

Isolamento, caracterizacão . . .  
2000 TS-PP-2000.00437



CNPMA-3755-1

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ECOLOGIA DE  
*Acinetobacter baumannii* DEGRADADORA  
DO HERBICIDA DIURON

MILTON RICARDO DE ABREU ROQUE

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do Campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Área de Microbiologia Aplicada).

RIO CLARO

Estado de São Paulo - Brasil

Maio de 2000

2000.00437

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

WILTON RICHARDS DE ALBUQUERQUE

Trabalho de Conclusão de Curso

Este trabalho foi desenvolvido no âmbito do curso de Graduação em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, sob a orientação do Prof. Dr. [nome não legível].

GRADUADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ECOLOGIA DE  
*Acinetobacter baumannii* DEGRADADORA  
DO HERBICIDA DIURON

**MILTON RICARDO DE ABREU ROQUE**

Orientador: Dr. Itamar Soares de Melo

Tese apresentada ao Instituto de Biociências  
do Campus de Rio Claro, Universidade  
Estadual Paulista, como parte dos requisitos  
para obtenção do título de Doutor em Ciências  
Biológicas (Área de Microbiologia Aplicada).

# AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por terem sido os primeiros a acreditar em mim e a apoiar-me incondicionalmente em todas as etapas da minha vida.

Aos meus amigos, por serem a minha rede de apoio e por terem partilhado comigo momentos inesquecíveis.

Aos meus professores, por serem a minha fonte de conhecimento e por me terem inspirado a alcançar os meus objetivos.

Aos meus colegas de trabalho, por serem a minha família e por me terem apoiado em todos os momentos.

Aos meus mentores, por serem a minha luz e por me terem guiado na minha jornada profissional.

Aos meus colegas de turma, por serem a minha família e por me terem apoiado em todos os momentos.

Aos meus amigos de infância, por serem a minha alegria e por me terem apoiado em todos os momentos.

Aos meus colegas de trabalho, por serem a minha família e por me terem apoiado em todos os momentos.

Aos meus mentores, por serem a minha luz e por me terem guiado na minha jornada profissional.

Aos meus colegas de turma, por serem a minha família e por me terem apoiado em todos os momentos.

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Itamar Soares de Melo pela orientação e contribuição para a minha formação, pelo incentivo constante e pela amizade;

À Dra. Rosa Toyoko S. Frighetto e à Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro, pela orientação e apoio no desenvolvimento do trabalho;

Aos Doutores Célia Maria Maganhotto de S. Silva, Vera Lucia Ferracini, Elisabeth F. Fay, Shirlei Scramin, Vera Lúcia S. S. de Castro, Raquel Ghini, Wagner Bettioli e Pedro Valarini pela amizade, convivência e colaboração;

Aos amigos, estagiários, funcionários e pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente pelo convívio intelectual e social e colaboração nos trabalhos experimentais;

À toda a equipe do laboratório de Ecotoxicologia do Cena/USP pela colaboração nos trabalhos experimentais;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudo e suporte financeiro;

Ao curso de Pós-graduação em Microbiologia Aplicada do Instituto de Biociências Campus de Rio Claro da Universidade Estadual Paulista e a Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade;

Aos amigos, nunca perdidos mas sempre reencontrados;

À minha família, por acreditar em mim.



## ÍNDICE

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	04
2.1. Considerações sobre biodegradação.....	04
2.2. Diuron.....	06
2.2.1. Caracterização do herbicida.....	06
2.2.2. Impacto ambiental.....	08
2.2.3. Degradação microbiana.....	10
2.3. O Gênero <i>Acinetobacter</i> .....	12
2.4. Marcadores moleculares.....	16
2.5. Ecologia microbiana de ambientes contaminados.....	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1. Isolamento de bactérias com potencial para a degradação do herbicida diuron.....	25
3.1.1. Locais de coleta de solo.....	25
3.1.2. Metodologia de isolamento e preservação das linhagens bacterianas.....	27
3.2. Cinética de crescimento e caracterização das linhagens bacterianas.....	28
3.2.1. Seleção inicial.....	28
3.2.2. Testes preliminares de transformação do diuron.....	28
3.2.3. Crescimento bacteriano.....	30
3.2.4. Análise de DNA plasmidial.....	31
3.2.5. Identificação das Linhagens.....	32
3.2.5.1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos..	32
3.3. Ensaio de avaliação da biodegradabilidade do diuron.....	33
3.3.1. Extração e detecção de metabólitos.....	33

10	.....
11	.....
12	.....
13	.....
14	.....
15	.....
16	.....
17	.....
18	.....
19	.....
20	.....
21	.....
22	.....
23	.....
24	.....
25	.....
26	.....
27	.....
28	.....
29	.....
30	.....
31	.....
32	.....
33	.....
34	.....
35	.....
36	.....
37	.....
38	.....
39	.....
40	.....
41	.....
42	.....
43	.....
44	.....
45	.....
46	.....
47	.....
48	.....
49	.....
50	.....
51	.....
52	.....
53	.....
54	.....
55	.....
56	.....
57	.....
58	.....
59	.....
60	.....
61	.....
62	.....
63	.....
64	.....
65	.....
66	.....
67	.....
68	.....
69	.....
70	.....
71	.....
72	.....
73	.....
74	.....
75	.....
76	.....
77	.....
78	.....
79	.....
80	.....
81	.....
82	.....
83	.....
84	.....
85	.....
86	.....
87	.....
88	.....
89	.....
90	.....
91	.....
92	.....
93	.....
94	.....
95	.....
96	.....
97	.....
98	.....
99	.....
100	.....

3.3.1.1. Extração líquido-líquido.....	33
3.3.1.1.1. Teste colorimétrico.....	34
3.3.1.1.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)...	36
3.3.1.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	36
3.3.1.2. Extração fase sólida (SPE).....	36
3.3.2. Análise do crescimento em 3,4-dicloroanilina (DCA).....	38
3.4. Avaliação da mineralização do herbicida <sup>14</sup> C-diuron.....	39
3.5. Monitoramento de <i>Acinetobacter baumannii</i> GUS <sup>+</sup> no solo e na rizosfera.....	41
3.5.1. Obtenção de transconjugantes de <i>A. baumannii</i> .....	41
3.5.2. Monitoramento de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> no solo e na rizosfera de plantas de milho.....	42
3.5.3. Recuperação de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> do solo.....	43
3.6. Avaliação do efeito de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> na proteção de plantas.....	45
3.6.1. Efeito de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> (D16-12) na promoção do crescimento de plantas.....	45
3.6.2. Bioensaio com plantas de milho sensíveis ao diuron.....	45
3.6.3. Colonização de raízes e atividade microbiana.....	46
4. RESULTADOS.....	49
4.1. Isolamento de bactérias com potencial para a degradação do herbicida diuron.....	49
4.2. Cinética de crescimento e caracterização das linhagens bacterianas.....	50
4.2.1. Seleção inicial.....	50
4.2.2. Testes preliminares de transformação do diuron.....	51
4.2.3. Crescimento bacteriano.....	53



4.2.3.1. Linhagens D11-9, D12-1, D12-14, D12-18 e D16-12.....	53
4.2.3.2. Linhagem D12-12.....	54
4.2.4. Análise de DNA plasmidial.....	57
4.2.5. Identificação das Linhagens.....	58
4.3. Ensaio de avaliação da biodegradabilidade do diuron.....	59
4.3.1. Extração e detecção de metabólitos.....	59
4.3.1.1. Extração líquido-líquido.....	59
4.3.1.1.1. Teste colorimétrico.....	59
4.3.1.1.2. Cromatografia de camada delgada (CCD).....	60
4.3.1.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	61
4.3.1.2. Extração fase sólida (SFE).....	63
4.3.2. Análise do crescimento em 3,4-dianilina (DCA).....	63
4.4. Avaliação da mineralização do herbicida diuron.....	64
4.5. Monitoramento de <i>Acinetobacter baumannii</i> GUS <sup>+</sup> no solo e na rizosfera.....	67
4.5.1. Obtenção de transconjugantes de <i>A. baumannii</i> .....	67
4.5.2. Monitoramento de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> no solo e na rizosfera de plantas de milho.....	68
4.5.3. Recuperação de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> no solo.....	69
4.6. Avaliação do efeito de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> na proteção de plantas.....	70
4.6.1. Efeito de <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup> (D1) na promoção do crescimento de plantas.....	70
4.6.2. Bioensaio com plantas de milho expostas ao diuron.....	71
4.6.3. Colonização de raízes e atenuação da herbicida.....	71
5. DISCUSSÃO.....	76



5.1. Caracterização de linhagens isoladas de solos contaminados com diuron.....	76
5.2. Biodegradação do diuron.....	80
5.3. Ecologia de <i>Acinetobacter baumannii</i> GUS <sup>+</sup> .....	83
6. CONCLUSÕES.....	89
7. RESUMO.....	90
8. SUMMARY.....	91
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	92
10. APÊNDICE.....	108

10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19

1. În cadrul prezentei lucrări s-a realizat o analiză a evoluției economice și sociale a țării noastre în ultimii ani. S-au evidențiat atât punctele tari, cât și cele slabe ale economiei noastre. În ceea ce privește evoluția economică, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a PIB-ului, ceea ce este un semn bun pentru economia noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o inflație ridicată, ceea ce poate avea efecte negative asupra populației. În ceea ce privește evoluția socială, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a nivelului de trai, ceea ce este un semn bun pentru populația noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o creștere semnificativă a sărăciei, ceea ce este un semn rău pentru populația noastră.

2. În cadrul prezentei lucrări s-a realizat o analiză a evoluției economice și sociale a țării noastre în ultimii ani. S-au evidențiat atât punctele tari, cât și cele slabe ale economiei noastre. În ceea ce privește evoluția economică, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a PIB-ului, ceea ce este un semn bun pentru economia noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o inflație ridicată, ceea ce poate avea efecte negative asupra populației. În ceea ce privește evoluția socială, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a nivelului de trai, ceea ce este un semn bun pentru populația noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o creștere semnificativă a sărăciei, ceea ce este un semn rău pentru populația noastră.

3. În cadrul prezentei lucrări s-a realizat o analiză a evoluției economice și sociale a țării noastre în ultimii ani. S-au evidențiat atât punctele tari, cât și cele slabe ale economiei noastre. În ceea ce privește evoluția economică, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a PIB-ului, ceea ce este un semn bun pentru economia noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o inflație ridicată, ceea ce poate avea efecte negative asupra populației. În ceea ce privește evoluția socială, se poate observa că în ultimii ani s-a înregistrat o creștere semnificativă a nivelului de trai, ceea ce este un semn bun pentru populația noastră. Totuși, trebuie să notăm că această creștere este însoțită de o creștere semnificativă a sărăciei, ceea ce este un semn rău pentru populația noastră.

# 1. INTRODUÇÃO

A agricultura moderna tem se caracterizado por provocar mudanças nas estruturas física, química e biológica do solo, alterar as relações bioquímicas e ecológicas através da entrada de energia e nutrientes, como a adubação e a aplicação de pesticidas e pela uniformidade genética, evento raro em um ecossistema natural. Na atividade agrícola, a utilização de pesticidas visa sempre o incremento da produção, embora possa também gerar alterações negativas, tais como o surgimento de novas pragas e a contaminação do ambiente.

As alterações no ecossistema natural causadas pelo homem podem gerar desequilíbrio, que, para ser revertido, pode levar milhares de anos. Todavia, a ação dos próprios componentes do sistema ou a intervenção positiva do homem podem abreviar o tempo de desequilíbrio e minimizar o impacto dessas atividades. Esse modelo é importante para todo tipo de alteração na natureza,



resultante da atividade agrícola ou industrial. Entre os componentes de um ecossistema, os fatores bióticos, tais como a planta cultivada, as plantas invasoras e os microrganismos são importantes para a reciclagem de nutrientes, para a transferência de energia e transformação das moléculas químicas produzidas pelo sistema ou xenobióticas.

Os herbicidas são compostos xenobióticos de diversos grupos químicos, que apresentam ação sobre plantas daninhas, e cuja eficácia está relacionada às características físico-químicas e biológicas do solo. Eles têm sido utilizados globalmente em diversas culturas agrícolas de importância econômica, como a cana-de-açúcar por exemplo. Para o seu cultivo o herbicida diuron (3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia) e outros pesticidas são aplicados em grande escala. O uso indiscriminado desses agroquímicos pode afetar o meio ambiente, contaminando o solo, a água, além de causar fitotoxicidade em plantas não-alvo. Tais efeitos deletérios são devido às suas características físico-químicas, relacionadas a uma alta persistência e toxicidade do composto.

As plantas podem favorecer a transformação biológica desses compostos xenobióticos através do metabolismo e da estimulação de bactérias da rizosfera, capazes de metabolizar o contaminante (PFENDER, 1996). Os microrganismos também atuam na transformação de vários pesticidas no solo, resultado da capacidade das populações microbianas de utilizarem as moléculas xenobióticas como fonte alternativa de carbono, energia, nitrogênio e outros minerais orgânicos.



Os microrganismos e as plantas podem atuar na degradação dos pesticidas de forma independente ou interativa (BOYLE & SHANN, 1995). O uso de rizobactérias promotoras de crescimento de plantas (RPCPs) é bastante difundido devido à sua característica de promover o crescimento de plantas e de controlar fitopatógenos. Atualmente as RPCPs têm sido estudadas para a transformação de compostos xenobióticos e para a proteção de plantas sensíveis a essas moléculas (JACOBSEN, 1997).

A compreensão dos fenômenos envolvidos na interação do herbicida diuron com plantas não-alvo e com os microrganismos pode significar a adoção de estratégias mais eficazes no combate à contaminação ambiental. Pela importância de se entender estas interações é que este trabalho teve os seguintes objetivos:

1) Isolar e identificar linhagens bacterianas do solo e da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, cultivadas em locais com histórico de aplicação do herbicida diuron;

2) Avaliar e caracterizar a biotransformação e a mineralização do herbicida diuron;

3) Monitorar, no solo e na rizosfera, bactérias degradadoras geneticamente modificadas com o gene marcador (*gusA*), que codifica a enzima glucuronidase;

4) Avaliar a promoção de crescimento de plantas de milho (*Zea mays*) por rizobactérias e as possíveis relações entre estas com a proteção de plantas sensíveis ao herbicida diuron.



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1. CONSIDERAÇÕES SOBRE BIODEGRADAÇÃO**

Os microrganismos atuam na transformação de vários pesticidas, fenômeno este resultado da capacidade de utilizarem moléculas xenobióticas como uma nova fonte de carbono, energia, nitrogênio, fósforo ou enxofre. São capazes de degradar os compostos químicos através de processos de hidrólise, oxidação ou redução.

Para cada grupo de pesticidas, há um processo de seleção dos microrganismos, influenciado, por exemplo, pelo número de moléculas de cloro. Em alguns casos, enzimas que conduzem funções celulares normais são também capazes de catalisar a transformação de uma molécula tóxica devido, principalmente, à semelhança química. Esse tipo de metabolismo é, provavelmente, responsável pelas taxas normais de biotransformação

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Este trabalho tem como objetivo principal a revisão da literatura sobre a influência da nutrição na saúde humana. A nutrição adequada é essencial para o crescimento, o desenvolvimento e a manutenção da saúde. A falta de nutrientes essenciais pode levar a deficiências e doenças. Portanto, é importante entender os diferentes tipos de nutrientes e suas funções no corpo humano.

