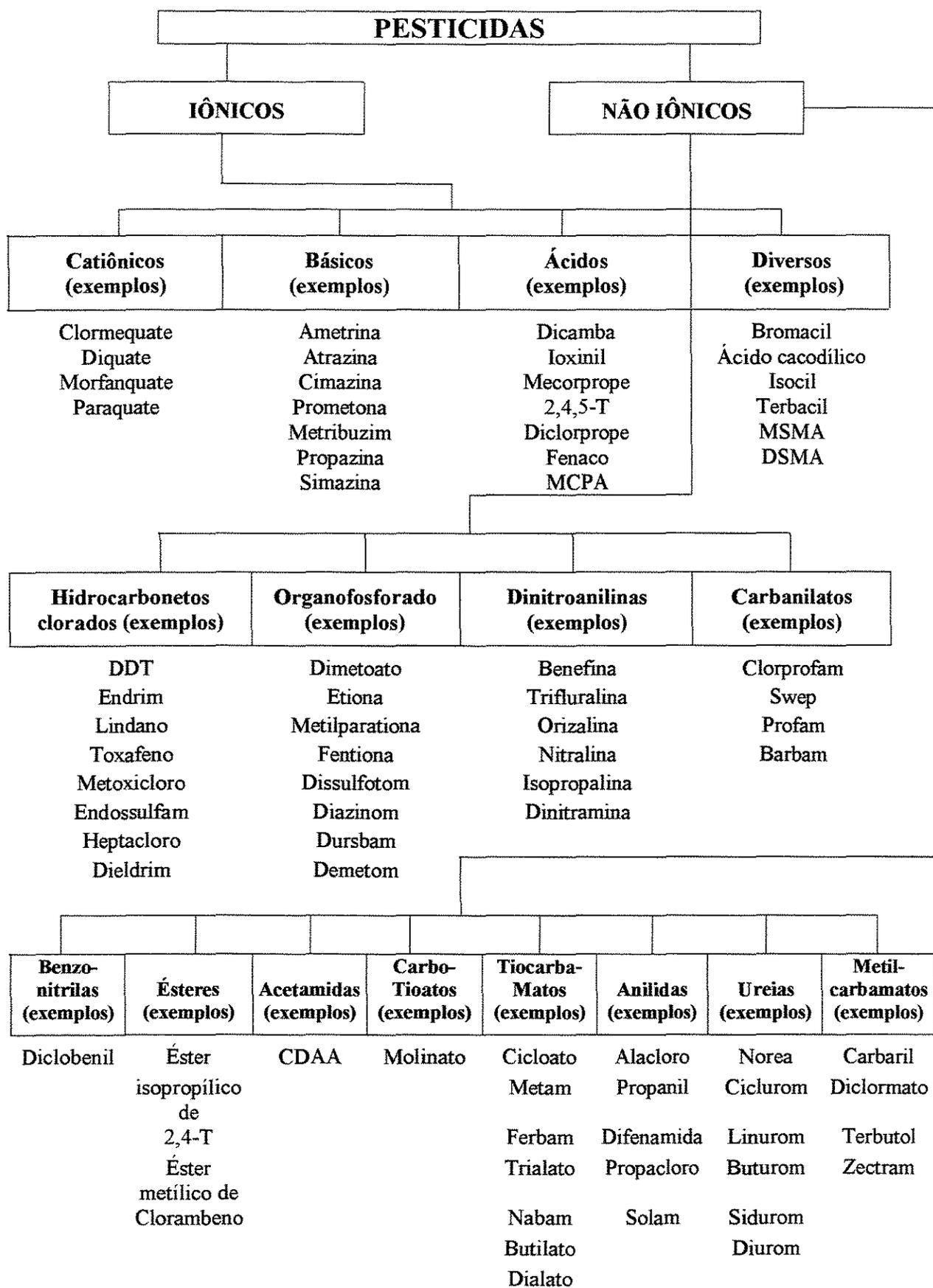


Figura 1. Classificação de pesticidas (GEVAO et al., 2000)

## 2.5. Controle no uso de pesticidas

Na década de 1940, com o advento e substituição dos pesticidas inorgânicos pelos orgânicos, acreditou-se que o problema da persistência estava sanado, uma vez que os agentes degradativos biológicos e não biológicos junto com a volatilização, eliminariam rapidamente esses novos produtos. Alguns desses pesticidas utilizados, principalmente os hidrocarbonetos clorados, não estavam sendo degradados, mas sim acumulados no ambiente. Em função disso, veio o descrédito desses conceitos e os estudos sobre persistência desses compostos no solo tornaram-se de grande importância (SILVA & FAY, 1997).

Alguns produtos agrícolas são suficientemente persistentes para causar sérios problemas de resíduos. O uso de tais pesticidas é atualmente restrito por uma variedade de regulamentações nacionais de proteção ao meio ambiente. Essa preocupação com resíduos de pesticidas em solos e na água tem favorecido o desenvolvimento de produtos menos persistentes e menos tóxicos (SCHIJVER & MOT, 1999).

A Holanda foi o primeiro país a desenvolver um programa para avaliação de contaminação e definir formas de remediação de solos e águas subterrâneas. Estabeleceu padrões considerando o princípio de multifuncionalidade do solo, definindo critérios para a avaliação e remediação de locais contaminados. Esses critérios resultaram em uma lista freqüentemente referida como “Lista Holandesa”, estabelecida em 1983. Nessa lista são citados níveis de referência, os quais são utilizados para alertar quanto a contaminação de um determinado solo (CASARINI, 1996).

No Brasil, a CETESB atua de acordo com a legislação (Decretos 8468/76 e 32955/91) de controle e prevenção da poluição em solos e águas subterrâneas. Para metais, a definição do padrão de referência considera a porcentagem e tipo de argila, matéria orgânica, capacidade de troca de cátions e o teor de óxido e hidróxido de ferro e manganês. Para os compostos orgânicos, o padrão de referência de qualidade será definido pelo limite de detecção do método analítico utilizado. Os países que possuem políticas estabelecidas de proteção ao solo

exigem a remediação até a função original do solo (multifuncionalidade) e aos padrões de potabilidade de águas subterrâneas (CASARINI, 1996).

## 2.6. Biodegradação

A mineralização ou completa biodegradação de uma molécula orgânica na água ou no solo se deve quase sempre a uma seqüência de atividades microbianas. Poucos mecanismos abióticos importantes na natureza convertem totalmente compostos orgânicos com algum grau de complexidade em produtos inorgânicos não tóxicos. Algumas moléculas orgânicas são resistentes ao ataque de microrganismos sugerindo assim sua persistência (ALEXANDER 1981).

O emprego de microrganismo ou enzimas para a degradação de pesticidas não é novo, sendo esse uso amparado pelo fato da degradação, ocorrer de forma natural no ambiente devido em grande parte, a processos mediados por microrganismos habitantes naturais do solo. (SCRAMIN et al., 1998)

O termo *biodegradação* se refere à transformação biológica de um composto químico orgânico para outra forma, sem se referir à extensão. Essa transformação pode ser primária, envolvendo somente mudança estrutural da molécula, tais como uma oxidação ou redução ou perda de um grupo funcional. Embora essas modificações sejam pequenas, alteram as características físico-químicas da molécula. A transformação pode ser mais complexa, envolvendo várias reações seqüenciais, implicando na perda da toxidez da molécula. O processo de biodegradação ideal resulta na mineralização do composto, com formação de dióxido de carbono, água, produtos inorgânicos e compostos orgânicos de ocorrência comum no ambiente como ácidos orgânicos e outros. Processos biodegradativos podem ocorrer através de uma simples espécie ou mais; no entanto, freqüentemente requer uma mistura de organismos diversos (SCHRIJVER & MOT, 1999).

Segundo MELO et al. (1999), o processo final de eliminação de um composto do solo é a mineralização do mesmo. Isso significa sua completa degradação em moléculas inorgânicas como CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, Cl. A mineralização completa de um composto químico é mais provável ocorrer quando

o mesmo é exposto a ação de uma população mista de microrganismos. Esses mesmos autores sugerem que o tipo de metabolismo dos microrganismos presentes em um determinado solo é um dos principais fatores na determinação do nível de persistência dos pesticidas nesse solo.

SCHIJVER & MOT (1999), afirmam que mesmo o pesticida mais complexo pode ser metabolizado por algum tipo de microrganismo.

Segundo ALEXANDER (1999), os microrganismos possuem capacidade enzimática de degradar uma grande variedade de compostos químicos que ocorrem na natureza. Embora os pesticidas não apresentem estruturas iguais aos dos compostos encontrados na natureza, ambos têm vários arranjos de substituintes e ligações em comum em suas moléculas. Consequentemente, muitos produtos sintéticos introduzidos no ambiente pelo homem podem ser degradados microbiologicamente por enzimas existentes em resposta à presença de substratos naturais. Assim, a população microbiana pode utilizar para seu desenvolvimento e crescimento produtos incorporados ao ecossistema pelo homem, removendo de forma involuntária a potencial toxidez desses compostos do meio ambiente.

A presença de uma população microbiana capaz de degradar determinado pesticida é resultado de uma seleção natural. A presença de um dado composto no solo possibilita o crescimento de determinados microrganismos ou grupo deles. Em função da disponibilidade de compostos orgânicos, a rizosfera é o ambiente onde se encontra a maior concentração de microrganismos no solo. É nesse ambiente que expressivamente ocorre a biodegradação dos compostos xenobióticos. Trabalhos mostram que a ocorrência de microrganismos nessa parcela do solo pode alcançar até 7 vezes mais que nas outras parcelas para actinomicetos. No caso de fungos e bactérias esses valores são de 12 e 23 vezes, respectivamente (CARDOSO & NEVES, 1992).

Os microrganismos exibem duas estratégias ecológicas para a assimilação do substrato: metabolismo e cometabolismo. Na mineralização o substrato absorvido é quebrado em pequenas moléculas, as quais são posteriormente metabolizadas em rotas que geram energia. Nesse caso, a biomassa microbiana

aumenta às expensas do substrato. Ao contrário da mineralização, no cometabolismo não há geração de energia. Os pesticidas são transformados pelas rotas metabólicas que contêm enzimas com alta especificidade de substrato. O resultado é um metabólico que poderá ser degradado posteriormente ou poderá ligar-se à matriz orgânica. Em alguns casos, o cometabolismo pode levar a um aumento temporário na taxa de degradação como, por exemplo, quando adiciona-se suplemento orgânico como restos vegetais ou lodo. As condições físicas e químicas favoráveis à atividade microbiana poderão resultar no aparecimento da biodegração (SILVA, 2001).

MUSUMECI (1992) cita, além da mineralização e do cometabolismo, dois outros mecanismos de detoxificação do solo: (a) *conjugação*: A molécula integral do xenobiótico (ou um seu metabólito) combina com compostos naturais do solo como os aminoácidos ou carboidratos. A formação do conjugado normalmente torna a molécula mais polar e assim mais hidrolisável; (b) *acúmulo*: O acúmulo de agrotóxico por microrganismos pode ocorrer por um processo ativo ou passivo e traz uma grande preocupação, uma vez que essa interferência microbiana significa apenas a remoção temporária da molécula tóxica. Compostos organoclorados como o DDT, dieldrin, aldrin e heptaclor foram detectados nas células de fungos do solo e no micélio de fungos cultivados em meio de cultura contendo esses compostos.

Vários são os mecanismos pelos quais ocorrem a seleção da microflora do solo que produzem populações capazes de acelerar a degradação de um pesticida. A adaptação se refere à mudança na comunidade microbiana que, por sua vez, incrementa a taxa de transformação de um dado composto como resultado de uma exposição prévia ao mesmo composto. Assim, áreas tratadas por dois ou mais anos consecutivos com o mesmo pesticida ou substâncias análogas podem apresentar uma biodegradação acelerada (MELO et al., 1999).

A seguir estão descritos os principais grupos de pesticidas e algumas de suas biodegradações relatadas por SCHRIJVER & MOT (1999).

*Organoclorados*: Foram os pesticidas pertencentes a esse grupo os mais usados na agricultura até a década de 1970. Entre os mais importantes pode-se

citar o DDT, aldrin e o dieldrin. Esse grupo tem como característica a longa permanência no meio ambiente, acarretando, dessa forma, perigo à saúde humana e animal.

*S-Triazinas:* As s-triazinas (triazinas simétricas) são herbicidas derivadas de nitrogênio heterocíclico. Membros desse grupo incluem simazina, propazina, cianazina, ametrina e prometrina. A atrazina tem se mostrado como o mais eficiente produto da família das s-triazinas. Ela tem sido a mais utilizada em todo mundo, especialmente em áreas de plantação de milho. O modo de ação desse herbicida é pela inibição no transporte de elétrons no processo de fotossíntese. Algumas bactérias que degradam s-triazina têm sido isoladas de solo, mas as culturas, quando no estado puro, muitas vezes falham na sua degradação.

*Triazinonas:* Metamitrom é um herbicida seletivo pré e pós emergente usado no controle de ervas daninhas das culturas da beterraba que inibe o transporte de elétrons no processo de fotossíntese. *Rhodococcus sp* (linhagem 0246b) utiliza metamitrom como fonte de carbono, mineralizando parcialmente essa molécula.

*Carbamatos:* Quimicamente, pesticidas carbamatos são ésteres de carbamatos. Esse grupo de pesticidas pode ser dividido em benzimidazol-N-metil-, N-fenil- e ditiocarbamatos. Eles podem ser aplicados como herbicidas, inseticidas e fungicidas. Na maioria dos casos, a degradação é iniciada pela clivagem da molécula de éster ligado.

*Organo-fosforado:* Os pesticidas organo-fosforados mais conhecidos são: paratiom, diazinom, malatiom e fenitrotiom. Essas moléculas têm larga atividade inseticida pela ação de inibição da acetilcolinesterase no sistema nervoso dos insetos. A hidrólise de origem microbiológica das ligações de P-O alquil ou P-O aril é considerado o melhor caminho de detoxicação de compostos organofosforados.

*Acetanilidas:* Herbicidas derivados de acetanilidas são geralmente usados para controle de ervas daninhas na plantação de milho, feijão, algodão, amendoim e outros grãos. Eles agem inibindo o crescimento das raízes. Os três maiores representantes de herbicidas do grupo acetanilidas são: alacloro, metalacloro e propalacloro. Até onde se conhece, não há descrição de culturas puras de

bactérias capazes de mineralizar completamente cloroacetamidas ou derivados sulfonados, e a biodegradação é realizada por cometabolismo primário.

*Sulfonilurías:* Estão incluídos neste grupo de herbicidas produtos como clorimurom etil, sulfometurom metil e clorosulfurom. A forma de atividade desse tipo de compostos se dá pela inibição da síntese de aminoácidos de cadeia ramificada. SCHRIJVER & MOT (1999) relataram a capacidade de representantes de *Streptomyces griseolus* (ATCC 11796) metabolizar esse herbicida. Essa capacidade está associada à atividade dos citocromos (P450, P450<sub>SU-1</sub> e P450<sub>SU-2</sub>).

## 2.7. Microrganismo com capacidade de degradar pesticidas

LOOS et al. (1967) demonstraram que uma linhagem de *Arthrobacter* é capaz de clivar a ligação éter do 2,4-D para produzir 2,4-diclorofenol, o qual é convertido em 3,5-Diclorocatecol, provavelmente pela enzima do citocromo P450.

HILL (1978) mostrou que após a aplicação do herbicida 2,4-D no solo, houve um período em que o produto permaneceu no solo na forma original e então a degradação ocorreu paulatinamente. Quanto mais aplicações do herbicida, mais rápida a sua degradação. Muitos são os trabalhos que mostram a ocorrência de fenômenos semelhantes com outros pesticidas, tais como dos grupos carbamatos, organofosforados e acetamidas (MONTEIRO, 1996).

REDDY et al. (1983) demonstraram que microrganismos foram capazes de clivar o anel do princípio ativo paration mais rapidamente em solos plantados com arroz do que em solos sem a presença dessa cultura.

KRUEGER et al. (1991) utilizaram linhagens de microrganismos isoladas da rizosfera de plantas resistentes, capazes de degradar o herbicida dicamba. Esses protegeram plantas susceptíveis na presença daquele herbicida em testes de laboratório e campo.

MANDELBAUM et al. (1995) citam uma linhagem de *Pseudomonas sp* capaz de degradar atrazina quando exposta a esse composto em altas concentrações (> 1000 µg mL<sup>-1</sup>), utilizando esse herbicida como única fonte de

nitrogênio. 80% do anel s-triazina (radiomarcada) foi transformado em CO<sub>2</sub> na presença desse microrganismo.

RODOSEVICH et al. (1995) isolaram de solos contaminados por atrazina uma bactéria capaz de degradar de 40 a 50% desse princípio ativo. Esse microrganismo é capaz de degradar aeróbica e anaerobicamente esse composto em meio contendo apenas atrazina, assim como, em meios contendo atrazina e glicose, assim como, quando a atrazina, a glicose e o nitrato estão presentes. A presença de ácido cianúrico indica que a degradação é decorrente da clivagem do anel da atrazina.

A contribuição da microfauna e microalgas do solo no que se refere à transformação dos herbicidas é incerta. São as bactérias e os fungos os principais responsáveis por essa transformação (MONTEIRO, 1996).

ALVEY & CROWLY (1996) trabalharam com um consórcio de três bactérias isoladas de solos agrícolas expostos a atrazina por um longo período e quando introduziram esse consórcio em um solo contaminado por atrazina observaram um significativo aumento na sua mineralização comparando com solo não inoculado. Por outro lado a porcentagem de atrazina mineralizada em solos com plantação e sem plantação de milho não houve diferença; no entanto, a população desse consórcio ficou maior no solo plantado.

KUMAR et al. (1996) citam algumas bactérias que apresentam plasmídios responsáveis pela degradação de pesticidas. Entre outras, *Pseudomonas putida*, *P. aeruginosa* sp, *Flavobacterium* sp, *Alcaligenes paradoxus*, *A. eutrophus* etc. Esses autores afirmam, ainda, que quando a propriedade de degradação de pesticidas está associada a um gene não cromossomal a manipulação genética se torna mais fácil.

Os actinomicetos são bactérias Gram positivas e, potencialmente, o grupo que oferece maior capacidade de biodegradação. Apresentam estrutura morfológica complexa, podendo se configurar na forma de cocos agregados ou mesmo na forma micelial. A presença de esporos assim como de mobilidade pode ser encontrada nesse grupo. A Tabela 1 mostra os principais gêneros pertencentes à ordem Actinomycetales e pesticidas degradados por eles.

Tabela 1. Principais Actinomicetos e pesticidas degradados por eles

<b>Gênero</b>	<b>Composto degradado</b>
<i>Arthrobacter</i>	PCP; fenoacetatos; organoclorados, triazinonas; N-metilcarbomato; N-fenilcarbomato; organosfosfados e glifosato
<i>Brevibacterium</i>	Fenilacetatos
<i>Clavibacter</i>	Organoclorados e s-triazinonas
<i>Corynebacterium</i>	Tiocarbomato
<i>Mycobacterium</i>	PCP e organoclorados
<i>Nocardia</i>	Organoclorados

Fonte: STACKEBRANDT et al. (1997)

TILBURY (1999) descreve uma linhagem de bactéria capaz de degradar atrazina. Essa foi isolada de lençóis de águas contaminados por esse composto. Essa bactéria foi identificada como *Pseudomonas citronellolis*, sendo capaz de degradar atrazinas, mineralizando esse composto.

