

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**Avaliação sobre a biodegradação de paclobutrazol  
utilizando culturas mistas de bactérias**

**Fernanda Leitão Vaz**

Recife – 2006

**Fernanda Leitão Vaz**

## **Avaliação sobre a biodegradação de paclobutrazol utilizando culturas mistas de bactérias**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia de Produtos Bioativos, Departamento de Antibióticos, da universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia de Produtos Bioativos.

Orientadoras: Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior  
Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

Recife – 2006

**Vaz, Fernanda Leitão**  
**Avaliação sobre a biodegradação de**  
**paclobutrazol utilizando culturas mistas de bactérias /**  
**Fernanda Leitão Vaz. – Recife : O Autor, 2006.**  
**83 folhas : il., fig., tab.**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de**  
**Pernambuco. CCB. Biotecnologia de Produtos**  
**Bioativos, 2006.**

**Inclui bibliografia.**

**1. Microbiologia – Biodegradação. 2.**  
**Agroquímicos – Paclobutrazol – *Pseudomonas* sp. –**  
**Culturas mistas. 3. Poluentes – Biorremediação. I.**  
**Título.**

**579.841.1**  
**579.33**

**CDU (2.ed.)**  
**CDD (22.ed.)**

**UFPE**  
**BC2006-154**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *FERNANDA LEITÃO VAZ* AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS  
BIOATIVOS, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO  
DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

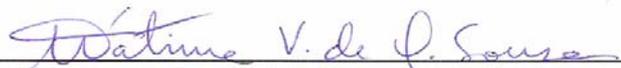
DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 10 DE MARÇO DE 2006 DIANTE DA BANCA  
EXMINADORA:



---

Prof. Dra. Maria de Los Angeles Perez Fernandez Palha

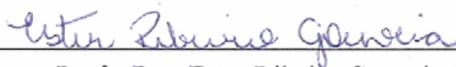
Departamento de Engenharia Química - UFPE



---

Prof. Dra. Maria de Fátima Vieira de Queiroz Sousa

Departamento de Antibióticos - UFPE



---

Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia (Orientadora)

Departamento de Antibióticos - UFPE

## **Dedico**

Aos meus pais e padrinhos por todo o amor, compreensão, apoio e incentivo nos diferentes caminhos da minha vida. Aos meus irmãos pela amizade.

## AGRADECIMENTOS

Ao Sr. Pedro Paulo pela enorme ajuda, sem a qual o meu mestrado não teria sido realizado.

À Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior pela orientação e por ter me cedido a oportunidade de trabalhar com o tema estudado.

À Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia pela amizade, co-orientação e incentivo, sempre indicando a direção a ser tomada nos momentos de maior dificuldade.

Aos meus amigos do Laboratório de Processos Biotecnológicos, Fábio e Isabel pelo companheirismo, e em especial às amigas Manuella e Catarina pela amizade e grande ajuda no decorrer do trabalho.

Aos colegas do mestrado pela amizade e incentivo em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Antibióticos pela ajuda e presteza.

Às minhas amigas Helen, Luciana, Sandra, Jacira, Samantha, Mellissa, Laís e Danise pela convivência, apoio, amizade, alegrias e tristezas vividas durante o mestrado. E por fazerem parte de minha família aqui em Recife.

Ao meu namorado Henrique, que sempre me estimula a crescer científica e pessoalmente.

A todos que colaboraram direta ou indiretamente para a concretização deste sonho.

**Muito Obrigada!**

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>01</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>04</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>05</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>08</b>
<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>09</b>
<b>2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>12</b>
2.1 – Compostos xenobióticos e impacto ambiental.....	12
2.2 – Persistência e biodegradação de xenobióticos.....	14
2.3 – Fatores que afetam a biodegradação.....	18
2.4 – Paclobutrazol.....	21
2.5 – Possíveis vias de degradação de paclobutrazol.....	23
<b>3 – MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 – Material.....	28
3.1.1 – Solo.....	28
3.1.2 – Paclobutrazol.....	29
3.1.3 – Meios de cultura.....	30
3.1.4 – Microrganismos.....	35
3.2 – Procedimento Experimental.....	35
3.2.1 – Isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol.....	35
3.2.2 – Caracterização parcial das bactérias resistentes a paclobutrazol.....	36
3.2.3 – Padronização dos inóculos.....	37
3.2.4 – Biodegradação de paclobutrazol.....	38
3.3 – Métodos analíticos.....	39
3.3.1 – Quantificação do crescimento.....	39
3.3.2 – Quantificação da biodegradação.....	39
3.3.3 – Quantificação de glicerol.....	40
3.3.4 – Quantificação de raminose.....	41

3.3.5 – Quantificação do índice de emulsificação.....	42
3.7 – Ensaio de atividade antimicrobiana.....	42
<b>4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
4.1 – Isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol.....	44
4.2 – Caracterização parcial dos isolados.....	44
4.3 – Padronização dos inóculos.....	50
4.4 – Biodegradação de paclobutrazol.....	52
4.4.1 – Biodegradação de paclobutrazol por culturas mistas das amostras ...	52
4.4.2 – Utilização da cultura mista da amostra MS acrescida de linhagens de <i>Streptomyces</i> e de <i>Rhodococcus</i> em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	62
4.4.3 – Efeito da adição de glicose ou glicerol como fontes de carbono adicionais na biodegradação de paclobutrazol pela cultura mista MS.....	65
4.5 – Avaliação da atividade antimicrobiana.....	72
<b>5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>73</b>
5.1 – Conclusões.....	73
5.2 – Sugestões.....	75
<b>6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> – Fórmula estrutural da molécula de paclobutrazol.....	21
<b>Figura 2.2</b> – Via metabólica de degradação do cloro-benzeno em <i>Pseudomonas</i> sp. P51, JS150, RHO1, JS6 (McLeish & Essenberg, 2004).....	25
<b>Figura 2.3</b> – Via metabólica de degradação da atrazina em <i>Pseudomonas</i> sp. ADP, <i>Ralstonia</i> sp. M91-3, <i>Clavibacter</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp. J14a, <i>Alcaligenes</i> sp. SG1 (Stephens & Kotharu, 2002a).....	26
<b>Figura 2.4</b> – Etapas de degradação da atrazina em <i>Rhodococcus</i> spp. NI86/2, <i>Pseudomonas</i> spp. 192, 194, <i>Streptomyces</i> sp. PS1/5 e <i>Nocardia</i> sp. (Stephens & Kotharu, 2002b).....	27
<b>Figura 3.1</b> – Esquema para o isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol.....	36
<b>Figura 3.2</b> – Esquema dos experimentos para a biodegradação de paclobutrazol.....	39
<b>Figura 3.3</b> – Espectro de paclobutrazol na faixa de 205 a 240 nm.....	40
<b>Figura 3.4</b> – Curva de calibração de glicerol.....	41
<b>Figura 3.5</b> – Curva de calibração de raminose.....	42
<b>Figura 4.1</b> – Porcentagem de bactérias caracterizadas pela coloração de Gram.....	48
<b>Figura 4.2</b> – Curvas de crescimento das <i>Pseudomonas</i> isoladas.....	50
<b>Figura 4.3</b> – Curvas de crescimento dos actinomicetos da Coleção do Departamento de Antibióticos: (a) <i>Rhodococcus rhodochrous</i> 3317 e (b) <i>Streptomyces</i> sp. 11470.....	51
<b>Figura 4.4</b> – Crescimento da cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	53
<b>Figura 4.5</b> – Crescimento da cultura mista MC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	53
<b>Figura 4.6</b> – Crescimento da cultura mista BS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	54

<b>Figura 4.7</b> – Crescimento da cultura mista BC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	54
<b>Figura 4.8</b> – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	56
<b>Figura 4.9</b> – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	56
<b>Figura 4.10</b> – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista BS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	57
<b>Figura 4.11</b> – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista BC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	57
<b>Figura 4.12</b> – Crescimento da bactéria MS9 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	58
<b>Figura 4.13</b> – Crescimento da bactéria MS23 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	59
<b>Figura 4.14</b> – Crescimento da bactéria MS26 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	59
<b>Figura 4.15</b> – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS9 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	60
<b>Figura 4.16</b> – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS23 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	61
<b>Figura 4.17</b> – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS26 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	61
<b>Figura 4.18</b> – Crescimento da cultura mista MS adicionada de S ( <i>Streptomyces</i> sp. 11470) e R ( <i>Rhodococcus</i> sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol).....	62

<b>Figura 4.19</b> – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MS adicionada de S ( <i>Streptomyces</i> sp. 11470) e R ( <i>Rhodococcus</i> sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	63
<b>Figura 4.20</b> – Crescimento das bactérias S ( <i>Streptomyces</i> sp. 11470) e R ( <i>Rhodococcus</i> sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seus respectivos controles (meio de cultura sem paclobutrazol).....	64
<b>Figura 4.21</b> – Degradação do paclobutrazol pelas bactérias S ( <i>Streptomyces</i> sp. 11470) e R ( <i>Rhodococcus</i> sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	65
<b>Figura 4.22</b> – Crescimento da cultura mista MS durante 30 dias de biodegradação em meio contendo paclobutrazol e glicose como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol, apenas com glicose).....	66
<b>Figura 4.23</b> – Crescimento, degradação de paclobutrazol e consumo de glicerol pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol e glicerol como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio sem paclobutrazol, apenas com glicerol).....	68
<b>Figura 4.24</b> – Produção de ramnose índice de emulsificação pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol e glicerol como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio sem paclobutrazol, apenas com glicerol).....	71
<b>Figura 4.25</b> – Produção de ramnose índice de emulsificação pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono.....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 3.1</b> – Amostras de solo utilizadas no isolamento de bactérias degradadoras de paclobutrazol.....	28
<b>Tabela 3.2</b> – Características dos solos utilizados no isolamento de bactérias degradadoras de paclobutrazol.....	29
<b>Tabela 3.3</b> – Propriedades físico-químicas do paclobutrazol (Silva <i>et al.</i> , 2003a).....	30
<b>Tabela 3.4</b> – Meio para o isolamento e ensaio de biodegradação.....	31
<b>Tabela 3.5</b> – Composição do meio Ágar Triptona Soja (TSA).....	32
<b>Tabela 3.6</b> – Composição do caldo Nutriente.....	32
<b>Tabela 3.7</b> – Composição do caldo ISP-I.....	32
<b>Tabela 3.8</b> – Composição do meio Ágar D4.....	33
<b>Tabela 3.9</b> – Composição do meio Ágar Cetrimida.....	33
<b>Tabela 3.10</b> – Composição do meio King (KING <i>et al.</i> , 1954).....	34
<b>Tabela 3.11</b> – Composição do meio ISP-II.....	34
<b>Tabela 4.1</b> – Bactérias isoladas de amostras dos solos de Mandacaru e de Bebedouro	46
<b>Tabela 4.2</b> – Resultados dos testes de coloração de Gram dos isolados.....	47
<b>Tabela 4.3</b> – Seleção de <i>Pseudomonas</i> isoladas de solos de Mandacaru e de Bebedouro.....	49
<b>Tabela 4.4</b> – Velocidade específica máxima de crescimento das bactérias utilizadas..	51
<b>Tabela 4.5</b> – Amostras de solos e bactérias correspondentes.....	52
<b>Tabela 4.6</b> – Comparação entre os percentuais de biodegradação de paclobutrazol obtidos no presente trabalho e encontrados na literatura.....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu_{\text{máx}}$	Velocidade Específica Máxima
ABS	Absorbância
BC	Solo bebedouro com histórico de paclobutrazol
BS	Solo bebedouro sem histórico de paclobutrazol
C	Carbono
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DCP	2,4-diclorofenol
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DT <sub>50</sub>	Dose Letal de 50 %
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
IE	Índice de Emulsificação
kPa	Quilo Pascal
M.O.	Matéria Orgânica
MC	Solo mandacaru com histórico de paclobutrazol
MS	Solo mandacaru sem histórico de paclobutrazol
N	Nitrogênio
P	Fósforo
PBZ	Paclobutrazol
R	<i>Rhodococcus</i>
rpm	Revoluções por minuto
S	<i>Streptomyces</i>

TSA	Agar Triptona Soja
U. V.	Radiação Ultravioleta
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Um	Umidade

## RESUMO

Paclobutrazol (PBZ) é um regulador do crescimento vegetal que permanece ativo no solo e pode afetar o crescimento e o desenvolvimento de plantios subseqüentes. O objetivo deste trabalho foi investigar a biodegradação deste composto por bactérias nativas de solos de duas regiões do semi-árido nordestino, Mandacaru e Bebedouro, com plantios de manga, com e sem histórico de aplicação de PBZ. As bactérias foram isoladas por enriquecimento e caracterizadas parcialmente. Os experimentos de biodegradação foram realizados em frascos utilizando-se culturas mistas de *Pseudomonas* spp., conforme o local de isolamento, em meio mineral, contendo apenas PBZ ou acrescido de glicerol ou glicose, como fonte de carbono, ou ainda adicionando-se duas linhagens bacterianas, uma de *Streptomyces* e outra *Rhodococcus*. Os frascos foram incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm, durante 30 dias, com a retirada de amostras em intervalos pré-definidos. As quantificações do crescimento e da biodegradação de paclobutrazol foram realizadas por espectroscopia a 420 nm e 221 nm, respectivamente. Nos experimentos utilizando apenas PBZ, como fonte de carbono, houve um significativo crescimento e a biodegradação alcançou seu valor máximo de 47 % em 20 dias de cultivo, quando foi utilizada a cultura mista composta pelas *Pseudomonas* spp., isoladas da região de Mandacaru sem histórico de aplicação de PBZ (MS). A esta cultura mista foram adicionadas linhagens de *Streptomyces* e de *Rhodococcus*, e foi observada uma inibição do crescimento e conseqüentemente da biodegradação. Nos experimentos utilizando PBZ e glicose, como fontes de carbono, o crescimento da cultura mista MS foi consideravelmente maior, não sendo, entretanto, verificado a biodegradação de PBZ. Por outro lado, quando foram utilizados PBZ e glicerol, o crescimento da cultura mista MS foi menor, mas ainda maior do que aquele obtido nos experimentos apenas com PBZ. A produção de biossurfactante nos experimentos utilizando PBZ e glicerol foi quantificada em 0,2 g/L, enquanto no experimentos com apenas PBZ como fonte de carbono, não foi verificada produção.

## ABSTRACT

Paclobutrazol (PBZ) is a regulator of vegetal growth that remains active in the soil and can affect the growth and the development of subsequent cultures. The aim of this work was to investigate the biodegradation of paclobutrazol by soil native bacteria of two locations of the northeastern region of Brazil, Mandacaru and Bebedouro, with cultures of mango, with and without previous PBZ utilization. The bacteria were isolated by enrichment and partially characterized. Biodegradation experiments were carried out using mixed cultures of *Pseudomonas* spp., according to the isolation location, in mineral broth with only PBZ or with addition of glycerol or glucose as carbon sources. Experiments were also carried out with the addition of *Streptomyces* and *Rhodococcus* strains. Shake flasks were incubated at 30 °C and 200 rpm, during 30 days, and samples were taken daily in predefined intervals. Quantification of growth and biodegradation were made by spectrophotometry at 420 and 221 nm, respectively. In experiments using PBZ as the sole carbon source, growth was significant and biodegradation reached a maximum value of 47 % in 20 days when a mixed culture of *Pseudomonas* (MS), isolated in the region of Mandacaru without previous PBZ application, was used. When *Streptomyces* and *Rhodococcus* strains were added to mixed culture MS, no growth was observed. In experiments using PBZ and glucose as carbon sources, growth of mixed culture MS was considerably higher, not being, however, verified biodegradation of PBZ. When PBZ and glycerol were used, growth of mixed culture MS was lower, but still higher than in the experiments with PBZ as the sole carbon source. Production of biosurfactant in experiments using PBZ and glycerol as carbon sources was quantified as 0,2 g/L, while in the experiments with PBZ as the sole carbon source production was not verified.

## 1 – INTRODUÇÃO

A mangueira, *Mangifera indica* L., é uma planta da família Anacardiaceae, originária da Índia, de distribuição tropical, capaz de se desenvolver com êxito em regiões subtropicais. A manga é uma das frutas mais procuradas no mundo, e esta demanda tem se mostrado crescente. Os principais países produtores dessa fruta são Índia, China, Tailândia e México, sendo o Brasil o nono na colocação desse *ranking* (MACIEL, 2005).

O Brasil é o maior produtor de manga da América do Sul, com uma produção de aproximadamente de 456 mil toneladas, correspondendo a 51 % do continente sul americano, mas apenas 2 % do total mundial, cuja produção é da ordem de 23.454.732 mil toneladas anuais (REIS *et al.*, 2000). Os produtores enfrentam grandes problemas com a cultura em função de baixos rendimentos alcançados devido a problemas no florescimento e frutificação da planta, sendo que menos de 1% dos frutos chegam à fase de colheita (MENDONÇA *et al.*, 2001). Outro problema do cultivo da mangueira é a irregularidade da produção e para isso faz-se o uso de reguladores de crescimento vegetal (SILVA *et al.*, 2003a).

Os reguladores de crescimento vegetal são agroquímicos usados na agricultura e horticultura para o controle vegetativo e aumento do rendimento reprodutivo de plantas. O paclobutrazol, cujo modo de ação é a inibição da síntese da giberelina, é um regulador do crescimento utilizado na cultura da manga para o controle do crescimento vegetativo e aumentando a capacidade reprodutiva da planta (JACOBS & BERG, 2000). Entretanto, este composto permanece ativo no solo por vários anos e pode afetar severamente o crescimento e o desenvolvimento de plantios subseqüentes, principalmente pela redução do vigor vegetativo do solo (SILVA *et al.*, 2003a). Por ser o paclobutrazol um derivado dos triazóis, também

possui efeitos na microbiota do filoplano da mangueira, alterando o seu equilíbrio, principalmente pela sua atividade fungicida (JACOBS & BERG, 2000).

A necessidade de reduzir o impacto ambiental de agroquímicos tem despertado o interesse para a biodegradação de tais compostos, uma vez que a ação dos microrganismos do solo contribui para a dissipação dessas molécula do ambiente (ARAÚJO, 2002). Os microrganismos exibem estratégias para a assimilação ou metabolismo do substrato, que são o catabolismo e o cometabolismo. No catabolismo, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores para gerar energia e biomassa. Por outro lado, no cometabolismo, os microrganismos transformam os compostos químicos em produtos sem produção de energia para o seu crescimento (SILVA & FAY, 1997).