Os nutrientes são divididos em macronutrientes e micronutrientes. Os macronutrientes são aqueles que são necessários em grandes quantidades e incluem carboidratos, proteínas e lipídios. Os micronutrientes são necessários em pequenas quantidades e incluem vitaminas e minerais. Cada um desses nutrientes desempenha um papel crucial na saúde humana.

Além disso, a nutrição também influencia a saúde mental. Uma dieta equilibrada pode ajudar a melhorar o humor e a reduzir o risco de doenças mentais. Por outro lado, a má nutrição pode levar a problemas de saúde mental, como depressão e ansiedade. Portanto, é importante considerar a nutrição como um fator chave para a saúde geral.

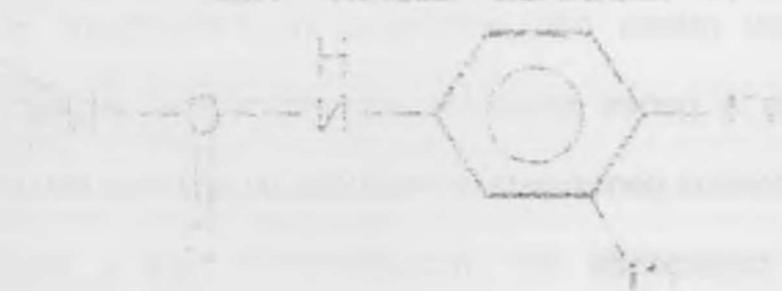
Em conclusão, a nutrição é um aspecto fundamental da saúde humana. Uma dieta equilibrada e saudável pode ajudar a prevenir doenças e promover o bem-estar. Portanto, é essencial educar a população sobre a importância da nutrição e incentivar hábitos alimentares saudáveis.

FAMÍLIA (2017) é o livro de referência para este trabalho.

observadas para a maioria dos pesticidas. A extensão da biodegradabilidade pode ser resultado de processos evolucionários para genes degradativos nos microrganismos (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992). Outro modelo pode envolver mutações que ocorram dentro da comunidade microbiana, tendo como consequência o surgimento de genes de degradação (KARNS, 1990). Geralmente, o substrato natural de uma enzima, na mesma via metabólica, age como um indutor da expressão gênica, causando mudanças em regiões regulatórias do DNA e aumentando a taxa de síntese de RNA mensageiro (RNAm) via transcrição. Esse aumento resulta em maior produção de uma determinada enzima. Desse modo, a mutação pode afetar a regulação de um gene de degradação em uma população de organismos gerando um potencial maior de transformação da molécula.

A via metabólica de compostos xenobióticos em bactérias pode ser codificada por genes localizados no DNA cromossômico ou plasmidial. Características como resistência a antibióticos e degradação de moléculas químicas, ou outras não envolvidas no metabolismo normal, podem estar relacionadas a genes presentes em plasmídeos. A descoberta de que DNA plasmidial conduz genes para a produção de enzimas catabólicas, pode ajudar a explicar a capacidade dos microrganismos para a adaptação enzimática e ambiental.

Um importante aspecto na manipulação genética das vias de degradação, apontado por FRANKLIN (1981), é o aumento da produção de enzimas que

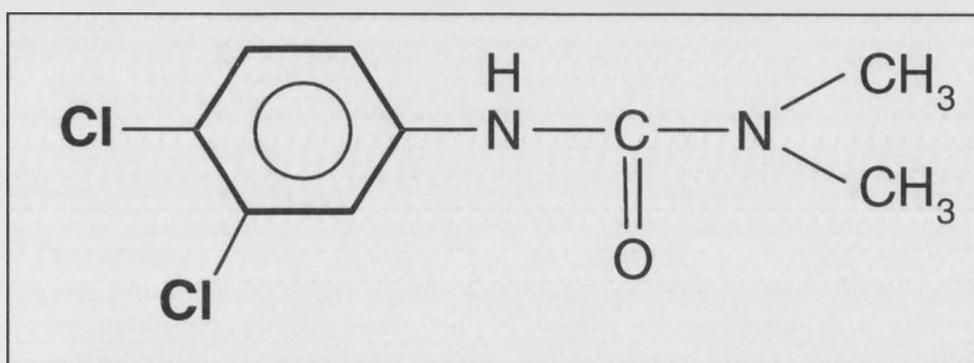


conduzem a transformações particulares. A clonagem de genes para enzimas individuais, torna-se de grande valia para a construção de novas vias catabólicas, e para recrutar enzimas de uma via a outra, a fim de expandir a especificidade de substratos.

## 2.2. DIURON

### 2.2.1. Caracterização do herbicida

O diuron, 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia (Figura 1), é um herbicida do grupo das feniluréias, indicado para o controle de plantas daninhas em pré e pós-emergência (TOMLIM, 1994). No Brasil, é indicado para as culturas de abacaxi, alfafa, algodão, alho, cebola, mandioca, bananeira, batata, cacau, café, chá, cana-de-açúcar, citrinos, videira, pimenta do reino e seringueira, como também para áreas não cultivadas, canais de irrigação e drenagem, ferrovias e rodovias (ALMEIDA, 1985).



**Figura 1.** Fórmula estrutural do diuron 3-(3,4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia.



Nas plantas suscetíveis, atua como inibidor da reação de Hill durante a fotossíntese, causando clorose seguida de necrose das folhas (ALMEIDA, 1985).

O principal fator responsável pela persistência e fitotoxicidade do diuron no solo é a adsorção. PAL *et al.* (1985) verificando o papel da adsorção no destino e comportamento do herbicida, observaram que as maiores taxas de adsorção encontravam-se relacionadas aos altos teores de argila e de matéria orgânica em solos com alta capacidade de troca catiônica. A adsorção do herbicida foi investigada em solo argiloso com 0,6 e 3,0 mg kg<sup>-1</sup> de diuron e umidade de 35 e 62%, por GAILLARDON (1996). Segundo o pesquisador, após o primeiro dia houve uma adsorção de 50% do produto e durante o restante do período de experimento (9 semanas) pouco foi desorvido.

A fotodegradação do diuron, utilizando água destilada e água do mar, foi observada por DURAND *et al.* (1990). A radiação luminosa ocasionou a perda de uma molécula de cloro do herbicida originando o monuron, composto comum na fotólise das feniluréias, sendo que os íons cloro presentes na água do mar influenciaram o processo.

Os herbicidas basagran, diquat e diuron foram avaliados quanto à degradação fotoquímica, em soluções com dióxido de titânio, utilizando radiação solar simulada e natural. As taxas de decomposição foram significativas na presença da radiação solar natural e do dióxido de titânio (KINKENNON *et al.*, 1995; KRÝSOVÁ *et al.*, 1998).



### 2.2.2. Impacto ambiental

A degradação ou lixiviação dos pesticidas depende das propriedades físico-químicas do ingrediente ativo; das condições ambientais, como temperatura e umidade; das propriedades do solo, como textura, matéria orgânica e da atividade microbiana.

Os herbicidas, devido à sua aplicação diretamente ao solo e às características de certas moléculas como persistência, solubilidade e toxicidade podem ser nocivos ao meio ambiente e ao homem. Muitas vezes a interação do composto com o meio pode gerar metabólitos mais tóxicos que o original (FIELD *et al.*, 1997).

O uso do herbicida diuron tem levado a contaminação de águas subterrâneas e superficiais (NEWMAN, 1995; FIELD *et al.*, 1997; NITSCHKE & SCHÜSSLER, 1998; HOUSE *et al.*, 1997). Através de um imunoenensaio enzimático monoclonal, KARU *et al.* (1994) encontraram diuron em águas subterrâneas a um limite de 0,07 ppb (parte por bilhão), enquanto BARREDA *et al.* (1996) em estudo sobre o desaparecimento do herbicida no solo, constataram quantidades desprezíveis, após 120 dias. Em solos não cultivados, o tempo para desaparecimento de 50% do composto (DT<sub>50</sub>) variou entre 29 e 102 dias, dependendo do tipo de solo (HASSINK *et al.*, 1994).

A contaminação ambiental tem levado pesquisadores a desenvolverem trabalhos sobre o efeito de herbicidas na fauna, flora e microbiota do solo. Entre



os organismos avaliados estão plantas, microrganismos, vertebrados e invertebrados aquáticos.

As doses de diuron capazes de causarem efeito crônico em invertebrados aquáticos (*Daphnia pulex*, *Hyalella azteca*, *Lumbriculus variegatus*, *Physa gyrina*), sob condições de laboratório, estão acima da concentração encontrada nas áreas de produção agrícola (NEBEKER & SCHUYTEMA, 1998). Os mesmos autores (SCHUYTEMA & NEBEKER, 1998) avaliaram o efeito do herbicida na sobrevivência, no crescimento e na malformação de diversas espécies de anfíbios (*Pseudacris regilla*, *Rana catesbeiana*, *Rana aurora* e *Xenopus laevis*). Verificaram uma similaridade entre as espécies, na sensibilidade ao herbicida e concluíram que ele é capaz de afetar a sobrevivência e o crescimento dos embriões, ainda que, em concentrações maiores do que as observadas em aplicações no campo.

O efeito do diuron sobre as enzimas do solo e no crescimento de fungos e bactérias foi relatado por NEMES-KÓSA & CSERHÁTI (1995). A atividade enzimática não foi afetada pelo herbicida, enquanto que o crescimento foi inibido em *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *Alternaria cucumerina*, *Mucor ramannianus* e *Trichoderma viride*. A concentração de 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  diuron foi letal para *Microcystis aeruginosa*, enquanto que 0,05  $\mu\text{g mL}^{-1}$  suprimiu a evolução de oxigênio fotossintético (SWAIN *et al.*, 1994).

O herbicida diuron, avaliado através do teste MUTATOX™ com *Vibrio fischeri*, foi enquadrado como potencialmente genotóxico (CANNA-MICHAELIDOU & NICOLAOU, 1996). Devido à forma de ação, bloqueio do transporte de elétrons



durante a fotossíntese, o diuron tem sido utilizado como parâmetro de comparação para avaliar a toxicidade de metais e efluentes, utilizando-se principalmente as algas fluorescentes *Selenastrum capricornutum*, *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum* como organismos testes (THOMPSON, 1997; SAMSON & POPOVIC, 1988; CLARKSON *et al.*, 1998). Quando o herbicida é adicionado à cultura de *Selenastrum capricornutum*, o transporte de elétrons do fotossistema II para o fotossistema I é bloqueado resultando em um máximo de fluorescência. A indução da fluorescência é próxima da luz total absorvida pelo fotossistema II, o que leva a comparação do efeito do diuron com o de outros contaminantes, portanto servindo como parâmetro de toxicidade.

### **2.2.3. Degradação microbiana**

A degradação do diuron através de fatores físico-químicos é baixa. No solo, a principal alternativa para o desaparecimento do herbicida é a transformação microbiana (ALMEIDA, 1985; DALTON *et al.* 1966; GEISSBÜHLER *et al.*, 1975; HERNANDEZ *et al.* 1984).

As características do solo influenciam a atividade microbiana e o comportamento do herbicida. A taxa de degradação é resultado da interação entre esses fatores bióticos e abióticos. McCORMICK & HILTBOLD (1966) descreveram que a atividade microbiana na decomposição da matéria orgânica do solo é importante para a degradação do herbicida.

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is arranged in several horizontal lines across the page.

Sob condições aeróbias, os microrganismos realizam a demetilação do grupo uréia e, posteriormente, a hidrólise, dando origem à anilina clorada (CULLINGTON & WALKER, 1999). O produto da degradação primária em aerobiose é a 3,4 - dicloroanilina (3,4-DCA) e o polímero 3', 3, 4', 4 - tetracloroazobenzeno (TCAB) (CRIPPS & ROBERTS, 1978; HERNÁNDEZ *et al.*, 1984). Em anaerobiose, a remoção da molécula de cloro, na posição *para* do anel aromático, converte o diuron a 3 - (3-clorofenil) - 1,1 - dimetiluréia (DCPU) (ATTAWAY *et al.*, 1982; STEPP *et al.*, 1985).

A degradação do herbicida, por *Streptomyces* sp. foi avaliada por SHELTON *et al.* (1996), que estudaram o metabolismo microbiano, de acordo com o tipo de fonte de nitrogênio em meio de cultura líquido. Após 7 dias de incubação, a taxa de degradação foi de 55% em meio de cultura com sulfato de amônia e de 19% com amino ácidos.

A degradação de 3 feniluréias (clorotoluron, isoproturon e diuron) por fungos do solo foi comparada e taxas diferenciadas de degradação foram encontradas para as diferentes espécies: *Alternaria alternata*, *Pestalotia palmarum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Ascochyta imperfecta* e *Cunninghamella echinulata*. *Rhizoctonia solani* degradou mais de 70% os 3 herbicidas e *Sporothrix cyanescens* foi capaz de degradar somente o diuron, em 55% do herbicida total (VROUMSIA *et al.*, 1996).

Após avaliarem a degradação do diuron em meio de cultura líquido cultivado com solo, HERNANDEZ *et al.* (1984) isolaram linhagens de *Pseudomonas* sp. e



*Arthrobacter* sp. e os fungos *Aspergillus niger* e *Neurospora crassa*. Recentemente, CULLINGTON & WALKER (1999) investigaram 5 linhagens que foram capazes de degradar o herbicida total presente em meio de cultura líquido, após um período de 3 dias. Em solos fumigados e incubados com as linhagens bacterianas, 50% do diuron total foi transformado após 2 dias de incubação, produzindo o metabólito 3,4 - dicloroanilina.

A importância da concentração na susceptibilidade da molécula de diuron quanto à degradação foi investigada por WANG *et al.* (1985). Os pesquisadores observaram que a mineralização somente ocorre em baixas concentrações (500 ng L<sup>-1</sup>). Sob condições anaeróbias, em amostras de sedimento, STEPP *et al.* (1985) observaram que 85% do diuron aplicado foi degradado, após 18 dias.

### **2.3. O GÊNERO *Acinetobacter***

As espécies que formam o gênero *Acinetobacter* são geralmente de importância clínica e ambiental. São consideradas patogênicas oportunistas e representam uma grande parte das bactérias Gram negativas, não fermentadoras, encontradas em microbiologia clínica (GENNARI & LOMBARDI, 1993). Para alguns autores somente a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* representa o gênero (JUNI, 1984; BOSCH & CLOETE, 1993), que apresenta características genéticas e fenotípicas heterogêneas (GENNARI & LOMBARDI, 1993; BOSCH & CLOETE, 1993).



A capacidade de degradar compostos biogênicos e xenobióticos, a tolerância e sobrevivência em diversos ambientes e a característica de receber DNA exógeno levando a ocorrência de transformação natural são evidências da plasticidade fenotípica encontrada nesse gênero (VRIES & WACKERNAGEL, 1998; LORENZ *et al.*, 1992).

Dentre os microrganismos com potencial de degradação de compostos aromáticos duas linhagens de *Acinetobacter* sp. (C2 e C3) foram avaliadas em solo enriquecido com pentaclorofenol, apresentando um aumento na taxa de crescimento após 3 meses de incubação (MARTINS *et al.*, 1997). *Acinetobacter* spp. foram encontradas em perfis profundos de solos contaminados com compostos aromáticos clorados e hexaclorociclohexanos (FEIDIEKER *et al.*, 1994).