O uso dos herbicidas mono-di-triclorofenoxiacetatos como única fonte de carbono e energia tem sido demonstrado em espécies de *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, e *Nocardioides*. Em linhagem de *Brevibacterium*, cometabolismo tem sido relatado por (SCHRIJVER & MOT1999).

*Phanerochaete chrysosporium* é um fungo reconhecido por sua capacidade de metabolizar uma larga gama de compostos. MENDOZA-CANTU et al. (2000) estudaram a capacidade desse fungo em degradar PCP (pentaclorofenol) em solos. Os autores sugerem que esse microrganismo é capaz de degradar altos níveis de PCP em curto período de tempo, sem a geração de outros compostos tóxicos.

EL BESTAWY et al. (2002) estudaram o potencial de quatro diferentes espécies de representantes do gênero *Bacillus* em degradar quatro pesticidas clorados. Os resultados mostram que todos as linhagens de *Bacillus* testadas (*B.*

*licheniformis*; *B. alvei* ; *B. sphaericus* e *B. cereus*) foram capazes de degradar rapidamente os quatro compostos testados. *B. cereus* se mostrou o mais eficiente entre os quatro, seguido de *B. alvei* , *B. licheniformis* e *B. sphaericus*.

ZHANG & QIAO (2002) discutem o uso do microrganismo, assim como de enzimas livres, no processo de biorremediação dos pesticidas. Eles preconizam a utilização de enzimas isoladas no lugar dos microrganismos. A argumentação desses pesquisadores reside no fato de que os microrganismos, especialmente os geneticamente modificados, quando liberados no meio ambiente, escapam do controle, podendo promover danos ao meio ambiente.

Embora muitos microrganismos capazes de degradar pesticidas tenham sido isolados, pouco se conhece sobre gene ou genes responsáveis por tal capacidade. A maioria dos genes que conferem essa propriedade aos microrganismos estão localizados no cromossomo; entretanto, alguns deles podem ser encontrados em plasmídios (moléculas de DNA circulares) ou em transposon (fragmentos móveis de DNA linear, capazes de se inserirem em diferentes pontos do cromossomo).

## **2.8. Isolamento de microrganismos biodegradadores**

Os fatores ambientais abióticos que podem atuar na atividade microbiana afetam, portanto, a degradação de pesticidas no solo. É possível, assim, obter microrganismos com potencial para degradar um determinado composto xenobiótico em solos virgens. No entanto, é de se esperar que em solos contaminados os microrganismos possam ser selecionados, apresentando a capacidade de utilizar o composto como fonte de energia para seu metabolismo.

Os estudos relativos às enzimas envolvidas no processo de biodegradabilidade auxiliam a estabelecer correlações sobre estrutura-biodegradabilidade. Também o isolamento pode explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo no ambiente; se catabólica (mineralização) ou cometabólica. Na mineralização, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores que, posteriormente, serão metabolizadas por reações que geram energia. Consequentemente, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a

---

concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana.

As populações de microrganismos degradadores de pesticidas representam uma pequena fração da população total. Partindo-se do princípio de que as populações microbianas capazes de metabolizar um determinado xenobiótico são encontradas em baixa frequência, estratégias especiais de isolamento devem ser adotadas para maximizar as chances de sucesso. São coletadas amostras de solos, água, sedimentos ou outras áreas contaminadas onde possam existir microrganismos degradadores. Um caminho rápido e direto é partir para o isolamento seletivo de um determinado grupo de microrganismos, que já tenham sido testados como potentes agentes degradadores. A comunidade microbiana, o número e tipos de microrganismos presentes num solo em particular dependem: dos tipos de solo, pH, conteúdo de matéria orgânica, cultivo, aeração e umidade.

ROQUE (2000) fez uso de meio mineral suplementado com diuron para isolamento de microrganismos habitantes do solo de plantio de cana-de-açúcar que apresentaram capacidade de decompor aquele produto. Esse autor conclui que solos provenientes da rizosfera de cana-de-açúcar são os que apresentam o maior número de microrganismos promissores quanto a degradação de diuron.

Como a biodegradação de muitos pesticidas tem sido aumentada na presença de raízes de plantas e exsudados de raízes (HSU & BARTHA, 1979) devido à grande biomassa e atividade microbiana, em função de substratos de carbono fornecidos pela rizodeposição, é possível, sem dúvida, amostrar solos rizosféricos à procura de microrganismos degradadores. Na rizosfera, análogos estruturais de vários xenobióticos presentes em exsudados, componentes de paredes celulares e lisados, assim como produtos secundários da decomposição desses materiais, podem ser seletivos para microrganismos que metabolizam ou cometabolizam estes compostos xenobióticos.

HSU & BARTHA (1979) relataram que a presença de plantas ou a irrigação de solo com exsudados de raízes aumentaram a taxa de mineralização do princípio ativo paration em comparação a solo não cultivado. Em outro estudo (SANDMANN & LOOS, 1984), encontraram taxas mais elevadas de

microrganismos degradadores de 2,4-D em solos da rizosfera de sua planta do que em solos não-rizosféricos. Os autores explicam que os degradadores de 2,4-D parecem ter sido seletivamente favorecidos na rizosfera de cana-de-açúcar.

Altas concentrações no solo podem tornar um produto biodegradável em persistente. Por exemplo, alacloro na dose de 3,36 Kg i.a./ha teve uma vida média de 2-4 semanas (SHARP, 1988). Entretanto, alacloro em altas concentrações (100 a 1000µg/mL) se mostrou persistente no solo (FELSOT & DZANTOR, 1990).

Há evidências que o tempo de residência do resíduo de um pesticida no solo influencia sua persistência. Quanto mais tempo após sua aplicação, mais resistente ele se torna para degradação (BOLLAG, 1992). Essa resistência pode ser resultado da redistribuição do herbicida de fracos para fortes sítios de ligação ou incorporação lenta do produto ao húmus. Os complexos mais persistentes resultam de ligações covalentes do produto ao material químico.

Mesmo aplicações continuadas de pesticidas análogos com moléculas estruturalmente similares podem induzir à degradação acelerada de outros compostos. A capacidade de populações microbianas que apresentem degradação acelerada relativa a um composto degradarem um composto similar tem sido chamada de adaptação cruzada. (RACKE & COATS, 1990).

## 2.9. O diclosulam

A molécula do diclosulam se apresenta como N-[2,6-diclorofenol]-5-etoxi-7-fluoro(1,2,4)triazolo-[1,5c]-pirimidina-2-sulfonilida, sendo um herbicida do grupo Triazo pirimidina sulfonilida (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998). A Figura 2 contém a fórmula estrutural da molécula.

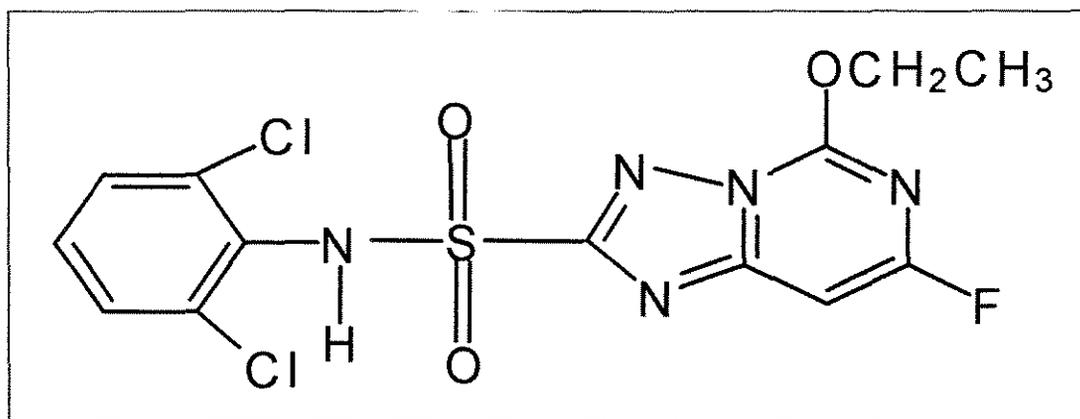


Figura 2. Fórmula estrutural do diclosulam.

### Características do produto puro:

Solubilidade em água:	124µg/mL a pH 7,0; 117 µg/mL a pH 5,0
Pressão de vapor:	$5 \times 10^{-15}$ mmHg a 25° C
pKa:	4,09
Temperatura de decomposição:	218°C

### Características do produto formulado:

Concentração:	42 g de produto comercial/ha (35 g de ingrediente ativo/ha em pós plantio e pré emergência total).
Inflamabilidade:	não inflamável
Corrosividade:	não corrosivo
Estabilidade de armazenagem:	estável sob condições normais de armazenamento.
Gormulação:	grânulos dispersíveis em água
Classe toxicológica:	II (altamente tóxica)

Esse produto sistêmico aplicado ao solo PPI/Pré (pré-plantio incorporado ou pré emergência), no plantio direto e convencional é indicado para o controle de plantas daninhas de folhas largas, inibindo a enzima acetolactato sintase (ALS). Esta enzima, que ocorre em todas as partes das plantas, atua na síntese de alguns aminoácidos essenciais para o desenvolvimento das mesmas. O diclosulam atua nas plantas daninhas após ser absorvido e trasladado para os pontos de crescimento (meristemas) localizados tanto na parte aérea como nas raízes. Durante o processo de germinação e emergência, as plântulas absorvem o herbicida pelas raízes, pelo caulículo e pelos cotilédones, que entram em contato com as moléculas do herbicida que estão disponíveis no solo. Muitas plantas sensíveis ao produto chegam a emergir, mas estas, ao iniciarem o processo de desenvolvimento ou crescimento vegetativo, já apresentam sintomas ou danos bastante acentuados e morrem após alguns dias; algumas plantas nem mesmo emergem (DOW AGROSCIENCES, 1999).

Esse herbicida no Brasil tem sido usado em lavouras de soja para o controle de plantas daninhas. Assim como outros produtos utilizados para esse controle (imazaquin e imazethapyr), o diclosulam apresenta longo efeito residual (BRIGHENTI et al., 2002).

YODER et al. (2000), quando trabalharam com os nove diferentes solos dos três diferentes países (Estados Unidos, Brasil e Argentina) para avaliar a taxa de degradação e os produtos formados após aplicação de diclosulam, obtiveram resultados em condições de laboratório que mostraram que o diclosulam se degrada rapidamente, apresentando um  $DT_{50}$  médio menor que 30 dias. Os resultados obtidos no campo levaram os autores a afirmar que as modificações naturais (radiação solar, umidade e temperatura) contribuem para dissipação do diclosulam e que o acúmulo desse produto no meio ambiente é pouco provável. No que diz respeito aos produtos terminais encontrados, os autores relataram a presença de  $CO_2$  mineralizado e resíduo ligado, dentre os solos estudados constataram que em Cascavel, após 140 dias, existia 30,8% de resíduo de diclosulam, 43,4% ligado e 1,9%  $Co_2$  e em Londrina 13,5%, 50,3% e 8,9% respectivamente.

Segundo ZABIK et al. (2001), a degradação do diclosulam foi rápida com meia-vida de 13 a 43 dias em quatro localidades estudadas nos Estados Unidos. A rápida degradação e o aumento da adsorção no solo com o passar do tempo é resultado da baixa persistência e mobilidade desse composto. Os parâmetros ambientais que podem influenciar na degradação do diclosulam no solo aparentam ser pela atividade microbiana e degradação hidrolítica ( $\text{pH} > 7$ ).

BRIGHENTI et al. (2002), avaliando o efeito residual dos herbicidas imazaquim, imazetapir e diclosulam na cultura do girassol em sucessão ao cultivo da soja, constataram que o girassol semeado aos 90 e aos 75 dias após a aplicação do imazaquim e do imazetapir na cultura de soja (respectivamente), não apresentou sintomas de fitotoxicidade. Por outro lado, a aplicação de diclosulam causa redução total da produtividade de girassol nas duas épocas de semeadura. A lesão causada pelos herbicidas ao girassol, observada na produtividade da cultura, é maior em ordem decrescente de fitotoxicidade para os herbicidas diclosulam, imazaquim e imazetapir.

A EMPRAPA (1999) recomenda um período mínimo de dezoito meses entre sua aplicação e a semeadura do girassol.

Segundo boletim técnico Dow (1998) a plantação de soja depois de ter recebido o diclosulam como herbicida não poderá ser rotacionada com as seguintes culturas de outono, plantadas imediatamente após a colheita: milho, girassol, sorgo e brássicas. O girassol poderá ser plantado 18 meses após a colheita da soja.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os trabalhos de pesquisa desta tese foram realizados nos laboratórios de Análises de Resíduos de Pesticidas e Biotecnologia de Processos do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da UNICAMP, localizado na Rua Alexandre Cazelatto 999, Vila Betel – Paulínia, no Estado de São Paulo.

#### 3.1. Composto estudado

O composto estudado para esta tese foi o diclosulam, comercializado pela Dow AgroSciences Indústria Ltda., com o nome Spider 840 GRDA. Esse é utilizado como herbicida pós e pré emergente em cultura de soja.

#### 3.2. Solos amostrados

As amostras de solos utilizadas para isolamento de microrganismos foram coletadas pelos agrônomos da Dow AgroSciences Ind. Ltda. em três diferentes regiões que fazem uso freqüente do Spider 840 GRDA, a saber:

- |                 |              |
|-----------------|--------------|
| a) Uberlândia   | Minas Gerais |
| b) Londrina     | Paraná       |
| c) Rondonópolis | Mato Grosso  |

A Tabela 3 mostra as características de cada um dos solos estudados .

Todas as regiões onde foram realizadas as coletas de solo receberam aplicação do Spider 840 GRDA (diclosulam), em pós-plantio e pré-emergência total, na concentração de 42 g de produto comercial/ha (35g de ingrediente ativo/ha). Foram utilizadas duas porções do solo: das entrelinhas e da rizosfera da

planta. Os solos amostrados foram analisados quanto a presença de resíduos de diclosulam sendo que os resultados obtidos se encontram na Tabela 2.

Tabela 2. Resultados analíticos das concentrações de resíduos de diclosulam nas amostras de solo.

<b>Localidade</b>	<b>Amostra</b>	<b>diclosulam (mg/Kg)</b>
Uberlândia	Rizosfera	N.D.
Uberlândia	Entre linhas	N.D.
Uberlândia	Mata virgem	N.D.
Londrina	Rizosfera	N.D.
Londrina	Entre linhas	N.D.
Londrina	Mata virgem	N.D.
Rondonópolis	Rizosfera	<0,01
Rondonópolis	Entre linhas	N.D.
Rondonópolis	Mata virgem	N.D.

Análises realizadas pela Dow AgroSciences Indústria Ltda.  
N.D. (não detectado)

Microrganismos provenientes de amostras de solos de matas virgens das três regiões, isto é, sem aplicação do Spider 840 GRDA, também foram isolados. As amostras de solo de entrelinhas foram coletadas nos primeiros 10 cm da superfície, nas entrelinhas da cultura. A amostra utilizada correspondeu a uma mistura de 6 sub-amostras de 1000g cada.

As amostras de solo correspondentes a rizosfera foram coletadas removendo-se o solo aderido às raízes das plantas de soja. Foram colhidas 6 sub-amostras cada uma constituída de 30 plantas.

As amostras de solo de mata virgem foram coletadas 10 cm abaixo da superfície em áreas de mata de vegetação natural próximas daquelas onde foram coletadas as amostras das áreas cultivadas. Foram recolhidas 6 sub-amostras de 1000 g de cada área estudada.

Todas as amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos transparentes e enviadas para os laboratórios do CPQBA/UNICAMP em caixas

térmicas. O tempo decorrido entre a coleta e a chegada das amostras no CPQBA variou de 24 a 32 horas, dependendo da facilidade de transporte de cada região.

Cada uma das amostras plaqueadas corresponde a uma homogeneização e peneiramento das 6 sub-amostras coletadas em cada um dos pontos. No final desse procedimento obteve-se amostras de 50 g cada, as quais foram mantidas sob refrigeração (4°C).

Tabela 3. Características dos solos utilizados no estudo.

Determinação	Procedência do solo		
	Rondonópolis	Londrina	Uberlândia
% argila *	45,0	70,0	17,5
% silte *	12,5	23,1	4,9
% areia grossa *	23,2	2,5	38,3
% areia fina *	19,3	4,4	39,3
% areia total*	42,5	6,9	77,6
matéria orgânica **	34	31	17
pH **	5,5	5,1	5,1
Fósforo resina (mg/dm <sup>3</sup> ) **	38	49	26
Potássio (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) **	4,4	4,1	2,1
cálcio (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> )	33	38	17
Magnésio (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) **	11	12	7
ac. Potencial (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) **	28	42	25
soma bases (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) **	48,4	54,1	26,1
cap. Troca cat (mmol <sub>c</sub> /dm <sup>3</sup> ) **	76,2	96,4	51,1
sat. Bases (%) **	64	56	51
boro (mg/dm <sup>3</sup> ) **	0,30	0,26	0,19
cobre (mg/dm <sup>3</sup> ) **	1,8	12,1	0,8
ferro (mg/dm <sup>3</sup> ) **	30	19	46
Manganês (mg/dm <sup>3</sup> ) **	2,1	154,8	2,4
zinco (mg/dm <sup>3</sup> ) **	4,7	1,8	1,1

\* Análises realizadas pelo IAC – Centro de Solos e Recursos Agroambientais – Laboratório de Física do Solo.

\*\* Análises realizadas pelo IAC – FUNDAG

### 3.3. Isolamento dos microrganismos

A técnica relatada a seguir foi utilizada para cada uma das 9 amostras coletadas. 10 g de amostra foram transferidas para frasco Erlenmeyer contendo 90 ml de água destilada estéril. Estes microrganismos foram incubados por 30 minutos a  $150 \pm 5$  rpm em shaker giratório para que todos os microrganismos aderidos às partículas de solo fossem recuperados. Desse frasco foram feitas diluições em água esterilizada até que a diluição  $10^5$  fosse atingida.

As diluições  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  e  $10^5$  foram transferidas para placas contendo os seguintes meios de cultivo:

- (a) *Meio Mínimo* :  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36$  g/L;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4$  g/L;  $\text{MgSO}_4 = 0,25$  g/L;  $\text{KCl} = 0,02$  g/L;  $\text{NaCl} = 0,2$  g/L;  $\text{NH}_4\text{Cl} = 0,75$ ; Agar = 20 g/L.
- (b) *Meio Mínimo* + 10  $\mu\text{g/mL}$  de diclosulam.
- (c) *King's B* (para isolamento de bactérias fluorescentes): Peptona 10g/L;  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 1,5$  g/L;  $\text{MgSO}_4 = 1,5$  g/L; Glicerol = 10 g/L; Agar = 20 g/L.
- (d) *King's B* + 10  $\mu\text{g/mL}$  de diclosulam.
- (e) *Rosa de Bengala* (para isolamento de fungo) - Difco – Artigo 218312.
- (f) *Rosa de Bengala* + 10  $\mu\text{g/mL}$  de diclosulam.

A técnica utilizada foi a de espalhamento de 0,1 ml de suspensão em cada uma das placas com auxílio de alça de Drigalsky (plaqueamento em superfície). Os microrganismos foram então incubados por 4 dias em estufa com temperatura de  $32 \pm 1$  °C.