As bactérias se destacam por apresentarem uma ampla diversidade metabólica como, por exemplo, o gênero de bactéria *Pseudomonas*, capaz de metabolizar mais de 90 diferentes compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia (BAKER & HERSON, 1994b). Jackson *et al.* (1996) isolaram nove bactérias capazes de degradar paclobutrazol, sendo oito do gênero *Pseudomonas* e uma do gênero *Alcaligenes*. Estes autores encontraram que um dos isolados de *Pseudomonas* foi capaz de degradar o anel cloro fenil, mas não o anel 1,2,4 triazol do paclobutrazol.

Diante do que foi exposto, o objetivo geral deste trabalho foi investigar a degradação de paclobutrazol por bactérias da microbiota nativa de solos provenientes de regiões com plantios de manga do semi-árido nordestino. Dentro desse objetivo principal, os objetivos específicos foram:

- ✓ Isolar microrganismos de solos com e sem histórico de aplicação de paclobutrazol;
- ✓ Selecionar bactérias do gênero *Pseudomonas* degradadoras de paclobutrazol;

- ✓ Investigar as cinéticas de crescimento das culturas mistas de *Pseudomonas* em meio mineral, contendo paclobutrazol como única fonte de carbono;
- ✓ Investigar a cinética de biodegradação de paclobutrazol pelas culturas mistas de *Pseudomonas* em meio mineral, contendo paclobutrazol como única fonte de carbono;
- ✓ Verificar a interferência de outros gêneros bacterianos, *Streptomyces* e *Rhodococcus* no crescimento das culturas mistas de *Pseudomonas* e na biodegradação de paclobutrazol;
- ✓ Verificar a interferência de fontes adicionais de carbono, glucose ou glicerol, no crescimento das culturas mistas de *Pseudomonas* e na biodegradação de paclobutrazol;
- ✓ Averiguar a toxicidade das amostras, durante os ensaios, contra as bactérias utilizadas.

## **2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 – Compostos xenobióticos e impacto ambiental**

Os xenobióticos são compostos orgânicos produzidos via síntese química, e que nunca estiveram presentes na natureza. São compostos químicos poluentes da biosfera, pois têm estruturas moleculares e seqüências de ligações que não são reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes na natureza e, portanto, resistem à biodegradação, ou não são completamente metabolizados, resultando num acúmulo no ambiente (SILVA & FAY, 1997). A ameaça destes poluentes ambientais não é um problema recente, sendo causada nos dias de hoje, principalmente, pela ação de despejos industriais e uso de agroquímicos em lavouras (BAKER & HERSON, 1994a). No caso dos agroquímicos, o impacto causado por esses compostos gera 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.

Existem várias razões que tornam um composto xenobiótico recalcitrante à biodegradação, como: substituições incomuns com cloro ou outro halogênio, ligações incomuns ou seqüências de ligações, em átomos de carbono terciários e quaternários, anéis aromáticos altamente condensados e moléculas de altíssimo peso molecular. Outras razões mais sutis podem ser: incapacidade do composto induzir a síntese de enzimas degradadoras, impossibilidade do composto penetrar nas células microbianas por falta de permeases adequadas, indisponibilidade do composto, devido à insolubilidade ou adsorção, e toxicidade excessiva do composto parental ou de seus produtos metabólicos (SILVA & FAY, 1997).

Os xenobióticos podem estar presentes de formas distintas nos solos, dissolvidos na água do solo, vaporizados no ar do solo, adsorvidos ou oclusos nas partículas minerais e orgânicas, fatores estes que também podem dificultar o processo de biodegradação (MONTEIRO, 1997). O grau de associação de poluentes orgânicos e inorgânicos no solo é governado por interações físico-químicas complexas. Essas interações envolvem sorção nos constituintes do solo, comportamento dentro da matriz do solo (microporos) e formação de fase líquida não-aquosa. A fase líquida não-aquosa representa as substâncias orgânicas que são relativamente insolúveis na água e que se tornam poluentes em longo prazo (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

O solo é um sistema vivo e heterogêneo composto de muitas associações microbianas. Estas associações são sensíveis a modificações físicas e químicas, tais como: alteração no modo de cultivo e adição de substâncias biologicamente ativas que podem afetar o equilíbrio microbiano (ARAÚJO, 2002).

Estudos sobre os efeitos dos xenobióticos sobre o solo e sobre os organismos do solo são realizados, em sua maioria, a curto-prazo, após a aplicação de uma única dose do composto. No entanto, no campo, um ou mais agroquímicos podem ser aplicados repetidamente no mesmo solo por muitos anos, o que pode levar a um aumento na concentração de resíduos destes xenobióticos ou de seus metabólitos. Desta forma, a possibilidade de efeitos danosos sobre a biomassa microbiana pode ser muito maior, podendo levar a um decréscimo nas populações microbianas, afetando desta forma a biodiversidade. Estes efeitos estão associados à sucessão ecológica de bactérias e fungos e à cadeia alimentar associada a estes organismos (SILVA *et al.*, 2003b). A extensão e a duração destas modificações dependerá da intensidade e do tempo de exposição ao composto.

Devido ao aumento da população e à crise de alimentos no mundo, o uso de agroquímicos tornou-se comum para o aumento da produção agrícola. Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da formação de grandes quantidades de resíduos, nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em se conhecer o comportamento e destino desses compostos nos diversos ecossistemas (JAVOREKOVÁ, 2001).

Os xenobióticos são produtos utilizados na agricultura com finalidade de controle fitossanitário, aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento. Muitos desses produtos têm seu efeito nocivo ao meio ambiente, devendo ser recomendado de maneira criteriosa a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (ARAÚJO, 2002).

Existe um consenso de que o impacto ambiental de um xenobiótico depende de alguns critérios (SILVA *et al.*, 2003b), entre eles destacam-se: quantidade do ingrediente ativo aplicado e local de aplicação; partição e concentração nos compartimentos ar, solo, águas superficiais e subterrâneas; taxa de degradação e toxicidade em cada compartimento.

## **2.2 – Persistência e biodegradação de xenobióticos**

Xenobióticos podem ser classificados como persistentes caso sua degradação, pelos microrganismos nativos do solo, demore mais do que a degradação da maioria das substâncias naturais (SILVA *et al.*, 2003b).

A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que possam ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. São

cada vez mais freqüentes os estudos baseados na adição de microrganismos para degradar compostos químicos, bem como a degradação total ou parcial de pesticidas por populações microbianas naturais presentes em solos (UETA, 2002).

A degradação microbiana é considerada o mais importante processo que determina a persistência de pesticidas no solo. Os microrganismos, devido à sua capacidade degradadora, participam de forma significativa na eliminação ou redução acentuada dos níveis desses compostos empregados na agricultura (ARAÚJO *et al.*, 2003).

O metabolismo pode resultar na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para CO<sub>2</sub>, água, íons inorgânicos e energia, que é utilizada na biossíntese dos constituintes celulares. Em contrapartida, muitos microrganismos são capazes de transformar parcialmente os compostos químicos em produtos sem produção de energia para o seu crescimento; este processo é denominado de cometabolismo e é um fenômeno celular típico. Pesquisas sobre estas transformações cometabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos à atividade de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais (SILVA *et al.*, 2003b).

O isolamento e seleção de linhagens microbianas capazes de degradar xenobióticos em geral, a partir de solos, têm sido realizados na busca de microrganismos adaptados ao ambiente onde vai ser empregado e com potencial poder de degradação da substância de interesse. Uma vez que microrganismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar xenobióticos, pode-se desenvolver a biorremediação de sítios contaminados empregando-se microrganismos selecionados (UETA, 2002).

Culturas de enriquecimento são freqüentemente usadas como uma primeira etapa na obtenção de culturas puras de organismos envolvidos nos ciclos biogeoquímicos de

degradação de contaminantes ambientais. Por exemplo, alguns meios de enriquecimento, promovem somente um único composto orgânico halogenado como única fonte de energia, enriquecendo o meio para organismos degradadores específicos (CALDWELL *et al.*, 1997).

Uma outra alternativa para resolver o problema da permanência de poluentes no solo é a utilização de surfactantes para aumentar a desorção e a disponibilidade destes compostos, o que muitas vezes leva à sua degradação ou remoção do ambiente. Entretanto, os surfactantes sintéticos podem diminuir a biodegradação devido ao seu efeito tóxico. Dessa forma, o uso de biosurfactantes no controle da biodisponibilidade de poluentes presentes no solo e em outros ambientes é uma opção atrativa devido à sua biodegradabilidade e baixa toxicidade (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os surfactantes são agentes ativos de superfície com propriedades que variam largamente, incluindo redução de tensões superficial e interfacial dos líquidos. A tensão superficial está definida como a entalpia de superfície livre por unidade de área. Os surfactantes sintéticos e naturais são capazes de reduzir a tensão superficial da água de 72  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  até ao redor de 27  $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$  (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

Os biosurfactantes são compostos de origem biológica, que possuem regiões, hidrofílicas e hidrofóbicas, características de moléculas anfífilas, e por esta propriedade, reduzem a tensão superficial formando agregados chamado micelas (KOSARIC, 2001). São moléculas produzidas por bactérias, fungos filamentosos ou leveduras, que apresentam propriedades biológicas aplicáveis a várias indústrias, tais como: as indústrias farmacêutica, de cosméticos, de petróleo e de alimentos. Estes compostos, nos últimos anos, têm recebido atenção especial devido à sua biodegradabilidade, baixa toxicidade e, conseqüentemente, aceitabilidade ecológica. Os biosurfactantes são classificados em glicopeptídeos, lipopeptídeos e lipoproteínas, biosurfactantes poliméricos, fosfolipídios e ácidos graxos.

Dentre os glicolipídeos, os mais estudados são os raminolipídeos, produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* (DESAI & BANAT, 1997).

Dentre os microrganismos produtores de biossurfactantes, destacam-se: *Pseudomonas aeruginosa* (biossurfactantes mono e di-raminolipídeo), *Corynebacterium*, *Nocardia* e *Rhodococcus* spp. (fosfolipídeos, trealose, glicolipídeos, etc.), *Bacillus subtilis* (lipopeptídeo surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeo similar à surfactina), *Arthrobacter paraffineus* (trealose) e outros (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

O uso de biossurfactantes tem ajudado na biodegradação de diversos compostos. Estes podem ser usados diretamente para emulsificar e aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos no solo. Alternativamente, podem ser utilizados microrganismos produtores ou a adição de fatores de crescimento de microrganismos selvagens capazes de produzir estes compostos (BANAT *et al.*, 2000).

Alguns estudos confirmam o aumento da biodisponibilidade de compostos aromáticos pouco solúveis, como os aromáticos policíclicos (HPA) pelo uso de biossurfactantes. O tratamento de amostras contaminadas por naftaleno com biossurfactantes resultou no aumento das taxas de mineralização e solubilização (ZHANG *et al.*, 1997; CALVO *et al.*, 2004).

O uso de biossurfactantes na biodegradação de pesticidas também vem sendo objeto de investigação. O uso de surfactante, produzido por *Pseudomonas*, na degradação de hexaclorociclohexano foi relatado. Outros organoclorados, como DDT e ciclodienos, também foram emulsificados, porém em menor grau (NITSCHKE & PASTORE, 2002).

Embora o potencial de produção dos biossurfactantes seja determinado pela genética do microrganismo, outros fatores, como as condições ambientais e a natureza do substrato, também influenciam no nível de expressão (RAHMAN *et al.*, 2002). Este último inclui a

qualidade e a quantidade dos constituintes de carbono e nitrogênio na cultura e/ou no ambiente físico natural de sistemas do solo (DESAI & BANAT 1997). *Pseudomonas aeruginosa* pode utilizar substratos, como: alcanos, piruvato, glicerol, succinato, frutose, óleo de oliva, glicose e manitol para produzir raminolipídeos (MULLIGAN *et al.*, 2001). Quanto ao nitrogênio, o tipo presente ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_3^-$ , uréia ou aminoácidos) também influencia na produção de biossurfactantes. Observações, a respeito do efeito da limitação de nitrogênio mostram que estimula a produção por alguns microrganismos. Isto tem implicações para a biorremediação, pois os sistemas são suplementados freqüentemente com os nitratos e os fosfatos para suprir a limitação de N e P (CHRISTOFI & IVSHINA, 2002).

### **2.3 – Fatores que afetam a biodegradação**

Diversos fatores físicos podem influenciar na biodegradação de xenobióticos, tais como a densidade do inóculo, a biodisponibilidade do poluente e as condições do solo (umidade, temperatura, pH e matéria orgânica) (KARPOUZAS & WALKER, 2000; SINGH *et al.*, 2003). Em trabalho com a degradação de etoprofos, um nematicida, Karpouzas & Walker (2000) verificaram que uma espécie de *Pseudomonas putida* degradou o composto mais efetivamente em solos com potenciais de água de -33 e -10 kPa, com temperaturas de 20 °C e 35 °C, com pH 6,8 ou 8,3, e com matéria orgânica entre 0,3 e 8,5 %.

Além de fatores físicos, também existem os fatores biológicos como competição com os microrganismos nativos por substratos, antagonismo e predação (KARPOUZAS & WALKER, 2000).

A biodegradação de compostos complexos requer freqüentemente a cooperação de mais de uma espécie microbiana. Culturas puras podem metabolizar somente uma faixa

limitada de substratos, assim, a formação de populações mistas com ampla capacidade enzimática é necessária (ALEXANDER, 1997).

Os membros de uma comunidade microbiana têm papéis significantes e podem depender da presença de outras espécies para sobreviver quando a fonte de energia é limitada e confinada a carbonos complexos. As vantagens de uma cultura mista podem ser atribuídas a efeitos de sinergismo entre os membros da associação. O mecanismo é complexo, sendo possível que uma espécie remova os metabólitos tóxicos de outras espécies precedentes. Isto também possibilita a degradação de compostos que a primeira degradou apenas parcialmente, por uma segunda espécie (GHAZALI *et al.*, 2004). Porém, se os organismos envolvidos na cultura mista não fazem parte de uma mesma associação adaptativa, a cultura pode não ser estável, havendo assim a predominância de um ou mais organismos (CALDWELL *et al.*, 1997).

Duetz *et al.* (1994), em trabalhos sobre a biodegradação de tolueno, mostraram que a competição de diferentes espécies de bactérias pelo mesmo substrato resultou na predominância de apenas uma espécie e que isto pode estar relacionado com os primeiros passos na biodegradação do composto utilizado.

Parâmetros cinéticos, como taxa de crescimento, são fatores relatados como importantes para a competição. Esse fator foi ilustrado recentemente em trabalho sobre a degradação de ácido 2,4-diclorofenoacético. Entretanto, outros fatores, tais como o período de indução, adaptação ao ambiente e influência de fatores do crescimento, podem também contribuir na competição (KA *et al.*, 1994)

As fontes de carbono presentes também podem influenciar na biodegradação. A presença de fontes adicionais pode aumentar ou diminuir a biodegradação de xenobióticos (SINGH *et al.*, 2003; SCHMIDT *et al.*, 1987).

Há diversos exemplos em que os contaminantes orgânicos podem não estar em quantidades suficientes, ou disponíveis para a biodegradação pelos microrganismos presentes. Se a concentração do composto estiver abaixo de um determinado nível inicial, necessário para fornecer as exigências de fontes de carbono e energia aos microrganismos, a degradação pode não ocorrer. Alternativamente, se a concentração do composto exceder um determinado nível, problemas de toxicidade podem ocorrer. Finalmente, pode não ser possível a degradação direta do composto, portanto a degradação através de um processo cometabólico pode ser necessária. Geralmente, a utilização simultânea de diferentes fontes de carbono favorece o crescimento microbiano numa situação de limitação de carbono (BAKER, 1994).

Por outro lado, a presença de um repressor catabólico, ou seja, a presença de uma fonte de carbono que reprime a expressão de certos genes e operons que são responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono, pode resultar numa baixa ou nenhuma taxa de biodegradação, havendo apenas o consumo da fonte de carbono preferencial (BRÜCKNER & TITGEMEYER, 2002).

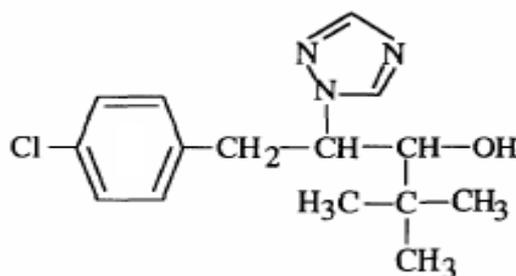
LaPat-Polasko *et al.* (1984) encontraram que a degradação de cloreto de metileno por uma linhagem de *Pseudomonas* sp. foi mais rápida quando acetato estava presente do que quando foi utilizado apenas cloreto de metileno como única fonte de carbono. Schmidt *et al.* (1987) verificaram que a presença de glicose como substrato secundário aumentou a taxa de degradação de *p*-nitrofenol por *Pseudomonas*. Em adição, eles verificaram que nem todos os substratos adicionados estimularam a degradação de *p*-nitrofenol, como a adição de fenol que inibiu a degradação.

Em trabalhos recentes, Lee *et al.* (2003) observaram que o piruvato pode ser usado como fonte adicional de carbono para estimular o crescimento e a degradação de hidrocarbonetos polinucleares aromáticos (HPAs) por *Pseudomonas putida* G7. Figueiredo *et*

*al.* (2004) e Gondim *et al.* (2004) verificaram que *Pseudomonas aeruginosa* BB2-572, uma bactéria isolada de poço de petróleo, aumentou significativamente a degradação de paclobutrazol quando, além deste composto, os meios continham glicerol como fonte de carbono adicional.

## 2.4 – Paclobutrazol

Paclobutrazol (PBZ), [2RS, 3RS]-1-[4-clorofenil]-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol] (Figura 2.1), é um composto regulador de crescimento vegetal utilizado em sistemas agrícolas com o propósito de controlar o crescimento vegetativo, aumentando a capacidade reprodutiva da planta.



**Figura 2.1** – Fórmula estrutural da molécula de Paclobutrazol

Muitos estudos são desenvolvidos utilizando PBZ numa ampla diversidade de culturas vegetais, tendo destaque a cultura de mangas na Índia (SHARMA & AWASTHI, 2005; SINGH & BHATTACHERJEE, 2005). No Brasil, principalmente nos estados do nordeste, muitos estudos também estão sendo realizados em cultivares de manga, em Mossoró-RN (MENDONÇA *et al.*, 2001), na Bahia (MOUCO & ALBUQUERQUE, 2005) e em Petrolina (FONSECA *et al.*, 2005). Na região Sudeste, em Jaboticabal-SP (SANTOS *et*

*al.*, 2004) e Viçosa-MG (SIQUEIRA *et al.*, 2004), foram realizados estudos com *Citrus* e em Palma-MG com morangueiro (DUARTE FILHO *et al.*, 2004).