PORTIER *et al.* (1996) utilizaram um protocolo, combinando processos físicos, químicos e microbiológicos, para a remoção de creosoto e pentaclorofenol de fibras de madeiras tratadas com preservantes. Um consórcio microbiano, formado por *Acinetobacter*, *Flavobacterium* e *Pseudomonas*, foi responsável pela etapa de remoção biológica, demonstrando a importância desses microrganismos para o sistema de tratamento. Outros exemplos da biotransformação de moléculas tóxicas e persistentes por *Acinetobacter* sp. têm sido relatados para compostos fenólicos (HOYLE *et al.*, 1995), cicloalcanonas (SANDEY & WILLETTS, 1992), *n*-alcanos (SAKAI *et al.*, 1994), guaiacol clorado (GONZÁLEZ *et al.*, 1993),

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

1994

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

... ..

tiocianatos (BOUCABEILLE *et al.*, 1994), hidrocarbonetos (BROWN & COOPER, 1992) e ligninas (VASUDEVAN & MAHADEVAN, 1991; LOPRETTI *et al.*, 1993).

ADRIAENS & FOCHT (1991) relataram que *Acinetobacter* sp. cometaboliza o 3,4-diclorobenzoato na presença de 4-clorobenzoato, enquanto COPLEY & CROOKS (1992) propuseram que esse gênero degrada esse composto através de uma rota alternativa.

A biotransformação de aleloquímicos, liberados pelas raízes de centeio (*Secale cereale* L.), para um composto com maior atividade no controle de plantas daninhas, foi realizada por *Acinetobacter calcoacetiicus*. A linhagem bacteriana transformou 2 (3H) benzoxazolinona (BOA) para 2,2' - oxo - 1,1' - azobenzeno (AZOB), composto mais tóxico e com maior efeito herbicida (CHASE *et al.*, 1991).

FEAKIN *et al.* (1995a) relataram que *Acinetobacter junii*, inoculada em carvão ativado, foi capaz de degradar os herbicidas atrazina e simazina. Os mesmos autores realizaram testes, em escala piloto, para descontaminação de águas superficiais com essas bactérias (FEAKIN *et al.*, 1995b).

A resistência a metais e antibióticos de linhagens de *Acinetobacter baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. junii* e de *Acinetobacter* genoespécie 3, isoladas de amostras ambientais, foi relatada por DHAKEPHALKAR & CHOPADE (1994). De dezessete antibióticos avaliados, *A. baumannii* apresentou uma resposta inconsistente, enquanto que *A. calcoaceticus* e *A. junii* apresentaram resistência a doze e sete antibióticos, respectivamente. Com relação aos metais, *A. junii* demonstrou ser resistente a dezoito íons de um total de vinte, *A. calcoaceticus* a



dezesseis e *A. baumannii* a seis. Para os autores, existe uma correlação entre os dois tipos de resistência, pois 88,2% das linhagens resistentes ao cádmio foram também resistentes aos antibióticos penicilina e ampicilina, estando, talvez, a produção de exopolissacarídeos relacionada à essa resistência.

VRIES & WACKERNAGEL (1998) desenvolveram um sistema de detecção para monitorar o gene *nptII* no DNA de plantas transgênicas e em amostras ambientais. O gene *nptII* que codifica para a enzima aminoglicosídeo fosfotransferase e confere resistência à kanamicina e neomicina foi utilizado como marcador na construção de plantas transgênicas. Através da captura de DNA e produção de células de *A. calcoaceticus* resistentes a kanamicina foi possível montar um sistema sensível, para a detecção de plantas engenheiradas, sem a necessidade da amplificação do DNA. A possível transferência de DNA não homólogo de plantas para *A. calcoaceticus* também foi investigada por NIELSEN *et al.* (1997c), embora sem sucesso.

A influência do ambiente (NIELSEN *et al.*, 1997a; 1997b) e a presença de xenobióticos alteram a resistência (LOFFHAGEN *et al.*, 1995) e a taxa de transformação natural de *Acinetobacter* sp., no solo e em meio de cultura. LORENZ *et al.* (1992) sugeriram que células de *A. calcoaceticus* podem ser competentes para receber DNA bacteriano livre de alto peso molecular, inclusive plasmídeos, de fontes naturais como solo, sedimento e águas subterrâneas.

O isolamento de *Acinetobacter* sp. em amostras ambientais pode ser realizado utilizando diversos substratos, tais como: solo, lodo, águas subterrâneas



e superficiais, resíduos domésticos, industriais, de laboratórios e de efluentes (DHAKEPHALKAR & CHOPADE, 1994). Tecidos vegetais, como caules e raízes, também foram utilizados para o isolamento de *Acinetobacter*. DOORN *et al.* (1995) constataram um alto nível de *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* sp. e *Alcaligenes* sp. na água utilizada para a imersão de flores de corte (*Dianthus caryophyllus* L.). Segundo os autores, as suspensões de células bacterianas podem afetar a longevidade das flores pela obstrução no fluxo de água na haste. O papel das bactérias endofíticas na formação e no controle do destacamento de tubérculos sadios de batata foi investigado por STURZ (1995), onde as bactérias dos gêneros *Acinetobacter*, *Actinomyces*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, capazes de colonizar a rizosfera e os tubérculos, foram importantes na promoção do crescimento e na proteção de plantas.

#### **2.4. MARCADORES MOLECULARES**

A utilização de técnicas de engenharia genética em microrganismos, com o objetivo de monitorá-los, tem sido de grande valia para a compreensão da ecologia microbiana.

O uso, em condições de campo, de microrganismos geneticamente modificados (MGMs), poderá trazer muitos benefícios para a indústria e agricultura num futuro próximo. Entretanto, ao se introduzir um MGM na natureza, torna-se premente se conhecer o comportamento do mesmo em relação à diferentes aspectos ecológicos, como sobrevivência, distribuição e transferência horizontal



de genes. Vários métodos são recomendados para monitoramento de MGMs em amostras do ambiente, desde meios seletivos a sondas de DNA e anticorpos fluorescentes (NAKAMURA, 1992). Obviamente, existem riscos ecológicos com a liberação de MGMs, pois atualmente sabe-se muito pouco sobre a dispersão e as interações com outras espécies. Existem três pontos básicos questionados sobre a sobrevivência, reprodução e dispersão de MGMs: se os microrganismos podem estabelecer uma população ampla e diferente da original; se os novos genes podem ser incorporados em outras espécies e afetarem seu comportamento ecológico; e se o material genético, ao se espalhar, pode afetar outras espécies (WILLIAMSON, 1992).

Uma das principais dificuldades no monitoramento de microrganismos introduzidos no solo é a inexistência de métodos eficientes para distingui-lo dos nativos. Muitos trabalhos envolvem alterações naturais, usando marcadores de resistência a antibióticos e fungicidas, principalmente pela facilidade com que são cultivados em meio de cultura contendo antibióticos, onde apenas microrganismos resistentes podem crescer (ATLAS & BARTHA, 1992). Porém, tais marcadores não são eficientes em solo natural, pois existem microrganismos nativos capazes de crescer e apresentar resistência a um grande número de antibióticos. Assim, técnicas de expressão genética e fenotípica têm sido desenvolvidas para permitir um melhor monitoramento.

Sistemas de detecção por bioluminescência, com utilização do microscópio e raio-x, podem ser utilizados para estudos de distribuição espacial dos



microrganismos introduzidos no solo ou na rizosfera (KOZDROJ, 1996). A detecção *in situ* de bactérias do solo também tem sido feita com a introdução de plasmídios com genes para luminescência (genes *lux*), originalmente clonado de *Vibrio fischeri*.

Marcadores moleculares que intencionalmente introduzem genes que conferem propriedades fenotípicas distintas, possibilitam rastrear os organismos após serem introduzidos no meio ambiente. A técnica proporciona vantagens significativas para os estudos de avaliações de risco em comparação aos métodos tradicionais. Mas é importante enfatizar que uma única técnica não pode proporcionar todas as informações necessárias para as avaliações de risco e o uso combinado de métodos moleculares torna-se fundamental. As aplicações de técnicas com marcadores, porém, têm grande potencial para aumentar a compreensão dessa ampla área de estudo que é a microbiologia ambiental (PROSSER, 1994)

Todos os sistemas marcadores visam determinar a viabilidade e concentração total de células. O mais importante avanço desses sistemas é a possibilidade de medir a atividade das células marcadas sem a necessidade de extração (PROSSER, 1994). Os marcadores mais empregados para detecção em meio ambiente são: genes de resistência a antibióticos, genes *gusA*, *lacZY*, *xylE*, *luxAB*, *tfdA* (PROSSER, 1994; SESSITSCH *et al.*, 1997; STREIT *et al.*, 1995; WILSON, 1995).



O gene marcador que codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS), apresenta alto grau de especificidade, sendo bastante utilizado para plantas e bactérias Gram negativas (SESSITSCH *et al.*, 1997). Diversos mini-transposons têm sido construídos para expressar o gene *gusA*, e conseqüentemente, para utilização em sistemas ecológicos como o monitoramento de *Rhizobium* (WILSON, 1995; SESSITSCH *et al.*, 1997) e em plantas (GALLAGHER, 1992). A detecção do gene ocorre através da incubação da planta ou bactéria marcada, em meio de cultura ou solução tampão com o substrato X-GlcA (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo) e um indutor IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosídeo). A enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS) é capaz de clivar o substrato, que dimeriza, produzindo 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-3,3'-bis-indigo, um precipitado azul, que é o fenótipo detectado (WILSON, 1995).

Avaliações de risco não podem recair somente nas técnicas de detecção da microbiologia tradicional e suas deficiências levaram a pesquisa de novas metodologias, em particular técnicas moleculares com a seletividade e sensibilidade necessária para rastrear o inóculo de MGMs e o DNA recombinante usado na sua construção. Tais técnicas recaem em três grupos básicos: métodos imunológicos, sondas de ácidos nucleicos e marcadores moleculares. Técnicas tradicionais de imunologia têm sido aprimoradas; tais como a produção de anticorpos poli e monoclonais; o desenvolvimento de enzimas imunosorventes (ELISA) e a aplicação potencial do fluxo citométrico. Técnicas com sondas envolvem detecção de seqüências específicas de DNA ou RNA que podem ser ao



acaso ou associadas a genes funcionais (SAYLER & LAYTON, 1990). Essas podem ser altamente específicas e permitirem o rastreamento do DNA, dependendo da estabilidade da seqüência específica de DNA do hospedeiro original. A sensibilidade tem sido grandemente aumentada pela amplificação de seqüências usando a técnica da reação em cadeia da polimerase (STEFFAN & ATLAS, 1991).

## **2.5. ECOLOGIA MICROBIANA DE AMBIENTES CONTAMINADOS**

Os microrganismos sobrevivem no ambiente devido à habilidade metabólica para explorarem suas reservas e ocuparem um nicho apropriado. Os contaminantes, freqüentemente, são fontes de energia em potencial. Se a microbiota residente for capaz de explorá-los pode ocorrer um novo equilíbrio entre as populações (DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992).

O termo rizosfera refere-se ao ambiente influenciado pelas raízes das plantas e com uma elevada atividade bacteriana. Rizoremediação é a degradação de poluentes recalcitrantes pela população bacteriana da rizosfera (YEE *et al.*, 1998). O efeito da rizosfera é importante para uma potencial redução dos resíduos dos pesticidas, devido a presença de populações microbianas, que cometabolizam ou catabolizam os xenobióticos como fonte de C e de energia.

O sistema radicular provê substrato para o crescimento das populações microbianas, através dos exsudatos (amino ácidos, carboidratos, ácidos orgânicos e co-fatores) e pela extensa superfície, permitindo aos microrganismos



atingirem regiões do solo onde não alcançariam sem o seu suporte (CATTELAN *et al.*, 1998; DENTON *et al.*, 1999; DI CELLO *et al.*, 1997; ENGELEN *et al.*, 1998; HUERTAS *et al.*, 1998; KA *et al.*, 1994; LUPWAYI *et al.*, 1998). A extensão linear e a área da superfície do sistema radicular são também importantes na degradação de compostos químicos. Plantas anuais, como o milho e o sorgo, apresentam um enraizamento que pode atingir até 2 metros de profundidade, dependendo das condições do solo, enquanto que outras espécies podem atingir uma profundidade de até 10 metros (SHIMP, 1993).

Nos ambientes contaminados, a recalcitrância é resultado das características do composto químico, da microbiota e da interação desses com o ambiente. Quando um composto xenobiótico, com histórico de biotransformação apresenta-se recalcitrante em um determinado ambiente; pode-se afirmar que microrganismos capazes de produzir as enzimas de degradação não estão presente ou que as condições ambientais não são favoráveis ao seu crescimento. Nessas duas situações tanto a estimulação da população nativa ou a introdução de um inóculo microbiano podem promover a transformação do composto.

O aumento no número de células de uma linhagem específica, na presença de um composto introduzido, pode representar uma vantagem seletiva em relação à população natural (JACOBSEN, 1997). LI & ALEXANDER (1990) conseguiram o estabelecimento de uma população de *Pseudomonas fluorescens* carregando os genes de resistência a estreptomicina, em solos tratados com esse antibiótico.



A adição do herbicida 2,4-D ao solo aumentou a colonização de raízes de plantas de cevada (*Hordeum vulgare*) pela bactéria *Burkholderia cepacia* degradadora do herbicida (JACOBSEN, 1997). CHATTERJEE *et al.* (1982) descreveram a importância da presença do ácido 2,4,5 - triclorofenoxiacético (2,4,5 - T) no aumento da população de uma bactéria degradadora, *Burkholderia cepacia*. Um maior número de células foi concomitante à maior atividade de degradação do 2,4,5 - T, e o desaparecimento do composto resultou em diminuição da população.

A mineralização de compostos xenobióticos por microrganismos introduzidos, pode ser realizada por um número mínimo inicial de células. Entretanto, nessas condições, uma vantagem seletiva é improvável de ocorrer, principalmente no solo, onde somente um inóculo inicial alto responderia pelo sucesso da aplicação (van VEEN *et al.*, 1997). O composto químico presente no solo pode, também, selecionar e auxiliar no estabelecimento de uma população suprimindo uma possível competição e ação antagonista da microbiota nativa.

A introdução de microrganismos no solo, principalmente bactérias e fungos, é uma prática comum e está relacionada ao fornecimento de nutrientes para as culturas agrícolas (FREIRE, 1992), estímulo ao crescimento (LIPPMANN *et al.*, 1995), mudança na estrutura do solo e controle ou inibição de fitopatógenos (FREITAS, 1994; LIU *et al.* 1995; van VEEN *et al.*, 1997).



As plantas capazes de sobreviver na presença de altas concentrações de misturas de pesticidas podem contribuir na degradação, como resultado da intensa atividade microbiana na rizosfera. Os microrganismos do solo e da rizosfera podem acelerar a degradação de compostos xenobióticos, a bioacumulação ou a imobilização de compostos inorgânicos (DEVLIEGHER *et al.*, 1995). Mais recentemente, microrganismos introduzidos em solos contaminados, promoveram a transformação ou mineralização de poluentes ou, ainda, a bioacumulação de compostos inorgânicos (AJITHKUMAR *et al.*, 1998; JACOBSEN, 1997; PFENDER, 1996; YEE *et al.*, 1998).

Os fatores bióticos e abióticos influenciam a sobrevivência e a atividade do inoculante em um ambiente específico. Segundo van VEEN *et al.* (1997), os principais fatores envolvidos na sobrevivência de rizobactérias no solo são a competição e a predação, que podem produzir uma diminuição no tamanho da população ou um efeito antagonista nos fitopatógenos e, o crescimento das raízes, que pode prover compostos orgânicos estimulantes. Os fatores abióticos também influenciam a sobrevivência dos microrganismos, devido à proteção contra os predadores (ex.: conteúdo de argila), seleção de espécies (ex.: carbono orgânico, pH e compostos químicos tóxicos) e diminuição da atividade metabólica (ex.: temperatura, tensão de água). As características metabólicas do organismo introduzido, entretanto, também determinam o seu destino e atividade no solo (van VEEN *et al.*, 1997).