### 3.4. Seleção dos microrganismos potencialmente degradadores do diclosulam

Nessa etapa do trabalho o objetivo foi o de selecionar, entre as linhagens isoladas, aquelas que têm capacidade de crescer na presença de doses elevadas do diclosulam. Para isso foram estudados os microrganismos que apresentaram

crescimento em qualquer um dos três meios, adicionados de diclosulam (mínimo, King's B e Rosa de Bengala).

Os microrganismos foram transferidos para os meios, os quais foram originalmente isolados (mínimo, King's B e Rosa de Bengala) adicionados de 100 µg/mL de diclosulam. Os que foram capazes de crescer a essa concentração do composto foram transferidos para o mesmo meio de origem, agora adicionado de 500 µg/mL de diclosulam. Os microrganismos foram incubados em estufas a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  por 4 dias.

As linhagens que foram capazes de crescer na condição de 500 e 100 µg/mL de diclosulam foram transferidas para tubos inclinados contendo meio King's B, crescidas por 24 horas em estufas a  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  e, então, recobertas com óleo mineral e conservados em geladeira a  $4^\circ\text{C}$ .

### **3.5. Utilização do diclosulam como única fonte de carbono e nitrogênio pelas linhagens selecionadas.**

Nessa etapa do trabalho o objetivo foi determinar se as linhagens selecionadas eram capazes de utilizar o diclosulam como única fonte de carbono e nitrogênio.

***Diclosulam como única fonte de carbono:*** As fermentações foram conduzidas, em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 90 mL de meio de fermentação com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} = 5 \text{ g/L}$ , adicionados com 100 µg/mL de diclosulam. O inóculo foi produzido pela suspensão em água esterilizada, dos microrganismos crescidos em meio King's B por 24 horas a  $32^\circ\text{C}$ . As células em suspensão foram adicionadas em volume igual a 10 ml nos frascos de fermentação. Os microrganismos foram incubados até 144 horas a  $32^\circ\text{C}$  /150 rpm.

Amostras foram retiradas nas horas 0 e 144 para determinação do crescimento microbiano utilizando metodologia de massa celular. Análise da massa celular produzida no inóculo também foi realizada.

**Diclosulam como única fonte de nitrogênio:** As fermentações foram conduzidas, em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 90 mL de meio de fermentação com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ; Glicose = 20 g/L, adicionados com 100  $\mu\text{g/mL}$  de diclosulam. O inóculo foi produzido pela suspensão em água esterilizada, dos microrganismos crescidos em meio King's B por 24 horas a 32°C. As células em suspensão foram adicionadas em volume igual a 10 ml nos frascos de fermentação. Os microrganismos foram incubados até 144 horas a 32 °C /150 rpm.

Amostras foram retiradas nas horas 0 e 144 para determinação do crescimento microbiano utilizando metodologia de massa celular. Análise da massa celular produzida no inóculo também foi realizada.

### **3.6. Avaliação da degradação do diclosulam por cometabolismo**

O objetivo dessa fase foi a de determinar se as linhagens selecionadas eram capazes de utilizar o diclosulam por cometabolismo, isto é, utilizar a molécula sem que ocorresse ganho de energia ou crescimento para o microrganismo. Para isso as fermentações foram conduzidas em meio contendo, além de uma fonte de carbono e nitrogênio, o diclosulam.

As fermentações foram conduzidas, em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 90 mL de meio de fermentação com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} = 5 \text{ g/L}$  com adição de 20 g/L de glicose, 5 g/L de extrato de levedura e 100  $\mu\text{g/mL}$  de diclosulam. O inóculo foi produzido pela suspensão em água esterilizada, dos microrganismos crescidos em meio King's B por 24 horas a 32°C. As células em suspensão foram adicionadas em volume igual a 10 ml nos frascos de fermentação. Os microrganismos foram incubados até 144 horas a 32 °C /150 rpm.

Amostras foram retiradas no tempo 0, 24, 48 e 72 horas para a determinação de massa celular, concentração de diclosulam e concentração de glicose.

Para avaliar a capacidade de degradação de diclosulam de cada linhagem, foram utilizados os seguintes parâmetros: Massa celular produzida (MCP), Massa de glicose consumida (MGC), Massa de diclosulam degradado (MDD), Rendimento em célula ( $Y_{X/S}$ ), Velocidade de degradação de diclosulam (VDD) e Degradação específica de diclosulam (DED). Estes parâmetros foram determinados através de balanço de massa, onde cada Erlenmeyer foi pesado vazio (FV), com meio após esterilização (FAE), após inoculação (FI) e no final da fermentação (FF). Com esses dados e as concentrações de glicose e diclosulam no início e no final do ensaio, e a concentração de células no inóculo e no final do ensaio, foi possível calcular esses parâmetros, como descrito na Tabela 4. Para efeito de cálculo da velocidade de degradação do diclosulam, foi considerado como tempo final de ensaio aquele que apresentou concentração de glicose igual a zero. Nos casos onde o consumo de glicose não foi total, este tempo foi considerado 72 horas.

Tabela 4. Definições dos parâmetros de desempenho das linhagens estudadas.

<b>Símbolo</b>	<b>Nomenclatura</b>	<b>Equação</b>	<b>Unidade</b>
<i>FV</i>	Massa do frasco vazio	-	G
<i>FAE</i>	Massa do frasco com meio esterilizado	-	G
<i>FI</i>	Massa do frasco inoculado	-	G
<i>FF</i>	Massa do frasco final	-	G
<i>MM</i>	Massa de meio esterilizado	$FAE - FV$	G
<i>MI</i>	Massa de inóculo	$FI - FAE$	G
<i>MF</i>	Massa de meio final	$FF - FV$	G
<i>CIG</i>	Concentração inicial de glicose	-	g/g
<i>CFG</i>	Concentração final de glicose	-	g/g
<i>MIG</i>	Massa inicial de glicose	$MM \times CIG$	G
<i>MFG</i>	Massa final de glicose	$MF \times CFG$	G
<i>MGC</i>	Massa de glicose consumida	$MIG - MFG$	G
<i>CCI</i>	Concentração de células no inóculo	-	g/g
<i>CCF</i>	Concentração de células final	-	g/g
<i>MCI</i>	Massa de células inóculo	$MI \times CCI$	G
<i>MCF</i>	Massa de células final	$MF \times CCF$	G
<i>MCP</i>	Massa de células produzida	$MCF - MCI$	G
<i>CDI</i>	Concentração de diclosulam inicial	-	mg/g
<i>CDF</i>	Concentração de diclosulam final	-	mg/g
<i>MDI</i>	Massa de diclosulam inicial	$MM \times CDI$	G
<i>MDF</i>	Massa de diclosulam final	$MF \times CDF$	G
<i>MDD</i>	Massa de diclosulam degradado	$MDF - MDI$	Mg
<i>TTE</i>	Tempo total de ensaio	-	H
$Y_{X/S}$	Rendimento em célula	$MCP \div MGC$	g/g
<i>VCD</i>	Velocidade da degradação do diclosulam	$MDD \div TTE$	mg/h
<i>DED</i>	Degradação específica do diclosulam	$MDD \div MCP$	g/g MS

### **3.7. Crescimento das linhagens em diferentes fontes de carbono**

Nessa fase do trabalho foi testada a capacidade das linhagens selecionadas de crescerem em duas diferentes fontes de carbono: frutose e sacarose.

As fermentações foram conduzidas, em triplicata, em frascos Erlenmeyers de 250 mL de capacidade contendo 90 mL de meio de fermentação com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} = 5 \text{ g/L} + 20\text{g/L}$  de sacarose no caso do teste para esse açúcar. O mesmo protocolo foi seguido no caso da fermentação conduzida com frutose, em que 20 g/L desse açúcar foi adicionado em lugar da sacarose. O inóculo foi produzido pela suspensão em água esterilizada, dos microrganismos crescidos em meio King's B por 24 horas a 32°C. As células em suspensão foram adicionadas em volume igual a 10 mL nos frascos de fermentação. Os microrganismos foram incubados até 144 horas a 32°C /150 rpm.

Amostras foram retiradas nos tempos 0, 24, 48, 72 horas para determinação de concentrações de sacarose e frutose em seus respectivos meios e massa celular.

### **3.8. Otimização do meio de produção de biomassa.**

Para a otimização do meio de produção, utilizou-se a metodologia de planejamento experimental fatorial de dois níveis: completo e configuração tipo estrela. As variáveis estudadas foram: (a) concentração de sacarose e (b) extrato de levedura, sendo a variável resposta a produção de massa celular. As faixas das variáveis estudadas estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5. Faixa das variáveis estudadas.

<b>Variáveis</b>	<b>-1</b>	<b>0</b>	<b>+1</b>
<i>Sacarose</i>	20 g/L	30 g/L	40 g/L
<i>Extrato de levedura</i>	3 g/L	5 g/L	7 g/L

A Tabela acima mostra os ensaios realizados segundo a metodologia de planejamento experimental.

Tabela 6. Descrição dos ensaios segundo metodologia de planejamento fatorial de dois níveis: completo e configuração estrela.

<b>Ensaio</b>	<b>Codificado</b>		<b>Descodificado</b>	
	Sacarose	Extrato Levedura	Sacarose (g/L)	Extrato Levedura (g/L)
1	+1	+1	40	7
2	+1	-1	40	3
3	-1	+1	20	7
4	-1	-1	20	3
5	0	0	30	5
6	0	0	30	5
7	0	0	30	5
8	+1,41	0	44,1	5
9	-1,41	0	15,9	5
10	0	+1,41	30	7,82
11	0	-1,41	30	2,18

As fermentações foram conduzidas em frascos Erlenmeyers de 500 mL de capacidade contendo 190 mL de meio de fermentação basal com a seguinte

composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl} = 5 \text{ g/L}$ . As quantidades de sacarose e extrato de levedura foram adicionadas seguindo as concentrações descritas na Tabela 6.

O inóculo foi preparado pela suspensão em água esterilizada, dos microrganismos crescidos em meio King's B por 24 horas a  $32^\circ\text{C}$ . As suspensões foram adicionadas em volume igual a 10 mL nos frascos de fermentação. Os microrganismos foram incubados por 24 horas a  $32^\circ\text{C}/150 \text{ rpm}$ . Amostras foram retiradas no final do ensaio para a determinação de massa celular produzida e concentração de glicose, frutose e sacarose. Os resultados obtidos foram analisados através do método de superfície de resposta, utilizando o programa STATISTIC 5.0.

### 3.9. Teste em reator de bancada

Esse teste foi conduzido com a linhagem que apresentou os melhores resultados quanto a capacidade de degradar o diclosulam nas etapas anteriores desse estudo. Para este ensaio foi utilizado um reator de vidro com capacidade de 6 litros, com sistema de agitação mecânica. O controle de temperatura foi feito por recirculação de água no interior do reator proveniente de um banho termostatizado. O fluxo de ar foi mantido manualmente através da manipulação de uma válvula acoplada a um rotâmetro.

A etapa de obtenção do inóculo foi conduzida em 2 fases. O primeiro inóculo foi produzido pela suspensão em água esterilizada, do microrganismo crescido em meio King's B por 24 horas a  $32^\circ\text{C}$ . A suspensão foi adicionada em volume igual a 10 mL em 5 frascos Erlenmeyer contendo 100 mL de meio de fermentação com a seguinte composição: 40 g/L de sacarose e 5 g/L de extrato de levedura. Os microrganismos foram incubados em "shaker" rotatório a 150 rpm e  $32^\circ\text{C}$  por 16 horas. A partir da obtenção do crescimento nos 5 frascos de fermentação foi produzido um único inóculo atingindo um volume final de 500 mL. A transferência do inóculo para o reator foi feita com auxílio de uma bomba peristáltica com volume de meio de 5000mL com a seguinte composição:  $\text{KH}_2\text{PO}_4 = 0,36 \text{ g/L}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4 = 1,4 \text{ g/L}$ ;  $\text{MgSO}_4 = 0,25 \text{ g/L}$ ;  $\text{KCl} = 0,02 \text{ g/L}$ ;  $\text{NaCl} = 0,2 \text{ g/L}$ ;

$\text{NH}_4\text{Cl}$  = 5 g/L 40 g/L de sacarose e 7 g/L de extrato de levedura. As condições de fermentação foram: a vazão de ar 5,5 L/min, 32°C, 250 rpm por 24 horas. Amostras foram recolhidas em intervalos de 1 hora para a determinação de sacarose, glicose, frutose e massa celular.

### 3.10. Identificação das linhagens

Foram identificadas 4 das linhagens isoladas. Com intuito de se tentar identificar as linhagens lançou-se mão de dois diferentes métodos: um independente das condições de cultivo (sequenciamento de fragmentos do gene rRNA 16S) e o outro dependente das condições de cultivo (perfil da composição de ácidos graxos). O primeiro foi realizado pela Divisão de Recursos Microbianos - CPQBA/UNICAMP e o segundo EMBRAPA - Meio Ambiente - Laboratório de Microbiologia Ambiental - Jaguariúna - SP.

### 3.11. Metodologia analítica

#### 3.11.1. Dosagem de diclosulam

As análises de diclosulam em meios de cultura e água foram realizadas em um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência nas seguintes condições:

Bomba isocrática:	HP-1500
Detector Shimatzo Ultra violeta:	$\lambda=254$ nm
Coluna:	Phenomenex, Luna C18, 5 $\mu$
Eluente:	acetonitrila/água 90:10 e 1% de ácido acético
Fluxo:	0,5 mL/min

Tabela 11. Número de colônias selecionadas das amostras provenientes de Londrina, capazes de crescer nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL de diclosulam.

<b>Rizosfera</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	32	6	0
<i>King's B</i>	210	33	não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	13	13	não testado
<b>Entrelinhas</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	25	8	1
<i>King's B</i>	119	21	não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	25	17	não testado
<b>Solo virgem</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	12	6	3
<i>King's B</i>	21	9	não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	20	4	não testado

Observa-se pela Tabela 10 que para a localidade de Uberlândia 16 colônias de solo da rizosfera foram capazes de crescer em meio suplementado com 500 µg/mL de diclosulam, das quais 4 foram escolhidas aleatoriamente para serem testadas. Pela Tabela 11, nota-se que nenhuma colônia isolada do solo da rizosfera da localidade de Londrina cresceu em meio suplementado com 500 µg/mL de diclosulam. No entanto, 6 colônias cresceram em meio suplementado com 100 µg/mL de diclosulam, sendo, então, 3 delas selecionadas aleatoriamente para serem testadas. Este procedimento teve como objetivo possibilitar que linhagens isoladas das 3 regiões fossem testadas.

Tabela 12. Número de colônias selecionadas das amostras provenientes de Rondonópolis, capazes de crescer nas concentrações de 10, 100 e 500 µg/mL de diclosulam.

<b>Rizosfera</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	61	12	3
<i>King's B</i>	42	6	não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	12	8	não testado
<b>Entrelinhas</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	95	9	0
<i>King's B</i>	123	6	Não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	6	2	Não testado
<b>Solo virgem</b>			
<b>Meio de Origem</b>	<b>10 µg/mL diclosulam</b>	<b>100 µg/mL diclosulam</b>	<b>500 µg/mL diclosulam</b>
<i>Mínimo</i>	53	12	5
<i>King's B</i>	40	12	Não testado
<i>Rosa de Bengala</i>	9	8	Não testado

Conforme a Tabela 12, observa-se que 3 colônias isoladas de solo da rizosfera da localidade de Rondonópolis foram capazes de crescer em meio suplementado com diclosulam em concentração de 500 µg/mL, sendo todas elas selecionadas para serem testadas.

### 4.3. Teste de assimilação do diclosulam

#### 4.3.1. Diclosulam como única fonte de carbono

A Tabela 13 mostra os resultados da concentração de massa celular no inóculo, no final da fermentação, e a massa celular produzida para cada linhagem testada, em meio cuja única fonte de carbono disponível foi o diclosulam.

Tabela 13. Resultados médios de crescimento microbiano em meios contendo diclosulam como única fonte de carbono.

Linhagem	Massa celular inóculo (g/L)	Massa celular final (g/L)	Massa produzida (g)
Uberlândia L1 (UL1)	0,0024	0,00021	-0,00165
Uberlândia L2 (UL2)	0,0028	0,00024	-0,00024
Uberlândia L3 (UL3)	0,0021	0,00019	-0,00079
Uberlândia L4 (UL4)	0,0024	0,00023	0,00049
Londrina L1 (LL1)	0,0028	0,00022	-0,00423
Londrina L2 (LL2)	0,0030	0,00026	-0,00198
Londrina L3 (LL3)	0,0027	0,00025	0
Rondonópolis L1 (RL1)	0,0029	0,00026	-0,00124
Rondonópolis L2 (RL2)	0,0023	0,00024	0,00250
Rondonópolis L3 (RL3)	0,0028	0,00026	-0,00260

Observa-se, pelos resultados contidos na Tabela 13, que a produção de massa celular foi negativa para praticamente todas as linhagens. Este fato pode ser explicado dada a precisão da metodologia utilizada, que provavelmente não possuía sensibilidade suficiente para detectar o aumento da massa celular, já que esta, se existiu, foi muito pequena devido à baixa concentração da fonte de carbono (diclosulam). Desta forma não se pode afirmar que o microrganismo cresce ou não com diclosulam como única fonte de carbono.

Para que essas dúvidas pudessem ser eliminadas, escolheu-se de forma aleatória uma das linhagens (UL1) e repetiu-se esse ensaio 4 vezes, analisando a concentração de diclosulam nos tempos 0, 48 e 96. Para comparação, o mesmo ensaio foi realizado com meios contendo glicose. A Tabela 14 mostra os resultados obtidos nesses ensaios.

Tabela 14. Concentração do diclosulam nos tempos 0, 48 e 96 horas de ensaio para o teste de degradação com a cepa UL1 em meios com e sem adição de glicose.

Tempo (h)	Com adição de glicose	Sem adição de glicose
	Concentração de diclosulam (µg/mL)	Concentração de diclosulam (µg/mL)
0	31,54	66,20
0	39,02	74,90
0	27,69	66,82
0	22,69	69,59
Média	30,24	69,38
48	21,56	77,64
48	22,86	69,96
48	16,33	70,10
48	13,82	84,33
Média	18,64	75,50
96	16,84	69,38
96	18,21	74,76
96	17,32	76,04
96	16,19	72,51
Média	17,14	73,17

Apesar de se observar variações nas repetições, nota-se que as concentrações médias de diclosulam nos ensaios realizados com adição de glicose sofreram uma redução com o decorrer do tempo de ensaio, o que não foi observado nos ensaios sem glicose. Esse fato nos permite afirmar que a linhagem UL1 não utiliza o diclosulam como fonte de carbono, mas tem capacidade de

degradação do mesmo quando cresce em meio com fonte de carbono e nitrogênio, indicando assim uma degradação cometabólica.

#### 4.3.2. Diclosulam como única fonte de nitrogênio

A Tabela 15 mostra os resultados da concentração de massa celular no inóculo no final da fermentação e a massa celular produzida para cada linhagem testada, em meio cuja única fonte de nitrogênio disponível foi o diclosulam.

Tabela 15. Resultados de crescimento microbiano em meios contendo diclosulam como única fonte de nitrogênio .