O primeiro efeito do PBZ é a paralisação do crescimento da planta, que afeta os fluxos vegetativos novos, reduzindo a extensão dos ramos. Esse efeito inibidor do PBZ sobre o crescimento varia em função da cultivar. Outro efeito do uso do PBZ é a antecipação do florescimento que, em alguns casos, quanto maior a dose usada, maior é a precocidade do florescimento comparada com plantas que não receberam o produto (FONSECA *et al.*, 2005).

O paclobutrazol pode ser aplicado nas folhas ou diretamente no solo. É absorvido passivamente pelas raízes, caule e folhas e tem movimento acropétalo dentro da planta, movendo-se pelo xilema para folhas e brotos (SILVA *et al.*, 2003a).

O composto ativo alcança os meristemas subapicais da planta inibindo a oxidação do kaureno para ácido kaurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico. O resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo (SILVA *et al.*, 2003c).

Estudos têm demonstrado que este composto permanece ativo no solo por muito tempo e que sua meia-vida varia com o tipo de solo e as condições climáticas. Na Índia, Sharma & Awasthi (2005) verificaram que mangueiras tratadas com paclobutrazol por três anos consecutivos, nas concentrações de 5 a 10 g de ingrediente ativo por árvore, não apresentaram resíduos de PBZ nos frutos maduros, porém foi verificado um aumento progressivo das concentrações de PBZ no solo, indicando caráter cumulativo. O mesmo acúmulo no solo foi observado por Singh & Bhattachjee (2005).

A meia-vida do paclobutrazol na água é de 24 dias, enquanto que no solo não foi detectada dissipação até a amostragem aos 168 dias após a aplicação do produto. Corpos de água superficial nas regiões próximas as culturas frutíferas são, portanto, suscetíveis à

contaminação pelo paclobutrazol com o risco de promover efeitos adversos em organismos que habitam estes ambientes (JONSSON *et al.*, 2002). A persistência também pode influenciar na atividade microbiana do solo. Silva *et al.* (2003c), em contagem de microrganismos de amostra de solo onde PBZ era aplicado freqüentemente, mostrou uma redução de 58 % do total de microrganismos no solo.

O paclobutrazol também apresenta propriedades fungicidas. Jacobs & Berg (2000) verificaram o efeito inibidor deste composto sobre diversos fungos patogênicos da madeira, como: *Armillaria*, *Botryosphaeria*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Ophiostoma*, *Sirococcus*, *Sphaeropsis* e *Verticilium*. Burpee (1998) estudou sua atividade contra o fungo *Rhizoctonia solani*. Também foi descrito como sendo inibidor do crescimento fúngico por Jackson *et al.* (1996), uma vez que é estruturalmente similar aos fungicidas do grupo triazol.

## **2.5 – Possíveis vias de degradação de paclobutrazol**

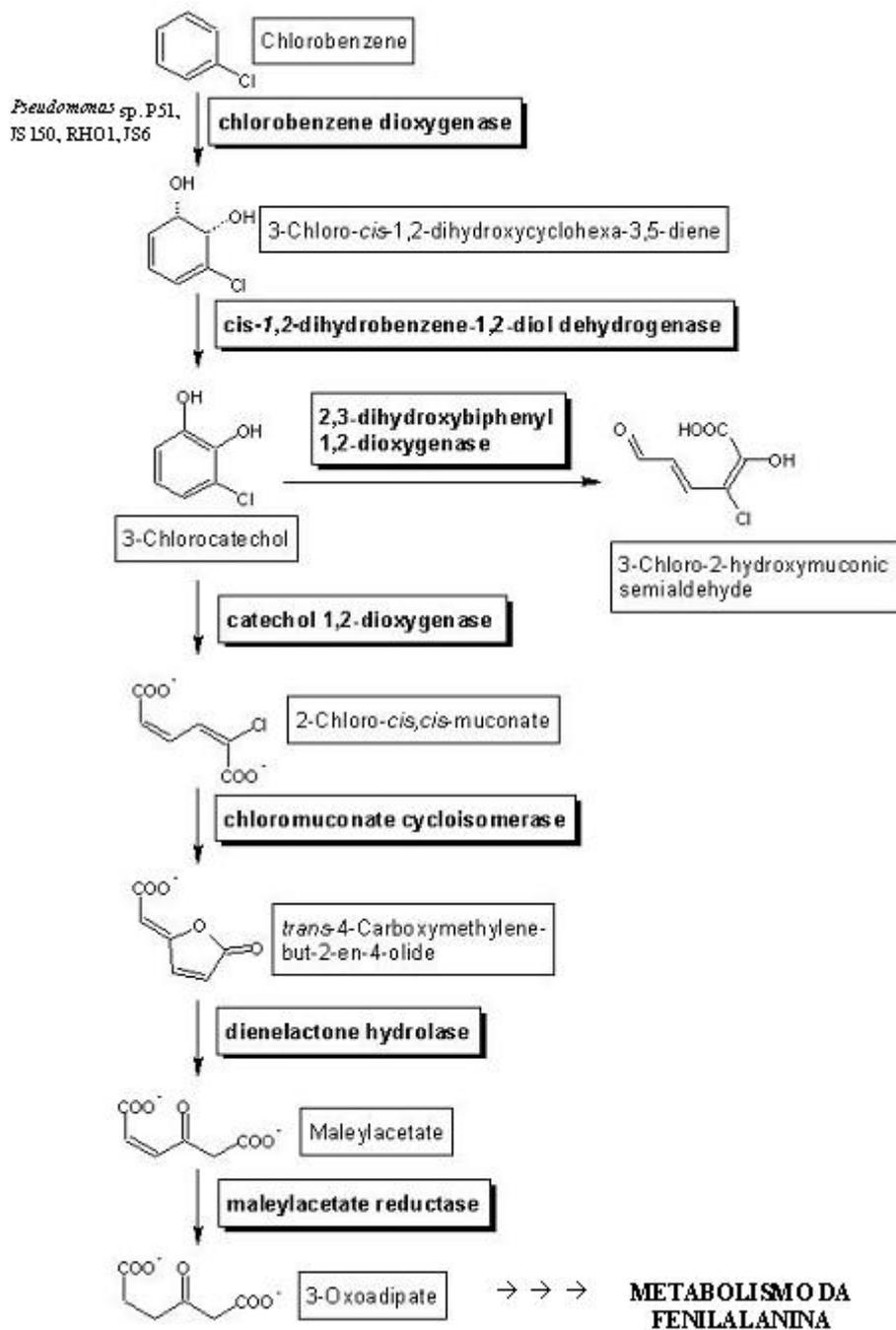
Não se conhece muito a respeito do composto paclobutrazol e, portanto, as vias de metabolização deste composto ainda são desconhecidas. No entanto, baseado na degradação de compostos conhecidos, pertencentes aos mesmos grupos funcionais contidos na molécula de paclobutrazol (cloro-benzeno e triazol), pode-se presumir que a via de degradação utilizada seja semelhante.

A Figura 2.2 apresenta a via utilizada por *Pseudomonas* spp. P51, JS150, RHO1, JS6 para degradação do cloro-benzeno a 3-oxoadipato e este último é um intermediário no metabolismo da fenilalanina, aminoácido formado a partir da via glicolítica (MCLEISH & ESSENBERG, 2004).

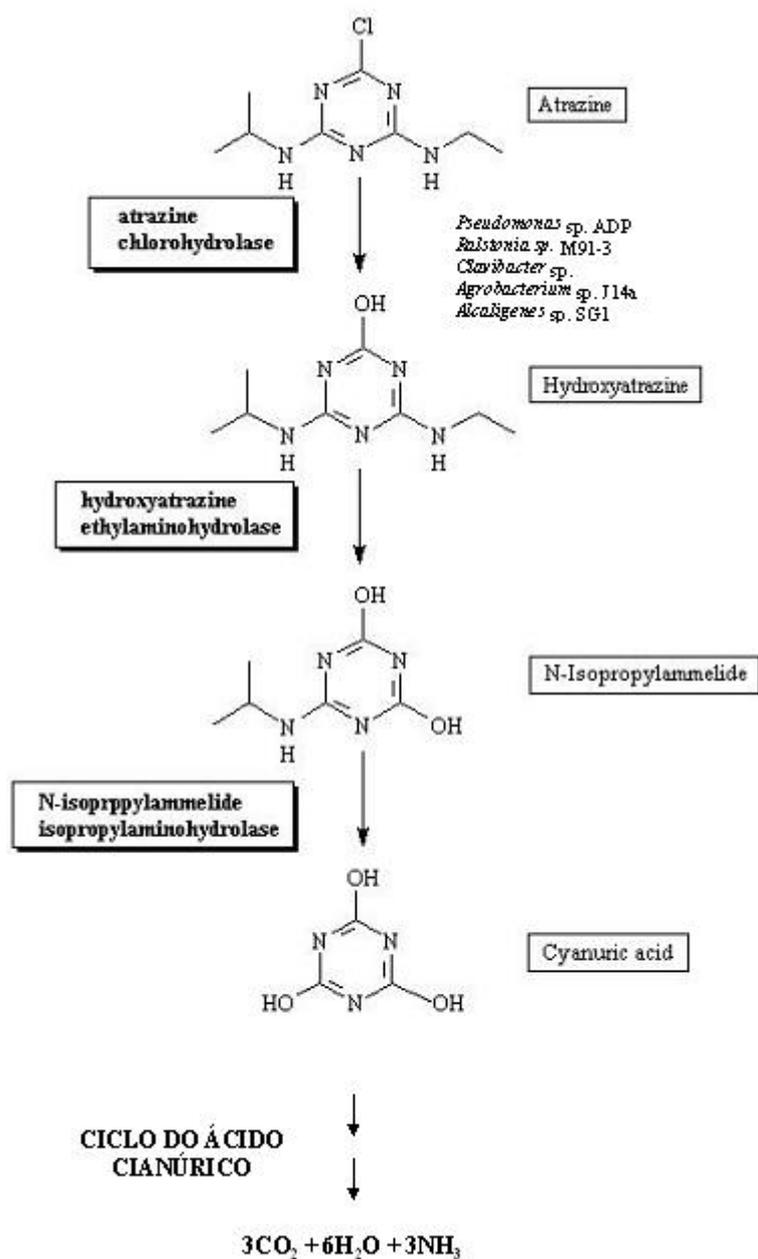
As Figuras 2.3 e 2.4 apresentam três vias diferentes, utilizadas por diferentes microrganismos para a degradação da atrazina a ácido cianúrico. Na Figura 2.3, os microrganismos *Pseudomonas* sp. ADP, *Ralstonia* sp. M91-3, *Clavibacter* sp., *Agrobacterium* sp. J14a e *Alcaligenes* sp. SG1 degradam o composto triazol a ácido cianúrico, que entra no ciclo do ácido cianúrico onde se vai obter CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e NH<sub>3</sub> como produtos finais (STEPHENS & KOTHARU, 2002a). Na Figura 2.4, é mostrada uma via metabólica utilizada por *Rhodococcus* spp. NI86/21, *Pseudomonas* spp. 192, 194 e *Streptomyces* sp. PS1/5 e *Nocardia* sp. também utilizada para a degradação da atrazina, essa via pode seguir duas rotas metabólicas diferentes. Uma dessas rotas, leva a produção de ácido cianúrico, por enzimas diferentes da via mostrada na Figura 2.3, porém esta também entra na via do ácido cianúrico como no processo anterior. O outro caminho leva a formação de 2-Cloro-4hidroxi-6-amino-1,3,5-triazina, como produto final (STEPHENS & KOTHARU, 2002b).

Smith *et al.* (2005) verificaram experimentalmente que a degradação de atrazina por *Nocardia* sp. e *Rhizobium* sp. seguiu a via de degradação mostrada na Figura 2.3, levando a formação de ácido cianúrico.

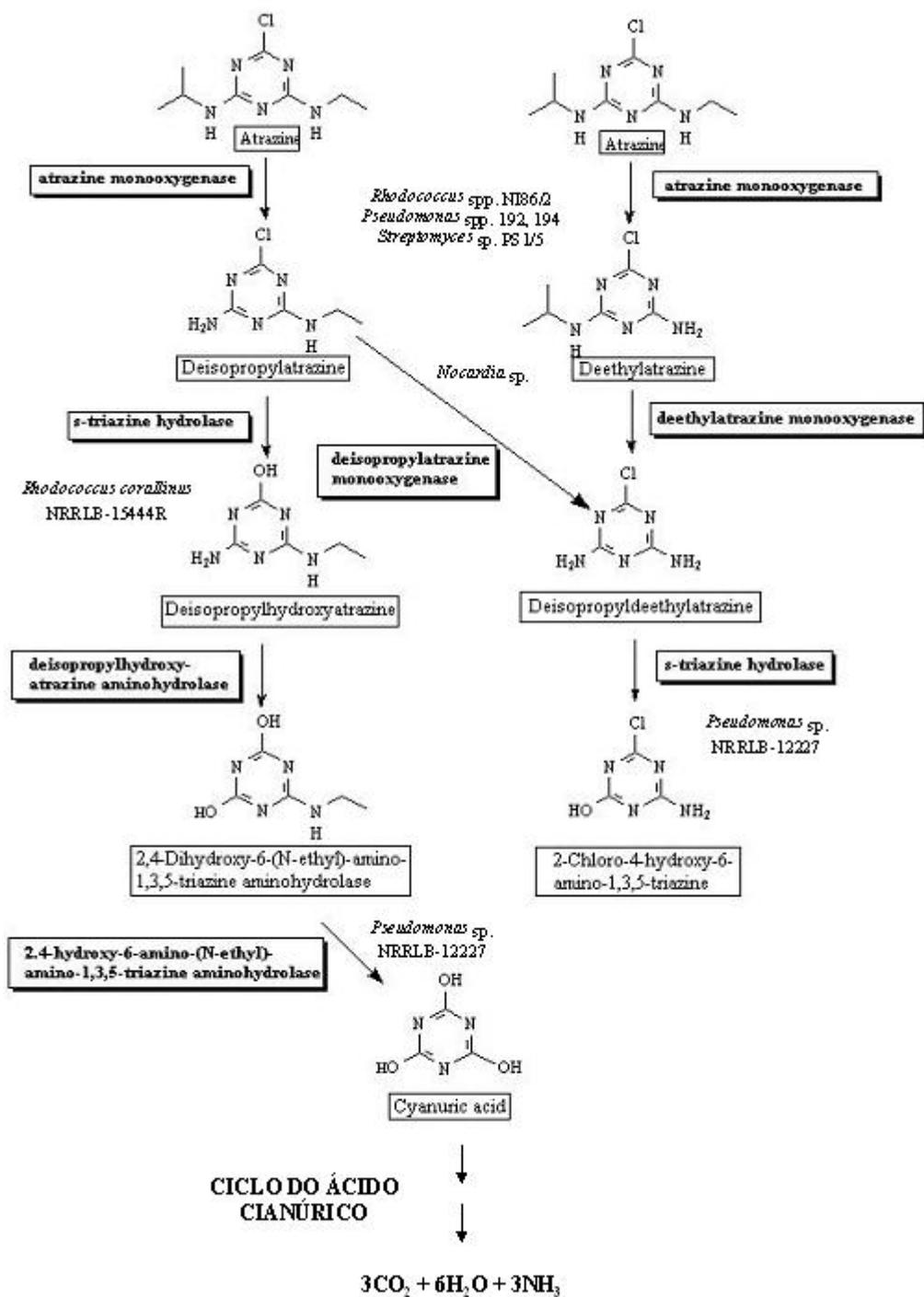
As vias de degradação dos dois grupos funcionais mais complexos que formam paclobutrazol mostram que o gênero *Pseudomonas* participa ativamente de várias etapas, despertando interesses na investigação sobre a degradação de paclobutrazol utilizando-se este gênero.



**Figura 2.2** – Via metabólica de degradação do cloro-benzeno em *Pseudomonas* sp. P51, JS150, RHO1, JS6 (MCLEISH & ESSENBERG, 2004)



**Figura 2.3** – Via metabólica de degradação da atrazina em *Pseudomonas* sp. ADP, *Ralstonia* sp. M91-3, *Clavibacter* sp., *Agrobacterium* sp. J14a, *Alcaligenes* sp. SG1 (STEPHENS & KOTHARU, 2002a)



**Figura 2.4** – Etapas de degradação da atrazina em *Rhodococcus* spp. NI86/2, *Pseudomonas* spp. 192, 194, *Streptomyces* sp. PS1/5 e *Nocardia* sp. (STEPHENS & KOTHARU, 2002b)

### 3 – MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 – Material

##### 3.1.1 – Solo

Os solos utilizados no isolamento de bactérias degradadoras de paclobutrazol (PBZ) foram provenientes de duas regiões do semi-árido nordestino, Mandacaru e Bebedouro que possuem culturas de manga. Foram utilizadas quatro amostras de solo: (1) Mandacaru sem histórico de aplicação de paclobutrazol - MS; (2) Mandacaru com histórico - MC; (3) Bebedouro sem histórico - BS e (4) Bebedouro com histórico - BC (Tabela 3.1). As coletas foram realizadas na região da rizosfera de mangueiras, numa profundidade de 0-20 cm. Descrições sobre a composição desses dois solos são apresentadas na Tabela 3.2.

**Tabela 3.1** – Amostras de solo utilizadas no isolamento de bactérias degradadoras de paclobutrazol

<b>Amostra</b>	<b>Solo</b>	<b>Local de isolamento</b>
1	MS	Mandacaru sem histórico de PBZ
2	MC	Mandacaru com histórico de PBZ
3	BS	Bebedouro sem histórico de PBZ
4	BC	Bebedouro com histórico de PBZ

**Tabela 3.2** – Características dos solos utilizados no isolamento de bactérias degradadoras de paclobutrazol

<b>Parâmetro</b>	<b>Bebedouro</b>	<b>Mandacaru</b>
pH (1:2, 5)	6,1	7,5
Ca <sup>2+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	1,2	31,8
Mg <sup>2+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,8	2,1
Na <sup>+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,01	0,10
K <sup>+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,2	0,26
(H <sup>+</sup> ) + Al <sup>3+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	1,32	0,00
Al <sup>3+</sup> (cmol/dm <sup>3</sup> )	0,1	0,00
C (g/Kg)	5,2	3,2
P (mg/L)	2,3	7,1
Argila (*)	10	49
Silte (*)	6	-
Areia (*)	64	25
Um, 0,3 atm (*)	6,13	26
M.O. (*)	0,8	1,0

### 3.1.2 – Paclobutrazol

Paclobutrazol ou, [2RS, 3RS]-1-[4-Clorofenil]-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-Triazol-1-il) pentan-3-ol, foi proveniente do Cultar 250 SC (Zeneca Brasil LTDA), produto comercial utilizado na agricultura, que apresenta uma concentração de 250 g/L de paclobutrazol e 750 g/L de ingredientes inertes.