A colonização de raízes por bactérias geneticamente modificadas, capazes de degradar poluentes, pode ser uma vantagem em relação às bactérias nativas que não colonizam raízes (YEE *et al.*, 1998). CATTELAN *et al.* (1998) observaram que a dinâmica de um gênero específico de bactérias pode variar em leguminosas, dependendo do tipo de solo, da presença de outros grupos bacterianos na rizosfera e da capacidade da planta de nodular. KA *et al.* (1994) afirmaram que a adaptação ao ambiente e a capacidade de utilizar outros substratos são fatores importantes para a competição entre linhagens e também determinantes na habilidade em colonizar o solo e a rizosfera.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi realizado nos laboratórios de Microbiologia, Química Orgânica e Análise de Resíduos do Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental, Embrapa Meio Ambiente, localizado no município de Jaguariúna, e no laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura, CENA-USP, em Piracicaba, Estado de São Paulo.

#### **3.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON**

##### **3.1.1. Locais de coleta de solo**

As amostras de solo utilizadas para isolamento de microrganismos foram coletadas em regiões produtoras de cana-de-açúcar do Estado de São Paulo, envolvendo os municípios de Mogi-Mirim, Itacemápolis, Holambra, Limeira e Conchal. Para a obtenção de diferentes comunidades microbianas, as coletas



das amostras de solos foram realizadas à partir da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar e das entre-linhas (Tabela 1), à 20 cm de profundidade, com sub-amostras (Apêndice 1).

**Tabela 1.** Relação dos locais de coleta de amostras de solo e tipo da amostra: solo rizosférico e solo não rizosférico (entre-linhas) de plantas de cana-de-açúcar.

<b>Amostras</b>	<b>Local</b>	<b>Tipo</b>
1	Mogi-Mirim	solo rizosférico
2	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	entre-linhas
3	Holambra	entre-linhas
4	Holambra	solo rizosférico
5	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	solo rizosférico
6	Iracemápolis (Perímetro Urbano)	solo rizosférico
7	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	entre-linhas
8	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	entre-linhas
9	Iracemápolis (Perímetro Urbano)	entre-linhas
10	Rodovia Iracemápolis - Limeira	entre-linhas
11	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	solo rizosférico
12	Rodovia Iracemápolis - Limeira	solo rizosférico
13	Conchal	solo rizosférico
14	Rodovia Limeira - Mogi Mirim	entre-linhas
15	Rodovia Limeira - Mogi Mirim	solo rizosférico
16	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	solo rizosférico
17	Rodovia Piracicaba-Limeira (Iracemápolis)	entre-linhas
18	Rodovia Limeira - Eng. Coelho	solo rizosférico
19	Mogi Mirim	entre-linhas
20	Conchal	entre-linhas
21	Rodovia Limeira - Eng. Coelho	entre-linhas

As linhagens foram denominadas DXX-Y, o D significa o herbicida diuron, XX a localidade e o tipo de solo amostrado e Y o número da amostra no solo, conforme descrito na Tabela 1.



### **3.1.2. Metodologia de isolamento e preservação das linhagens bacterianas**

As amostras de solo individualizadas foram secas ao ar, peneiradas em malha de 2 mm e homogeneizadas. Em seguida, sub-amostras de 10 g de peso seco foram depositadas em frascos de Erlenmeyer contendo 90mL de água deionizada esterilizada, mantidas sob agitação por 15 minutos. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para a realização da diluição em série e alíquotas de 100  $\mu$ L das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-3}$ , e  $10^{-5}$  semeadas em placas de Petri, contendo meio mínimo suplementado com 200  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> de diuron como fator seletivo e TTC (cloreto de trifeniltetrazólio 2,5 mg L<sup>-1</sup>).

Nas amostras denominadas como solo da rizosfera, raízes de cana-de-açúcar com solo foram coletadas e retiradas sub-amostras de 10 g. Essas foram transferidas para frascos de Erlenmeyer, contendo 90mL de H<sub>2</sub>O deionizada esterilizada. Após 15 minutos de permanência sob agitação em agitador orbital à 80 rpm e 5 minutos no banho-maria com ultra-som a 28°C, foram realizados os procedimentos descritos anteriormente para o solo não rizosférico.

As linhagens bacterianas obtidas foram preservadas em meio de conservação (Apêndice 2) depositados em congelador, a -20°C, no Laboratório de Microbiologia da Embrapa Meio Ambiente.



## 3.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS BACTERIANAS

### 3.2.1. Seleção inicial

As linhagens bacterianas foram testadas quanto à capacidade de crescimento em Meio Mineral J.E. sólido, (JONES & EDINGTON, 1968), descrito no apêndice 2, suplementado com diferentes concentrações de diuron, dependendo da linhagem.

Para as avaliações preliminares, as linhagens D1-8, D2-5, D11-9 e D16-10 foram testadas na dosagem de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  do herbicida diuron. As culturas foram incubadas à  $28^\circ\text{C}$ , por 7 dias. As demais linhagens, foram avaliadas em meio de cultura suplementado com  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , após 4 dias de incubação à  $28^\circ\text{C}$ . As linhagens bacterianas que apresentaram os melhores resultados nesse teste (D1-8, D1-9, D2-5, D5-5, D5-6, D11-9, D12-12, D12-14, D12-16, D12-17, D12-18, D12-20, D13-7, D13-13, D16-2, D16-3 e D16-12) foram submetidas à avaliação em meio de cultura mineral sólido M9 (Apêndice 2) suplementado com diuron nas concentrações de  $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a leitura do crescimento bacteriano ocorreu após 7 dias de incubação à  $28^\circ\text{C}$ .

### 3.2.2. Testes preliminares de transformação do diuron.

Com o objetivo de avaliar o crescimento das linhagens bacterianas em meio suplementado com diuron e a influência do tipo de solvente, acetona ou água, utilizado para dissolver o herbicida, foram realizados testes com as linhagens D2-5 e D16-10, conforme os tratamentos descritos a seguir:



- 1- Diuron
- 2- DCA
- 3- Meio Mineral J.E. + diuron (dissolvido em água)
- 4- Meio Mineral J.E. + diuron (dissolvido em acetona)
- 5- Meio Mineral J.E. + diuron (dissolvido em acetona) + linhagem D16-10
- 6- Meio Mineral J.E. + diuron (dissolvido em água) + linhagem D16-10
- 7- Meio Mineral J.E. + diuron (dissolvido em água) + linhagem D2-5

Em outro experimento as linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12, inoculadas em meio J.E. suplementado com diuron nas concentrações de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  foram avaliadas quanto a presença de metabólitos, principalmente, 3,4-dicloroanilina (DCA), utilizada como padrão de transformação do diuron.

Os frascos dos dois experimentos foram incubados por 48 horas em agitador orbital (180 rpm,  $28^{\circ}\text{C}$ ), e avaliados através de cromatografia de camada delgada (CCD). Para isso, extratos concentrados do meio de cultura com as linhagens bacterianas foram aplicados em placas sílica-gel /  $\text{UV}_{254}$  (Whatman) na quantidade máxima de  $10 \mu\text{L}$ , tendo sido aplicado também o padrão analítico de 3,4-DCA como referência.

O eluente usado para o desenvolvimento das placas foi diclorometano/metanol (95:5). As manchas foram identificadas sob luz ultravioleta e o cálculo realizado, segundo a seguinte equação:

$$R_f = \frac{\text{distância percorrida pela substância teste}}{\text{distância do eluente}}$$



### 3.2.3. Crescimento bacteriano

As linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12 foram utilizadas para avaliação do crescimento, em meio de cultura mineral líquido suplementado com diuron e em meio LB. Frascos de Erlenmeyer de 250 mL, contendo 100 mL de meio mineral J.E. acrescido de diuron ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e inoculado com as linhagens foram incubados sob agitação orbital (180 rpm,  $28^\circ\text{C}$ ) por 6 dias. Nos intervalos com 48, 110 e 134 horas após a inoculação da bactéria, foi avaliado o crescimento bacteriano, pela leitura da absorbância (560 nm) em espectrofotômetro Beckman DU-8B. Nas mesmas condições o meio de cultura LB foi utilizado com as linhagens D11-9, D12-12 e D16-12.

A linhagem D12-12 foi avaliada quanto ao crescimento nos intervalos de 0, 6, 24, 48, 120, 168 e 216 horas, em diferentes meios de cultura. O objetivo foi verificar se o herbicida diuron estava sendo utilizado como fonte de carbono ou de nitrogênio, bem como o papel desses compostos no metabolismo microbiano. A avaliação foi desenvolvida conforme descrito anteriormente e os tratamentos foram:

1. Meio mineral J.E. suplementado com diuron ( $20, 50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).
2. Meio mineral J.E. (sem  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) suplementado com diuron como fonte de nitrogênio ( $0, 20, 50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e acrescido de glicose (0,5%)
3. Meio mineral J.E. suplementado com diuron ( $0, 20, 50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e acrescido de glicose (0,5%)



### 3.2.4. Análise de DNA plasmidial

As linhagens bacterianas, mantidas em meio mineral M9 (Apêndice 2) suplementado com diuron ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foram testadas quanto a presença de DNA plasmidial. Para a realização do teste, as linhagens D1-9, D12-14, D12-20, D13-13, D12-16, D13-7, D12-17, D2-5, D1-8, D12-12, D5-5, D12-18, D16-2, D11-9, D16-12 foram repicadas para meio L.B. líquido e incubadas por 24 horas. Após esse período procedeu-se a lise das células (ANDERSON & McKAY, 1983). Para isto, transferiu-se 1,5 mL da cultura para um tubo Eppendorf, centrifugando-se a amostra em microcentrífuga por 2 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido em 379  $\mu\text{L}$  de solução 6,7% de sacarose em Tris (50mM)-EDTA (1mM) pH 8,0, incubando-se os tubos em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Após este período, adicionou-se 96,9  $\mu\text{L}$  de lisozima ( $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) em Tris (25mM), pH 8,0 e incubou-se as amostras por 5 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ . Adicionou-se 48,2  $\mu\text{L}$  de tampão Tris (10mM)-EDTA (250mM) pH 8,0 e 27,6  $\mu\text{L}$  de SDS 20% em Tris (50mM)-EDTA (20mM) pH 8,0 seguido de agitação manual imediata. As amostras foram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 5 a 10 minutos adicionando-se, então, 27,6  $\mu\text{L}$  de NaOH (3,0N) com agitação gentil das amostras por 10 minutos. A elas foram adicionados 49,6  $\mu\text{L}$  de tampão (Tris HCl 2M, pH 7,0), seguido de nova agitação por mais 3 minutos. Após a adição de 71,7  $\mu\text{L}$  de NaCl (5,0M) e 700  $\mu\text{L}$  de fenol equilibrado com Tris (pH 7,5), ambas as amostras foram misturadas por inversão dos tubos e centrifugadas por 10 minutos. A extração com o fenol foi repetida até que o sobrenadante ficasse transparente. Em seguida, transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e a ele adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de clorofórmio:álcool isoamílico



(24:1 v/v) gelado. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos, transferindo-se o sobrenadante para tubos novos onde adicionou-se 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado. Após incubação a  $0^{\circ}\text{C}$  por no mínimo 30 minutos, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos, descartando-se o sobrenadante em seguida e deixando os tubos abertos, em temperatura ambiente, para permitir a evaporação do álcool e secagem do DNA precipitado. O "pellet" foi ressuscitado em 20  $\mu\text{L}$  de tampão TE, adicionando-se a este 2  $\mu\text{L}$  de azul de bromofenol, para aplicação no gel de agarose (0,6%) e eletroforese. As amostras foram corridas em tampão TBE (Tris, ácido bórico, EDTA em pH 8,0) com uma voltagem constante de 100 Volts por 2-3 horas. A coloração foi realizada com brometo de etídio ( $50\mu\text{g mL}^{-1}$  de água). A visualização de DNA plasmidial foi realizada com o auxílio de um transluminador.

As linhagens de *P. aeruginosa* (PAO) e *E. coli* ( $\alpha$  DH5) utilizadas como controle negativo e *P. putida* (C<sub>1</sub>C) como controle positivo foram obtidas na coleção de culturas do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos.

### **3.2.5. Identificação das linhagens**

#### **3.2.5.1. Testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos**

Foram realizados testes para a identificação e caracterização das linhagens bacterianas D12-12, D12-18, D16-12, segundo metodologias descritas no "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology" (KRIEG e HOLT, 1984). Os parâmetros avaliados foram cor, superfície, forma, arranjo,



motilidade, teste catalase, teste oxidase, teste O/F, requerimento de oxigênio e crescimento em 3,4-dicloroanilina. As linhagens D12-12, D12-18 e D16-12 foram identificadas, através de Kit do sistema API 20 NE e de Taxonomia clássica convencional, pela Fundação Tropical de Pesquisas e Tecnologia “André Tosello”, Campinas, S.P..

### **3.3. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO DIURON**

Com o objetivo de avaliar a biodegradação do diuron, linhagens bacterianas previamente selecionadas foram utilizadas para experimentos de extração e quantificação do herbicida e análise de crescimento em 3,4-dicloroanilina.

#### **3.3.1. Extração e detecção de metabólitos**

Foram desenvolvidos protocolos de extração do diuron do meio de cultura contendo as linhagens bacterianas. O objetivo desta etapa foi uma quantificação segura da taxa de degradação, por isto foram testadas as metodologias de extração líquido-líquido e fase sólida (SPE)

##### **3.3.1.1. Extração líquido-líquido**

Avaliou-se nesse experimento a presença da 3,4-dicloroanilina, metabólito primário da degradação do diuron, pelo método colorimétrico descrito por WALKER (1987), e, após extração líquido-líquido, por cromatografia de camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).