Linhagem	Massa celular inóculo (g/L)	Massa celular final (g/L)	Massa produzida (g)
Uberlândia L1 (UL1)	0,0024	0,00016	-0,00690
Uberlândia L2 (UL2)	0,0028	0,00021	-0,00567
Uberlândia L3 (UL3)	0,0021	0,00021	0,00120
Uberlândia L4 (UL4)	0,0024	0,00004	-0,01900
Londrina L1 (LL1)	0,0028	0,00019	-0,00797
Londrina L2 (LL2)	0,0030	0,00010	-0,01940
Londrina L3 (LL3)	0,0027	0,00012	-0,00438
Rondonópolis L1 (RL1)	0,0029	0,00022	-0,00587
Rondonópolis L2 (RL2)	0,0023	0,00022	0,00010
Rondonópolis L3 (RL3)	0,0028	0,00018	-0,00905

Assim como para o ensaio que envolveu a utilização de diclosulam como única fonte de carbono, no ensaio acima descrito não houve detecção de crescimento celular para todas as linhagens estudadas, uma vez que os dados foram de ordem negativa. Esse fato foi associado à falta de precisão da metodologia utilizada, que provavelmente não possuía sensibilidade suficiente para detectar o aumento da massa celular, já que esta, se existiu, foi muito

pequena devido à baixa concentração de fonte de nitrogênio (diclosulam). Portanto, não se pode afirmar que os microrganismos crescem ou não com diclosulam como única fonte de nitrogênio. No entanto, com os dados da Tabela 14, observa-se que a linhagem UL1 mostra capacidade de degradação ou acúmulo de diclosulam quando crescida em meio com outras fontes de carbono e nitrogênio. Dessa forma, os ensaios realizados depois foram direcionados de maneira a incrementar este tipo de degradação, ou seja, realizar a degradação do diclosulam por cometabolismo.

#### **4.4. Avaliação de desempenho das linhagens na biodegradação de diclosulam através de cometabolismo**

Os testes foram conduzidos com 10 diferentes linhagens, sendo 4 linhagens provenientes da região de Uberlândia, 3 da região de Londrina e 3 da região de Rondonópolis.

##### **Desempenho das linhagens provenientes da região de Uberlândia**

As Figuras 3, 4 e 5 mostram os perfis da concentração de glicose, massa celular e diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens UL1, UL2, UL3 e UL4.

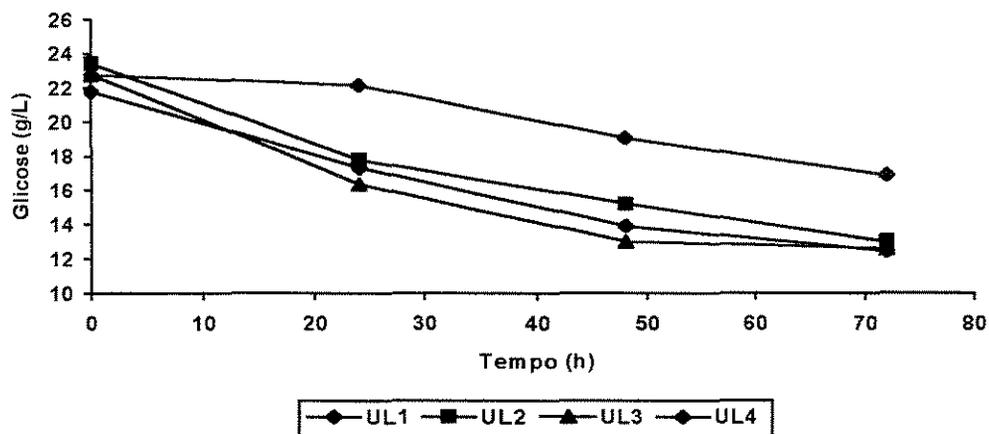


Figura 3. Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.

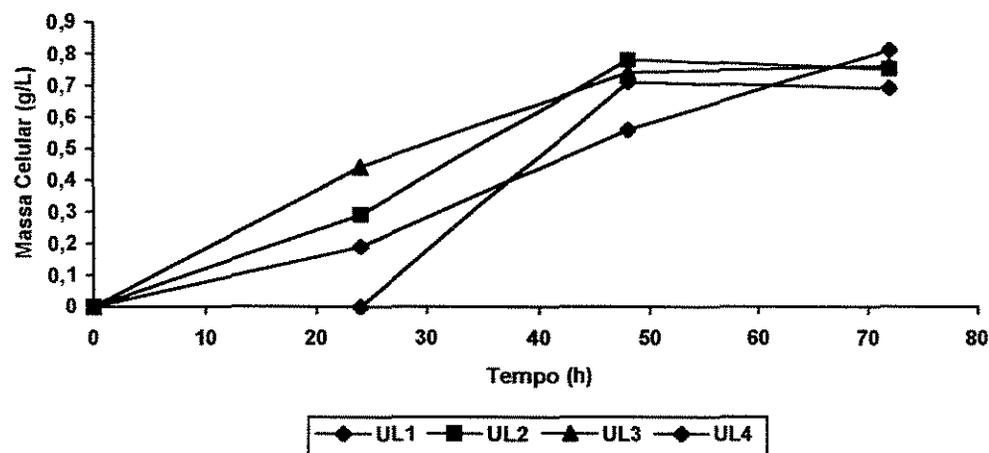


Figura 4. Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.

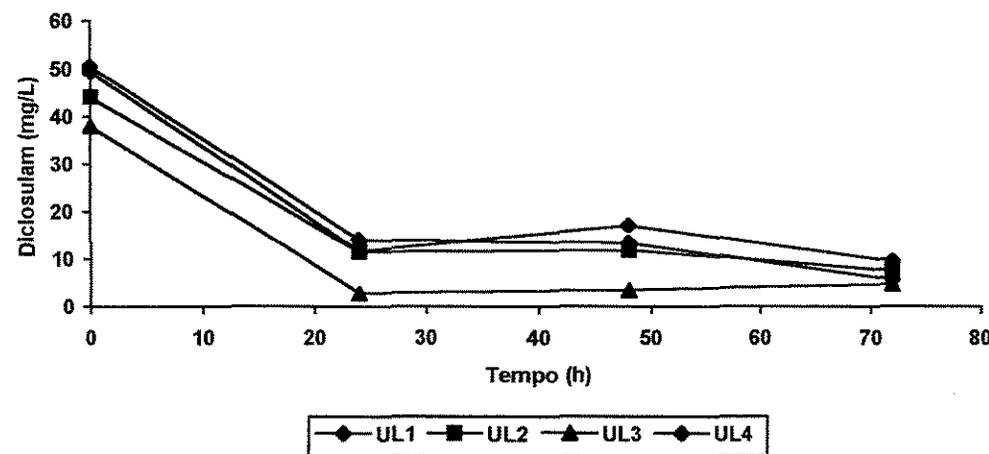


Figura 5. Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia.

Observa-se pelas Figuras 3, 4 e 5 que os perfis de concentração de glicose, massa celular e diclosulam em função do tempo de fermentação mostram-se diferentes para cada linhagem estudada. No entanto, nota-se um fato em comum a todas as linhagens. Existe um consumo acentuado de diclosulam nas primeiras 24 horas de ensaio, ficando praticamente constante após este tempo. Outro fato em comum a todas as linhagens estudadas é que existe o consumo da glicose e do diclosulam de forma simultânea.

### **Desempenho das linhagens provenientes da região de Londrina**

As Figuras 6, 7 e 8 mostram os perfis da concentração de glicose, massa celular e diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens LL1, LL2 e LL3.

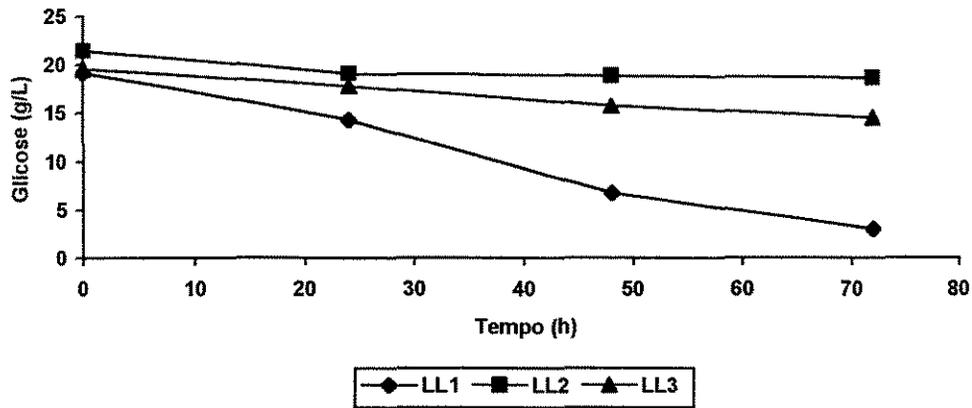


Figura 6. Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.

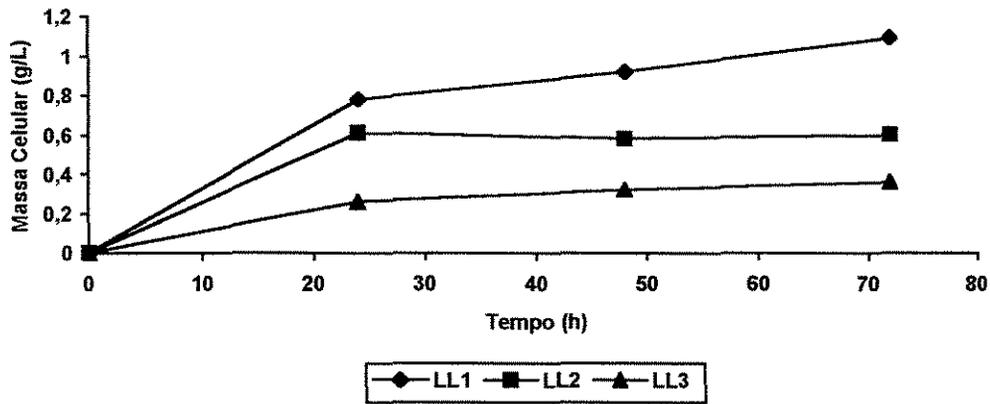


Figura 7. Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.

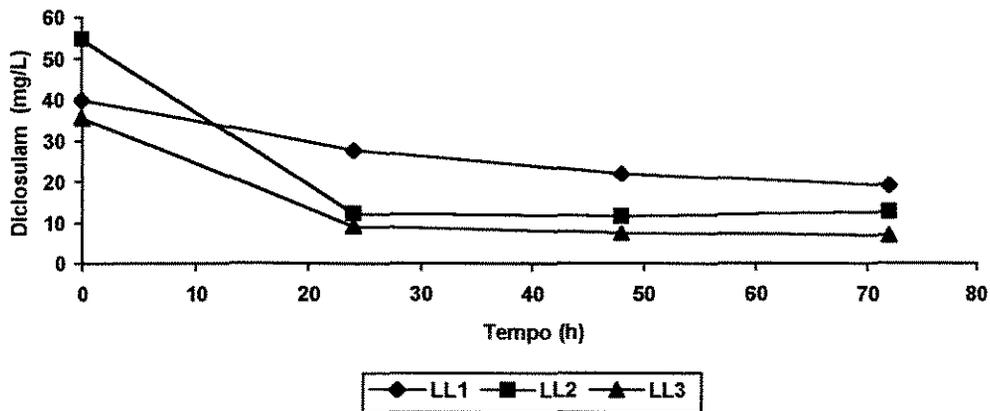


Figura 8. Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Londrina.

Pelos resultados contidos nas Figuras 6, 7 e 8 observa-se que o mesmo comportamento para as concentrações de diclosulam obtido para as linhagens isoladas da localidade de Uberlândia foi observado para as linhagens LL2 e LL3 isoladas da localidade de Londrina. Somente a linhagem LL1, apesar de mostrar um maior consumo de glicose e produção de massa celular, degradou uma menor quantidade de diclosulam quando comparado as outras linhagens.

### **Desempenho das linhagens provenientes da região de Rondonópolis**

As Figuras 9, 10 e 11 mostram os perfis da concentração de glicose, massa celular e diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens RL1, RL2 e RL3.

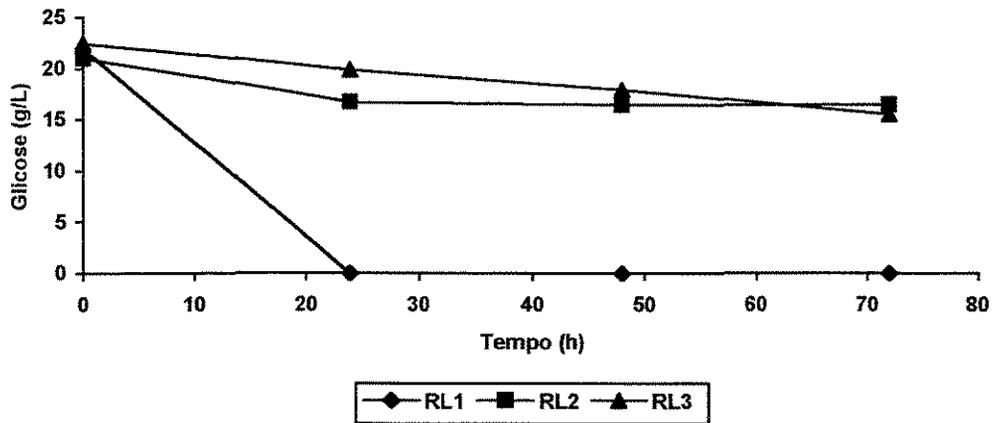


Figura 9. Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis.

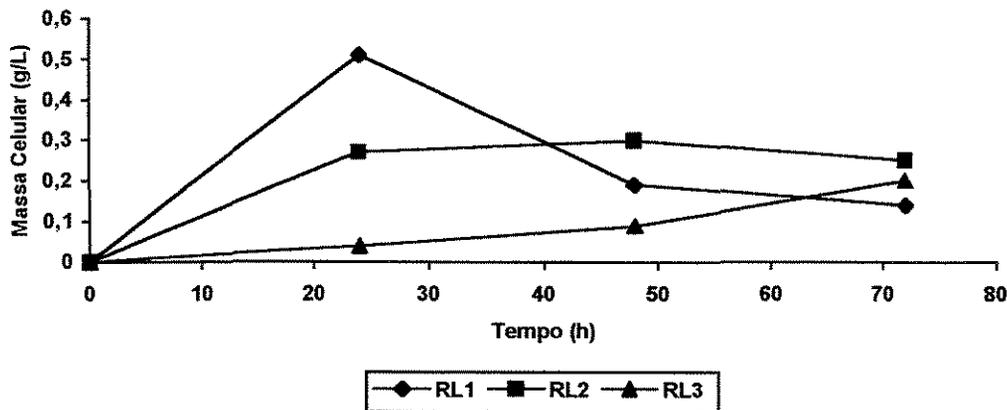


Figura 10 Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis.

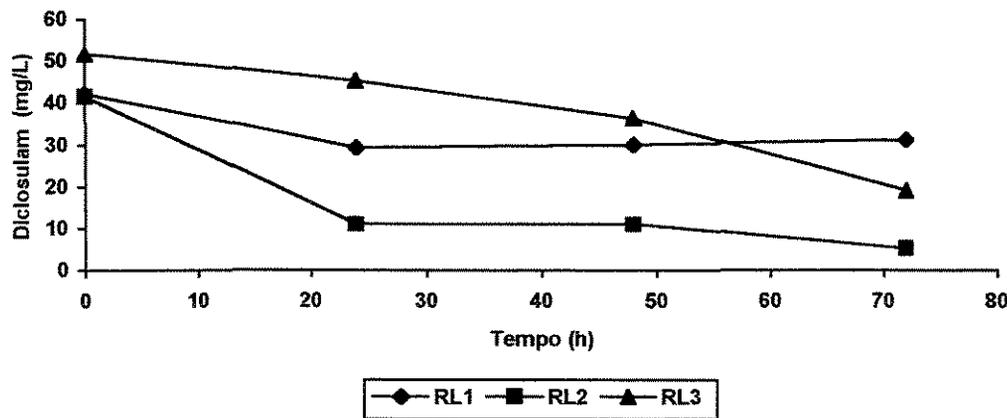


Figura 11 Perfis da concentração de diclosulam em função do tempo de fermentação para as linhagens isoladas da localidade de Rondonópolis.

A linhagem RL1 apresentou uma alta velocidade de consumo de glicose, acompanhado de crescimento celular acentuado nas primeiras 24 horas. Após esse tempo, com o esgotamento do substrato, a massa celular diminuiu indicando que as células entraram em processo de lise. Quanto à degradação do diclosulam, além de pequena, somente aconteceu enquanto houve crescimento celular. A linhagem RL2 foi a única isolada da localidade de Rondonópolis que apresentou o mesmo comportamento daquele apresentado pelas linhagens UL1, UL2, UL3, UL4, LL2 e LL3 de Uberlândia e Londrina respectivamente.

Deve-se considerar, portanto, a hipótese de que os microrganismos apenas acumulam o diclosulam na célula, sem degradá-lo.

Para determinar as linhagens de melhor desempenho foram calculados alguns parâmetros que auxiliam nessa tarefa. A Tabela 16 mostra os valores dos parâmetros de desempenho das 10 linhagens estudadas.

Tabela 16. Valores dos parâmetros MCP (massa de células produzidas), MGC (massa de glicose consumida), MDD (massa de diclosulam degradado),  $Y_{X/S}$  (rendimento em célula) VCD (velocidade de degradação do diclosulam) e DED (degradação específica do diclosulam) para as 10 linhagens estudadas.

Parâmetros	MCP (g)	MGC (g)	MDD (mg)	$Y_{X/S}$ (g/g)	VCD (mg/h)	DED (g/g MS)
<b>Cepas</b>						
UL1	0,0293	0,78	4,80	0,0398	0,1997	0,1629
UL2	0,0275	0,75	5,00	0,0373	0,2086	0,1811
UL3	<b>0,0502</b>	<b>3,27</b>	<b>7,10</b>	<b>0,0155</b>	<b>0,2971</b>	<b>0,1441</b>
UL4	<b>0,0859</b>	<b>0,82</b>	<b>8,40</b>	<b>0,1042</b>	<b>0,3495</b>	<b>0,0979</b>
LL1	0,1398	0,91	1,50	0,1534	0,0643	0,0114
LL2	<b>0,1113</b>	<b>0,48</b>	<b>5,70</b>	<b>0,2372</b>	<b>0,2386</b>	<b>0,0510</b>
LL3	0,0436	0,29	4,20	0,1578	0,1737	0,0977
RL1	0,0886	4,10	2,60	0,0216	0,1084	0,0295
RL2	<b>0,0415</b>	<b>0,90</b>	<b>9,60</b>	<b>0,0467</b>	<b>0,2980</b>	<b>0,1761</b>
RL3	0,0210	0,35	1,10	0,0815	0,0466	0,0785

Pelos dados contidos na Tabela 16, observa-se que todas as linhagens estudadas mostraram capacidade de degradar ou acumular o diclosulam quando crescidas em meio contendo glicose como fonte de carbono e sulfato de amônio e extrato de levedura como fontes de nitrogênio. Nota-se, ainda, que houve uma grande variação nos valores dos parâmetros de desempenho. Para selecionar as melhores linhagens, foram utilizados principalmente os parâmetros Massa de diclosulam degradado ou acumulado (MDD), Velocidade de consumo do diclosulam (VCD) e Degradação específica do diclosulam (DED), por estarem intimamente ligados ao objetivo deste trabalho. Além disso, buscou-se selecionar pelo menos uma linhagem de cada uma das localidades avaliadas objetivando obter linhagens adaptadas a cada tipo de solo característico das regiões.