Uma série de propriedades físico-químicas são conhecidas a respeito do composto paclobutrazol, algumas são apresentados na Tabela 3.3.

**Tabela 3.3** – Propriedades físico-químicas do paclobutrazol (SILVA *et al.*, 2003a)

Nome IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)	[2RS, 3RS]-1-[4-chlorophenyl]-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol
Grupo químico	Azol
Peso molecular	293,8
Fórmula molecular	C <sub>15</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>3</sub> O
Forma	Sólidos cristalinos brancos
Ponto de ebulição	165-166 °C
Pressão de vapor (20 °C)	0,001 mPa
Solubilidade	26 mg.L <sup>-1</sup> em água (20 °C)
Destino no ambiente	Solo e água
DT <sub>50</sub> no solo	0,5-1,0 ano
DT <sub>50</sub> em solo franco-argiloso (pH 8,8; 14% M.O.)	< 42 dias
DT <sub>50</sub> em solo franco-arenoso (pH 6,8; 4% M.O.)	> 140 dias
Resistencia à hidrólise	pH 4-9
Degradação pela luz U.V. (pH 7, 10 dias)	pH 7, 10 dias

### 3.1.3 – Meios de cultura

#### Meio para o isolamento de microrganismos e ensaio de biodegradação

O meio de cultura utilizado durante o isolamento de microrganismos degradadores de paclobutrazol e para o ensaio de biodegradação foi o meio mineral descrito por Ridgway *et al.* (1990), com diferentes fontes de carbono (PBZ, glicose e/ou glicerol) (Tabela 3.4).

As concentrações de PBZ utilizadas foram correspondentes ao intervalo de aplicação do produto no solo que é de 0,25 a 1,5 g/L

**Tabela 3.4** – Meio para o isolamento e ensaio de biodegradação

<b>Componente</b>	<b>Concentração</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,36 g/L
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,42 g/L
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,05 g/L
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	3 mg/L
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,039 mg/L
ZnCl <sub>2</sub>	0,021 mg/L
CaCl <sub>2</sub>	0,01 g/L
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	1,54 mg/L
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,041 mg/L
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,025 mg/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1 g/L
Paclobutrazol (PBZ)	0,25 g/L no isolamento 1g/L no ensaio de biodegradação
Glicose	10 g/L
Glicerol	5 g/L
pH = 7,0 ± 0,2	

#### Meio para a manutenção das culturas puras isoladas

O meio Agar Triptona Soja (TSA) fabricado pela MERK, descrito na Tabela 3.5, foi utilizado na preservação, manutenção e reativação dos microrganismos isolados.

**Tabela 3.5** – Composição do meio Ágar Triptona Soja (TSA)

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Peptona de caseína	15,0
Peptona de farinha de soja	5,0
Cloreto de Sódio	5,0
Agar	15,0
pH 7,2 ± 0,2	

Meio para a preparação dos inóculos

O caldo Nutriente (MERK) (Tabela 3.6) foi utilizado para a determinação do crescimento exponencial do microrganismo e preparação do inóculo (Tabela 3.6). No caso dos actinomicetos o meio utilizado foi o caldo ISP-I (Tabela 3.7)

**Tabela 3.6** – Composição do caldo Nutriente

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de carne	1,0
Extrato de levedura	2,0
Peptona	5,0
NaCl	5,0
pH 7,4 ± 0,2	

**Tabela 3.7**– Composição do caldo ISP-I

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Triptona	5,0
Extrato de levedura	3,0
pH = 7,0 ± 0,2	

### Meios para a seleção de *Pseudomonas*

Foram utilizados meios diferentes para a seleção de bactérias do gênero *Pseudomonas*. O meio Agar D4 (Tabela 3.8) foi descrito por Kado & Heskett (1970) como sendo seletivo para o gênero em questão. Além desse, foram utilizados os meios Agar Cetrimida (MERK) (Tabela 3.9) e meio de King *et al.* (1954) (Tabela 3.10).

**Tabela 3.8**– Composição do meio Ágar D4

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Sacarose	10,0
Caseína hidrolisada	1,0
NH <sub>4</sub> Cl	5,0
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,3
SDS	0,6
Agar	15
Glicerol	12,6
pH = 6,8 ± 0,2	

**Tabela 3.9** – Composição do meio Ágar Cetrimida

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Gelatina Peptona	20,0
Sulfato de Potássio	10,0
Cloreto de Magnésio	1,4
Cetrimida	0,3
Agar	13,6
Glicerol	12,6
pH = 7,2 ± 0,2	

**Tabela 3.10** – Composição do meio King (KING *et al.*, 1954)

<b>Componente</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Proteose Peptona	20,0
Glicerol	10,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5
Agar	15,0
pH = 7,2 ± 0,2	

Meio para a ativação e a manutenção de actinomicetos

Para a ativação e manutenção das bactérias do gênero *Streptomyces* e *Rhodococcus*, foi utilizado o meios ISP-II, descrito na Tabela 3.11.

**Tabela 3.11** – Composição do meio ISP-II

<b>Componentes</b>	<b>Concentração (g/L)</b>
Extrato de levedura	4,0
Extrato de malte	10,0
Amido	10,0
Dextrose	4,0
Agar	15,0
pH = 7,0 ± 0,2	

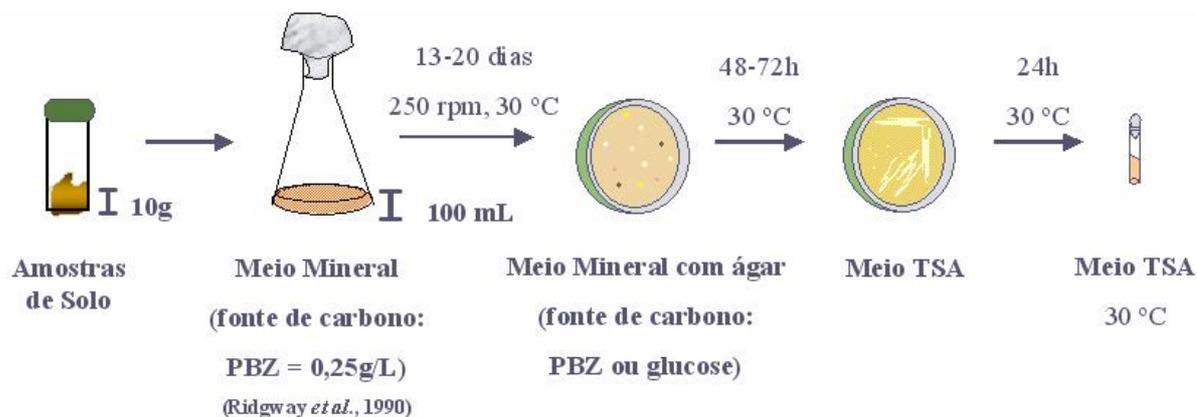
### **3.1.4 – Microrganismos**

Além das bactérias isoladas no presente trabalho (item 3.2.1), foram utilizados nos ensaios de biodegradação, os microrganismos *Streptomyces* sp. 11470 e *Rhodococcus rhodochrous* 3317, cedidos pela coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.

## **3.2 – Procedimento experimental**

### **3.2.1– Isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol**

O isolamento de microrganismos resistentes a paclobutrazol foi realizado por enriquecimento, conforme a Figura 3.1. Aproximadamente 10 g de cada solo foram adicionadas a frascos contendo 100 mL do meio mineral enriquecido com PBZ na concentração de 0,25 g/L (Tabela 3.4). Os frascos foram incubados a 30 °C sob agitação de 250 rpm, durante 20 dias. Em períodos de 13 e 20 dias, foram realizadas repicagens em dois meios diferentes: (1) em meio mineral sólido (Tabela 3.4) com a adição de ágar bacteriológico (15 g/L), e (2) em meio mineral sólido como o anterior, porém substituindo PBZ por glicose; todos incubados a 30 °C por 24-72 horas, para a obtenção de colônias isoladas, as quais foram repicadas em placas com meio TSA (Tabela 3.5) para a obtenção de culturas puras, através do esgotamento por estrias. As culturas puras isoladas foram mantidas em tubos inclinados contendo meio TSA para estudos posteriores.



**Figura 3.1** – Esquema para o isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol

### 3.2.2 – Caracterização parcial das bactérias resistentes a paclobutrazol

Cada uma das culturas isoladas foi caracterizada pela técnica de coloração diferencial de Gram (SOARES *et al.*, 1991).

Foram preparados esfregaços das culturas jovens das bactérias isoladas. As lâminas foram coradas como se segue: cristal violeta (2%) por 1 minuto, lavagem com água corrente, lugol por 1 minuto, lavagem com álcool, lavagem com água e safranina (0,25%) por 30 segundos.

O cristal violeta e o lugol penetram tanto nas bactérias Gram-positivas quanto nas Gram-negativas, formando um complexo de cor roxa. O tratamento com álcool é a etapa diferencial. Nas Gram-negativas, devido à remoção dos lipídeos presentes na membrana externa da parede celular, o complexo corado é extraído pelo álcool deixando as células descoradas. Nas bactérias Gram-positivas, entretando, o álcool não retira o complexo corado

devido à ausência de membrana externa na parede celular destas bactérias. O tratamento com safranina não altera a cor roxa adquirida pelas Gram-positivas por ser este último, um corante mais fraco, ao passo que as Gram-negativas, descoradas pelo álcool, tornam-se avermelhadas.

As bactérias Gram-negativas foram submetidas a três meios seletivos para *Pseudomonas*: agar D4 (KADO & HESKETT, 1970), agar Cefrimida e meio King (KING *et al.*, 1954) (Tabelas 3.6, 3.7 e 3.8, respectivamente). As culturas puras foram reativadas em TSA por 24 h a 30 °C, e essas foram inoculadas em cada um dos meios seletivos e incubadas a 30° C por 24 h.

### **3.2.3 – Padronização dos inóculos**

Para os ensaios de biodegradação (Figura 3.2), inicialmente foram padronizados os inóculos de todos os microrganismos utilizados. As bactérias selecionadas foram ativadas em TSA a 30 °C por 24 h e, após esse período, cada uma foi repicada para frascos Fernbach com 300 mL de caldo nutriente.

Na padronização dos inóculos dos actinomicetos, *Streptomyces* sp. e *Rhodococcus* sp., a reativação foi realizada em meio ISP-II (Tabela 3.11) por 3 e 7 dias, respectivamente. Após esse período, foram repicados para frascos Fernbach com 300 mL de caldo ISP-I (Tabela 3.10).

Foram retiradas amostras em intervalos de uma hora para a quantificação do crescimento bacteriano.

### 3.2.4 – Biodegradação de paclobutrazol

Culturas puras de *Pseudomonas* isoladas dos solos foram inoculadas em meio TSA (Tabela 3.5) a 30 °C para reativação. Após 24 h, foi realizado o repique em 40 mL de caldo nutriente (Tabela 3.6). Após um período, entre quatro e seis horas de incubação, a 30 °C e 250 rpm de agitação, quando todos os inóculos apresentaram aproximadamente 0,5 de absorbância a 420 nm, foram preparadas culturas mistas e inoculadas em 400 mL de meio mineral (Tabela 3.4) com PBZ como única fonte de carbono. As condições de temperatura e agitação desta etapa foram iguais às do inóculo. A Figura 3.2 apresenta um desenho esquemático desses ensaios.

Posteriormente, foram realizados ensaios de biodegradação com a adição das bactérias: *Streptomyces* sp. 11470 e *Rhodococcus rhodochrous* 3317. E, ainda, foram realizados experimentos em meio com PBZ e glicose ou PBZ e glicerol como fontes de carbono, para um dado consórcio que foi selecionado na fase anterior. No caso dos microrganismos *Streptomyces* sp. e *Rhodococcus rhodochrous*, a ativação foi feita em meio ISP-II (Tabela 3.11) por 3 e 7 dias, e o inóculo foi de 9 e 23 horas, respectivamente, período que representa a fase de crescimento exponencial desses microrganismos.

Em todos os casos, foram realizados experimentos controle e as amostras foram retiradas, em intervalos de tempo pré-definidos, para a quantificação do crescimento e da biodegradação de PBZ.



**Figura 3.2** – Esquema dos experimentos para a biodegradação de paclobutrazol

### 3.3 – Métodos analíticos

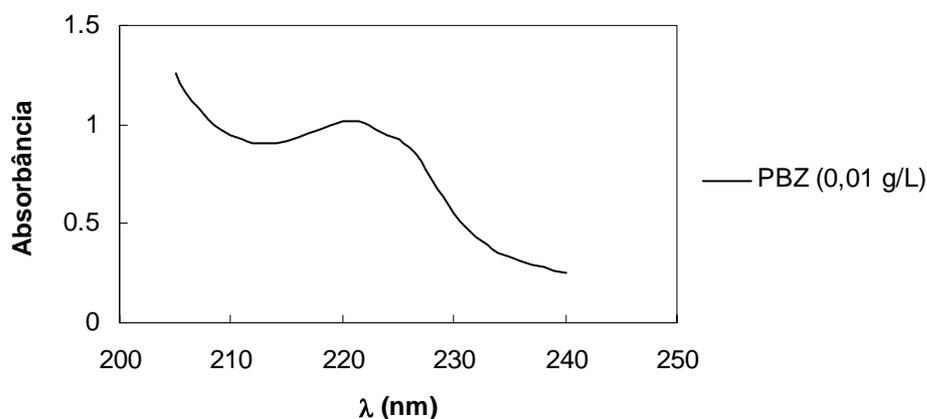
#### 3.3.1 – Quantificação do crescimento

A concentração de células foi quantificada por espectrofotometria, pela medida da absorbância a 420 nm em espectrofotômetro DAD (detector por arranjo diodo) da Agilent 8453. Nos experimentos para a biodegradação, a amostra foi diluída em metanol para a dissolução de possíveis partículas de paclobutrazol (JACKSON *et al.*, 1996).

#### 3.3.2 – Quantificação da biodegradação

A quantificação de PBZ foi realizada por espectrofotometria a 221 nm, após adição de metanol a 80% v/v às amostras, com agitação de 200 rpm por 15 minutos e posterior

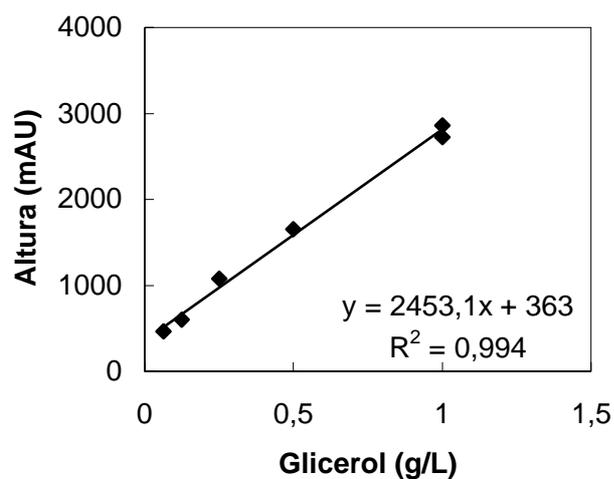
centrifugação a 10.000 rpm, durante 5 minutos. Para a determinação do comprimento de onda correspondente ao maior pico do espectro de PBZ, foi obtido o espectro deste composto através do espectrofotômetro por arranjo de diodo, pois este permite o conhecimento do melhor comprimento de onda. A Figuras 3.3 apresenta o espectro do PBZ numa faixa entre 205 e 240 nm.



**Figura 3.3** – Espectro de paclobutrazol na faixa de 205 a 240 nm

### 3.3.3 – Quantificação de glicerol

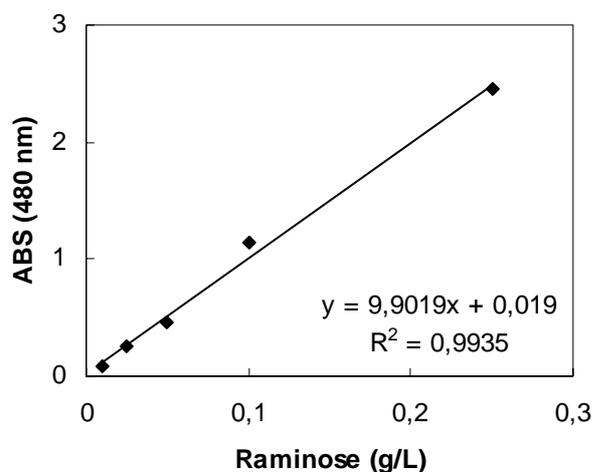
O glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As condições de trabalho foram as seguintes: 50°C, 1 mL.min<sup>-1</sup> e uma coluna Shodex KS 802 (Lonpak – divisão da Millipore). A curva de calibração é apresentada na Figura 3.4.



**Figura 3.4** – Curva de calibração de glicerol

### 3.3.4 – Quantificação de raminose

Foi utilizado um método colorimétrico para quantificar a concentração de raminose durante os experimentos. Foram adicionados 50  $\mu\text{L}$  de fenol (80% p/v) e 5 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado, a 1 mL de amostra. O tempo de reação foi de 10 minutos. Após esse período a amostra foi resfriada até uma temperatura de 30  $^{\circ}\text{C}$  e a absorbância lida no espectrofotômetro a 480 nm (DUBOIS *et al.*, 1956). A curva de calibração de raminose encontra-se na Figura 3.5.



**Figura 3.5** – Curva de calibração de raminose

### 3.3.5 – Quantificação do índice de emulsificação

O índice de emulsificação foi quantificado segundo Cooper & Goldemberg (1987). Foi utilizada uma proporção de 1,5: 1, ou seja, 1,5 mL de hexano foi adicionado a 1 mL da amostra em um tubo de ensaio, o qual foi agitado por dois minutos. Após 24 h, o resultado foi obtido dividindo-se a altura da camada emulsificada pela altura da mistura total, multiplicando-se por 100.