As linhagens D11-9, D12-12, D12-18, D16-12 e um consórcio dessas mesmas linhagens foram inoculados em meio mineral J.E. suplementado com  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diuron, tendo como controle o mesmo meio sem o inóculo bacteriano e água deionizada adicionada de diuron ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Todos os tratamentos foram realizados em frascos Erlenmeyer com um volume de 100 mL de meio de cultura e delineados ao acaso com 6 repetições. Após 10 dias de incubação a temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$  em agitador orbital a 120 rpm as amostras foram submetidas as avaliações, para isto foi retirada uma alíquota de 2 mL de cada frasco para o teste colorimétrico (item 3.3.1.1.1.) e o restante utilizado para a extração líquido-líquido, descrita a seguir:

Acidificação da amostra com HCl 1M



Extração em funil de separação com acetato de etila (3 X)



Concentração em  $\text{N}_2$



**3.3.1.1.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)**

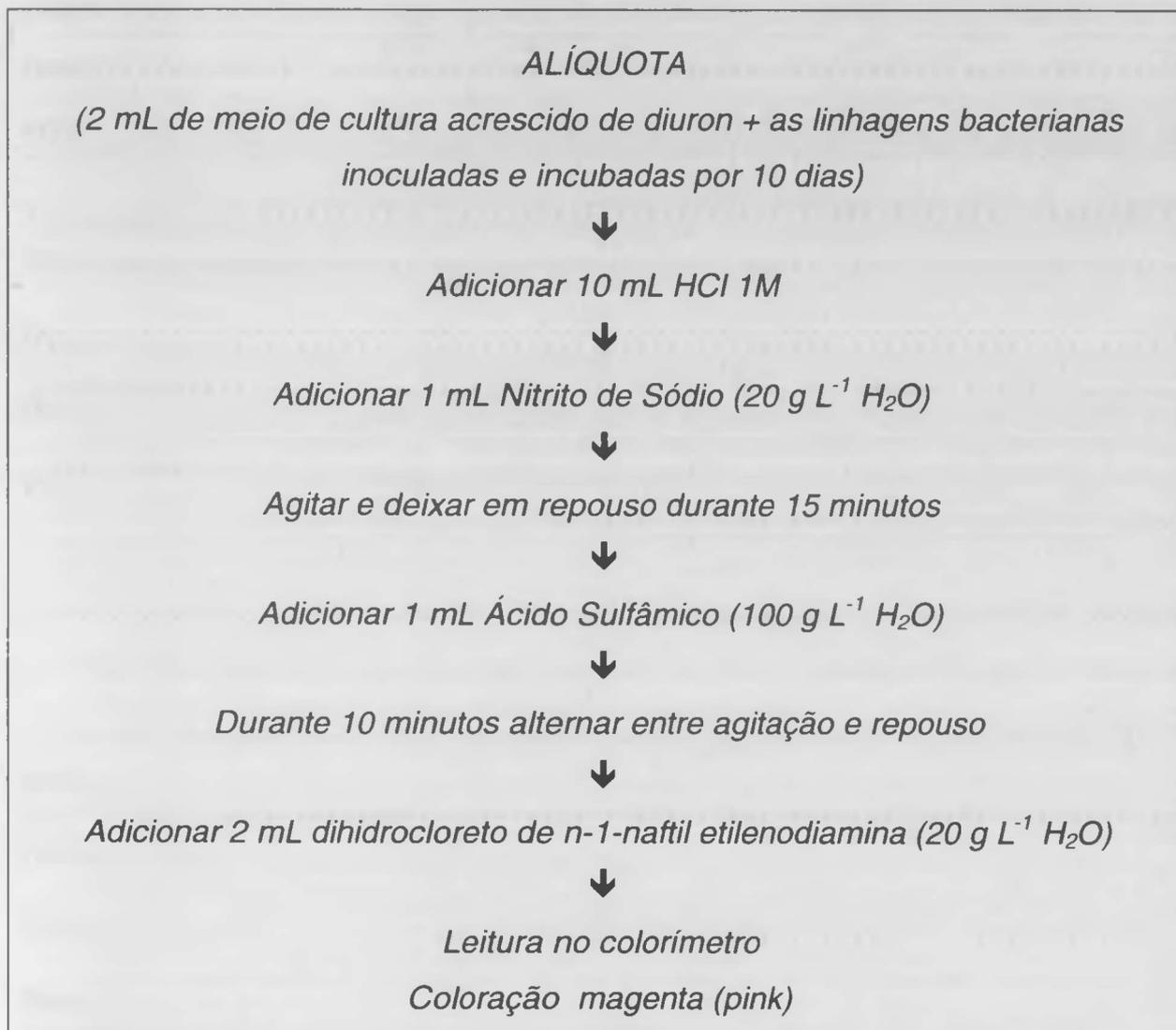
**3.3.1.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

#### **3.3.1.1.1. Teste colorimétrico**

Para verificar a presença de 3,4-dicloroanilina (DCA) no meio de cultura, realizou-se o teste colorimétrico descrito por WALKER (1987). As alíquotas de 2 mL foram retiradas das amostras descritas no item anterior. Como padrão foram utilizadas soluções de DCA nas concentrações de 2 e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O método baseou-se em uma extração ácida da 3,4-dicloroanilina e posterior



ligação com o di-hidrocloreto de n-1-naftil etilenodiamina, produzindo uma suspensão colorida, reconhecida pela cor magenta.



**FIGURA 2.** Método colorimétrico utilizado para a detecção de 3,4-dicloroanilina.

A tonalidade magenta na solução final indicou a presença de 3,4-dicloroanilina, sendo que uma maior intensidade na coloração significou uma alta concentração do metabólito na amostra.

THE UNIVERSITY OF CHICAGO

PHYSICS DEPARTMENT

PHYSICS 350

LECTURE 1

1.1

1.2

1.3

1.4

1.5

1.6

### **3.3.1.1.2. Cromatografia de camada delgada (CCD)**

Para a realização dos ensaios de cromatografia, após a retirada da alíquota para o teste conforme descrito no item 3.3.1.1.1., o meio de cultura restante,  $\pm$  98 mL, foi utilizado para extração líquido-líquido, descrito anteriormente.

As amostras concentradas e o padrão analítico de DCA foram aplicados em placas de sílica gel/UV<sub>254</sub> (Whatman) na quantidade de 10  $\mu$ L. O eluente de desenvolvimento utilizado foi diclorometano/metanol (95:5, v/v). Após o desenvolvimento das amostras nas placas, os pontos foram identificados em transluminador de ultra violeta e calculado os R<sub>f</sub>s (item 3.2.2.).

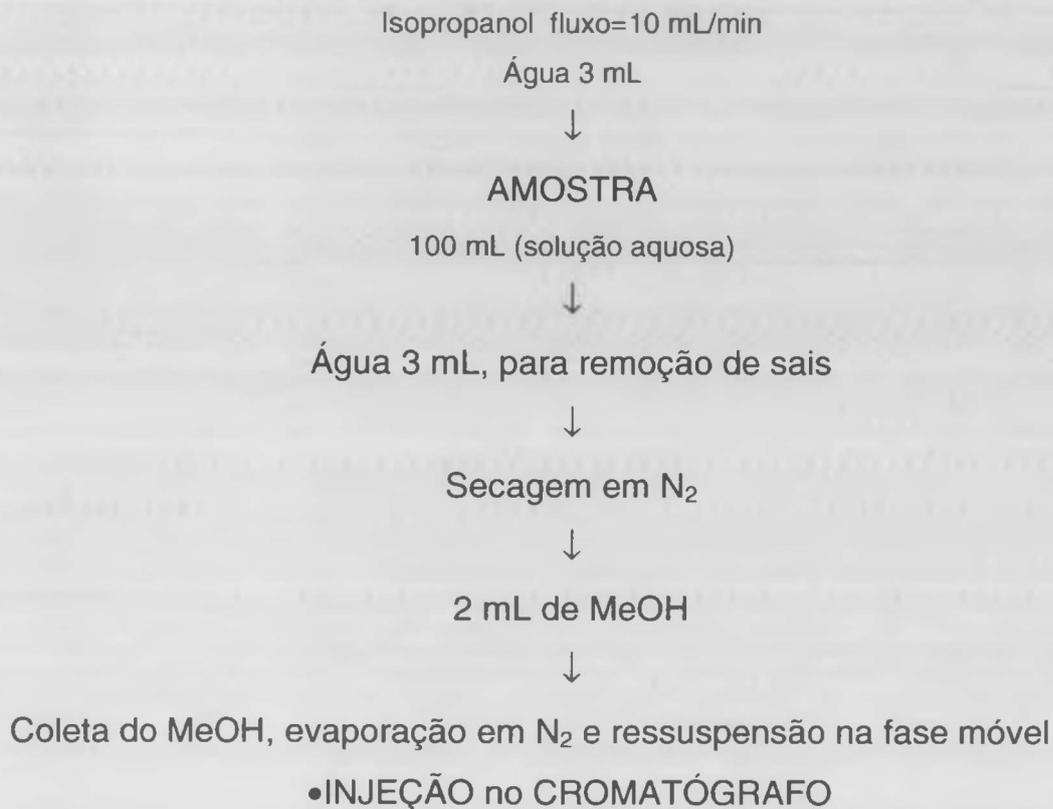
### **3.3.1.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)**

Utilizando o procedimento de extração descrito anteriormente, as amostras concentradas em N<sub>2</sub> foram diluídas na fase móvel (metanol : água (63:37, v/v)) para injeção no cromatógrafo modelo SHIMADZU, equipado com coluna C<sub>18</sub>, detetor ultravioleta operando a 251 nm e fluxo de 1,5 mL/minuto. Nestas condições, o herbicida diuron apresentou um tempo de retenção de aproximadamente 10 minutos.

### **3.3.1.2. Extração fase sólida (SPE)**

Em substituição ao procedimento de extração líquido-líquido (item 3.3.1.1.), nesses experimentos utilizou-se os cartuchos C-18 SEP-PAK®, Millipore, VAC-3cc, adaptados de KARU *et al.* (1994), conforme descrito a seguir:



**CONDICIONAMENTO DOS CARTUCHOS C-18 SEP-PAK®:**

A primeira etapa desse teste foi a validação do método de extração (SPE) e, posteriormente, a quantificação da degradação do diuron e seus metabólitos em CLAE. Os tratamentos foram delineados em duplicata, com as seguintes denominações:

- DIU1= água milliquer
- DIU2= água milliquer + diuron ( $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ )
- DIU3= água milliquer + diuron ( $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ )
- DIU4= água milliquer + diuron ( $6,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ )
- DIU5= Meio mineral J.E. + diuron ( $3,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

Para a construção da curva de calibração, utilizou-se o padrão técnico do diuron nas concentrações ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de 0.8, 1.6, 3.2, 4.8 e 6.4.



No segundo experimento, para avaliar a taxa de recuperação e de degradação do diuron pelas linhagens bacterianas, utilizou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado, em duplicatas, tendo como tratamento as linhagens D12-12, D12-18 e D16-12, que foram inoculadas em meio de cultura J.E. acrescido de diuron ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os tratamentos testemunha e branco, foram o meio de cultura mineral J.E. e a água, respectivamente, adicionados com o herbicida nas concentrações descritas acima. Os frascos foram incubados por 32 dias, a  $30^{\circ}\text{C}$  em agitador orbital (120 rpm). Posteriormente as amostras foram utilizadas para a extração fase sólida descrita acima e para injeção no cromatógrafo, de acordo com as condições demonstradas no item 3.3.1.1.3.. Para a obtenção do valores de recuperação e degradação do diuron, os dados foram analisados estatisticamente.

### **3.3.2. Análise de crescimento em 3,4-dicloroanilina (DCA).**

As linhagens D12-12, D12-18 e D16-12, foram repicadas para meio mineral J.E. suplementado com diuron ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e incubadas por 48 horas a  $30^{\circ}\text{C}$ . Em seguida, foi produzido uma suspensão em solução salina para repicagem de  $100 \mu\text{L}$  para placas de Petri contendo o meio J.E. acrescido de 3,4-dicloroanilina ( $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) com 5 repetições. O material foi incubado a  $30^{\circ}\text{C}$  por um período de 48 horas e avaliadas quando ao crescimento.



### 3.4. AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO HERBICIDA $^{14}\text{C}$ -DIURON

A biodegradabilidade do herbicida diuron foi testada, através da avaliação da taxa de  $^{14}\text{CO}_2$  despreendido e acumulado após 32 dias de incubação.

Esse experimento foi desenvolvido no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Cena / USP. Foram utilizados 50 mL de meio de cultura mineral J.E. por frasco, inoculado com as linhagens puras de D12-12, D12-18, D16-12 e com uma mistura das três, denominado consórcio, o controle constou do mesmo meio de cultura mas não inoculado com as bactérias. O delineamento foi inteiramente casualizado com 4 repetições e as condições de incubação foram a 28°C em agitador orbital a 120 rpm. O diuron radiomarcado foi aplicado com uma atividade de 39,3215 KBq/50 mL, e a concentração do produto técnico foi de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os frascos Erlenmeyers de 300 mL foram adaptados com uma coluna de vidro (130-25 mm), contendo cal sodada, como armadilha para absorver o  $^{14}\text{CO}_2$  liberado.

As trocas das armadilhas ocorreram no 4º, 8º, 16º e 32º dia, quando procedeu-se a extração do  $^{14}\text{CO}_2$  em um sistema fechado. A cal sodada foi dissolvida em ácido clorídrico (20-50 mL), sendo que o  $^{14}\text{CO}_2$  liberado foi arrastado por um fluxo de ar comprimido para 2 armadilhas subsequentes com solução metanol-monoetanolamina (70:30 v/v). Em seguida, alíquotas de 1 mL, em duplicata, de cada armadilha e de cada tratamento foram transferidas para frascos de cintilação contendo 10 mL de solução cintiladora. A avaliação da radioatividade foi realizada em espectrômetro de cintilação líquida da marca Beckman.



Na última avaliação realizou-se uma cromatografia de camada delgada para verificar a presença de metabólitos do composto radiomarcado. A qual foi desenvolvida em placa de vidro com sílica gel F<sub>254</sub> (Merck), utilizando um sistema automático para a aplicação de amostras. Uma alíquota de 100 µL foi depositada por ponto da placa, em intervalos de 1,5 cm de largura. O solvente de desenvolvimento utilizado foi diclorometano/metanol (95:05, v/v) com duração de 30 minutos para a primeira placa, e clorofórmio/acetona/metanol (110:55:35, v/v/v) para a segunda placa. A leitura foi realizada em transiluminador ultra violeta com comprimento de onda longo e curto e os pontos marcados para o cálculo dos R<sub>f</sub>s (item 3.2.2.).

Posteriormente, uma das placas foi prensada em um filme de raio X e colocada no escuro por 30 dias para posterior revelação e conseqüente visualização de possíveis metabólitos com menor atividade radioativa.

Para a obtenção da porcentagem de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> despreendido e acumulado, os dados médios obtidos no espectrômetro de cintilação líquida, em desintegrações por minuto, foram utilizados para o seguinte cálculo:

$$Y = DPM \cdot F - e$$

onde:

Y = total de <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> despreendido na amostra

DPM = média da desintegração por minuto no tempo (T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>16</sub>, T<sub>32</sub>)

F = 0,333 (fator de correção da amostra)

e = erro padrão da média

E, para cada linhagem:



$$Y_4 = T_4 \cdot F - e$$

$$Y_8 = T_4 + T_8 \cdot F - e$$

$$Y_{16} = T_4 + T_8 + T_{16} \cdot F - e$$

$$Y_{32} = T_4 + T_8 + T_{16} + T_{32} \cdot F - e$$

A porcentagem de  $^{14}\text{CO}_2$  acumulado, será então:

$$\% \text{ } ^{14}\text{CO}_2 \text{ acumulado} = \frac{Y_x}{393,215}$$

onde:

$$Y_x = Y_4, Y_8, Y_{16}, Y_{32}$$

393,215 = valor total aplicado em K bq, convertido para porcentagem.

### 3.5. MONITORAMENTO DE *Acinetobacter baumannii* GUS<sup>+</sup> NO SOLO E NA RIZOSFERA

#### 3.5.1. Obtenção de transconjugantes de *A. baumannii*

O mini transposon pm Tn5SS GUS A10 foi inserido nas linhagens D12-12, D12-18 e D16-12, por conjugação utilizando o protocolo descrito no Apêndice 3. O Tn5SS GUS A10 codifica a enzima  $\beta$ -glucuronidase (GUS), que, na presença do indutor IPTG (isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo e do substrato cromogênico X-glucA (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-glucuronídeo), produz colônias com um precipitado azul.

Tendo sido utilizado a linhagem de *Escherichia coli* S17-1/ $\lambda$ -pir como doadora no processo. O meio BD, suplementado com IPTG, na concentração



de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ , X-glc ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), espectinomicina ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e sacarose foi utilizado para a detecção do fenótipo azul e do gene GUS nos transconjugantes.