Levando-se em conta esses critérios, foram escolhidas para identificação as linhagens UL3, UL4, LL2, e RL2, sendo que a UL3 foi a que apresentou o melhor desempenho geral. Por esse motivo, a mesma foi utilizada nas etapas seguintes do trabalho, pois pareceu ser o microrganismo mais promissor para ser utilizado nessa aplicação.

#### 4.5. Identificação das bactérias

Conforme Anexo 1, segue o resultado do Relatório Técnico de análises feitas no CPQBA/UNICAMP, que identificou as bactérias isoladas.

Tabela 17. Identificação dos microrganismos selecionados.

AMOSTRA	DADOS MORFOLÓGICOS	IDENTIFICAÇÃO
UL3	Colônia de coloração creme translúcida. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocobacilos Gram negativos.	<b><i>Klebsiella sp</i></b>
UL4	Colônia de coloração creme amarelada. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocobacilos Gram negativos.	<b><i>Sphingobacterium multivorum</i></b>
LL2	Colônia de coloração branca opaca. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocos Gram positivos.	<b><i>Staphylococcus capitis subsp. capitis</i></b>
RL2	Colônia de coloração branca translúcida. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de bastonetes Gram negativos.	<b><i>Acinetobacter sp.</i></b>

Análises por Cromatografia Gasosa para a identificação de bactérias selecionadas foram realizadas na EMBRAPA - Meio Ambiente, por meio dos ácidos graxos encontrados na membrana celular depois de metiladas, tendo como resultados:

UL3	<i>Klebsiella</i>
UL4	<i>Acinetobacter sp.</i> (Não foi possível identificar ao nível de espécie)
LL2	<i>Staphylococcus – epidermidis</i>
RL2	<i>Acinetobacter radioresistens</i>

#### 4.6. Testes de crescimento das linhagens selecionadas em diferentes fontes de carbono

##### 4.6.1. Frutose

As Figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, os perfis de concentração de frutose e massa celular em função do tempo para as 4 linhagens selecionadas.

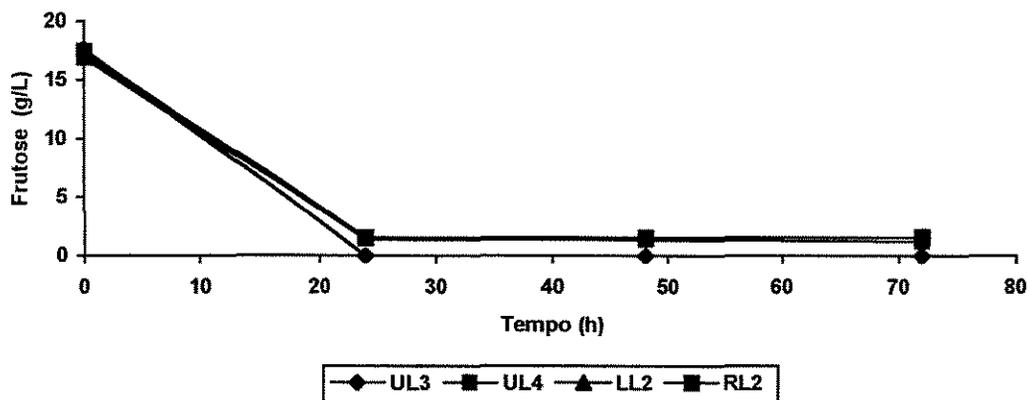


Figura 12. Perfis da concentração de frutose em função do tempo de fermentação.

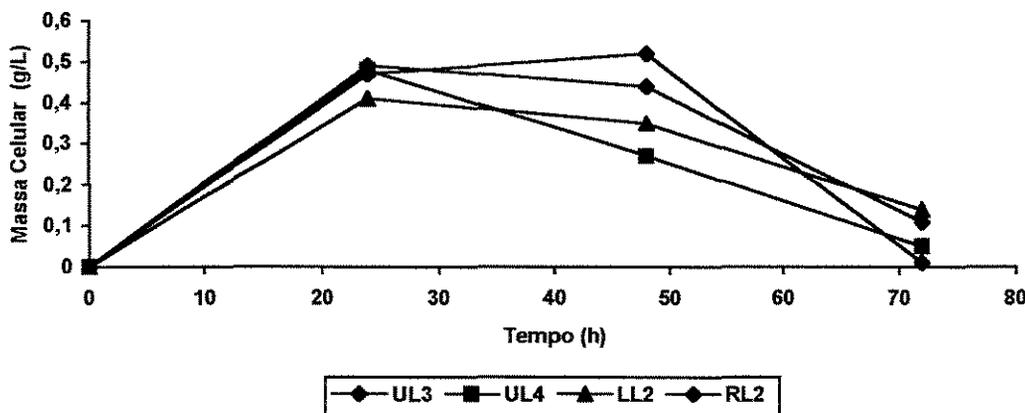


Figura 13. Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação.

Observa-se pelos perfis na Figura 12 que toda frutose foi consumida em menos de 24 horas por todas linhagens estudadas. Nota-se na Figura 13 que após o término da frutose houve diminuição da concentração de massa celular, provavelmente devido à lise das células. Com base nesses dados, fica claro que todas linhagens selecionadas foram capazes de crescer em meios contendo frutose como única fonte de carbono.

#### 4.6.2. Sacarose

As Figuras 14 e 15 mostram, respectivamente, os perfis de concentração de sacarose e massa celular em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas

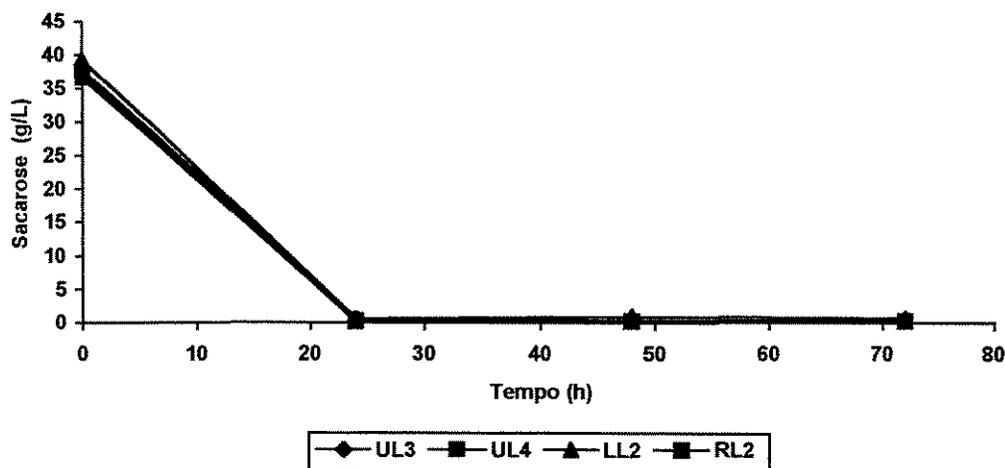


Figura 14. Perfis da concentração de sacarose em função do tempo de fermentação.

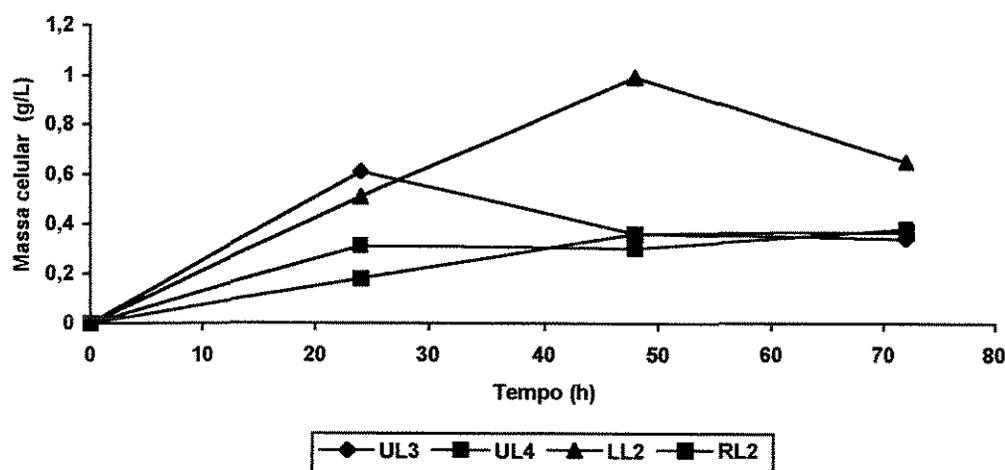


Figura 15. Perfis da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação.

Observa-se pela Figura 14 que a quantidade de sacarose residual foi muito próxima de zero, mostrando que as 4 linhagens selecionadas foram capazes de consumir sacarose. A Figura 15 mostra que, com exceção da linhagem LL2, as outras apresentaram o mesmo perfil de crescimento celular, atingindo a concentração máxima em 24 horas de ensaio, coincidindo com o esgotamento dos açúcares. Já a linhagem LL2 atingiu o máximo após 48 horas.

A seguir, as Figuras 16 e 17 mostram, respectivamente, os perfis de concentração de glicose e frutose em função do tempo de fermentação para as 4 linhagens selecionadas.

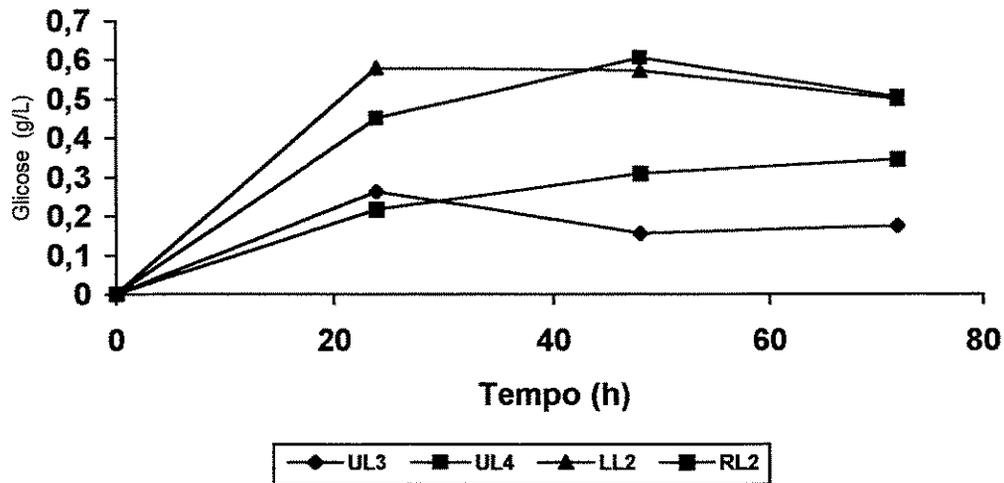


Figura 16. Perfis da concentração de glicose em função do tempo de fermentação.

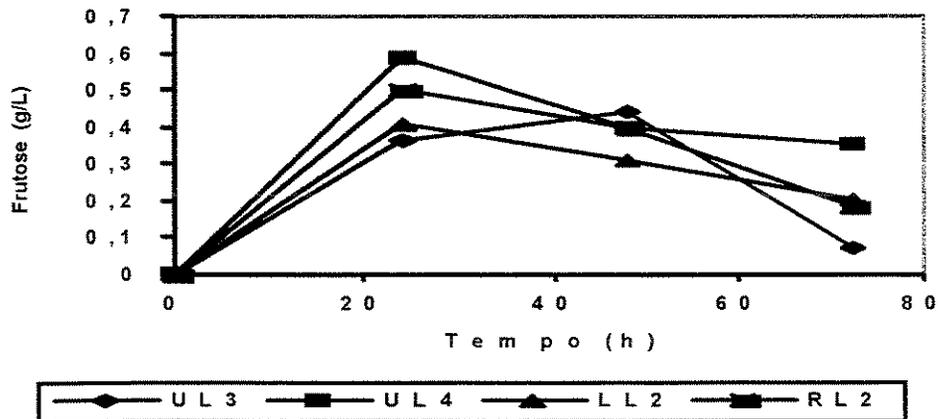


Figura 17. Perfis da concentração de frutose em função do tempo de fermentação.

Nas figuras 16 e 17 nota-se que as concentrações residuais de glicose e frutose foram, no máximo, de 0,6 g/l; sendo que a concentração máxima inicial de sacarose era de 40 g/l.

#### **4.6.3. Seleção da fonte de carbono a ser utilizada no meio de produção de biomassa**

Pelos dados contidos nos itens 4.6.1 e 4.6.2, observa-se que os microrganismos são capazes de consumir tanto a frutose quanto a sacarose. Por ser um substrato de baixo custo e com grande disponibilidade no mercado brasileiro, a sacarose foi escolhida como fonte de carbono para compor o meio de produção de biomassa.

#### **4.6.4. Seleção da fonte de nitrogênio do meio**

Optou-se por trabalhar com extrato de levedura como fonte de nitrogênio. Essa escolha, em detrimento ao sulfato de amônio, se baseou em dois fatores: a) por ser uma matéria prima complexa, além de suprir o meio com nitrogênio amínico, este contém outros nutrientes e micronutrientes que incrementam o crescimento do microrganismo; b) o extrato de levedura, por possuir uma grande quantidade de aminoácidos, acaba por transferir ao meio um maior poder tampão, auxiliando na manutenção do pH próximo de 6, índice em que as linhagens isoladas mostraram um bom crescimento.

#### **4.6.5. Seleção da linhagem para testes de produção**

As 4 linhagens selecionadas apresentaram bom desempenho na degradação de diclosulam e devem ser consideradas como alternativas de produtos com potencial de aplicação. No entanto, para realizar os ensaios de otimização de meio e de produção de biomassa em reator, escolheu-se somente a linhagem UL3, já que esta mostrou uma maior velocidade de degradação do diclosulam e uma quantidade de massa produzida satisfatória.

#### 4.7. Otimização do meio de produção de biomassa

A Tabela 18, mostra os resultados de massa celular obtidos nos 11 ensaios de otimização.

Tabela 18. Resultados obtidos das concentrações de massa celular dos organismos selecionados.

Ensaio	Codificado		Descodificado		Concentração final Sacarose (g/L)	Massa celular (g/L)
	Sacarose	Extrato Levedura	Sacarose (g/L)	Extrato levedura (g/L)		
1	+1	+1	40	7	0,57	0,69
2	+1	-1	40	3	24,93	0,21
3	-1	+1	20	7	0	0,35
4	-1	-1	20	3	2,11	0,31
5	0	0	30	5	0	0,59
6	0	0	30	5	0	0,60
7	0	0	30	5	0	0,64
8	+√2	0	44,10	5	14,37	0,60
9	-√2	0	15,90	5	0	0,29
10	0	+√2	30	7,82	0	0,53
11	0	-√2	30	2,18	18,22	0,19

Os dados contidos na Tabela 18 foram analisados utilizando-se o programa de análise estatística STATISTIC 5.0.

A Tabela 19, mostra o resultado da análise de variância para o ajuste de um modelo linear pelo método dos mínimos quadrados.

Tabela 19. Análise de variância.

Fonte de variação	Soma Quadrática	Número de g. l.	Média quadrática
Regressão	0,3260	5	0,065204
Resíduos	0,00547	5	0,001094
Falta de ajuste	0,005404	3	0,001801
Erro puro	0,000067	2	0,0000335
Total	0,331491	10	

Pelos dados contidos na Tabela 19, tem-se que a porcentagem de variação explicada do modelo ( $r$ ) é de 0,9835 e que a porcentagem máxima de variação explicável é de 0,9998. O valor do teste F obtido para estes dados é de 59,59, sendo que o valor tabelado para 95% de confiança é de 5,5. O parâmetro F calculado é aproximadamente 11,8 vezes o valor de F tabelado. Portanto, podemos afirmar que o modelo obtido é preditivo. Além disto, o modelo matemático para a forma codificada apresentou um coeficiente de correlação quadrático bastante satisfatório (0,9835) principalmente por se tratar de um experimento envolvendo microrganismos.

O modelo quadrático na forma codificada é assim representado matematicamente:

$$\text{BMP} = 0.5967 + 0.0849 \times \text{SAC} - 0.07916 \times \text{SAC}^2 + 0.12529 \times \text{EL} - 0.12191 \times \text{EL}^2 + 0.11 \times \text{SAC} \times \text{EL}$$

Onde:

**BMP** Biomassa produzida (g/L)

**SAC** Concentração de sacarose (codificada +1,41 a -1,41)

**EL** Concentração de Extrato de levedura (codificada +1,41 a -1,41)

Sendo este modelo válido, pode-se utilizá-lo para avaliar o efeito das variáveis estudadas sobre a variável resposta.

A Figura 18. mostra a superfície de resposta gerada pelo modelo codificado.

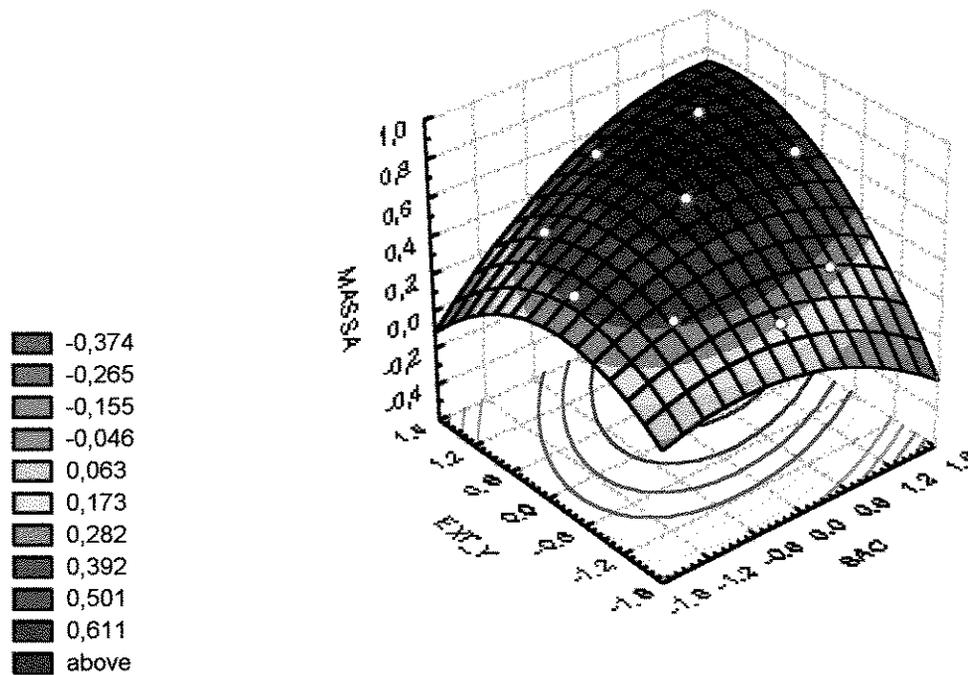


Figura 18: Superfície de resposta descrita pelo modelo quadrático codificado, relacionando a concentração de sacarose e extrato de levedura no meio utilizado na obtenção de massa celular.

Observa-se pela Figura 18 que a produção de biomassa aumenta com o aumento da concentração de sacarose e extrato de levedura no meio fermentativo e que existe uma interação entre elas. Com base nesses dados, optou-se por trabalhar no biorreator com concentrações de sacarose e extrato de levedura de 40 g/L e 7 g/L, por fornecer a melhor relação de custo de formulação de meio por biomassa produzida.