### 3.3.6 – Ensaio de atividade antimicrobiana

Foi verificada a atividade antimicrobiana do PBZ ou a formação de produtos com atividade durante os cultivos. O teste de susceptibilidade foi realizado de acordo com o método de difusão em disco descrito por Bauer *et al.* (1966). Para cada uma das três bactérias do solo MS, foi preparado um inóculo de 4 a 5 colônias e repicadas em tubos com 5 mL de

solução salina (0,85 % v/v), atingindo uma turbidez equivalente a 0,5 da escala de Mac Farland (cerca de  $10^8$  UFC/mL) e, em seguida, foi semeada com *swab* esterilizado, sobre a superfície da placa de Petri de 14 cm de diâmetro contendo o meio TSA. Sobre a superfície da placa foi depositado, com pinça esterilizada, discos de papel contendo as amostras, livre de células, do tempo inicial e com 30 dias do cultivo de uma cultura mista. As placas foram incubadas a 30 °C em estufa por 24 horas.

## **4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1 – Isolamento de bactérias resistentes a paclobutrazol**

Foram obtidos 37 isolados de bactérias das amostras de solo em dias e meios diferentes, segundo a Tabela 4.1. O número de isolados foi aproximadamente igual para todas as amostras de solo, sendo 9 isolados de MS (Mandacaru sem histórico de aplicação de PBZ), de MC (Mandacaru com histórico) e de BC (Bebedouro com histórico) e 10 de BS (Bebedouro sem histórico).

### **4.2 – Caracterização parcial dos isolados**

Quanto à caracterização inicial pela técnica de coloração de Gram, a maioria dos isolados (89%), foi Gram-negativa (Tabela 4.2). A Figura 4.1 mostra os percentuais de bactérias Gram-positivas encontradas em cada um dos quatro solos.

As bactérias Gram-negativas foram submetidas a três diferentes meios seletivos para *Pseudomonas*: agar Cetrimida, agar D4 e meio King. Para favorecer a seleção de *Pseudomonas*, apenas as bactérias que cresceram nos três meios foram selecionadas para a continuidade do trabalho. Dessa forma, apenas 13, das 37 bactérias isoladas dos solos, cresceram nos três meios (Tabela 4.3).

Bactérias do gênero *Pseudomonas* foram selecionadas devido a sua capacidade de degradar os mais diversos compostos. Registros mais recentes na literatura indicam que este gênero é capaz de degradar hidrocarbonetos (GHAZALI *et al.*, 2004), 2,4-diclorofenol

(KARGI & EKER, 2005), naftaleno (LEE *et al.*, 2003) e organofosfatos (FOSTER *et al.*, 2004).

Alguns autores também verificaram a participação de *Pseudomonas* em vias metabólicas de degradação de compostos similares ao paclobutrazol, como cloro-benzeno (MCLEISH & ESSENBERG, 2004) e atrazina (STEPHENS & KOTHARU, 2002a,b; SMITH *et al.*, 2005). Além disso, Jackson *et al.* (1996) em trabalhos com biodegradação de paclobutrazol, obtiveram oito isolados de *Pseudomonas*, dentre os nove com capacidade de biodegradação.

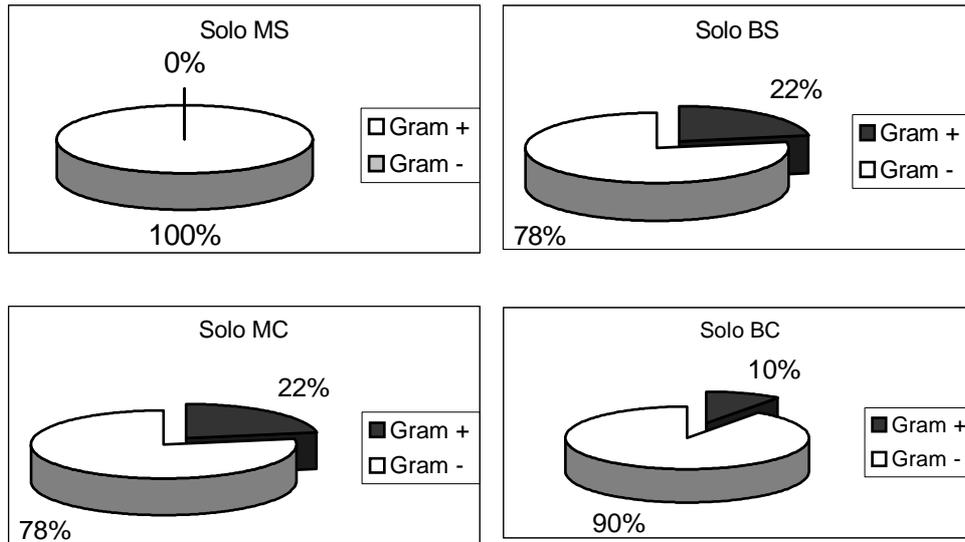
Das 13 linhagens de *Pseudomonas* duas foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (Tabela 4.3), pois apresentaram o pigmento característico em meio King. Porém, não foram utilizadas no trabalho devido a sua patogenicidade (FREITAS & BARTH, 2004; SANT'ANA *et al.*, 2003).

**Tabela 4.1** – Bactérias isoladas de amostras dos solos de Mandacaru e de Bebedouro

Isolado	Local de isolamento	Dias de incubação	Fonte de carbono
01	MS	13	Glicose
02	MS	13	Glicose
03	MC	13	Glicose
04	MC	13	Glicose
05	BS	13	Glicose
06	BS	13	Glicose
07	BC	13	Glicose
08	BC	13	Glicose
09	MS	20	Glicose
10	MC	20	Glicose
11	BS	20	Glicose
12	BS	20	Glicose
13	BC	20	Glicose
14	MS	13	PBZ
15	MS	13	PBZ
16	MC	13	PBZ
17	MC	13	PBZ
18	BS	13	PBZ
19	BS	13	PBZ
20	BC	13	PBZ
21	BC	13	PBZ
22	BC	13	PBZ
23	MS	20	PBZ
24	MS	20	PBZ
25	MS	20	PBZ
26	MS	20	PBZ
27	MC	20	PBZ
28	MC	20	PBZ
29	MC	20	PBZ
30	MC	20	PBZ
31	BS	20	PBZ
32	BS	20	PBZ
33	BS	20	PBZ
34	BS	20	PBZ
35	BC	20	PBZ
36	BC	20	PBZ
37	BC	20	PBZ

**Tabela 4.2** – Resultados dos testes de coloração de Gram dos isolados

Isolado	Local de isolamento	GRAM
01	MS	-
02	MS	-
03	MC	-
05	BS	-
06	BS	-
07	BC	-
08	BC	-
09	MS	-
10	MC	-
11	BS	-
12	BS	-
13	BC	-
14	MS	-
15	MS	-
16	MC	+
17	MC	+
18	BS	-
19	BS	-
20	BC	-
21	BC	-
22	BC	-
23	MS	-
24	MS	+
25	MS	-
26	MS	-
27	MC	-
28	MC	-
29	MC	-
30	MC	-
31	BS	-
32	BS	-
33	BS	-
34	BS	+
35	BC	-
36	BC	-
37	BC	-



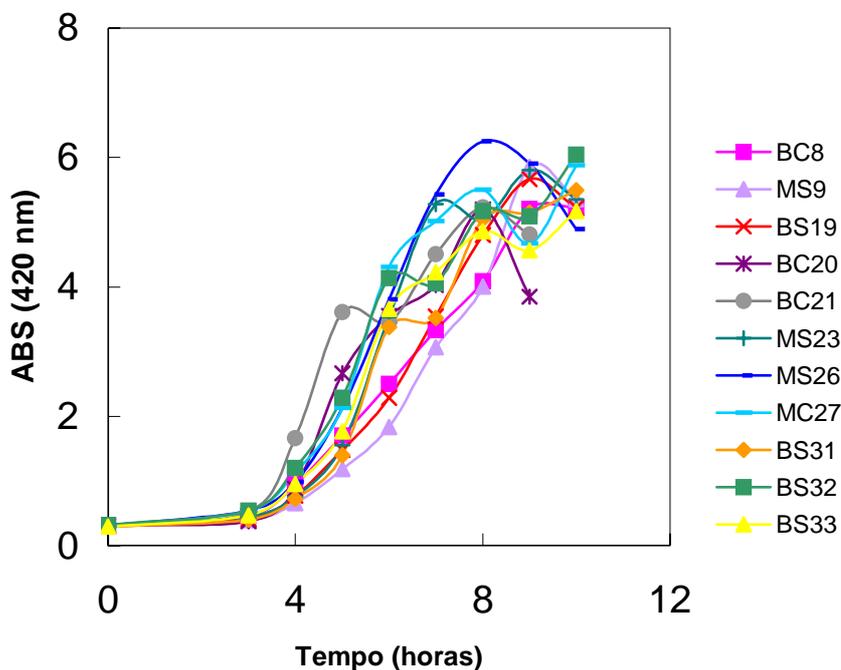
**Figura 4.1** – Porcentagem de bactérias caracterizadas pela coloração de Gram

**Tabela 4.3** – Seleção de *Pseudomonas* isoladas de solos de Mandacaru e de Bebedouro

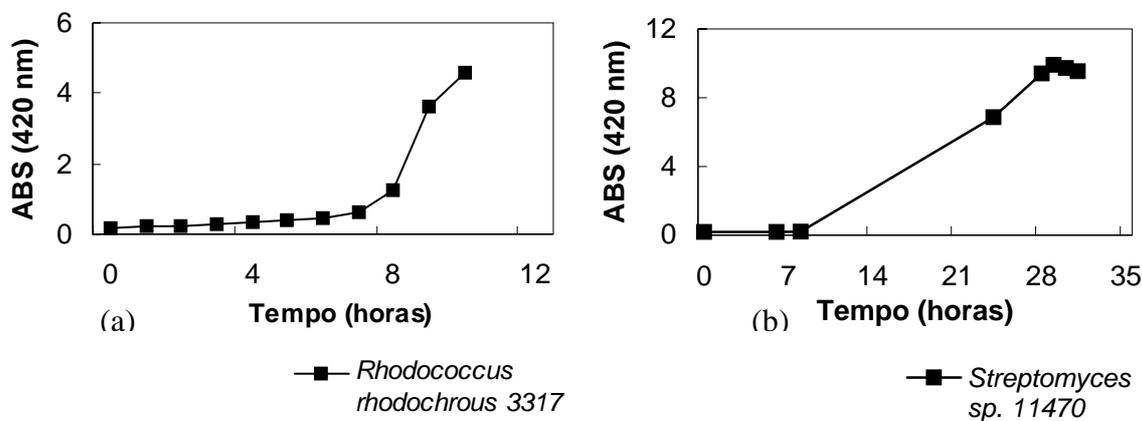
Isolado	Local de Isolamento	Teste <i>Pseudomonas</i>			
		D4	Agar Cetrimida	Meio King	
				Sem pigmento	Com pigmento e a 41 °C
01	MS	-	-	-	-
02	MS	+	-	-	-
03	MC	-	+	+	-
04	MC	-	-	+	-
05	BS	+	+	-	-
06	BS	-	-	+	-
07	BC	-	-	+	-
08	BC	+	+	+	-
09	MS	+	+	+	-
10	MC	-	-	+	-
11	BS	-	-	+	-
12	BS	-	-	-	-
13	BC	-	+	+	-
14	MS	-	-	-	-
15	MS	-	-	-	-
18	BS	-	+	+	-
19	BS	+	+	+	-
20	BC	+	+	+	-
21	BC	+	+	+	-
22	BC	-	-	-	-
23	MS	+	+	+	-
25	MS	+		+	-
26	MS	+	+	+	-
27	MC	+	+	+	-
28	MC	-	-	-	-
29	MC	+	-	-	-
30	MC	+	+	+	+
31	BS	+	+	+	-
32	BS	+	+	+	-
33	BS	+	+	+	-
35	BC	-	+	-	-
36	BC	+	+	+	+
37	BC	-	-	-	-

### 4.3 – Padronização dos inóculos

Foram elaboradas as curvas de crescimento para a padronização dos inóculos de todos os microrganismos utilizados nos ensaios de biodegradação. As curvas de crescimento dos 11 isolados de *Pseudomonas*, apresentaram fase exponencial entre 4 e 6 horas de cultivo (Figura 4.2). Por outro lado, *Rhodococcus rhodochrous* 3317 apresentou fase exponencial entre 8 e 10 horas (Figura 4.3 a) e *Streptomyces* sp. 11470, entre 20 e 24 horas (Figura 4.3 b). Para cada bactéria foi calculada a velocidade específica máxima de crescimento ( $\mu_{max}$ ), cujos valores são apresentados na Tabela 4.4.



**Figura 4.2** – Curvas de crescimento das *Pseudomonas* isoladas



**Figura 4.3** – Curvas de crescimento dos actinomicetos da Coleção do Departamento de Antibióticos: (a) *Rhodococcus rhodochrous* 3317 e (b) *Streptomyces* sp. 11470

**Tabela 4.4** – Velocidade específica máxima de crescimento das bactérias utilizadas

Bactérias	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )
<i>Pseudomonas</i> sp. BC8	0,3603
<i>Pseudomonas</i> sp. MS9	0,4529
<i>Pseudomonas</i> sp. BS19	0,4947
<i>Pseudomonas</i> sp. BC20	0,7816
<i>Pseudomonas</i> sp. BC21	0,9654
<i>Pseudomonas</i> sp. MS23	0,6471
<i>Pseudomonas</i> sp. MS26	0,5965
<i>Pseudomonas</i> sp. MC27	0,6857
<i>Pseudomonas</i> sp. BS31	0,7056
<i>Pseudomonas</i> sp. BS32	0,6762
<i>Pseudomonas</i> sp. BS33	0,676
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 3317	0,7054
<i>Streptomyces</i> sp. 11470	0,2008

## 4.4 – Biodegradação de paclobutrazol

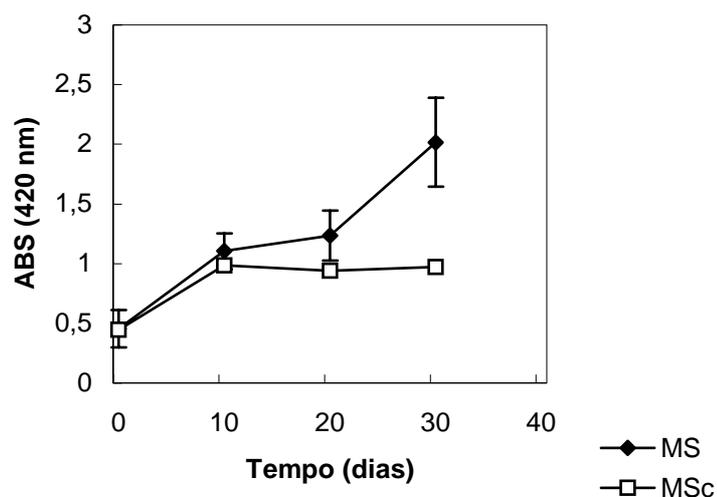
### 4.4.1 – Biodegradação de paclobutrazol por culturas mistas das amostras

Na primeira etapa sobre a investigação da biodegradação de PBZ, foram realizados experimentos com culturas mistas das amostras de solo MS, MC, BS e BC (Tabela 4.5), utilizando apenas PBZ como fonte de carbono. Esses experimentos foram realizados em duplicata e o experimento controle não continha nenhuma fonte de carbono.

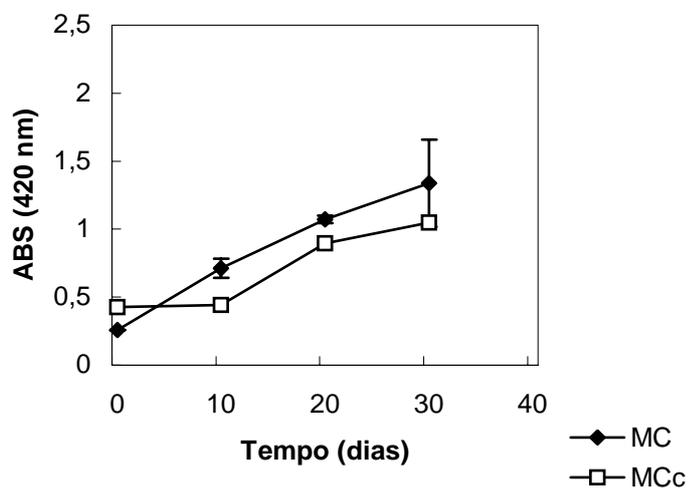
**Tabela 4.5** – Amostras de solos e bactérias correspondentes

<b>Amostra</b>	<b>Bactéria</b>	<b>Local de isolamento</b>
MS	MS9, MS23, MS26	Mandacaru sem histórico de PBZ
MC	MC27	Mandacaru com histórico de PBZ
BS	BS5, BS19, BS31, BS32, BS33	Bebedouro sem histórico de PBZ
BC	BC8, BC20, BC21	Bebedouro com histórico de PBZ

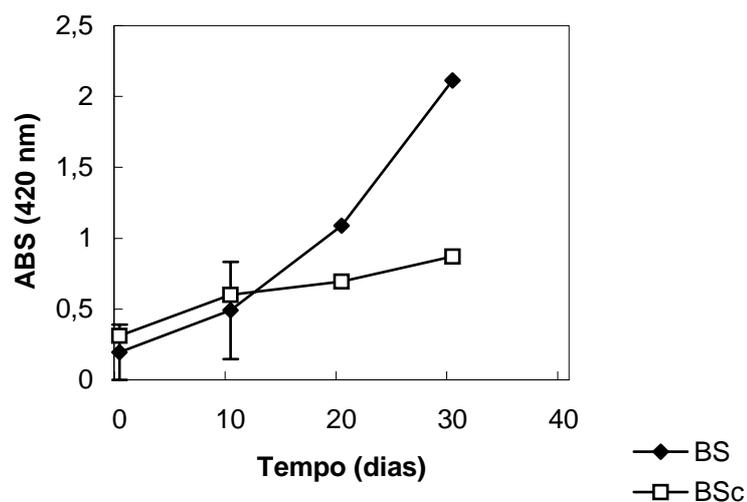
Os resultados de crescimento, com médias, desvios padrão e os respectivos controles, são apresentados nas Figuras 4.4 a 4.7. O crescimento foi semelhante em três casos, isto é, MS, BS e BC, tendo máximos de absorvância 2,0, 2,1 e 2,2, respectivamente (Figuras 4.4, 4.6 e 4.7). No experimento MC, a absorvância máxima alcançada foi de 1,3 (Figura 4.5), provavelmente por conter apenas uma bactéria.