### 3.5.2. Monitoramento de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> no solo e na rizosfera de plantas de milho

Nesse experimento o solo utilizado foi coletado de um perfil de 30 centímetros de profundidade, sem serrapilheira na mata pertencente ao Centro Experimental da Embrapa Meio Ambiente. As amostras foram peneiradas (malha 2 mm), e secas ao ar e enviados para a caracterização físico-química (Tabela 2).

A linhagem D16-12 GUS<sup>+</sup> foi utilizada nos experimentos de monitoramento no solo e na rizosfera. O meio seletivo para avaliação do fenótipo foi suplementado com o herbicida diuron ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), substituindo a sacarose (item 3.5.1.).

**Tabela 2** - Características físico-químicas do solo utilizado para experimentação com o  $^{14}\text{C}$ -diuron.

areia	silte	argila	pH	M.O.	P	Ca	Al	CTC
(%)	(%)	(%)	CaCl <sub>2</sub>	g dm <sup>-3</sup>	(mgdm <sup>-3</sup> )	mmolc dm <sup>-3</sup>		
47	9	44	3,7	32	7	3	88	97,1

O experimento para avaliação da colonização das raízes e da persistência da linhagem no solo foi desenvolvido em vasos de 300 mL, semeados com a cultivar BR 201 de milho com 3 tratamentos e 6 repetições:

de 40 µg ml<sup>-1</sup> X-Glc (100 µg ml<sup>-1</sup> espiromicina) (100 µg ml<sup>-1</sup>) e secrose  
 foi utilizado para a detecção de lactose azul e do gene GUS nos

3.5.2. Monitoramento de A. tumefaciens GUS<sup>+</sup> no solo e na rizosfera de

plantas de milho  
 Neste experimento o solo utilizado foi coletado de um perfil de 30  
 centímetros de profundidade, sem enriquecimento em nada pertencente ao cultivo  
 Experimental de Eucalyptus Meio Ambiente. As amostras foram pesadas  
 (100 g) e secas em 60 °C em vidros para a caracterização físico-química

(Tabela 2).  
 A linhagem D10-15 GUS<sup>+</sup> foi utilizada nos experimentos de  
 monitoramento no solo e na rizosfera. O meio seletivo para avaliação de

Tabela 2 - Características físico-químicas do solo utilizado para  
 experimentação com A. tumefaciens

Matéria orgânica (%)	pH	N	P	K	Ca	Mg	Al	CTC
1,5	5,2	0,05	0,02	0,1	0,5	0,2	0,8	15,1

O experimento para avaliação da colonização das raízes e da  
 rizosfera de milho no solo foi desenvolvido em vasos de 300 ml,  
 contendo com a cultura BR 207 de milho com 3 tratamentos e 6 repetições.

1. controle (solo e semente não inoculados);
2. solo não inoculado + semente inoculada com *A. baumannii* Gus<sup>+</sup>;
3. solo Inoculado com *A. baumannii* Gus<sup>+</sup>.

Para a inoculação das sementes via imersão na suspensão de bactérias, utilizou-se 0,1% de goma arábica para favorecer a adesão das células. Primeiramente, realizou-se um pré-cultivo em meio LB, suplementado de espectinomicina por 48 horas. Em seguida, o material foi centrifugado a 10.000 rpm/20°C/10min, o sobrenadante foi descartado e ressuspendido em tampão fosfato salino com proteínas (Apêndice 2). A concentração da suspensão bacteriana foi ajustada para  $1 \times 10^7$  u.f.c. e a inoculação das sementes realizada sob agitação (180 rpm) por 3 horas a 28°C.

No tratamento 3, o solo foi inoculado com a suspensão acima descrita, sendo que a contagem de unidades formadoras de colônias por grama de solo (u.f.c./g solo) foi realizada por diluição seriada nos seguintes períodos: 1º, 7º e 16º dia da montagem.

Os tratamentos 1 e 2 foram avaliados de acordo com a massa da matéria seca da parte aérea e raízes das plantas e a concentração da linhagem no solo e raízes, no 7º e 16º dia.

### **3.5.3. Recuperação de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> do solo**

Após a retirada das plantas (item 3.6.1.), o solo permaneceu em repouso por 7 dias, quando foi novamente semeado com o milho, cultivar BR 201 sem nenhum tratamento, com o objetivo de verificar a recuperação e a persistência da linhagem GUS<sup>+</sup> no solo. Após 14 dias do plantio, as plantas foram retiradas



e utilizadas para reisolamento das linhagens GUS<sup>+</sup> do rizoplano e da rizosfera, em meio seletivo mineral (item 3.5.2.), conforme descrito abaixo:

- i.* PARA REISOLAMENTO DA LINHAGEM D16-12 GUS<sup>+</sup> DAS RAÍZES, ESSAS FORAM LAVADAS, PARA RETIRADA DO SOLO, COLOCADAS EM TUBOS COM 9 ML DE SOLUÇÃO SALINA ESTERILIZADA E, EM SEGUIDA, COLOCADAS EM ULTRASOM, POR 30 SEGUNDOS. APÓS ESTA ETAPA, AS RAÍZES FORAM LAVADAS 5 VEZES EM SOLUÇÃO SALINA, E EM SEGUIDA SEGMENTOS DE RAÍZES FORAM CULTIVADOS EM MEIO DE CULTURA SELETIVO. A ÁGUA DA PRIMEIRA LAVAGEM FOI DILUÍDA EM SÉRIE, COM PLAQUEAMENTO DAS DILUIÇÕES  $10^{-3}$  E  $10^{-4}$ .
  
- ii.* PARA REISOLAMENTO DA MESMA BACTÉRIA DA RIZOSFERA, AS RAÍZES COM AGREGADOS DE SOLO ADERIDOS AS MESMAS FORAM COLOCADAS EM TUBOS COM 9 ML DE SOLUÇÃO SALINA, AGITADAS EM VORTEX, E TRANSFERIDAS PARA UM NOVO TUBO DE SOLUÇÃO SALINA, ONDE FORAM LAVADAS 5 VEZES E COLOCADAS EM ULTRASOM. PROCEDEU-SE ENTÃO AO PLAQUEAMENTO DE CADA SOLUÇÃO DE LAVAGEM EM MEIO SELETIVO. A SOLUÇÃO DE SOLO DO PRIMEIRO TUBO, APÓS AGITAÇÃO EM VORTEX, FOI UTILIZADA PARA DILUIÇÃO SERIADA E PLAQUEAMENTO DAS DILUIÇÕES  $10^{-4}$  E  $10^{-5}$ .

1. Para o acabamento das bordas, o operador deve utilizar o acabamentoador de bordas (Fig. 1) e aplicar o produto em todas as bordas do tubo.

2. Para o acabamento das bordas, o operador deve utilizar o acabamentoador de bordas (Fig. 1) e aplicar o produto em todas as bordas do tubo. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

3. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

4. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

5. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

6. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

7. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

8. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

9. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

10. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas. O acabamentoador de bordas deve ser aplicado em todas as bordas do tubo, inclusive nas bordas das soldas.

### **3.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> NA PROTEÇÃO DE PLANTAS**

#### **3.6.1. Efeito de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> (D16-12) na promoção do crescimento de plantas**

A capacidade de promoção de crescimento de plantas de milho, pela linhagem D16-12 de *A. baumannii* Gus<sup>+</sup>, foi avaliada em solo esterilizado (autoclavado 3 vezes), colocado em bandejas com capacidade de 10 litros, onde foram semeadas 30 sementes, com dois tratamentos: inoculado via semente (item 3.5.2.) e não inoculado. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 5 repetições. As plantas foram retiradas das bandejas após 16 dias, lavadas e secas em estufa (60°C) para a pesagem em balança eletrônica. A massa da matéria seca da parte aérea e das raízes foi então analisado estatisticamente.

#### **3.6.2. Bioensaio com plantas de milho sensíveis ao diuron**

Esse experimento foi realizado com o objetivo de verificar a dosagem do herbicida diuron, responsável pela redução de crescimento de plantas de milhos. O solo utilizado foi coletado na mata (item 3.5.2.) sem histórico de utilização de herbicidas.

As amostras de solo foram secas ao ar e peneiradas (malha 2 mm), calculado a capacidade de campo, e, posteriormente, colocados 250 g em vasos plásticos com capacidade total de 300 mL.

Os tratamentos foram os seguintes: controle (ausência de herbicida) e diuron nas concentrações de 2, 4 e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com 4 plantas por vaso e com

## 2.8. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> NA PROTEÇÃO DE

### PLANTAS

#### 2.8.1. Efeito de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> (D16-12) na promoção do

##### desenvolvimento de plantas

A capacidade de promoção de crescimento de plantas de milho pela cepagem D16-12 de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> foi avaliada em uma estufa (autoclavado a vapor, temperatura: 121°C, pressão: 15 psi, duração: 15 min) onde foram colocadas 30 sementes com dois tratamentos: inoculado via semente (Item 2.3.2.) e não inoculado. O delineamento utilizado foi inteiramente casualizado com 2 repetições. As sementes foram colocadas das 16h às 18h dias, resultando em 100 plantas por tratamento. Em 15 dias após a emergência, a massa de matéria seca da parte aérea e das raízes foi então analisado estatisticamente.

#### 2.8.2. Biorresistência com plantas de milho sensíveis ao dióxido

Este experimento foi realizado com o objetivo de verificar a dosagem de herbicida diuron responsável pela redução do crescimento de plantas de milho. O solo utilizado foi colado na mata (Item 2.3.2.) sem histórico de utilização de herbicidas.

As amostras de solo foram secas ao ar e peneiradas (malha 2 mm), calculado a capacidade de campo e posteriormente colocados 250 g em vasos plásticos com capacidade total de 300 ml.

Os tratamentos foram os seguintes: controle (ausência de herbicida) e diuron nas concentrações de 2, 4 e 10 µg ml<sup>-1</sup>, com 4 plantas por vaso e com

3 repetições. Na instalação do experimento foram preparadas soluções estoque do herbicida (200 e 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), utilizadas na dosagem de cada tratamento, para se obter uma concentração final de 55% de umidade da capacidade de campo. Para o tratamento controle utilizou-se água. Em seguida, as sementes de milho foram semeadas e os vasos colocados em incubadoras do tipo B.O.D., com temperatura de  $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  e fotoperíodo de 14 horas. A umidade do solo foi controlada diariamente pelo peso total de cada vaso medido por ocasião da instalação do bioensaio. Após 16 dias, as plantas foram coletadas, avaliadas quanto à fitotoxicidade, lavadas e secas em estufa para então, serem avaliadas quanto a massa da matéria seca das raízes e parte aérea.

### **3.6.3. Colonização de raízes e atividade microbiana**

Para avaliar a interação entre a linhagem D16-12 de *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> e plantas de milho (cultivar BR 201) em solo de mata na presença do herbicida, delineou-se um ensaio em blocos ao acaso, com 8 repetições e 1 planta por vaso. Os tratamentos foram os seguintes:

1. controle (sementes de milho plantadas em solo natural);
2. sementes não inoculadas plantadas em solo com diuron ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ );
3. sementes inoculadas com *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>, plantadas em solo natural;
4. sementes inoculadas com *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>, plantadas em solo com diuron ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



A inoculação foi realizada via imersão das sementes em suspensão bacteriana (item 3.5.2.) na concentração de  $1 \times 10^7$  u.f.c./mL. A avaliação realizada no 16º dia após o plantio, constou dos seguintes parâmetros: diversidade de microrganismos no solo rizosfera; massa da matéria seca da parte aérea; massa da matéria seca das raízes; atividade microbiana total no solo (rizosfera e adjacente).

Para a avaliação da diversidade de microrganismos, seguiu-se as seguintes etapas:

- i.* retirada das raízes do vaso e remoção do solo (adjacente), através de agitação manual;
- ii.* retirada do solo restante (rizosférico) aderido às raízes, após agitação manual, com o auxílio de um pincel;
- iii.* pesagem de 1 g do solo, item 1 e 2, e realização da diluição seriada até  $10^{-6}$ ;
- iv.* plaqueamento de alíquotas de 100  $\mu$ L em meios seletivos (Apêndice 2) para fungos das diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  e para bactérias, leveduras e *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> das diluições  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$ .

Para a obtenção da massa da matéria seca (MMS) da parte aérea e das raízes, as partes das plantas foram secas em estufa a 60 °C até obtenção de massa constante e realizada a pesagem em balança eletrônica.

A atividade microbiana total no solo, segundo ALEF & KLEINER (1989), consistiu no monitoramento da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) a dimetilsulfeto (DMS), em que a resposta é expressa em  $\text{ng.g}^{-1}\text{solo seco.h}^{-1}$ . Por



ser o DMS insolúvel em água, dilui-se na fase gasosa ("headspace"), podendo, desta forma, ser analisado quantitativamente.

Para essa avaliação, pesou-se 1,0 g de solo de cada uma das amostras em um frasco com tampa rosqueável e septo de silicone. Adicionou-se 0,2 mL de DMSO e os frascos foram incubados a 30°C por 3 horas. Após esse período, 100 µl da amostra do "headspace" do frasco foi analisado por cromatografia gasosa em cromatógrafo Hewlett Packard com detetor de ionização de chama e coluna empacotada Hayesep (2 metros).

Realizou-se um segundo experimento, com os mesmos objetivos e metodologias descritas anteriormente, diferindo-se nas dosagens do herbicida diuron, o qual foi utilizada 1 e 2 µg mL<sup>-1</sup> e nas avaliações de contagem de microrganismos, que foi realizada somente para *Bacillus*, fungos e *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> e de solo, que foi avaliado somente o rizosférico.

O delineamento foi em blocos ao acaso, com 4 repetições e 1 planta por vaso. A inoculação da semente foi calibrada para uma concentração de 1 x 10<sup>7</sup> u.f.c./mL e as avaliações realizadas no 16<sup>o</sup> dia após o plantio.



## **4. RESULTADOS**

### **4.1. ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL PARA A DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON**

A contagem de células bacterianas viáveis é apresentada na Tabela 3. Observou-se que os solos da rizosfera de cana-de-açúcar, apresentaram maior número de bactérias, do que solos não rizosféricos. As linhagens D1-8, D1-9, D2-5, D2-7, D5-5, D5-6, D11-9, D12-7, D12-12, D12-14, D12-16, D12-17, D12-18, D12-20, D13-3, D13-6, D13-7, D13-11, D13-12, D13-13, D15-7, D15-10, D16-2, D16-3, D16-10 e D16-12, isoladas e purificadas, foram avaliadas quanto ao seu potencial em utilizar o diuron como fonte de carbono e energia.



**Tabela 3 .** Resultado do isolamento direto de bactérias resistentes ao diuron, em u.f.c./g de solo, de amostras de solo coletadas em diversas localidades do Estado de São Paulo.

Local/tipo*	CONTAGEM**	Local/tipo*	CONTAGEM**	Local/tipo*	CONTAGEM**
1/RZ	$1,9 \times 10^7$	8/EL	$2 \times 10^4$	15/RZ	$3,2 \times 10^5$
2/EL	$1,2 \times 10^6$	9/EL	$1,1 \times 10^5$	16/RZ	$3,2 \times 10^7$
3/EL	$3,6 \times 10^5$	10/EL	$3,3 \times 10^5$	17/EL	$3 \times 10^5$
4/RZ	$1,3 \times 10^7$	11/RZ	$1,9 \times 10^7$	18/RZ	$0,07 \times 10^4$
5/RZ	$4,7 \times 10^5$	12/RZ	$7 \times 10^7$	19/EL	$2,2 \times 10^2$
6/RZ	$1,1 \times 10^6$	13/RZ	$4,2 \times 10^7$	20/EL	$3 \times 10^7$
7/EL	$8 \times 10^4$	14/EL	$1,2 \times 10^5$	21/EL	$5 \times 10^6$

\* RZ= solo rizosférico; EL= solo das entre-linhas.