#### 4.8. Produção de biomassa em biorreator

As Figuras 19, 20, 21 e 22 mostram os perfis da concentração de sacarose, glicose, frutose e massa celular respectivamente, no cultivo de *Klebsiella*, utilizando sacarose como fonte de carbono nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temperatura = 32°C.

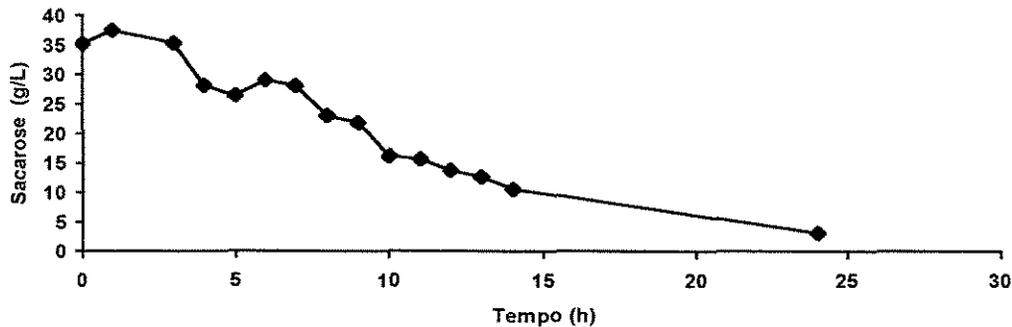


Figura 19. Perfil da concentração da sacarose em função do tempo de fermentação em biorreator

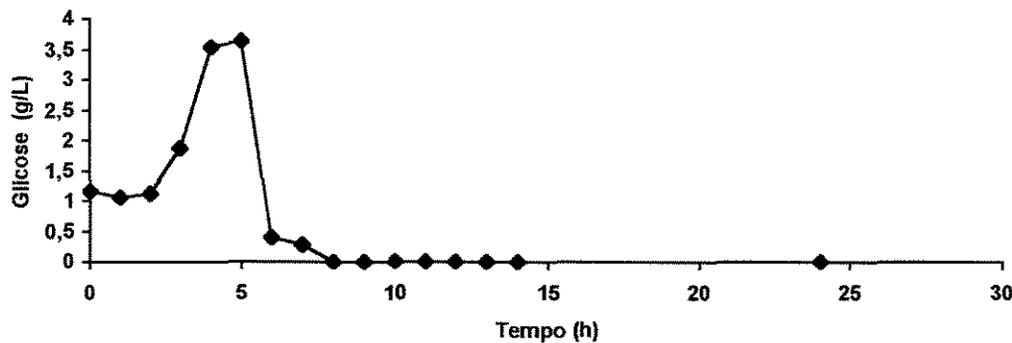


Figura 20. Perfil da concentração de glicose em função do tempo de fermentação em biorreator

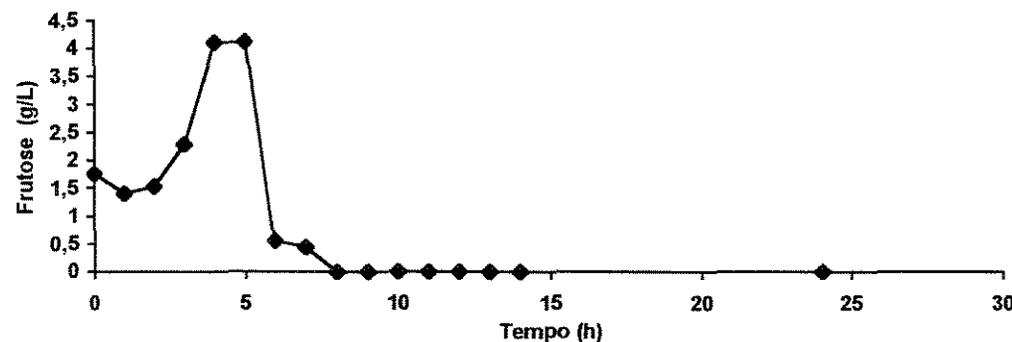


Figura 21. Perfil da concentração de frutose em função do tempo de fermentação em biorreator

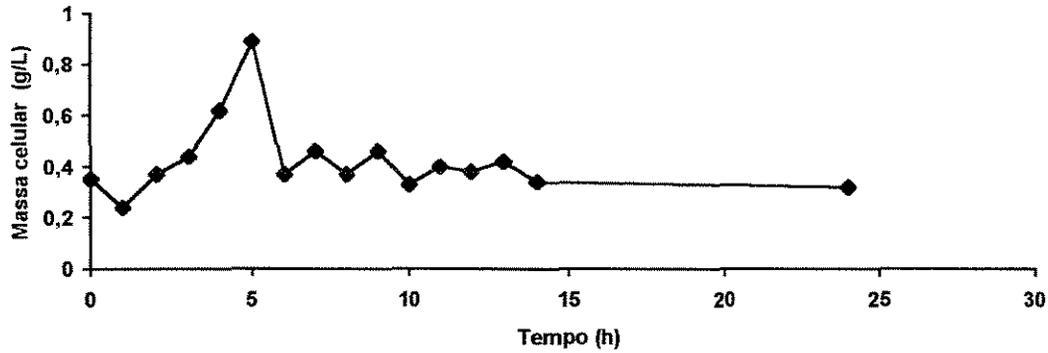


Figura 22. Perfil da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação em biorreator

Observa-se pela Figura 22 que a concentração de biomassa atingiu o valor máximo após 5 horas de fermentação, caindo em seguida e se estabilizando a valores próximos de 0,4 g/L. A queda na concentração de massa celular pode ter ocorrido por causa da autólise das células microbianas. Todavia, esse comportamento não era esperado, pois existia ainda no meio uma grande quantidade de sacarose. Mas podemos observar também que a queda na massa celular ocorreu ao mesmo tempo em que a concentração de glicose e frutose caiu para zero. Apesar de existir um consumo da sacarose, a concentração de glicose e frutose permaneceu próxima de zero a partir da 6ª hora de fermentação, indicando que a velocidade de hidrólise da sacarose foi a etapa limitante do processo do crescimento microbiano. O que ocorreu aparentemente no biorreator foi uma primeira etapa onde a concentração microbiana era pequena e o consumo de glicose e frutose também era baixo, sendo a velocidade de hidrólise da sacarose suficientemente alta para acumular glicose e frutose no meio. Nestas condições, os microrganismos cresceram rapidamente e, conseqüentemente, o consumo de glicose e frutose. Ao atingir uma determinada concentração, a velocidade de consumo de glicose e frutose superou a velocidade de hidrólise da sacarose, provocando uma falta destes açúcares, levando a morte uma parte da população, a qual atingiu o equilíbrio em concentrações celulares próximas a 0,4 g/L.

Esse fato limita a utilização da sacarose como fonte de carbono na produção de biomassa desta linhagem. Por esta razão, foi realizado um ensaio

com o mesmo meio de fermentação, somente substituindo a sacarose pela glicose no cultivo de *Klebsiella* nas condições: aeração = 1 vvm, agitação = 150 rpm e temperatura = 32°C, cujos resultados estão mostrados nas Figuras 23 e 24.

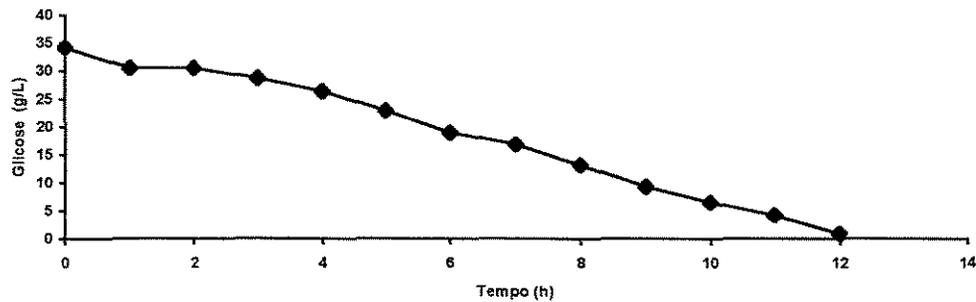


Figura 23. Perfil da concentração de glicose em função do tempo de fermentação em biorreator

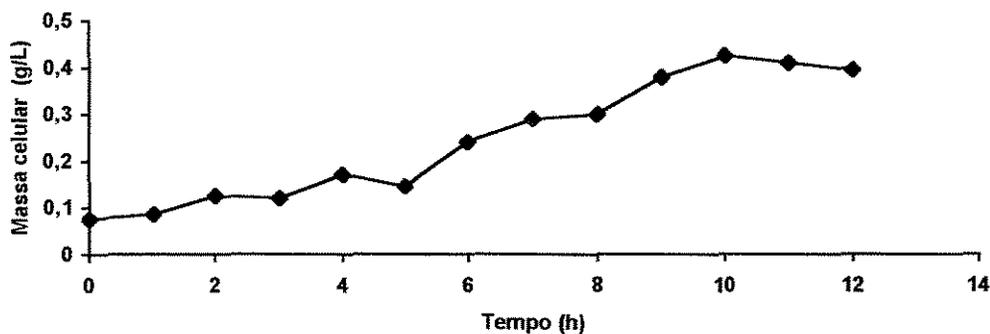


Figura 24. Perfil da concentração de massa celular em função do tempo de fermentação em biorreator

Observa-se pelas Figuras 23 e 24 que o comportamento de produção de biomassa e consumo de glicose foi muito mais coerente, apesar de não se ter atingido a concentração máxima de massa celular obtida no ensaio com sacarose. No entanto, observa-se que neste experimento, a concentração de massa celular no ponto zero horas é de aproximadamente 0,07 g/L, bem inferior à observada no ensaio com sacarose, a qual atingiu valores próximos a 0,35 g/L. Considerando a concentração inicial de células e a máxima obtida em cada ensaio, observa-se que no ensaio com sacarose a concentração cresceu 2,5 vezes e com glicose 5,5 vezes. O cultivo do microrganismo em meio contendo glicose como fonte de

carbono, além de levar a uma produção maior de biomassa, o comportamento observado torna o controle operacional do reator muito mais fácil; portanto, recomenda-se a utilização de glicose em reatores industriais para a produção de biomassa.

## **5. PROPOSTA PARA UMA PLANTA DE PRODUÇÃO**

Uma planta de produção desse biocatalisador seria composta pelas unidades de preparo do meio, de propagação e de separação e conservação.

### **5.1. Preparo do meio**

O meio de cultivo a base de glicose e extrato de levedura deverá ser preparado em um tanque de diluição, passando em seguida por uma unidade de esterilização em linha, onde a temperatura do mesmo deverá atingir 121°C por 15 minutos. Em seguida o mesmo será resfriado em um trocador casco tubo utilizando mistura hidro-alcoólica resfriada a -2°C como fluido refrigerante. O meio estéril e frio será então enviado para os biorreatores previamente esterilizados, onde serão inoculados.

### **5.2. Propagação**

A unidade de propagação será constituída de dois tipos de tanques, um semeador com volume igual a 10% do volume total do fermentador e o fermentador onde se dará a produção de massa. O ar utilizado nestes tanques serão esterilizados por filtração.

A cultura vinda do laboratório em frascos apropriados será transferida para o semeador, onde o microrganismo irá se multiplicar até que o substrato do meio seja todo consumido, sendo então transferido para os fermentadores contendo o meio esterilizado.

Após o crescimento da massa e o esgotamento do substrato, o material contendo as células será enviado para a unidade separadora.

### 5.3. Separação e conservação

O material proveniente dos fermentadores serão centrifugados e lavados em uma bateria de três centrífugas ligadas em série. A massa recuperada será então enviada para liofilizadores, onde serão desidratadas – o que permitirá sua conservação até adição junto às sementes na hora do plantio.

A figura abaixo mostra o fluxograma do processo de produção de biocatalisador.

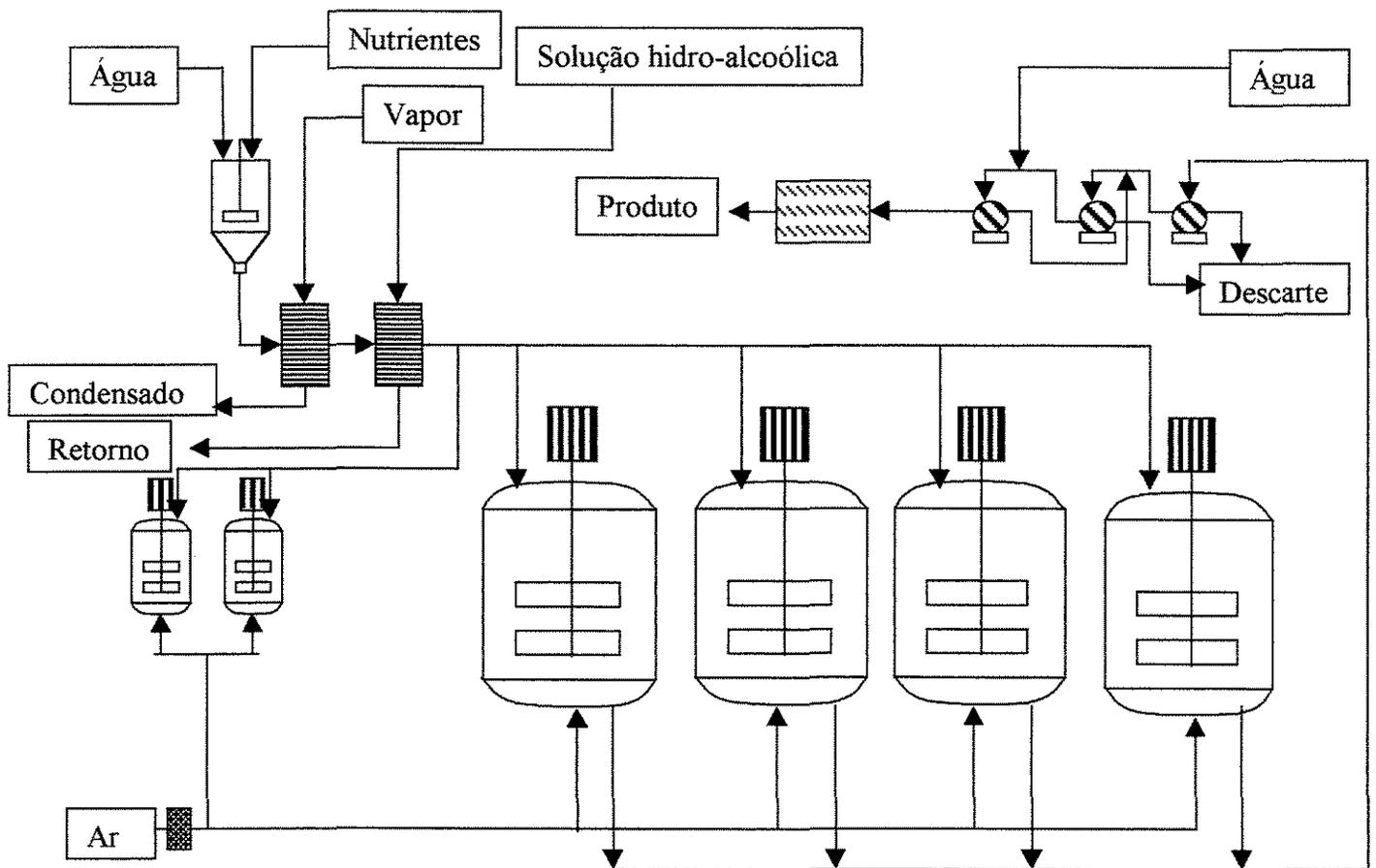


Figura 25: Fluxograma esquemático da planta de produção de biocatalisadores

#### 5.4. Estimativa de produção

Supondo que a quantidade de produto liofilizado adicionado à semente de milho seja da ordem de 1% ou seja 1 g de produto para 100 g de semente, e que são necessários 20 kg de semente por hectare, para aditivar sementes para uma área de 100.000 hectares, seria necessário produzir 20.000 kg de produto.

Tendo este valor como base, seria necessário uma planta com as seguintes dimensões:

##### Base de cálculo

Produção anual	20.000 kg
Período de produção	120 dias
Tempo de ciclo	15 horas
Concentração final de biocatalisador em base seca	0,45 g/L

##### Resultados

Produção diária	180 kg
Volume de meio fermentado	400.000 L
Número de Fermentadores	4
Ciclos por dia	1,6
Volume útil dos fermentadores	62.500 L
Volume total dos fermentadores	100.000 L
Volume dos semeadores	10.000 L
Volume de meio utilizado por dia	360.000 L
Glicose consumida por dia	10,8 ton

### **5.5. Avaliação prévia**

Observa-se pelos dados de estimativa de produção que sendo o rendimento em células baixo, a quantidade de glicose consumida é bastante elevada e o tamanho da planta cresce com a baixa concentração de células no material fermentado. Portanto, estudos de otimização de produção, visando aumentar tanto o rendimento em massa como a concentração de massa final é de fundamental importância para tornar essa planta viável economicamente, obtendo um produto que possa ser colocado no mercado a um preço satisfatório. Caso contrário, essa prática se torna inviável, pois, aumenta muito o custo de produção do milho.

## 6. CONCLUSÕES

- A comunidade de microrganismos (bactérias e fungos) encontrados nas amostras de rizosfera e entrelinhas nas três regiões estudadas foi considerada igual tanto nos meios adicionados de diclosulam como nos meios sem adição desse produto.

- Foram encontrados microrganismos resistentes a até 500 µg/mL de diclosulam nas 3 regiões estudadas.

- Os solos amostrados indicaram ou uma flora microbiana bastante resistente ao diclosulam ou esse produto não apresentou toxidez para a flora microbiana instalada nos solos avaliados.

- Não houve crescimento celular para nenhuma das linhagens isoladas das 3 regiões estudadas quando essas foram submetidas a crescimento em meios de cultivo contendo o diclosulam como única fonte de carbono ou de nitrogênio. Todos os microrganismos testados só foram capazes de utilizar o diclosulam por cometabolismo.

- As linhagens de bactérias que apresentaram melhor desempenho em relação ao consumo de diclosulam, quando identificados por biologia molecular, apresentaram-se como: família *Enterobacteriaceae* (cocobacilos Gram negativo); *Sphingobacterium multivorum* (cocobacilos Gram negativo); *Staphylococcus capitis* subespécies *capitis* (cocos Gram positivo) e *Acinetobacter* sp. (bastonete Gram negativo).

- As quatro linhagens de bactérias apresentaram crescimento satisfatório quando se utilizou glicose, frutose e sacarose como fonte de carbono.

- Quando cultivado em meio contendo sacarose como fonte de substrato, visando obter massa celular em biorreator, o microrganismo apresentou baixa velocidade de hidrólise da mesma, o que afetou seu desempenho, pois houve limitação de crescimento e morte celular por falta de glicose e frutose no meio.

- Apesar da sacarose ser a fonte de carbono mais abundante e de baixo custo, o uso da glicose se mostrou mais econômico devido seu maior rendimento em massa, obtido nos testes em biorreatores para produção do biocatalisador

- Foi possível obter quantidade satisfatória de biocatalisador com rendimentos de 0,015 g de massa celular por g de glicose, utilizando-se biorreatores agitados com taxa de aeração próximas a 1vvm (volume de ar por volume de meio por minuto), agitação de 150 rpm e temperatura de 32°C, utilizando-se meios de cultivo à base de glicose e extrato de levedura.