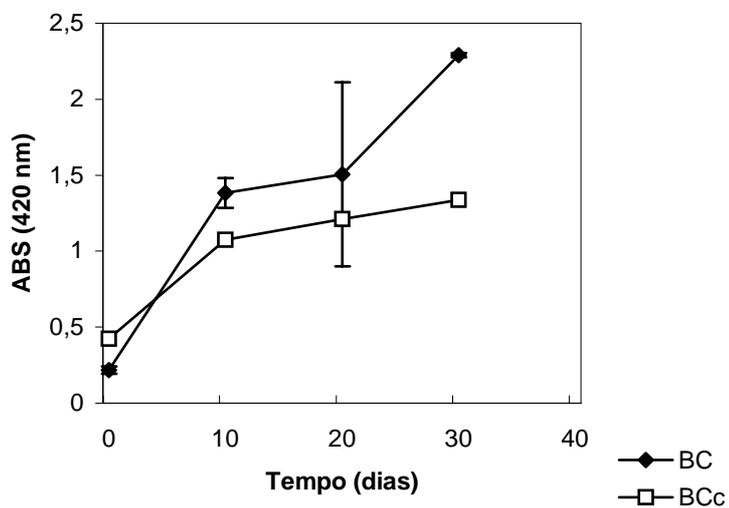
**Figura 4.4** – Crescimento da cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



**Figura 4.5** – Crescimento da cultura mista MC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



**Figura 4.6** – Crescimento da cultura mista BS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



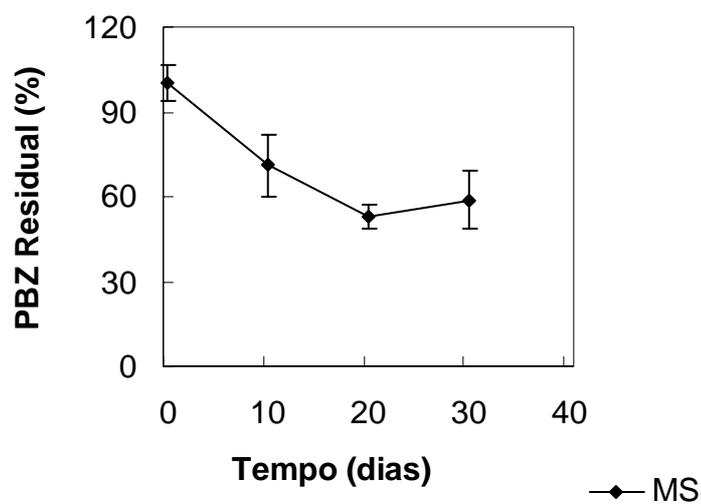
**Figura 4.7** – Crescimento da cultura mista BC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)

Nos experimentos controle, MSc, BSc e BCc, houve crescimento até cerca de 10 dias, provavelmente devido à presença de alguma fonte de carbono que foi adicionada ao meio mineral junto com o inóculo, uma vez que essa transferência foi realizada ainda na fase exponencial de crescimento. Por outro lado, no experimento controle MCc, houve crescimento durante todo o período avaliado.

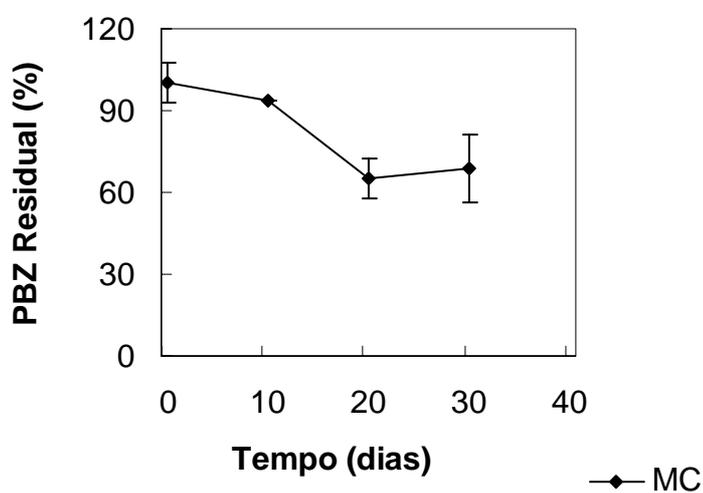
Os resultados de biodegradação obtidos são apresentados nas Figuras 4.8 a 4.11 em valores percentuais. Os valores encontrados indicam um perfil de degradação semelhante nas culturas de MS e BC, apesar de se tratar de bactérias isoladas de diferentes amostras de solo. Por outro lado, apesar das amostras MS e MC (Mandacaru), assim como as amostras BS e BC (Bebedouro) serem do mesmo tipo de solo, houve uma diferença significativa nos perfis de degradação entre MS e MC e entre BS e BC.

Não foi observada relação entre a biodegradação de PBZ e a presença de histórico de aplicação. Isso se deve, provavelmente, devido ao isolamento ter sido por enriquecimento, ou seja, os microrganismos isolados já foram pré-selecionados como degradadores de PBZ, em meio mineral líquido contendo apenas PBZ como fonte de carbono.

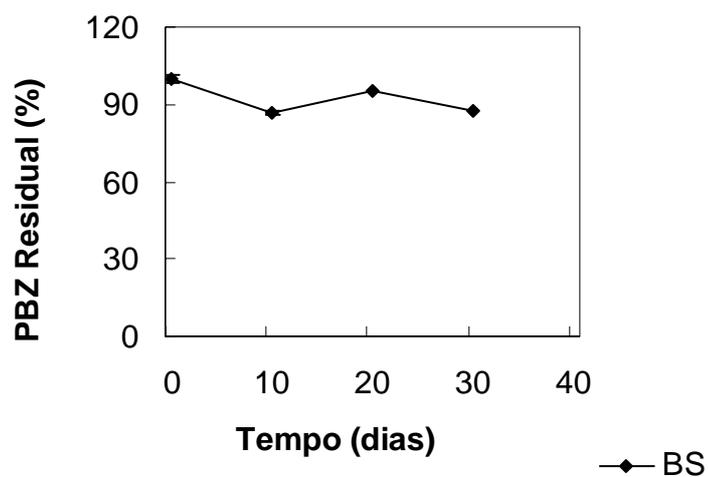
Os consórcios MS e BC apresentaram maior degradação, atingindo o máximo em 20 dias de cultivo, aproximadamente 47% e 43% (Figura 4.8 e 4.11), respectivamente. Os consórcios MC e BS degradaram apenas, 35% e 13% (Figura 4.9 e 4.10), respectivamente.



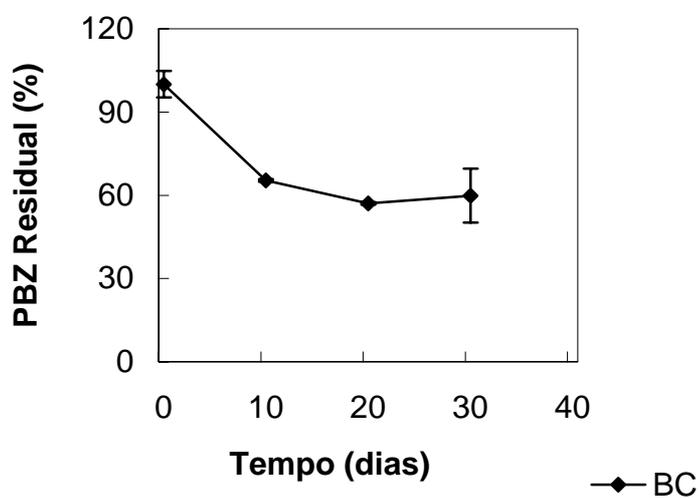
**Figura 4.8** – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono



**Figura 4.9** – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

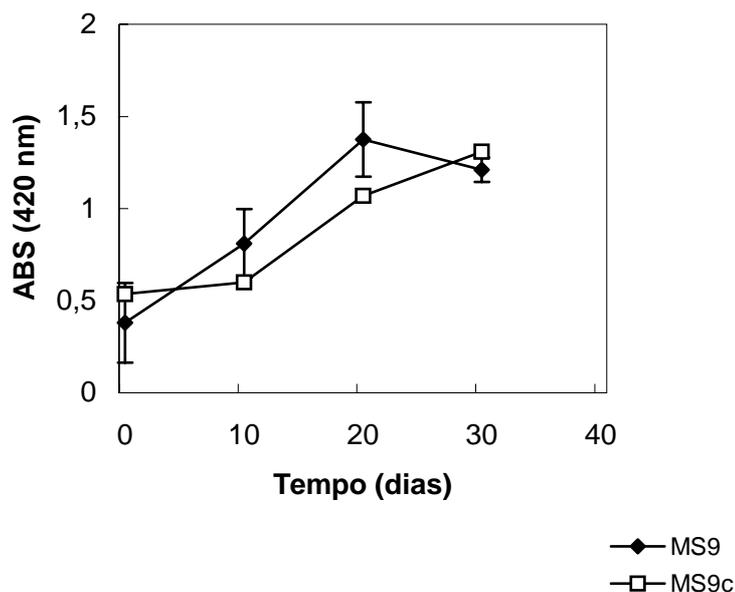


**Figura 4.10** – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista BS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

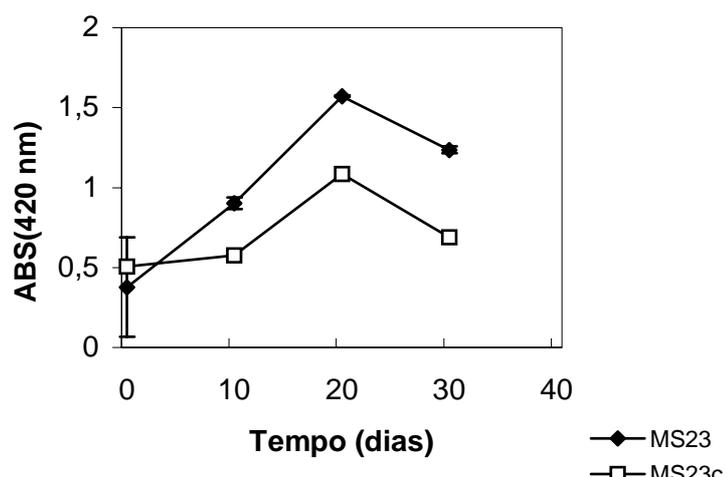


**Figura 4.11** – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista BC durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

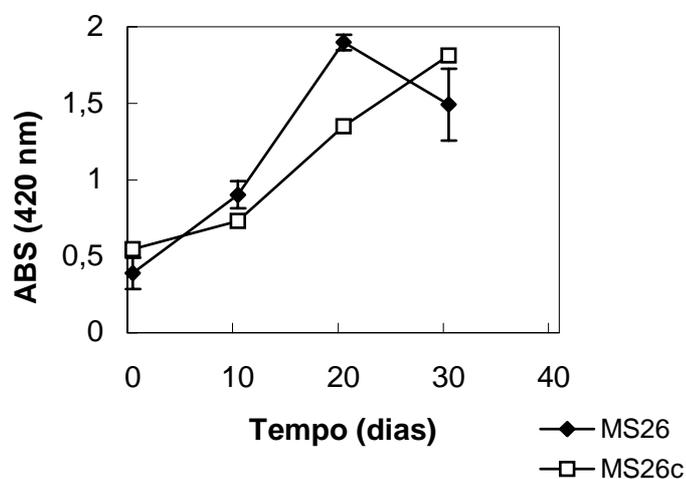
Como os resultados dos experimentos com as culturas mistas MS e BC foram semelhantes, optou-se pela continuidade do trabalho com a cultura MS, sendo inicialmente realizados experimentos com cada uma das três bactérias, para verificar se haveria degradação de PBZ em cada caso (Figuras 4.12 a 4.14). Maior crescimento foi observado para a bactéria MS 26, com absorbância máxima de 1,8, porém para as três bactérias, nos experimentos controles (meio mineral sem fonte de carbono) o crescimento foi praticamente igual aos experimentos com PBZ. Esse resultado indica que o crescimento obtido foi provavelmente devido ao consumo de fontes de carbono ainda presentes no inóculo e não ao consumo de PBZ (Figura 4.14).



**Figura 4.12** – Crescimento da bactéria MS9 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



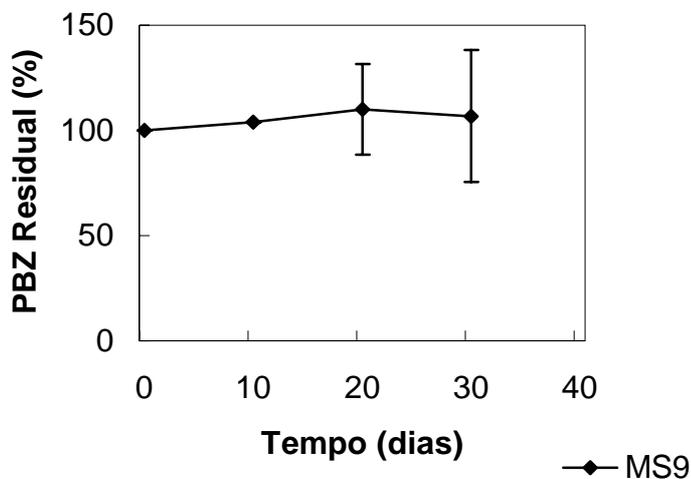
**Figura 4.13** – Crescimento da bactéria MS23 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



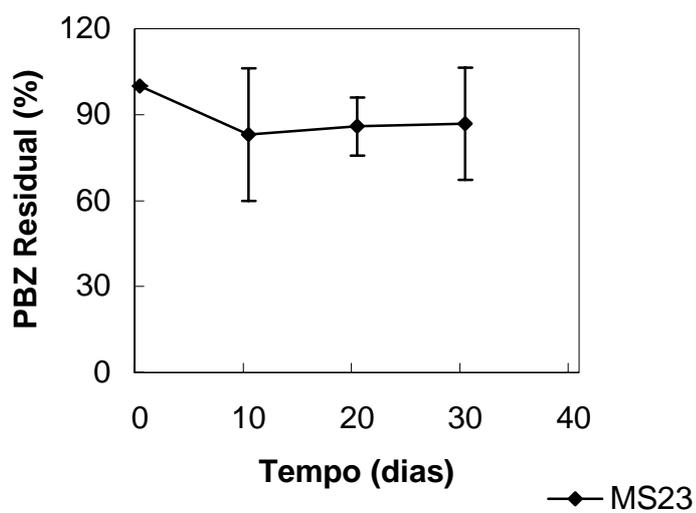
**Figura 4.14** – Crescimento da bactéria MS26 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)

A biodegradação, nos experimentos com as bactérias isoladas, concorda com os resultados de crescimento, pois a porcentagem de PBZ degradado em MS 9 permaneceu constante e para MS 23 e MS 26 os valores foram muito baixo, 14% e 20%, respectivamente (Figuras 4.15 a 4.17).

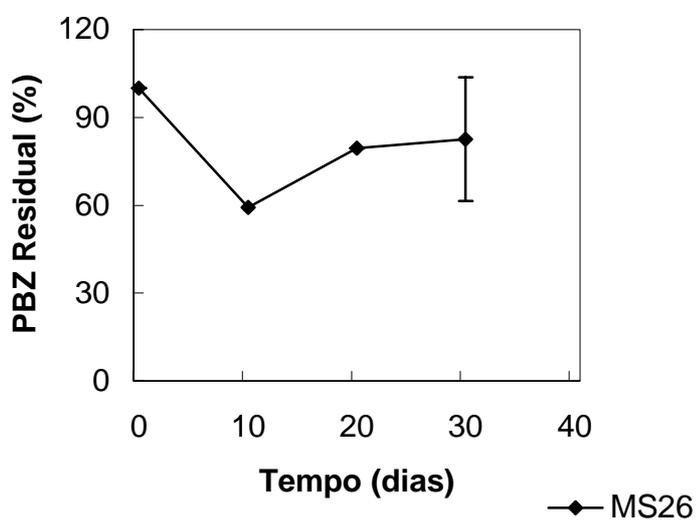
Essa diminuição na biodegradação, comparada com a biodegradação por essas mesmas bactérias juntas, é facilmente explicada. A biodegradação de compostos complexos requer freqüentemente a cooperação de mais de uma espécie microbiana (ALEXANDER, 1997). Culturas puras podem metabolizar somente uma faixa limitada de substratos, assim, a formação de populações mistas com ampla capacidade enzimática são mais efetivas.



**Figura 4.15** – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS9 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono



**Figura 4.16** – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS23 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

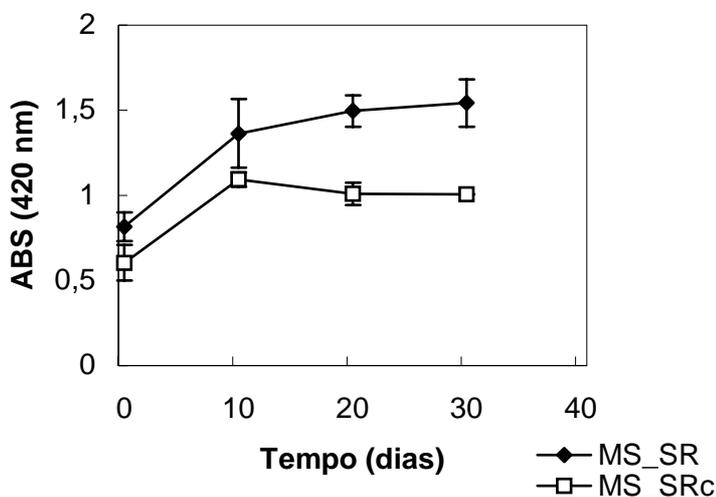


**Figura 4.17** – Degradação de paclobutrazol pela bactéria MS26 durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

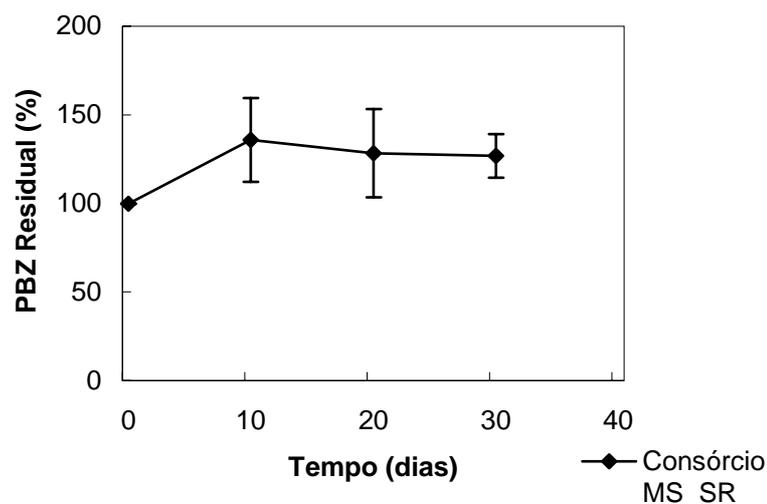
#### 4.4.2 – Utilização da cultura mista da amostra MS acrescida de linhagens de *Streptomyces* e de *Rhodococcus* em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

A continuidade do trabalho foi realizada utilizando-se apenas a cultura mista da amostra MS, uma vez que esta apresentou maior degradação de PBZ. Os experimentos foram realizados em duplicata e com controle, sendo este sem fonte de carbono.