\*\*média de 3 repetições.

## 4.2. CINÉTICA DE CRESCIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS LINHAGENS

### BACTERIANAS

#### 4.2.1. Seleção inicial

A avaliação inicial, realizada com quatro linhagens em meio mineral sólido J.E. suplementado com diuron  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , apresentou somente uma linhagem com crescimento satisfatório (D11-9), enquanto que as linhagens D2-5 e D16-10 apresentaram um crescimento razoável. A linhagem D1-8 não cresceu.

Outras dezoito linhagens foram testadas no mesmo meio de cultura, acrescido, porém, de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  de diuron. Um ótimo crescimento das linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12 foi observado. As linhagens D1-9, D2-5, D5-6, D13-6, D15-7, D15-10, D16-2 e D16-10 apresentaram um crescimento inferior quando comparado com as linhagens mencionadas acima. As linhagens D2-7, D12-7, D13-3, D13-11 e D13-12 não cresceram.

Os resultados obtidos na avaliação de crescimento utilizando outro meio de cultura, o M9 (Apêndice 2) e diversas dosagens de diuron estão na Tabela 4. O aumento da concentração do herbicida influenciou negativamente o



crescimento das linhagens D1-8, D1-9, D12-20 e D16-2. Para outras linhagens ocorreu um crescimento atípico, como foi o caso da linhagem D5-6, que cresceu em meio de cultura suplementado com 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do diuron, mas não em 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e para D12-18, D13-7 e D16-12 que cresceram somente nas concentrações de 5 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do herbicida. As linhagens D12-12 e D12-14 apresentaram ótimo crescimento.

**TABELA 4.** Avaliação do crescimento das linhagens bacterianas em meio mineral M9 acrescido de diuron, após 7 dias de incubação.

Linhagem	DIURON ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )		
	5	10	20
D1-8	++	++	-+
D1-9	++	++	-+
D2-5	-+	-+	-+
D5-5	-	-	-
D5-6	-+	++	++
D11-9	-+	-+	-+
D12-12	++	++	++
D12-14	++	++	++
D12-16	-+	-+	-+
D12-17	-+	-+	-+
D12-18	-+	-	-+
D12-20	-+	-+	-
D13-7	++	-	++
D13-13	-+	-+	-+
D16-2	-+	-	-
D16-3	-	-	-
D16-12	-+	-	-+

- nenhum crescimento, -- pouco crescimento, -+ crescimento razoável, + crescimento satisfatório, ++ ótimo crescimento

#### 4.2.2. Testes preliminares de transformação do diuron.

Na Tabela 5 estão os resultados da cromatografia de camada delgada (CCD) do diuron, diluído em água e em acetona. O herbicida foi detectado nos solventes (água e acetona) e no meio de cultura sem a bactéria, demonstrando



a não ocorrência de transformação química. Quando o meio foi inoculado com as linhagens D2-5 e D16-10, observou-se que, após 48 horas de crescimento em meio mineral, acrescido de diuron diluído em água, surgiu um novo metabólito ( $R_f = 0,17$ ), enquanto que, no tratamento com a acetona como solvente, não houve transformação do herbicida.

**Tabela 5.** Valores de Rfs encontrados para o diuron, diluído em água ou acetona, 3,4-dicloroanilina (DCA) e para os meios de cultura inoculados com as linhagens D2-5 e D16-10, após 48 horas de incubação.

<b>Tratamentos</b>	<b>Valores</b>
1- Diuron	<b>0,09</b>
2- DCA	<b>0,57</b>
3- Meio Mineral J.E. + diuron (diluído em água)	<b>0,09</b>
4- Meio Mineral J.E. + diuron (diluído em acetona)	<b>0,09</b>
5- Meio Mineral J.E. + diuron (diluído em acetona) + linhagem D16-10	<b>0,09</b>
6- Meio Mineral J.E. + diuron (diluído em água) + linhagem D16-10	<b>0,17</b>
7- Meio Mineral J.E. + diuron (diluído em água) + linhagem D2-5	<b>0,17</b>

As linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12 foram testadas quanto à capacidade de transformar o herbicida diuron. Para isto avaliou-se através de cromatografia de camada delgada (CCD) a ocorrência de metabólitos (Tabela 6). Todas as linhagens apresentaram valores de Rfs similares (0,12; 0,13 e 0,14), diferindo provavelmente pelas condições do desenvolvimento da cromatografia. Como não foi aplicado o herbicida diuron, não foi possível avaliar qual o composto presente nas amostras, no entanto confirmou-se que o metabólito 3,4-dicloroanilina não foi produzido.



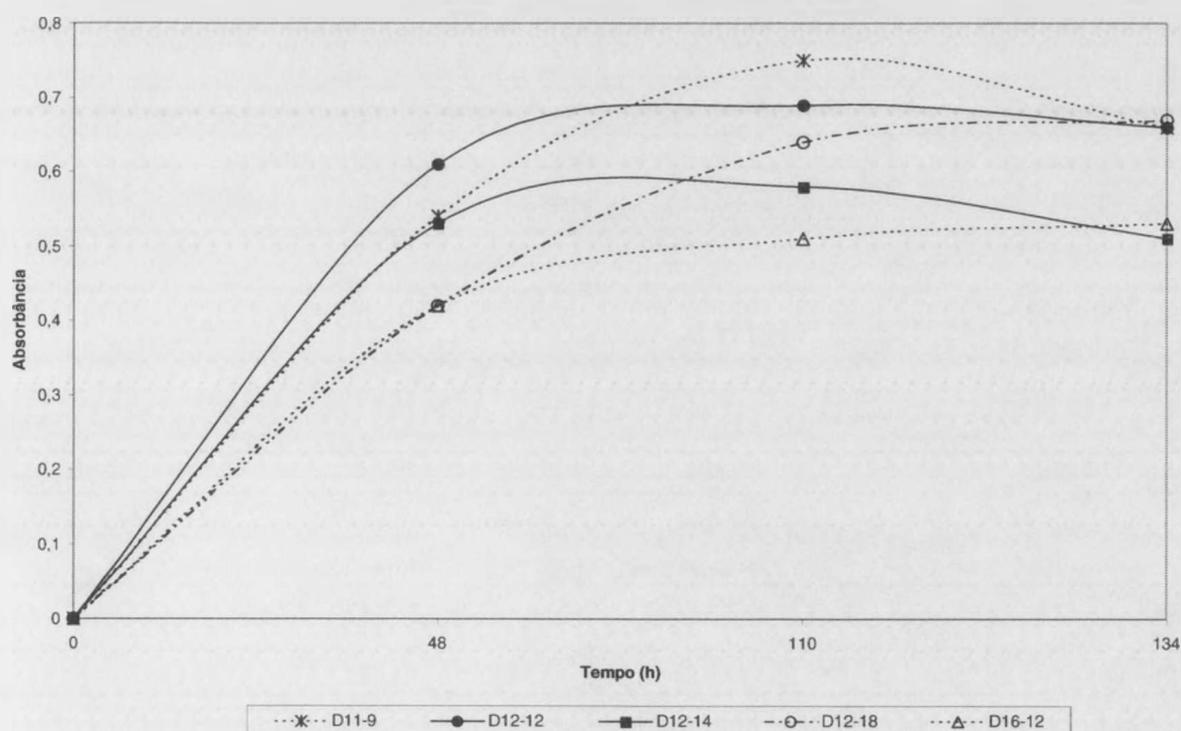
**Tabela 6.** Valores de Rfs para o meio de cultura suplementado com diuron diluído em água e inoculado com as linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12 após 48 horas de incubação e para a 3,4-dicloroanilina.

Linhagem	DIURON	
	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	50 $\mu\text{g mL}^{-1}$
DCA	0,42	0,42
D11-9	0,13	0,14
D12-12	0,13	0,14
D12-14	0,13	0,12
D12-18	0,12	0,12
D16-12	0,13	0,12

### 4.2.3. Crescimento bacteriano

#### 4.2.3.1. Linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12

Na avaliação de crescimento, apresentada na Figuras 3, observou-se um comportamento similar de crescimento entre as linhagens.

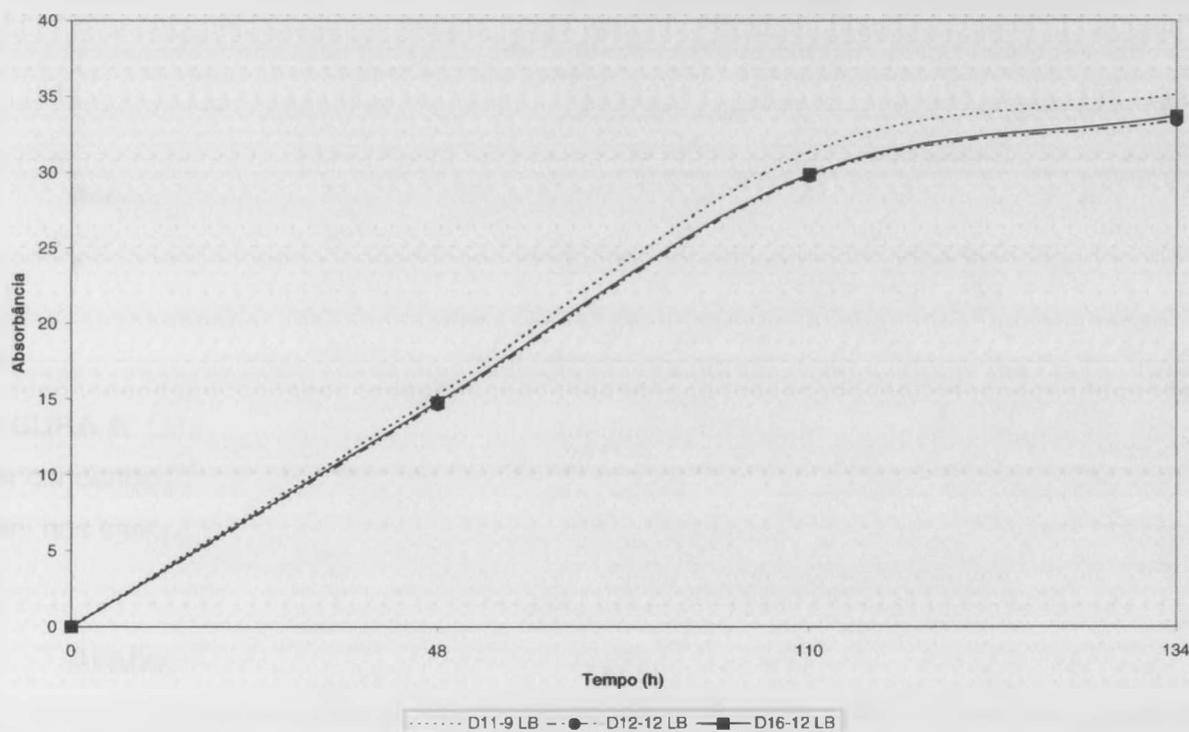


**Figura 3.** Crescimento das linhagens D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12 em meio mineral J.E. acrescido de 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diuron, avaliado através da leitura da absorbância (560 nm) nos intervalos de 48, 110 e 134 horas de crescimento.



Uma maior produção de biomassa foi encontrada nas linhagens D11-9 e D12-18 e uma menor em D12-14 e D16-12. A linhagem D12-12 apresentou valores médios quanto a produção de biomassa.

No meio de cultura LB, as três linhagens testadas D11-9, D12-12 e D16-12 apresentaram um comportamento similar no crescimento e na produção de biomassa (Figura 4).



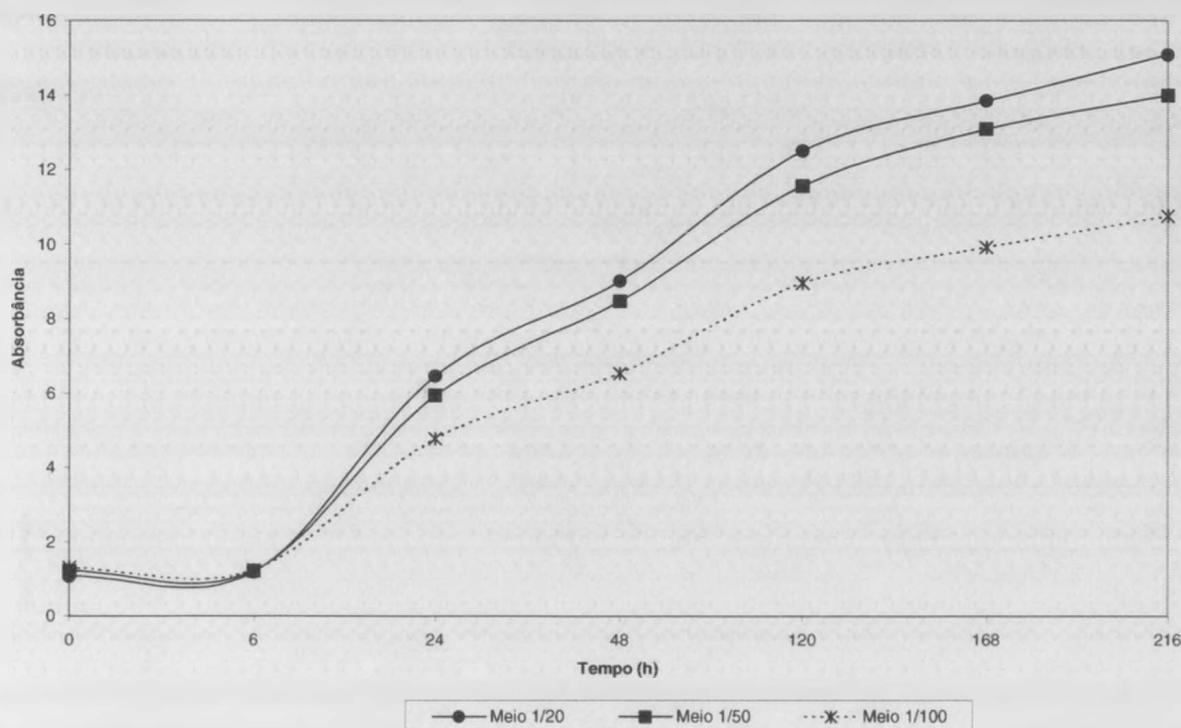
**Figura 4.** Crescimento das linhagens D11-9, D12-12 e D16-12 em meio de cultura LB, avaliado através da leitura da absorbância (560 nm) nos intervalos de 48, 110 e 134 horas de crescimento.

#### 4.2.3.2. Linhagem D12-12

A Figura 5 mostra a produção de biomassa da linhagem D12-12 em meio mineral acrescido unicamente do diuron (20, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), demonstrando a diminuição da biomassa com o aumento da concentração do herbicida no



meio de cultura. Apesar dessa diferença na massa celular, a curva de crescimento foi similar nas três concentrações do herbicida.