- Deve ser considerada a hipótese de que ocorra um transporte do diclosulam para dentro da célula do microrganismo quando esse composto é adicionado no meio de cultivo. Assim, o diclosulam poderia ser apenas realocado, o que não o eliminaria do meio ambiente.

## 7. SUGESTÕES

Para trabalhos futuros sugerimos:

- Testar a aplicação do biocatalisador no campo, em culturas de milho desenvolvidas nas entressafras de culturas de soja que tenham recebido várias aplicações de diclosulam.

- Otimizar o processo de produção do biocatalisador, utilizando-se outros tipos de reatores de operação mais simples, tais como o torre de bolha que consome menos energia.

- Estudar a conservação e aderência do biocatalisador na semente do milho.

- Utilizar meios de menor custo, tais como melaço previamente hidrolisado.

- Otimizar o processo de produção do biocatalisador, trabalhando em batelada alimentada ou mesmo com ciclos consecutivos, sem a necessidade de produção de um inóculo no laboratório para cada ciclo de produção.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. *Biodegradation of Chemicals of Environmental Concern*. In Science, 1981, v.211, p.132-211.

ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. 2.ed. New York: Academic Press, 1999, cap.11: Effect of Chemical Structure on Biodegradation, p.177-193.

ALVEY, S.; CROWLEY, D.E. *Survival and Activity of an Atrazine-Mineralizing Bacterial Consortium in Rhizosphere Soil*. In Environmental Science & Technology, 1996, v.30, p. 1596-1603.

ANDERSON, J.P.E. *Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass*. In Soil Biology & Biochemistry, 1984, v.16, p. 483-489.

ASPELIN, A.L.; GRUBE, A.H.; TORLA, R. *Pesticide industrial sales and usage 1990-1991 marked estimates*. Washington: EPA,1992.

BOLLAG, J.M. *Decontaminating soil with enzymes*. In Environmental Science & Technology, 1992, v. 26, n10, p.1876-1881.

BRIGHENTI, A. M.; MORAES, V.J.; OLIVEIRA JÚNIOR, R.S.; GAZZIERO, D.L.P.; BARROSO, A.L.L.; GOMES, J.A. *Persistência e fitotoxicidade de herbicidas aplicados na soja sobre girassol em sucessão*. In Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2002, v. 37, n4, p. 559-565.

BRITTO, J.S. *Apresentação de slides sobre a Legislação Federal de Agrotóxicos*. In XXI Encontro Anual de Analistas de Resíduos de Pesticidas. São Paulo: GARP/INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2000.

CARDOSO, E.J.B.N.; FREITAS, S.S. *A Rizosfera*. In CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, cap. IV, p. 41-57.

CASARINI, D.C.P. *Padrões de qualidade de solos e águas subterrâneas*. In Anais do Workshop sobre biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1996.

COUTINHO, H.L.C. *Avaliação da biodiversidade do solo através de exame de DNA*. Boletim de Pesquisa, EMBRAPA/CNPQ, 1999.

DOW AGROSCIENCES. *Boletim Técnico Spider* (herbicida). 1999.

EI BESTAWY, E.A.; MANSY, A.H. e EL KOWEIDY A.H. *The potential use of Bacillus spp. in the bioremediation of highly persistent chlorinated pesticides*. In Al-Azhar Journal of Microbiology, 2002. v. 55, p. 320-335.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Soja (Londrina, Pr). *Recomendações técnicas para cultura da soja na região central do Brasil 1999-2000*. Londrina: EMBRAPA, 1999. 229p. (Documentos, 132).

FAY, E.F.; SILVA, C.M.M.S. e MELO, I.S. *Degradação abiótica de xenobióticos*. In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1997, cap. 5, p.125-140.

FELSOT, A ; DZANTOR, E.K. *Enhancing for detoxification of herbicide waste in soil*. In RACKE , K.D.; COATS, J.R., *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Washington: American Chemical Society, p. 49-268. (ACS Symposium Series, 426), 1990.

GEVAO, B.; SEMPLE, K.T.; JONES, K.C. *Bound pesticide residues in soils: a review*. In *Environmental Pollution*, 2000, v.108, p. 3-14.

HILL, I.R. *Microbial transformation of pesticides* In *Pesticide Microbiology: microbiological aspects of pesticide behavior in the environ*. New York: Academic Press, 1978, p.137-185.

HSU, T.S.; BARTHA, R. *Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere*. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, v. 37, p. 36-41.

KRUEGER, J.P.; BUTZ, R.G.; CORK, D.J. *Use of Dicamba-degrading microorganisms to protect dicamba susceptible plant species*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1991, v. 39, p. 1000-1003.

KUMAR, S.; MUKERJI, K.G; LAL, R. *Molecular aspects of pesticide degradation by microorganisms*. In *Critical Reviews in Microbiology*, 1996, v. 22, n1, p. 1-26.

LAVORENTI, A. *Comportamento dos herbicidas no meio ambiente situação brasileira*. In *Anais do Workshop sobre Biodegradação*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1996.

LOOS, M.A.; HELLING, C.S.; ALEXANDER, M. *Phenoxyacetate herbicide detoxication by bacterial enzymes*. In Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1967, v. 15, n.5, 858 –860.

MANDELBAUM, R.T.; ALLAN, D.L.; WALCKET, L.P. *Isolation and characterization of a Pseudomonas sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine*. In Applied and Environmental Microbiology. 1995, v. 61, n. 4, p. 1451-1457.

MELO, I.S.; AZEVEDO J. L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1997, 438 p.

MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; FAY E. F.; MONTEIRO, R.R.; ROSAMIGLIA A.C. *Degradação de atrazina por fungos filamentosos*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1999. 24 p. (Boletim de Pesquisa, 5).

MENDOZA-CANTU, A.; ALBORES, A.; FERNANDEZ-LINARES, L.; RODRIGUEZ-VAZQUEZ, R. *Pentachlorophenol biodegradation and detoxification by the white-rot fungus Phanerochaete chrysosporium*. In Environmental Toxicology, 2000. v.15, n2, p. 107-113.

MONTEIRO, R.T.R. *Biodegradação de herbicidas*. In Anais do Workshop sobre biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1996.

MONTEIRO, R.T.R. *Degradação de pesticidas*. In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1997. Cap. 4, p. 108-124.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Ecologia do solo*. In MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. *Microbiologia e Bioquímica do Solo*. Lavras: Editora UFLA, 2002, Cap. III, p. 81-152.

MUSUMECI, M. R. *Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo*. In CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. *Microbiologia do Solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, cap. 24, p. 341-360.

OLIVEIRA M.C.B. *Regulamentação de agentes biológicos para fins de biorremediação: situação brasileira*. In Anais do Workshop sobre Biodegradação. Jaguariúna: EMBRAPA/CNPMA, 1996.

PAULINO, S.R. *Indústria de pesticidas agrícolas no Brasil: dinâmica inovativa e demandas ambientais*. Campinas: UNICAMP. Dissertação de Mestrado, 1997. 171p.

RACKE, K.D.; COATS, J.R. *Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern corn soil*. In RACKE, K.D.; COATS, J.R. *Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment*. Washington: American Chemical Society, 1990, p. 68-81 (ACS Symposium Series, 426).

REDDY, B.R.; SETHUNATHAN, N. *Mineralization of parathion in rice rhizosphere*. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1983, v.45, n. 3, p.826-829.

RADOSEVICH, M.; TRAINA, S.J.; HAO, Y.L.; TUOVINEN, O.H. *Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate*. In *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, v. 61, n1, p. 297-302.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. *Guia de Herbicidas* Londrina: edição dos autores, 1998, 648 p.

ROQUE, M.R.A. *Isolamento, Caracterização e Ecologia de "Acinetobacter baumannii" degradadora do Herbicida Diuron*. Rio Claro: UNESP, Tese de Doutorado, 2000, 121p.

SANDMANN, E.R.I.C.; LOOS, M.A. *Degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media; high populations associated with sugarcane (Saccharum officinarum)*. In *Chemosphere*, 1984, v.13, n.9, p.1073-1084.

SCHRIJVER, A.; MOT, R. *Degradation of Pesticides by Actinomycetes*. In *Critical Reviews in Microbiology*, 1999, 25(2), p. 85-119.

SCRAMIN, S.; DENTZIEN A; ROSSO C.R.S. *Avaliação da atividade de enzimas intracelulares*. In SILVA, C.M.M.S.; ROQUE, M.R.A.; MELO, I.S. *Microbiologia Ambiental: manual de laboratório*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1998.

SHARP, D.D. In KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. *Herbicides: chemistry, degradation and Mode of Action*. New York: Marcel Dekker, 1988, p.301-333.

SILVA, C.M.M.S. *O fenômeno da biodegradação acelerada de pesticidas*, In MELO, I.S.; SILVA, C.M.M.S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. *Biodegradação*. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001, cap. II, p. 15-28.

SILVA, C.M.M.S.; FAY, E.F. *Persistência e Biomagnificação de moléculas xenobióticas* In MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. *Microbiologia Ambiental*. Jaguariuna: EMBRAPA/CNPMA, 1997, cap. 3, p.67-105.

STACKEBRANDT, E.; RAINEY, F.A.; WARD-RAINEY, N.L. *Proposal for a new hierarchic classification system, actinobacteria classis nov.* In *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1997, v. 47, n. 2, p. 479-491.

TILBURY, A. *Bioremediation of atrazine-contaminated groundwater.* Artarmon, Austrália: Water, 1999, v. 26 n.6, p. 27-29.

YODER, R.N.; HUSKIN, M.A.; KENNARD, L.M.; ZABIK, J.M. *Aerobic Metabolism of diclosulam on U.S. and South American Soils.* In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2000, v. 48, p. 4335-4340.

ZABIK J.M.; WESENBEECK I. J. van; PEACOCK A. L.; KENNARD L. M.; ROBERTS D. W. *Terrestrial Field Dissipation of diclosulam at Four Sites in the United States.* In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001, v.49, p. 3284-3290.

ZHANG, J.L.; QIAO C.L. *Novel approaches for remediation of pesticide pollutants.* In *International Journal of Environment and Pollution*, 2002, v.18(5), p.423-433.

## 9. ANEXOS

## 1. IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS

 <p>UNICAMP</p>	<b>UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS</b> CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS  <b>RELATÓRIO TÉCNICO</b>	 <p>CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS          QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS</p>
--	--	---

<b>NUMERO de REGISTRO</b>	CPQBA 057-03 DRM	<b>Página</b> 1 de 10
---------------------------	------------------	-----------------------

## 1 – DADOS CADASTRAIS DA EMPRESA SOLICITANTE

RAZÃO SOCIAL: Divisão de Resíduos - CPQBA/UNICAMP			
ENDEREÇO: R. Alexandre Caselatto, 999			
BAIRRO: Vila Betel	CIDADE: Paulínia	UF: SP	CEP: 13140-000
CNPJ/CPF 46.068.425/0001-33	INSCRIÇÃO ESTADUAL: isenta		

## 2 – DADOS DAS AMOSTRAS

IDENTIFICAÇÃO DO PRODUTO: Placas de Petri com crescimento bacteriano (CPQBA 057-03 DRM-1 a 4)	
TOTAL DE AMOSTRAS: 04	LOCAL DE PRODUÇÃO: não informado
LOTE: não informado	VALIDADE: não informado

## 3 – ANÁLISES

ANÁLISES REALIZADAS: Identificação de bactérias por análise de rDNA 16S		
NÚMERO DOS POP		
Verificação de pureza	Extração de DNA genômico	PCR rDNA 16S
Clonagem	Seqüenciamento de DNA (ALFExpress)	Análise filogenética

## 4 – EXECUÇÃO DAS ANÁLISES

DIVISÃO: DRM	
RESPONSÁVEL PELAS ANÁLISES: Valéria Maia de Oliveira	
PERÍODO REALIZAÇÃO DAS ANÁLISES	DE: 12/05/2003 a 13/06/2003

CPQBA - UNICAMP, 17/06/2003.

## Identificação de Bactérias

### 1. Objetivos

- Identificação molecular de linhagens bacterianas utilizando seqüenciamento e análise filogenética de fragmentos do gene rRNA 16S.

### 2. Metodologia utilizada

- **Amplificação do rDNA 16S.** A metodologia consistiu na amplificação do DNA ribossomal 16S pela metodologia de PCR, utilizando como molde o DNA genômico extraído diretamente da amostra. O par de *primers* (oligonucleotídeos sintéticos) utilizado para a reação de PCR foram p27f e p1401r, homólogos às extremidades conservadas do gene rRNA 16S de bactérias. No caso da amostra **CPQBA 057-03 DRM-2** (Cód. 1-6), foi necessário empregar a clonagem de parte do gene rDNA 16S como um passo extra para o seqüenciamento e subsequente identificação. Neste caso, os *primers* 27f e 915r foram usados na reação de PCR.
- **Clonagem.** Cerca de 200 ng dos produtos de PCR foram utilizados diretamente, sem purificação prévia, em reações de ligação empregando o vetor plasmidial pGEM-T e a enzima T4 DNA ligase (Kit *pGEM-T Vector System I*, Promega). A seguir, procedeu-se à transformação de células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , previamente preparadas utilizando-se cloreto de cálcio e mantidas a -80°C. Os transformantes positivos foram selecionados utilizando placas de meio LA (Luria agar) contendo o antibiótico ampicilina e suplementadas com IPTG e X-Gal (sistema *Lac Z* de seleção). Foram selecionadas 5 colônias brancas (transformantes positivos) para posterior extração de DNA plasmidial e digestão enzimática, a fim de se confirmar a presença de inserto.
- **Seqüenciamento.** Os fragmentos de rDNA 16S amplificados foram a seguir purificados e submetidos diretamente ao seqüenciamento em seqüenciador automático ALFExpress II (Amersham Biosciences). Os *primers* internos ao gene para o rRNA 16S utilizados para o seqüenciamento foram p10f (*forward*), p530r (*reverse*), p765f, p782r e p1100r.

No caso da amostra **CPQBA 057-03 DRM-2**, o seqüenciamento dos clones foi realizado utilizando os *primers* M13f e M13r, homólogos a regiões do plasmídeo que flanqueiam o DNA inserido (rDNA 16S).

- **Análise filogenética.** As seqüências parciais de rDNA 16S obtidas foram montadas em um *contig* (seqüência única combinando os diferentes fragmentos obtidos) e comparadas com as seqüências de rDNA 16S de organismos representados nas bases de dados RDP (Ribosomal Database Project; <http://www.cme.msu.edu/RDP/html/index.html>) e Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Foram então selecionadas diversas seqüências de organismos relacionados à seqüência do organismo desconhecido para realização das análises filogenéticas. As matrizes de distância evolutiva foram calculadas com o modelo de Kimura (1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei, 1987).

### 3. Resultados

- As placas enviadas para análise apresentavam crescimento distribuído pela placa toda, sem evidências de contaminação.

Amostra	Dados morfológicos
CPQBA 057-03 DRM-1 (cód. 1-4)	Colônia de coloração creme translúcida. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocobacilos Gram negativos.
CPQBA 057-03 DRM-2 (cód. 1-6)	Colônia de coloração creme amarelada. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocobacilos Gram negativos.
CPQBA 057-03 DRM-3 (cód. 4-4)	Colônia de coloração branca opaca. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de cocos Gram positivos.
CPQBA 057-03 DRM-4 (cód. 9-5)	Colônia de coloração branca translúcida. Análise microscópica revelou cultura pura e presença de bastonetes Gram negativos.

- Fragmentos de rDNA 16S foram amplificados com sucesso a partir do DNA genômico extraído da amostra. O material foi purificado em mini-colunas (*GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, Amersham Biosciences) e submetido ao seqüenciamento automatizado no sistema ALFExpress II.
- No caso da amostra **CPQBA 057-03 DRM-2**, o sequenciamento não foi bem sucedido quando o produto de PCR do rDNA 16S e *primers* internos a este gene foram utilizados. Foi necessário introduzir uma etapa de clonagem e confirmação da presença de inserto por restrição enzimática antes de se proceder ao sequenciamento com *primers* dirigidos para o vetor plasmidial.
- Os dados referentes às seqüências parciais de rDNA 16S obtidas para as linhagens **CPQBA 057-03 DRM-1**, **CPQBA 057-03 DRM-2**, **CPQBA 057-03 DRM-3** e **CPQBA 057-03 DRM-4** encontram-se no Anexo 1. Os resultados de identificação estão apresentados a seguir.

Amostra	Descrição do Serviço/Amostra	Identificação
CPQBA 057-03 DRM-1	Placa de Petri com crescimento bacteriano (cód. 1-4)	Bactéria pertencente à Família <i>Enterobacteriaceae</i>
CPQBA 057-03 DRM-2	Placa de Petri com crescimento bacteriano (cód. 1-6)	<i>Sphingobacterium multivorum</i> (Holmes <i>et al.</i> 1981) Yabuuchi <i>et al.</i> 1983
CPQBA 057-03 DRM-3	Placa de Petri com crescimento bacteriano (cód. 4-4)	<i>Staphylococcus capitis</i> subsp. <i>capitis</i> Kloos & Schleifer 1975
CPQBA 057-03 DRM-4	Placa de Petri com crescimento bacteriano (cód. 9-5)	<i>Acinetobacter</i> sp. Brisou & Prevot 1954

#### 4. Comentários

- **Amostra CPQBA 057-03 DRM-1 (cód. 1-4):** a seqüência parcial do rDNA 16S desta amostra apresentou entre 97 e 99% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Pantoea agglomerans*, "*Pantoea endophytica*" (não considerada ainda espécie válida, segundo a base de dados DSMZ, <http://www.dsmz.de>), *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens* e *Klebsiella oxytoca*, encontradas nas bases de dados consultadas. A análise filogenética (Anexo 2) agrupou a amostra CPQBA 057-03 DRM-1 juntamente com as espécies *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e "*Pantoea endophytica*", sugerindo uma relação filogenética mais próxima da amostra com estas espécies.

Os resultados de comparação da seqüência de rDNA 16S da amostra CPQBA 057-03 DRM-1 com as bases de dados, juntamente com a análise filogenética, indicaram ainda que o gene para o RNA ribossomal 16S apresenta um alto grau de conservação entre as bactérias da Família Enterobacteriaceae, não permitindo a identificação da amostra em nível de gênero e espécie.

- **Amostra CPQBA 057-03 DRM-2 (cód. 1-6):** a seqüência parcial do rDNA 16S desta amostra apresentou 98% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Sphingobacterium multivorum*, incluindo a linhagem tipo da espécie.
- **Amostra CPQBA 057-03 DRM-3 (cód. 4-4):** a seqüência parcial do rDNA 16S desta amostra apresentou 99% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae* e *Staphylococcus epidermidis*, encontradas nas bases de dados consultadas. Apresentou também entre 97 e 98% de similaridade com seqüências de linhagens de *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus pasteurii* e *Staphylococcus warneri*. A análise filogenética (Anexo 3) agrupou a amostra 057-03 DRM-3 com *Staphylococcus capitis* subsp. *capitis*, evidenciando uma relação evolutiva mais próxima da amostra com esta espécie.
- **Amostra CPQBA 057-03 DRM-4 (cód. 9-5):** a seqüência parcial do rDNA 16S desta amostra apresentou 98% de similaridade com seqüências de rDNA 16S de várias linhagens de *Acinetobacter* sp. encontradas nas bases de dados consultadas, e entre 95 e 96% com seqüências de rDNA 16S de linhagens de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii* e *Acinetobacter radioresistens*.