Nesta etapa foi investigada a adição de outros gêneros de bactérias, *Streptomyces* sp. 11470 e *Rhodococcus rhodochrous* 3317, à cultura mista MS. O crescimento foi menor (Figura 4.18) que o observado pelas *Pseudomonas* da cultura mista MS (Figura 4.4) e praticamente não ocorreu biodegradação de PBZ (Figura 4.19).



**Figura 4.18** – Crescimento da cultura mista MS adicionada de S (*Streptomyces* sp. 11470) e R (*Rhodococcus* sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol)



**Figura 4.19** – Degradação de paclobutrazol pela cultura mista MS adicionada de S (*Streptomyces* sp. 11470) e R (*Rhodococcus* sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

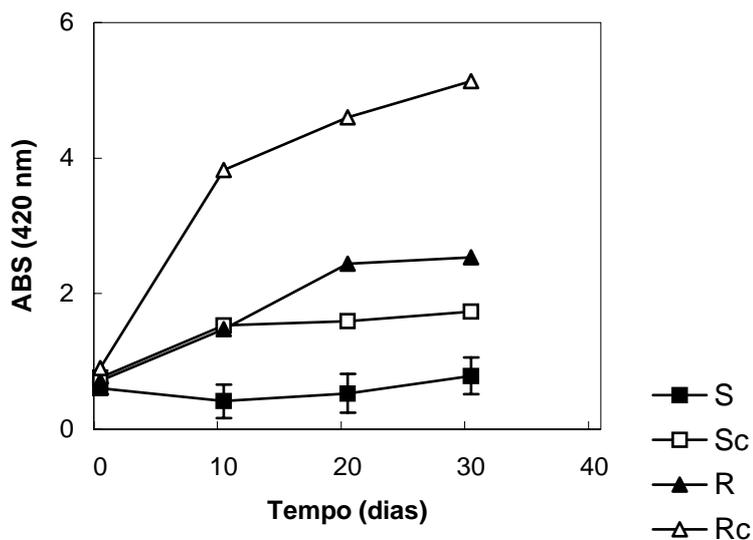
Uma possível causa para os baixos valores de crescimento é a inibição competitiva, que pode ter sido ocasionada pela presença de compostos com atividade antibacteriana produzidos por *Streptomyces* sp. 1170.

As vias metabólicas de degradação do PBZ ainda são desconhecidas, porém existem vias determinadas de degradação de cloro-benzeno e triazol. Estudos relatam que esses gêneros competem pela mesma etapa da via metabólica de degradação do triazol (KARPOUZAS & WALKER, 2000; SMITH *et al.*, 2005), fator que pode ter levado à inibição do crescimento da cultura mista MS\_SR e, conseqüentemente da biodegradação. Duetz *et al.* (1994), em trabalhos com a biodegradação de tolueno, mostraram que a competição de diferentes espécies de bactérias pelo mesmo substrato resultou na predominância de apenas uma espécie.

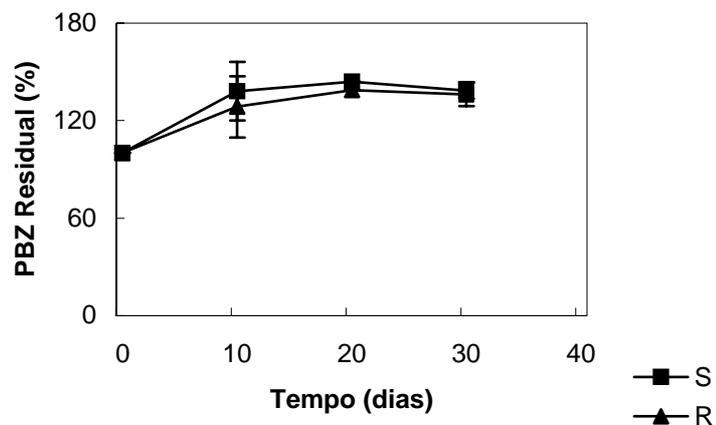
Para confirmar esta hipótese, foram realizados cultivos, de forma isolada, com as bactérias *Rhodococcus rhodochrous* 3317 e *Streptomyces*.sp. 11470.

Nos experimentos com culturas puras S e R, o crescimento foi maior para a linhagem de *Rhodococcus*. Em ambos os casos houve maior crescimento no experimento controle (meio de cultura sem PBZ) (Figura 4.20), indicando que o paclobutrazol inibe o crescimento dos actinomicetos utilizados, não havendo, conseqüentemente, a degradação de PBZ (Figura 4.21).

Silva *et al.* (2003d) verificaram um efeito inibitório do PBZ sobre actinomicetos, obtendo um decréscimo de 28% dos actinomicetos do solo quando o PBZ foi aplicado.



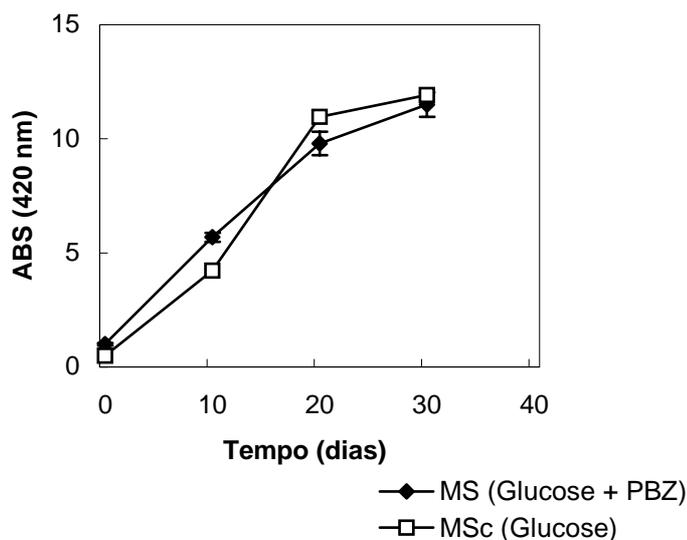
**Figura 4.20** – Crescimento das bactérias S (*Streptomyces* sp. 11470) e R (*Rhodococcus* sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono e seus respectivos controles (meio de cultura sem paclobutrazol)



**Figura 4.21** – Degradação do paclobutrazol pelas bactérias S (*Streptomyces* sp. 11470) e R (*Rhodococcus* sp. 3317) durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

#### 4.4.3 – Efeito da adição de glicose ou glicerol como fontes de carbono adicionais na biodegradação de paclobutrazol pela cultura mista MS

Inicialmente, foram realizados experimentos utilizando glicose como fonte adicional. Os resultados de crescimento foram consideravelmente maiores do que àqueles obtidos apenas com PBZ como fonte de carbono. Entretanto, o experimento controle (meio mineral contendo apenas glicose como fonte de carbono) apresentou valores semelhantes, indicando que apenas a glicose foi consumida (Figura 4.22).



**Figura 4.22** – Crescimento da cultura mista MS durante 30 dias de biodegradação em meio contendo paclobutrazol e glicose como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio de cultura sem paclobutrazol, apenas com glicose)

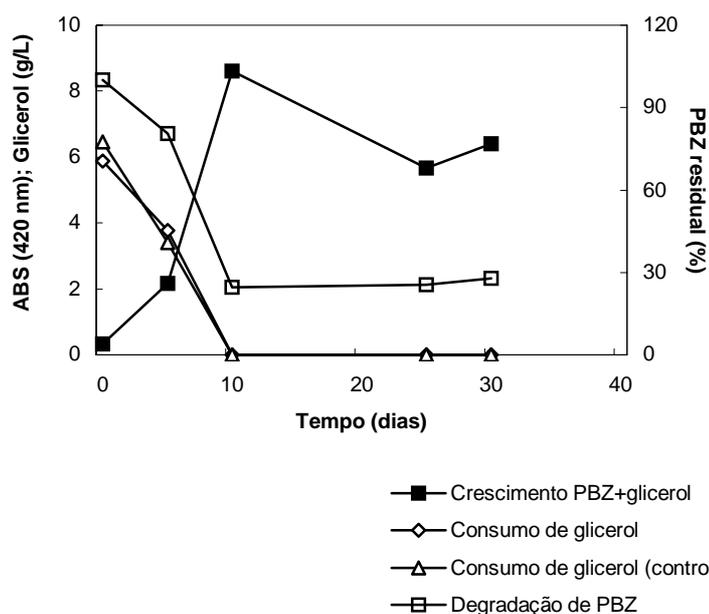
Esse fato foi confirmado pela porcentagem de PBZ, que permaneceu praticamente constante durante todo o período investigado. A biodegradação de PBZ provavelmente não aumentou devido à repressão catabólica da glicose

A adição de uma fonte de carbono adicional aumenta a biomassa microbiana, no entanto, pode inibir a degradação de compostos contaminantes ou resultar em um crescimento diáuxico, como foi observado em uma cultura de *Escherichia coli* em um meio com duas fontes de carbono, sendo uma delas preferida pelo metabolismo de *E. coli* (ALEXANDER, 1999). Schmidt *et al.* (1987) estudaram a degradação de *p*-nitrofenol por *Pseudomonas* e observaram que nem todos os substratos adicionados estimularam a degradação de *p*-nitrofenol, como por exemplo, a adição de fenol que inibiu essa degradação.

Segundo Brückner & Titgemeyer (2002), a presença de um repressor catabólico, ou seja, a presença de uma fonte de carbono que reprime a expressão de certos genes e operons

que são responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono, pode resultar numa baixa concentração de indutores de rotas cometabólicas específicas. Segundo Lee *et al.* (2003), a adição de outra fonte de carbono como um nutriente aumentará a biomassa, mas poderá inibir a biodegradação do contaminante, resultando num crescimento diáuxico.

Posteriormente, glicerol foi utilizado como fonte adicional de carbono. O crescimento neste caso foi consideravelmente maior do que no meio apenas com PBZ como fonte de carbono, no entanto, menor que o apresentado com a adição de glicose ao meio. A absorvância máxima foi de 8,6 (a 420 nm). A biodegradação, porém foi maior, tanto nos experimentos que utilizaram apenas PBZ, quanto nos que utilizaram glicose e PBZ, atingindo cerca de 75 % em apenas 10 dias de cultivo. Também foi observado que os valores máximos de crescimento no meio com PBZ e glicerol foram atingidos também em 10 dias de cultivo e o PBZ foi consumido simultaneamente com o glicerol, não sendo portanto, observado crescimento diáuxico. O consumo de glicerol do experimento controle (meio apenas com glicerol) foi semelhante ao experimento com PBZ e glicerol (Figura 4.23).



**Figura 4.23** – Crescimento, degradação de paclobutrazol e consumo de glicerol pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio contendo paclobutrazol e glicerol como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio sem paclobutrazol, apenas com glicerol)

A biodegradação praticamente permaneceu constante após 10 dias de cultivo. Esse fato também foi observado nos experimentos com apenas PBZ como fonte de carbono (Figura 4.8), porém, neste caso, a estabilização da degradação aconteceu após 20 dias de cultivo. Alguns trabalhos sobre a biodegradação de PBZ também apresentaram essa estabilização na degradação após um período do experimento (SILVA *et al.*, 2003c; JACKSON *et al.*, 1996). Foster *et al.* (2004) também obtiveram resultados semelhantes na investigação sobre a biodegradação de organofosfato.

Em trabalhos mais recentes, Lee *et al.* (2003) também observaram que o piruvato pode ser usado como fonte adicional de carbono para estimular o crescimento e a degradação de hidrocarbonetos polinucleares aromáticos (HPAs) por *P. putida* G7. Em relação ao

glicerol, Figueiredo *et al.* (2004) e Gondim *et al.* (2004) também apresentaram resultados similares ao verificarem que *Pseudomonas aeruginosa* BB2-572 degradou rapidamente paclobutrazol quando os meios continham esse composto como fonte de carbono adicional.

Jackson *et al.* (1996), utilizando um isolado de *Pseudomonas*, obtiveram uma redução de 79% de paclobutrazol após 39 dias de cultivo. Por outro lado, Silva *et al.* (2003c) observaram uma biodegradação de aproximadamente 42% após 90 dias, utilizando culturas mistas de *Stenotrophomonas*, *Bacillus* e *Brevibacillus* spp. isolados de solo com histórico de aplicação de PBZ. A Tabela 4.5 apresenta percentuais de biodegradação de PBZ em relação ao tempo, encontrados no presente trabalho e na literatura. Vale ressaltar que Jackson *et al.* (1996) não utilizaram bactérias de solo com histórico de aplicação e obtiveram resultados satisfatórios, assim como no presente trabalho. É de grande importância ressaltar que os resultados encontrados no presente trabalho, comparado aos resultados obtidos na literatura, foram bastante animadores.

**Tabela 4.6** – Comparação entre os percentuais de biodegradação de paclobutrazol obtidos no presente trabalho e encontrados na literatura

<b>Biodegradação (%)</b>	<b>Tempo de cultivo</b>	<b>(%/dia)</b>	<b>Fonte de carbono</b>	<b>Referência</b>
79	39 dias	2,0	PBZ	Jackson <i>et al.</i> (1996)
42	90 dias	0,5	PBZ	Silva <i>et al.</i> (2003b)
47	20 dias	2,35	PBZ	Presente trabalho
75	10 dias	7,5	PBZ + glicerol	Presente trabalho

Ainda, Figueiredo *et al.* (2004) e Gondim *et al.* (2004) investigaram a biodegradação de paclobutrazol e encontraram um percentual de aproximadamente 80% em 3 dias de cultivo em meio mineral. Entretanto, estes autores utilizaram uma linhagem de *Pseudomonas*

*aeruginosa*, que são patogênicas ao homem, sendo grandes responsáveis por infecções hospitalares em todo o mundo, bem como pela resistência a muitos antibióticos (FREITAS & BARTH, 2004).

Nos experimentos utilizando glicerol e PBZ, como fontes de carbono, também foi acompanhada a produção de biossurfactante, uma vez que muitos trabalhos relatam que *Pseudomonas* produzem biossurfactante raminolipídico quando em meio de cultura contendo glicerol como fonte de carbono (DESAI & BANAT, 1997; GOUVEIA *et al.*, 2003; OCHSNER & REISER, 1995).

O índice de emulsificação e a produção de raminose aumentaram significativamente a partir de 10 dias de cultivo (Figura 4.24), coincidindo assim com a exaustão de glicerol e com a estabilização na degradação de PBZ. Devido a ausência da fonte de carbono estimuladora do crescimento, a biodegradação cessou, porém possivelmente na presença dessa fonte, a biodegradação poderia ter aumentado ainda mais devido a presença de biossurfactante. Além disso, esses dados apresentam biossurfactante raminolipídico como metabólito secundário, pois é produzido após a fase exponencial de crescimento e na ausência de fonte de carbono.

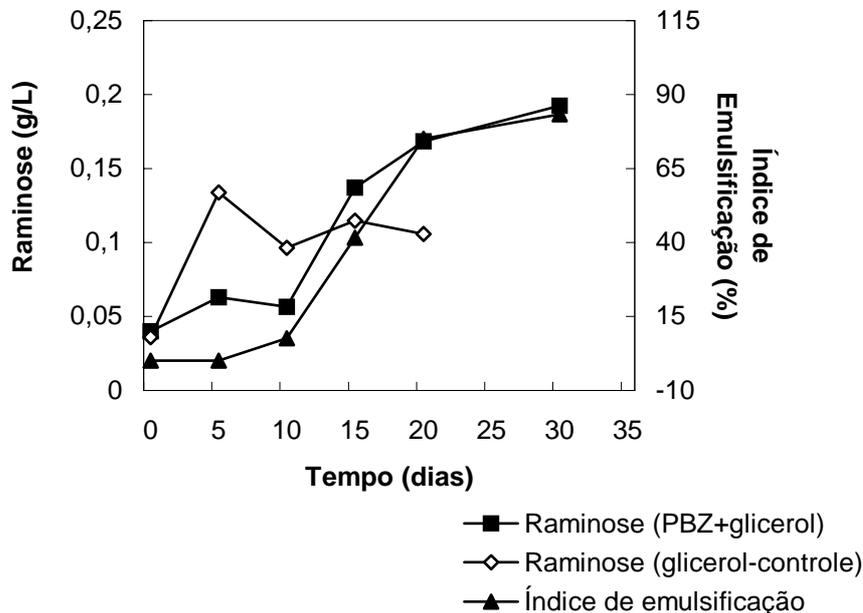
A quantidade de raminolipídeo produzida foi aproximadamente 0,2 g/L. No experimento controle, a produção de raminose foi menor, apenas 0,13 g/L, porém esta concentração foi alcançada rapidamente, com cinco dias de cultivo, permanecendo praticamente constante após esse período. Nesse caso, a produção de raminose não coincidiu com o término de glicerol.

Concentrações similares de raminolipídeos, utilizando-se outros substratos, foram obtidas por alguns autores. Patel & Desai (1997) relataram uma produção de 0,24 g/L de

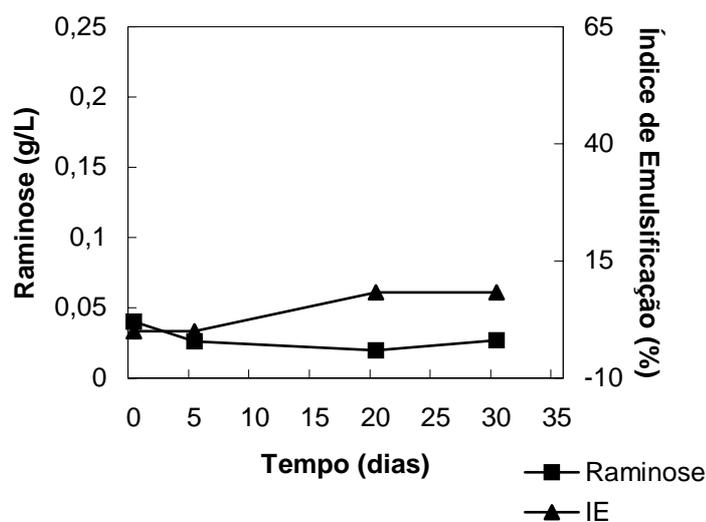
raminose por *P. aeruginosa* GS3 quando cultivada em melão e em água de maceração de milho como fontes de carbono e de nitrogênio, respectivamente.