A análise filogenética (Anexo 4) agrupou a amostra CPQBA 057-03 DRM-4 com a linhagem não identificada *Acinetobacter* sp. DSM 590. Ainda, a distância evolutiva observada entre a seqüência de rDNA 16S da amostra CPQBA 057-03 DRM-4 e as seqüências das espécies de *Acinetobacter* que apresentaram maior percentagem de similaridade sugerem que esta amostra pode representar uma espécie ainda não descrita na literatura.

- Os dados de morfologia corroboraram os resultados de identificação.

## 5. Referências Bibliográficas

- Kimura, M. (1980). A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16:111-120.
- Kloos, W. E., Schleifer, K. H. 1975. Isolation and characterization of staphylococci from human skin. II. Descriptions of four new species: *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus simulans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 25: 62-79.
- Saitou, N. & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Yabuuchi, E., Kaneko, T., Yano, I., Moss, C. W., Miyoshi, N. 1983. *Sphingobacterium* gen. nov., *Sphingobacterium spiritivorum* comb. nov., *Sphingobacterium multivorum* comb. nov., *Sphingobacterium mizutae* sp. nov., and *Flavobacterium indologenes* sp. nov.: glucose-nonfermenting Gram-negative rods in CDC groups I1K-2 and I1b. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:580-598.

**Anexo 1. Sequências de rDNA 16S das amostras analisadas:**

>CPQBA 057-03 DRM-1 (530r-1100r)

```
ACATGCAARTCGAGCGCCAKCgVAAAGTRGCTTGCTACTTTGCCGRGAG
CGCCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAAACTGCCTGATGGAGGGGGATAA
CTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTGCAAGACCAAAGAGGG
GGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGGATTAGCTAGT
AGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGG
ATGACCAGCCACACTGGAAGTGGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCG
CGTGTATGAAGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAA
GGTGTGAGGTTAATaACCTCaAGCAATTGACGTTACCCGCAAGAAGC
ACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCAAGCGT
TAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTGTCAAGTCGG
ATGTGAAATcCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATTTCGAAACTGGCAGG
CTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCG
TAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGCCCCCTGGACAAAGAC
TGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGG
TAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGT
GGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA
AGGTTAAAACCTCAAATGAATTGACgGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCAT
GTGGTTAATTGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCTTGACATCCA
GAGAACTTASCAGAGATGSWTTGGTGCCTTCGGGAAGTCTGAGACAGGTG
CTGCATGGCTGTGCTCAG
```

>CPQBA 057-03 DRM-2 (M13r)

```
GCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCCTAATACATGCAAGTCGGACGGGA
TCCATCGGAGAGCTTGCTCGAAGATGGTGAGAGTGGCGCACGGGTGCGTA
ACGCGTGAGCRACCTACCTCTATCAGGGGGATAGCCTCTCGAAAGAGAGA
TTAACACCGCATAACATCAACAGTTCGCATGTTCTGTTGATTAAATATTT
ATAGGATAGAGATGGGCTCGCGTGACATTAGCTAGTTGGTAGGGTAACGG
CCTACCAAGGCGACGATGTCTAGGGGCTCTGAGAGGAGAMTCCCCCACAC
TGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAATA
TTGGTCAATGGGCGGAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGCAGGATGACT
GCCCTATGGGGTGTAACCTGCTTTTGTCCAGGAATAAACCTAAATACGTG
TATTTAGYTGAAATKTAAGAAwTTARGGGTBGG
```

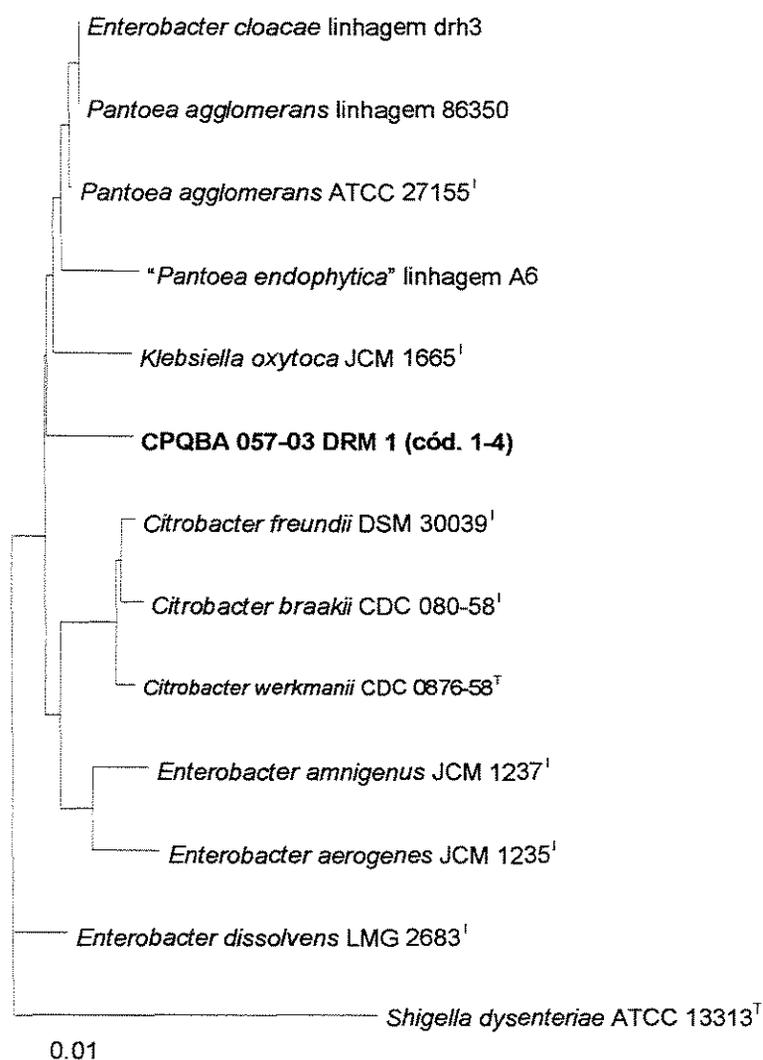
>CPQBA 057-03 DRM-3 (10f-1100r)

GGCGTGCTAAKAGATGCRRRKGKCGAGCGAACAGACGAGGAGCTTGCTCCT  
CTtGACGTTAGCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGATAACCTACCTATA  
AGACTGGGATAAATTTCGGGAAACCGGAGCTAATACCGGATAACATGTTGA  
ACCGCATGGTTCAACAGTGAAAGACGGTCTTGCTGTCACCTTATAGATGGA  
TCCGCGCCGCATTAGCTAGTTGGTAAGGTAACGGCTTACCAAGGCAACGA  
TGGCTACCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGAAGTGAACACGGT  
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGGRrTCTTCCGCAATGGGCGAA  
AGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAA  
ACTCTGTTATTAGGGAAGAACAATGTGTAAGTAACTATGCACGTCTTGA  
CGGTACCTAATCAGAAAGCCACGGCTAACKACGTGCCAGCAGCCGCGGTA  
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATFGGGCGTAAAGCGCGCGT  
AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCACGGCTCAACCGTGGAGGG  
TCATTGGAAACTGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGAAAAGTGGAAATCCAT  
GTGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  
GACTTCTGGTCTGTAAGTACGCTGATGTGCGAAAGCGTGGGGATCAA  
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCCTAAGTG  
TTAGGGGTTTTCCGCCCTTAGTGTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCG  
CCTGGGGAGTTCGACCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACC  
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT  
TACCAAATCTTGACATCCTCTGAYCCCTCTAGAGATAGAGTTTTCCCTTC  
GGGACAGAGTGACAgGT

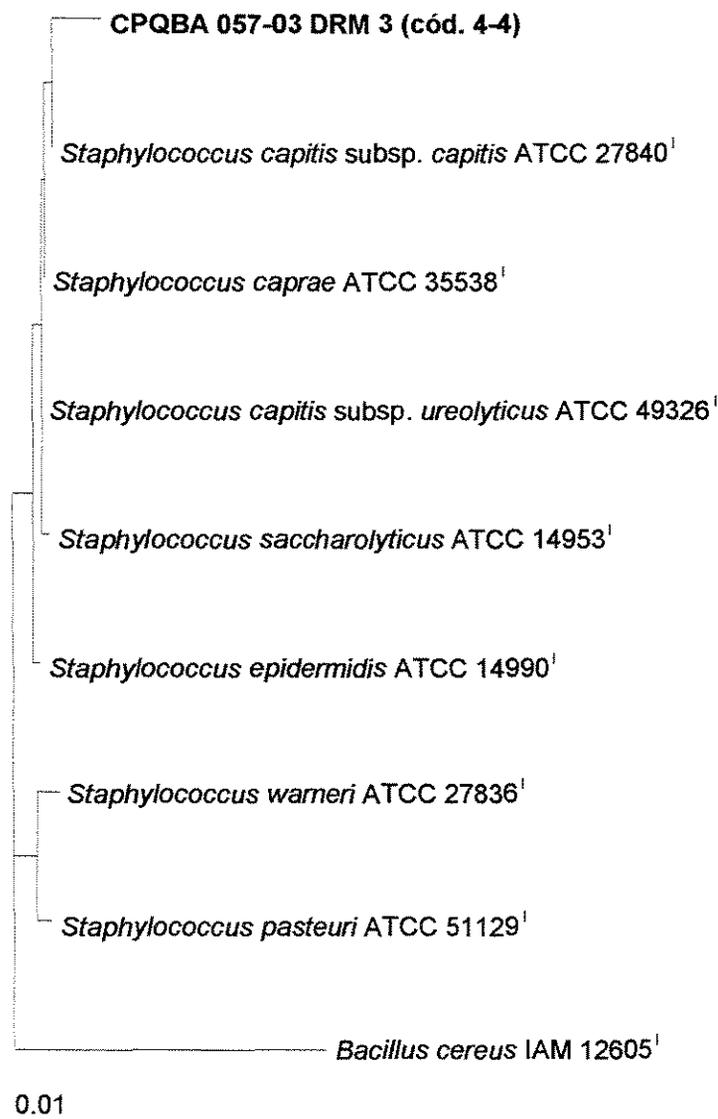
>CPQBA 057-03 DRM-4 (10f-1100r)

CAGGCTTAACACAKGCRAAGTSGAGCGGGGAGGTTGCTTCGGTAACTGAC  
CTAGCGGCGGACGGGTGAGTAATACTTAGGAATCTGCCTATTAATGGGGG  
ACAACATCTCGAAAGGGATGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAAG  
CAGGGGATCACTTGTGACCTTGCCTTAATAGATGAGCCTAAGTCGGATTA  
GCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCCTACCAAGGCGACGATCTGTAGCGGGTCT  
GAGAGGATGATCCGCCACACTGGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTAC  
GGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGGAACCcTGATCCAGC  
CATGCCCGCTGTGTGAAGAAGGCCCTTATGGTTGTAAAGCACTTTAAGCGA  
GGAGGAGGCTCTTTTGGTTAATACCAAGATGAGTGGACGTTACTCGCAG  
AATAGGCACCGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGTAATACAGAGGGTG  
CGAGCGTTAATCGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTGCCTAGGCGGCTTTTT  
AAGTCCGATGTGAAATCCCCGAGCTTAACTTGGGAATTGCATCCGATACT  
GGGAAGCTAGAGTATGGGAGAGGATGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGTGA  
AATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCATCTGGCC  
TAATACTGACGCTGAGGTACGAAAGCATGGGAGCAMCCAGGATTAGATAC  
CCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGTCTACTAGCCGTTGGRGTCTTTGA  
GACTTTAGTGGCGCAGCTAACCGGATAAGTAGACCGCCTGGGGAGTACGG  
TCGCAAGACTAAAACCTCAAATGAATTGACgGGGGCCCGCACAAAGCGGTGG  
AGCATGTGGTTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGAC  
ATAGTAAGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGcCTTCgGGaACTTACATAC  
AgGTGCTG

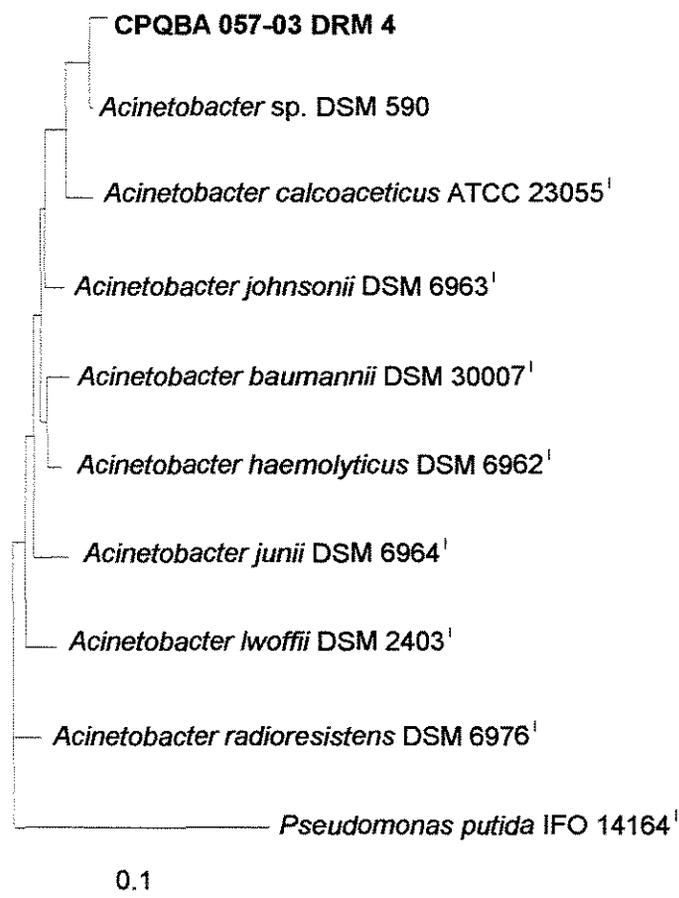
**Anexo 2:** Árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do rRNA 16S da amostra CPQBA 057-03 DRM 1 e de linhagens de *Pantoea agglomerans*, "*Pantoea endophytica*", *Citrobacter braakii*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter werkmanii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter dissolvens*, *Klebsiella oxytoca* e *Shigella dysenteriae* (esta última usada como *outgroup*). ATCC: American Type Culture Collection (Coleção Americana de Culturas Puras, EUA); DSM: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Coleção Alemã de Culturas de Microorganismos e Células, Braunschweig, Alemanha); CDC: *Center for Disease Control* (Centro para Controle de Doença, Atlanta, EUA); JCM: *Japan Collection of Microorganisms* (Coleção de Microorganismos do Japão, Wako, Japão); LMG: *Collection of the Laboratorium voor Microbiologie en Microbiele Genética* (Coleção do Laboratório de Microbiologia e Genética Microbiana, Gent, Bélgica).



**Anexo 3:** Árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do rRNA 16S da amostra **CPQBA 057-03 DRM 3** e de linhagens de *Staphylococcus capitis*, *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saccharolyticus*, *Staphylococcus pasteurii*, *Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus* sp. e *Bacillus cereus* (esta última usada como *outgroup*). ATCC: American Type Culture Collection (Coleção Americana de Culturas Puras, EUA); IAM: Institute of Molecular and Cellular Biosciences (Instituto de Biociência Molecular e Celular, Tóquio, Japão).



**Anexo 4:** Árvore filogenética baseada na análise de sequências parciais do rRNA 16S da amostra **CPQBA 057-03 DRM 4** e de linhagens de *Acinetobacter* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter Iwoffii*, *Acinetobacter radioresistens* e *Pseudomonas putida* (esta última usada como *outgroup*). ATCC: American Type Culture Collection (Coleção Americana de Culturas Puras, EUA); DSM: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH* (DSMZ, Coleção Alemã de Culturas de Microorganismos e Células, Braunschweig, Alemanha); IFO: *Institute for Fermentation* (Instituto para Fermentação, Coleção de Culturas de Microorganismos, Osaka, Japão).



## 2. AVALIAÇÃO DA SOLUBILIDADE E DOS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA DETERMINAÇÃO DE DICLOSULAM EM MEIOS LÍQUIDOS

### 1- Em água

A Tabela abaixo mostra os resultados analíticos obtidos para os ensaios de solubilidade de diclosulam em água, sem passar pelo processo de esterilização, em diferentes tempos de agitação em shaker rotatório.

Resultados analíticos de diclosulam, solubilizado em água, utilizando a técnica CLAE.

<b>Tempo (horas)</b>	<b>Concentração esperada (µg/mL)</b>	<b>Concentração obtida com filtração (µg/mL)</b>	<b>Concentração obtida sem filtração (µg/mL)</b>
0	6,0	2,0	3,1
0	25,0	2,7	6,8
60	6,0	8,7	9,3
60	25,0	12,4	15,6
84	6,0	9,0	9,4
84	25,0	12,6	14,5
108	6,0	8,5	8,9
108	25,0	13,4	13,5

Observa-se pelos resultados acima que para a concentração de 6,0 µg/mL os valores se mostraram bem inferiores ao valor esperado no tempo zero, aproximando-se do valor de referência após 60 horas de agitação em shaker rotatório, mantendo-se constante para os outros tempos. Para a concentração de 25 µg/mL, a concentração obtida analiticamente foi abaixo do valor esperado em todas as análises realizadas ao longo do tempo. A diferença entre as amostras

filtradas e não filtradas diminuiu ao longo do tempo. Esses dados mostram que a temperatura ambiente não foi possível solubilizar mais que 15 µg/mL de diclosulam e que as filtrações das amostras em membranas de 0,22 µ não interferem nos resultados.

## 2- Em meio fermentativo esterilizado

A Tabela abaixo mostra os resultados analíticos dos testes de solubilidade de diclosulam em meios de fermentação suplementados com glicose e extrato de levedura, em diferentes tempos de agitação em shaker rotatório.

Resultados analíticos (utilizando a técnica CLAE) de diclosulam solubilizado em meio de levedura complementado com glicose e diclosulam.

Tempo (horas)	Concentração de glicose (µg/mL)	Concentração de diclosulam esperada (µg/mL)	Concentração de diclosulam obtida com filtração (µg/mL)	Concentração de diclosulam obtida sem filtração (µg/mL)
0	20	25,0	20,7	22,5
24	20	25,0	19,7	22,1
48	20	25,0	21,3	21,9
72	20	25,0	18,0	21,6
0	40	25,0	17,8	20,0
24	40	25,0	18,1	20,8
48	40	25,0	16,0	21,7
72	40	25,0	17,3	22,3
0	20	100,0	79,8	83,9
24	20	100,0	75,0	85,7
48	20	100,0	65,0	89,1
72	20	100,0	75,1	87,1
0	40	100,0	87,8	98,9
24	40	100,0	80,6	98,6
48	40	100,0	78,6	102,0
72	40	100,0	75,3	107,9

Observa-se pelos resultados acima que as diferenças entre o valor esperado e o obtido foram pequenas quando comparado com o ensaio de dissolução em água sem o processo de esterilização. Esse fato mostra que nas condições de preparação de meio utilizadas nos ensaios é possível dissolver até 100 µg/mL de diclosulam. Apesar dos ensaios mostrarem pequenas diferenças de concentração entre as amostras filtradas e não filtradas em membranas 0,22 µm, essa operação foi realizada com amostras contendo microrganismos, com o objetivo de preservar a coluna cromatográfica.