Alguns trabalhos apresentam uma produção significativamente maior de raminolipídeos. Sim *et al.* (1997) utilizaram glicose, óleo de canola e óleo de soja, entre outras fontes de carbono, para a produção de raminolipídeo por *P. aeruginosa* UW-1 e obtiveram 1,2, 11,0 e 14,5 g/L de raminolipídeo, respectivamente, após sete dias de cultivo. No entanto, esses dados podem variar mesmo com a utilização de substratos semelhantes. Benincasa *et al.* (2002) utilizaram ácido oléico, óleo de soja e óleo de girassol e obtiveram produção de 4,5; 4,9 e 4,9 g/L de raminolipídeos, respectivamente.

Não houve emulsificação e nem produção de raminose no experimento contendo apenas PBZ como fonte de carbono (Figura 4.25).



**Figura 4.24** – Produção de raminose e índice de emulsificação obtidos pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol e glicerol como fontes de carbono e seu respectivo controle (meio sem paclobutrazol, apenas com glicerol)



**Figura 4.25** – Produção de raminose e índice de emulsificação pela cultura mista MS durante 30 dias de cultivo em meio mineral contendo paclobutrazol como única fonte de carbono

#### 4.5 – Avaliação da atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana dos metabólitos produzidos durante os experimentos com a cultura mista MS foi realizada contra as próprias bactérias constituintes da cultura MS. O teste de toxicidade foi realizado com as amostras do tempo inicial e final, isto é, zero e trinta dias de cultivo. Não foi observada atividade antibacteriana em nenhuma das amostras, indicando que o PBZ e os produtos metabólitos produzidos durante os experimentos com a cultura mista MS não foram tóxicos às bactérias desta cultura. Entretanto, segundo Kargi & Eker (2004), quanto maior a concentração de 2,4-diclorofenol (DCP), menor a taxa de biodegradação deste composto por *Pseudomonas putida*. Esses autores verificaram que o próprio DCP causava a inibição nas bactérias utilizadas.

## 5 – CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 5.1 – Conclusões

- Das 37 bactérias isoladas dos quatro solos, MS (Mandacaru sem histórico de aplicação de PBZ), MC (Mandacaru com histórico), BS (Bebedouro sem histórico) e BC (Bebedouro com histórico), 89% foram Gram-negativas e 13 foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, sendo duas *P. aeruginosa*.
- Na etapa de padronização do inóculo, 11 isolados de *Pseudomonas* apresentaram fase exponencial entre 4 e 6 horas de cultivo, enquanto que os actinomicetos, *Rhodococcus rhodochrous* 3317 e *Streptomyces* sp. 11470, apresentaram fase exponencial entre 8 e 10 horas e entre 20 e 24 horas, respectivamente.
- O crescimento das bactérias isoladas dos quatro solos (MS, MC, BS, BC), em meio contendo paclobutrazol como única fonte de carbono, foi semelhante para MS, BS e BC, diferindo apenas para BS, provavelmente por esta última conter apenas uma bactéria. No entanto, os melhores resultados de biodegradação foram obtidos apenas pelas culturas mistas MS e BC, 47 e 43 %, respectivamente. Não foi observada relação entre a biodegradação de paclobutrazol e a presença de histórico de aplicação.
- Os resultados, relacionados ao crescimento e a biodegradação de paclobutrazol pelas bactérias isoladas do solo MS, foram maiores quando estas bactérias foram utilizadas em cultura mista.

- Nos experimentos com culturas mistas utilizando três gêneros bacterianos, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Streptomyces*, os valores de crescimento e de biodegradação foram inferiores àqueles obtidos utilizando apenas *Pseudomonas* spp.
- Foi observado um efeito inibidor do paclobutrazol sobre as bactérias *Streptomyces* sp. 11470 e *Rhodococcus rhodochrous* 3317, pois estas cresceram mais nos experimentos controles (sem fonte de carbono) do que nos experimentos com paclobutrazol como única fonte de carbono.
- O crescimento foi maior nos experimentos utilizando paclobutrazol e glicose como fontes de carbono, porém, neste caso, não houve degradação de paclobutrazol.
- Nos experimentos utilizando paclobutrazol e glicerol como fontes de carbono, foi observado um crescimento um pouco menor do que quando foi utilizado a glicose e paclobutrazol, mas ainda maior do que aquele obtido nos experimentos apenas com paclobutrazol como fonte de carbono. Neste caso, houve maior degradação (75 %), indicando que o glicerol pode ser considerado uma fonte de carbono que estimula o crescimento e não inibe a degradação de paclobutrazol por *Pseudomonas* spp.
- Houve produção de biossurfactante raminolipídico (0,2 g/L) nos experimentos utilizando paclobutrazol e glicerol.

## 5.2 – Sugestões

Para etapas posteriores, sugere-se:

- Investigar a natureza dos metabólitos produzidos durante a biodegradação.
- Avaliar o impacto dos metabólitos produzidos durante a biodegradação sobre a microbiota nativa de cada amostra de solo, bem como sobre as linhagens de *Rhodococcus* e *Streptomyces*.
- Avaliar a biodegradação de paclobutrazol pela cultura mista MS em amostras de solo.
- Avaliar a biodegradação de paclobutrazol pela cultura mista MS com experimentos em batelada alimentada experimento com PBZ e glicerol, como fontes de carbono e avaliar o efeito da produção de biossurfactantes nesse caso.

## 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. Ed. Academic Press. 2 ed. New York, 1999, p.325–353.

ALEXANDER, M. Microbial Communities and Interactions: a Prelude. In: Hurst, C. J.; Knudsen, G. R.; McInerney, M. J.; Stetzenbach, L. D. & Walter, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Ed. ASM Press, Washington, D. C., 1997, p.5-13.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R. & ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, p. 799-804, 2003.

BAKER, K. H. Bioremediation of Surface and Subsurface Soils. In: BAKER, K. H & HERSON, D. S. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. New York, 1994, cap. 6, p. 203-249.

BAKER, K. H. & HERSON, D. S. Microbiology and Biodegradation. In: \_\_\_\_\_. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. New York, 1994a, cap. 1, p. 09-59.

BAKER, K. H. & HERSON, D. S. Microbiology and Biodegradation. In: \_\_\_\_\_. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. New York, 1994b, cap. 2, p. 09-59.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S. & CAMEOTRA, S. S. Potential Commercial Applications of Microbial Surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495-508, 2000.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C. & TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A. & MORAES, I. O. Rhamnolipid Production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI Growing on Soapstock as the Sole Carbon Source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.

BRÜCKNER, R. & TITGEMEYER, F. Carbon Catabolite Repression in Bacteria: Choice of the Carbon Source and Autoregulatory Limitation of Sugar Utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 141-148, 2002.

BURPEE, L. L. Effects of Plant Growth Regulators and Fungicides in *Rhizoctonia* Blight of Tall Fescue. **Crop Protection**, v. 17, n°. 6, p. 503-507, 1998.

CALDWELL, D. E.; WOLFAARDT, G. M.; KORBER, D. R. & LAWRENCE, J. R. Cultivation of Microbial Consortia and Communities. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D. & WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, Ed. ASM Press, Washington, D. C., 1997, p.5-13.

CALVO, C.; TOLEDO, F. L. & GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Surfactant Activity of a Naphtalene Degrading *Bacillus pumilus* Strain Isolated from Oil Sludge. **Journal of Biotechnology**, v. 109, p. 255-262, 2004.

CHRISTOFI, N. & IVSHINA, I. B. Microbial Surfactants and their Use in Field Studies of Soil Remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.

DEAN, S. M.; JIN, Y.; CHA, D. K.; WILSON, S. V. & RADOSEVICH, M. Bioremediation and Biodegradation: Phenanthrene Degradation in Soils Co-Inoculated with Phenanthrene-Degrading and Biosurfactant-Producing Bacteria. **Journal of Environmental Quality**, v. 30, p. 1126-1133, 2001.

DESAI, J. D. & BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47-64, 1997.

DUARTE FILHO, J.; ANTUNES, L. E. C. & PÁDUA, J. G. GA<sub>3</sub> e Paclobutrazol no Florescimento e na Produção de Frutos em Duas Cultivares de Morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n°. 2, p. 202-205, 2004.

DUBOIS, M.; GILLES, K. A.; HAMILTON, J. K. REBERS, P. A. & SMITH, F. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substance. **Analytical Chemistry**, v. 28, n°. 3, p. 350-356, 1956.

DUETZ, W. A.; DE JONG, C.; WILLIAMS, P. A. & VAN ANDEL, J. G. Competition in Chemostat Culture between *Pseudomonas* Strains That Use Different Pathways for the Degradation of Toluene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n°. 8, p. 2858-2863, 1994.

FIGUEIREDO, C. M.; GONDIM, M. V. S. & GOUVEIA, E. R. Biodegradação de paclobutrazol e sua relação com a produção de biossurfactante. **Anais do III Congresso Nacional de Meio Ambiente**, Salvador, 2004.

FONSECA, N.; NETO, M. T. C.; LEDO, C. A. S. Paclobutrazol e Estresse Hídrico no Florescimento e Produção da Mangueira (*Mangifera indica*) 'Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n°. 1, p. 21-24, 2005.

FOSTER, L. J.; KWAN, B. H. & VANCOV, T. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticide, Ethion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, p. 49-53, 2004.

FREITAS, A. L. & BARTH, A. L. Typing of *Pseudomonas aeruginosa* from Hospitalized Patients: a Comparison of Susceptibility and Biochemical Profiles with Genotype. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 77-82. 2004.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B. & BASRI, M. Biodegradation of Hydrocarbons in Soil by Microbial Consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 61-67, 2004.

GONDIM, M. V. S.; FIGUEIREDO, C. M. & GOUVEIA, E. R. Aumento da degradação de paclobutrazol por *Pseudomonas aeruginosa*. **Anais do III Congresso Nacional de Meio Ambiente**, Salvador, 2004.

GOUVEIA, E. R.; LIMA, D. P. A.; DUARTE, M. S.; LIMA, G. M. S. & ARAÚJO, J. M. Bactérias Produtoras de Biossurfactantes – Produção de Biossurfactantes por Bactérias Isoladas de Poços de Petróleo. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 30, p. 39-45, 2003.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A. & HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant – paclobutrazol (PP333). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n°. 9, p. 1265-1267, 1996.

JACOBS, K. A. & BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. **Pest Management Science**, v. 56, p. 407-412, 2000.

JAVOREKOVÁ, S.; STEVLÍKOVÁ, T.; LABUDA, R. & ONDRISÍK, P. Influence of Xenobiotics on the Biological Soil Activity. **Jóurnal Central European Agriculture**, v.2, N° 3-4, p. 191-198, 2001.

JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; RANCEL, M. & AGUIAR, S. R. Alterações Bioquímicas e Acúmulo em Pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n°. 3, p. 441-446, 2002.

KA, J. O.; HOLBEN, W. E. & TIEDJE, J. M. Analysis of Competition in Soil among 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n°. 4, p. 1121-1128, 1994.

KADO, C. I. & HESKETT, M. G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KARGI, F. & EKER, S. Kinetics of 2,4-diclorofenol Degradation by *Pseudomonas putida* CPI in Batch Culture. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, n°. 1, p. 25-28, 2005.

KARPOUZAS, D. G. & WALKER, A. Factors Influencing the Ability of *Pseudomonas putida* epI to Degrade Ethoprophos in Soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1753-1762, 2000.

KING, E. O., WARD, M. K. E RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their Application for Soil Bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, n°. 4, p. 295-304, 2001.

LAPAT-POLASKO, L. T.; MCCARTY, P. L. & ZEHNDER, A. J. B. Secondary Substrate Utilization of Methylene Chloride by an Isolated Strain *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n°. 4, p. 825-830, 1984.

LEE, K. PARK, J. W., AHN, I. S. Effect of Additional Carbon Source on Naphthalene Biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. **Journal of Hazardous Materials**, p. 157-167, 2003.

MACIEL, E. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica de Multirresíduos para Quantificação de Resíduos de Pesticidas em Manga (*Mangifera indica*)**. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba/SP, 2005.

MCLEISH, R. & ESSENBERG, C. **Chlorobenzene Graphical Pathway Map.**, 2004. Disponível em: <[http://umbbd.ahc.umn.edu/cb/cb\\_image\\_map.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/cb/cb_image_map.html)>. Acesso em: 11 nov. 2005.

MENDONÇA, V.; NETO, S. E. A.; HAFLE, O. M.; MENEZES, J. B.; RAMOS, J. D. Florescimento e Frutificação de Magueira com Uso de Paclobutrazol, Ethephon e Nitrato de Cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n°. 2, p. 265-269, 2001.

MONTEIRO, R. T. Degradação de Pesticidas. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. **Microbiologia Ambiental**, Embrapa, Jaguariúna, 1997, p. 107-124.

MOUCO, M. A. C. & ALBUQUERQUE, J. A. S. Efeito do Paclobutrazol em Duas Épocas de Produção da Mangueira. **Bragantia**, v. 64, n°. 2, p. 219-225, 2005.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N. & GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced Remediation of Contaminated Soil: A Review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371-380, 2001.

NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e Aplicações. **Química Nova**, v. 25, nº. 5, p. 772-776, 2002.

OCHSNER, A. & REISER, J. Autoinducer-Mediated Regulation of Rhamnolipid Biosurfactant Synthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v. 92, p. 6424-6428, 1995.

PATEL, R. M., & DESAI, A. J. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. **Letters in Applied Microbiology**, v. 25, p. 91-94, 1997.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MARCHANT, R. & BANAT, J. M. Rhamnolipid Biosurfactant production by Strains os *Pseudomonas aeruginosa* Using Low-Cost Raw Materials. **Biotechnology Program**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, K.S.M.; RAHMAN, T.J.; KOURKOUTOAS, Y.; PETSAS, I.; MARCHANT, R. & BANAT, I.M. Enhanced bioremediation of n-alkane in petroleum sludge using bacterial consortium amended with rhamnolipid and micronutrients. **Bioresource Technology**, v. 90, p. 159-168, 2003.

REIS, V. C. S.; NETO, M. T. C. & SOARES, J. M. Efeito da Aplicação Foliar do Paclobutrazol na Floração e Frutificação da Mangueira (*Mangifera indica* L.) cv. 'Tommy Atkins'. **Magistra**, v. 12, p. 11-18, 2000.

RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P. & CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3565-3575, 1990.

SANT'ANA, A. S.; SILVA, S. C. F. L.; FARANI, I. O.; AMARAL, C. H. R. & MACEDO, V. F. Qualidade Microbiológica de Águas Minerais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 23, p. 190-194, 2003.

SANTOS, C. H.; KLAR, A. E.; FILHO, H. G.; RODRIGUES, J. D. & PIERRE, F. C. Indução do Florescimento e Crescimento de Tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) em Função da Irrigação e da Aplicação de Paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, nº. 1, p. 08-12, 2004.

- SCHMIDT, S. K.; SCOW, K. M. & ALEXANDER, M. Kinetics of para-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: Effects of second substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2617-2623, 1987.
- SHARMA, D. & AWASTHI, M. D. Uptake of Soil Applied Paclobutrazol in Mango (*Mangifera indica* L.) and its Persistence in Fruit and Soil. **Chemosphere**, v. 60, p. 164-169, 2005.
- SILVA, C. M. M. S. & FAY, E. F. Persistência e Biomagnificação de Moléculas Xenobióticas. In: MELO, I. S. & AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**, Embrapa, Jaguariúna, 1997, p. 67-105.
- SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. & JONSSON, C. M. Paclobutrazol – Regulador de Crescimento Vegetal. In: SILVA, C. M. M. S. & FAY, E. F. **Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol**, Jaguariúna-SP, 2003a, p. 09-14.
- SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. & CASTRO, V. L. Xenobióticos e seus Impactos Ambientais. In: SILVA, C. M. M. S. & FAY, E. F. **Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol**, Jaguariúna-SP, 2003b, p. 15-35.
- SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. & VIEIRA, R. F. Degradação de paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n.º. 10, p. 1223-1227, 2003c.
- SILVA, C. M. M. S.; VIEIRA, R. F. & NICOLELLA, G. Paclobutrazol effects on soil microorganisms. **Applied Soil Ecology**, v. 22, p. 79-86, 2003d.
- SIM, L., WARD, O. P., & LI, Z. Y. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 19, p. 232–238, 1997.
- SINGH, V. K. & BHATTACHERJEE, A. K. Genotypic Response of Mango Yield to Persistence of Paclobutrazol in Soil. **Scientia Horticulturae**, v. 101, n.º. 1, p. 53-59, 2005.
- SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W. & WRIGHT, D. J. Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.º.9, p. 5198-5206, 2003.

SIQUEIRA, D. P.; BARCENA, J. L. G. & ESPOSTI, M. D. D. Florescimento de Tangerineiras Satsuma 'Owari' Tratadas com Paclobutrazol, Anelamento do Caule e Baixa Temperatura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n.º. 3, p. 406-409, 2004.

SMITH, D. ALVEY, S. & CROWLEY, D. E. Cooperative Catabolic Pathways within an Atrazine-Degrading Enrichment Culture Isolated from Soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, n.º. 2, p. 265-273, 2005.

SOARES, J. B.; CASIMIRO, A. R. S. & ALBUQUERQUE, L. M. B. Microscopia. **Microbiologia Básica**, 2ª ed., Ed. Universidade Federal do Ceará, 1991, p. 17-42.

STEPHENS, S. & KOTHARU, P. **Atrazine Degradation Graphical Pathway Map 1**. 2002a. Disponível em: <[http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr\\_image\\_map1.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_image_map1.html)> Acesso em: 11 de Novembro de 2005.

STEPHENS, S. & KOTHARU, P. **Atrazine Degradation Graphical Pathway Map 2**. 2002b. Disponível em: <[http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr\\_image\\_map2.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_image_map2.html)> Acesso em: 11 de Novembro de 2005.

UETA, J. PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K. & CERDEIRA, A. L. **Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação - Microrganismos degradadores do herbicida Atrazina**. 17 de novembro de 2002. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>>. Acesso em: 21 de Outubro de 2004.

ZHANG, Y.; MAIER, W. J. & MILLER, R.M. Effect of rhamnolipids on the dissolution, bioavailability and biodegradation of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, v. 31, p. 2211-2217, 1997.

ZHANG, Y. & MILLER, R.M. Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, p. 3276–3282, 1992.