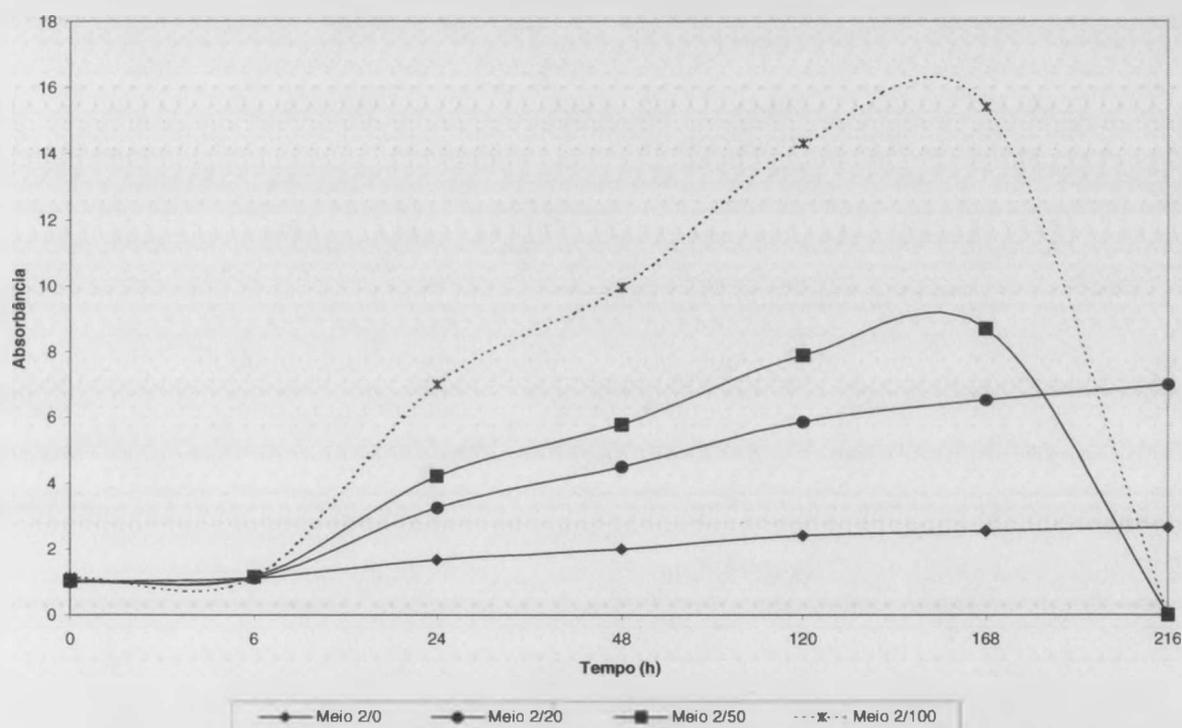


**FIGURA 5.** Crescimento da linhagem D12-12 em meio mineral J.E. suplementado com diuron na concentração de 20, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , avaliado através da leitura da absorbância (560 nm) nos intervalos de 0, 6, 24, 48, 120, 169 e 216 horas de crescimento.

Avaliou-se (Figura 6) a linhagem em meio de cultura mineral, sem uma fonte de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ), mas suplementado com diuron (0, 20, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e com uma fonte alternativa de carbono (glicose 0,5%). Os resultados, quando comparados com a Figura 5, foram inversos, ou seja, na presença da glicose a linhagem apresentou um maior crescimento em biomassa com o aumento da concentração do herbicida, no intervalo de 6 a 120 horas. Após esse período, as concentrações mais altas do herbicida (50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) levaram a uma diminuição da massa celular.



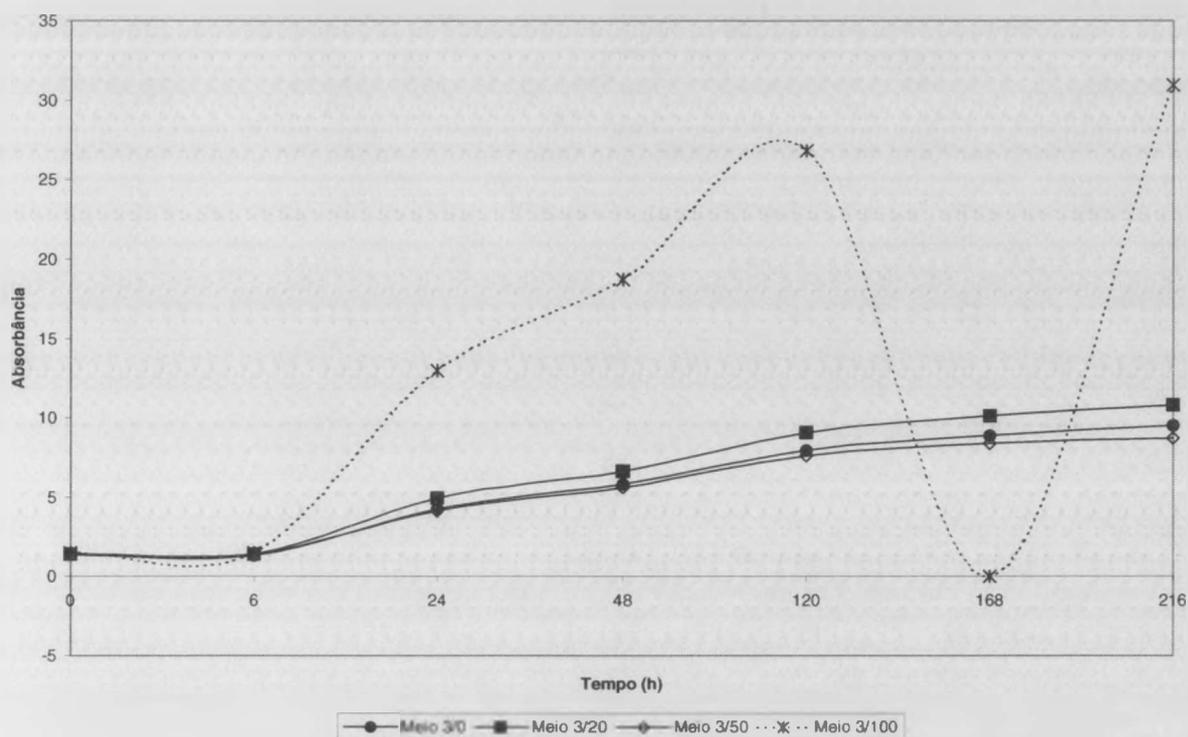
A glicose como fonte de carbono e energia (Figura 6), influenciou a adaptação da linhagem na dosagem de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  no intervalo de 6 a 120 horas. Em contrapartida, o crescimento da linhagem sem a presença do herbicida, somente com a glicose, não ocorreu.



**FIGURA 6.** Crescimento da linhagem D12-12 em meio mineral J.E. ( $-\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) suplementado com diuron, concentração de 0, 20, 50 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , e glicose (0,5%), avaliado através da leitura da absorvância (560 nm) nos intervalos de 0, 6, 24, 48, 120, 169 e 216 horas de crescimento.

Na presença do herbicida ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), da glicose e da fonte de nitrogênio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (Figura 7), a linhagem apresentou um comportamento similar ao exibido no meio de cultura sem nitrogênio, onde no intervalo de 6 a 120 horas, a produção de biomassa foi crescente (Figura 6).



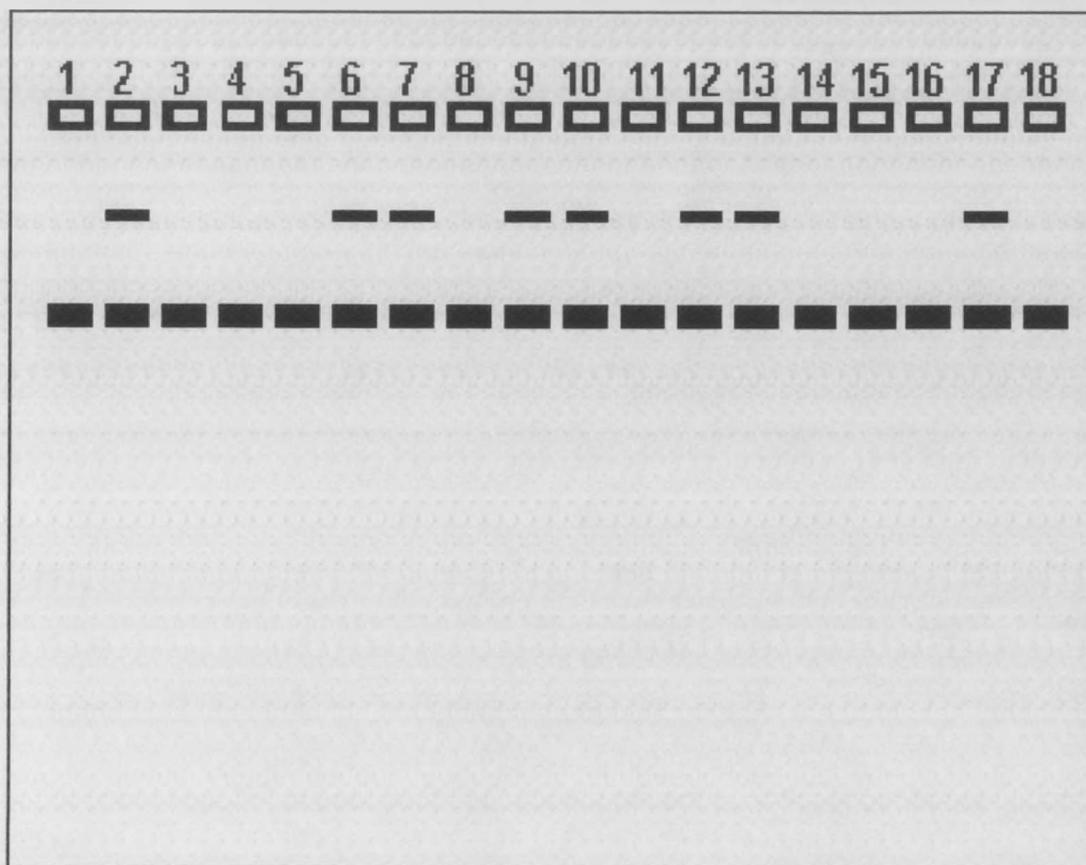


**FIGURA 7.** Crescimento da linhagem D12-12 em meio mineral J.E. suplementado com diuron, concentração de 0, 20, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e glicose (0,5%), avaliado através da leitura da absorbância (560 nm) nos intervalos de 0, 6, 24, 48, 120, 169 e 216 horas de crescimento.

#### 4.2.4. Análise de DNA plasmidial

A avaliação da presença de plasmídeos foi realizada em 15 linhagens bacterianas resistentes ao diuron. Desse total, 46,6% apresentaram DNA plasmidial (Figura 8), ou seja as linhagens D12-12, D16-2, D12-16, D2-5, D11-9, D12-20 e D16-12.





**Figura 8.** Análise do DNA plasmidial visualizada através de zimograma das linhagens bacterianas resistentes ao diuron . (1=controle negativo, 2=controle positivo, 3=D1-9, 4=D13-13, 5=D12-17, 6=D12-12, 7=D16-2, 8=D12-14, 9=D12-16, 10=D2-5, 11=D5-5, 12=D11-9, 13=D12-20, 14=D13-7, 15=D1-8, 16=D12-18, 17=D16-12, 18=controle negativo).

#### 4.2.5. Identificação das linhagens

Os testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos realizados, indicaram que as linhagens D12-12, D12-18 e D16-12, são Bastonetes Gram Negativos, aeróbios, não fermentativos (Tabela 7).



**TABELA 7.** Resultados de testes morfológicos, bioquímicos e fisiológicos realizados com as linhagens D12-12, D12-18 e D1612.

TESTES	LINHAGENS BACTERIANAS		
	D12-12	D12-18	D16-12
Cor	creme translúcida	creme	creme
Superfície	lisa	lisa	lisa
Forma	cocobacilos	cocobacilos pequenos	cocobacilos bastonetes curtos
Arranjo	isolados e aos pares	isolados e agrupados	isolados e aos pares
Motilidade	+	+	+
Catalase	+	+	+
Oxidase	-	-	-
O/F	oxidativo	oxidativo	oxidativo
Requerimento O <sub>2</sub>	aeróbio	aeróbio	aeróbio
Crescimento DCA	-	-	++

A identificação, realizada na Fundação Tropical de Pesquisas “André Tosello” designou as linhagens ao nível de espécie como *Acinetobacter baumannii* BOUVET & GRIMONT (1986), com índice de similaridade na identificação de 99,9% para D12-12 e D16-12 e de 94,1% para a D12-18 .

### 4.3. ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA BIODEGRADABILIDADE DO DIURON

#### 4.3.1. Extração e detecção de metabólitos

##### 4.3.1.1. Extração líquido-líquido

##### 4.3.1.1.1. Teste colorimétrico

Os resultados apresentados na Tabela 8 indicam que a 3,4-dicloroanilina não foi detectada entre os limites de 2 a 10 µg mL<sup>-1</sup>. Os tratamentos com as



linhagens D16-12 e consórcio (D11-9, D12-12, D12-18 e D16-12) apresentaram uma coloração magenta translúcida.

**TABELA 8.** Resultados obtidos no teste colorimétrico para detecção de DCA (3,4-dicloroanilina), utilizando como padrão de transformação a solução com DCA técnico ( $2$  e  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

TRATAMENTOS	Coloração Magenta	
	Fraca	Forte
Solução DCA $2 \mu\text{g mL}^{-1}$	++	
Solução DCA $10 \mu\text{g mL}^{-1}$		+++
D11-9	-	
D12-12	-	
D12-18	-	
D16-12	-+	
Consórcio (todas as linhagens)	-+	
água + diuron	-	
JE + diuron	-	

(-) não ocorreu a coloração magenta; (-+) coloração magenta translúcida; (++) coloração magenta fraca, (+++) coloração magenta forte.

#### 4.3.1.1.2. Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Na avaliação por cromatografia de camada delgada (CCD) observou-se em todos os tratamentos a presença do herbicida diuron. Quando comparado, os padrões analíticos do diuron e da 3,4-dicloroanilina (DCA) com o tratamento consórcio (linhagens D11-9, D12-12, D12-18, D16-12) observou-se um metabólito de  $R_f$  igual ao DCA. Outro composto, denominado metabólito 1 presente no consórcio e na linhagem D-12-12 foi observado. Os metabólitos 3 e 6 foram encontrados somente nas amostras do consórcio (Tabela 9).



**TABELA 9.** Valores de Rfs dos padrões analíticos (diuron e DCA) e dos metabólitos dos tratamentos controle (meio mineral + diuron 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e inoculados com D12-12 e consórcio (todas as linhagens).

Substâncias	Padrões		METABÓLITOS					
	DCA	Diuron	1	2	3	4	5	6
<b>DCA</b>	0,78							
<b>Diuron</b>		0,59						
<b>JE+Diuron</b>		0,59		0,10		0,15	0,24	
<b>D12-12</b>		0,59	0,02	0,09			0,24	
<b>Consórcio</b>	0,78	0,59	0,02	0,09	0,11	0,15	0,24	0,37

#### 4.3.1.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As amostras correspondentes aos tratamentos controle e inoculados com as linhagens D12-12 e consórcio, após a extração líquido-líquido, foram utilizadas para a cromatografia líquida de alta eficiência. Os cromatogramas (ABS=0,02) são apresentados na Figura 9. Observou-se a presença do diuron em todas as amostras através do pico entre 10.03 e 10.16 minutos.

Nos tratamentos consórcio e inoculado com a linhagem D12-12 detectou-se 2 picos: um em 1.63-1.7 minutos e outro em 2.53 minutos que não foram quantificados no tratamento controle, podendo estar relacionado com o metabolismo celular. Um outro pico detectado nas três amostras mas podendo ser quantificado somente no cromatograma C apresentou um pico aos 8.73 minutos.



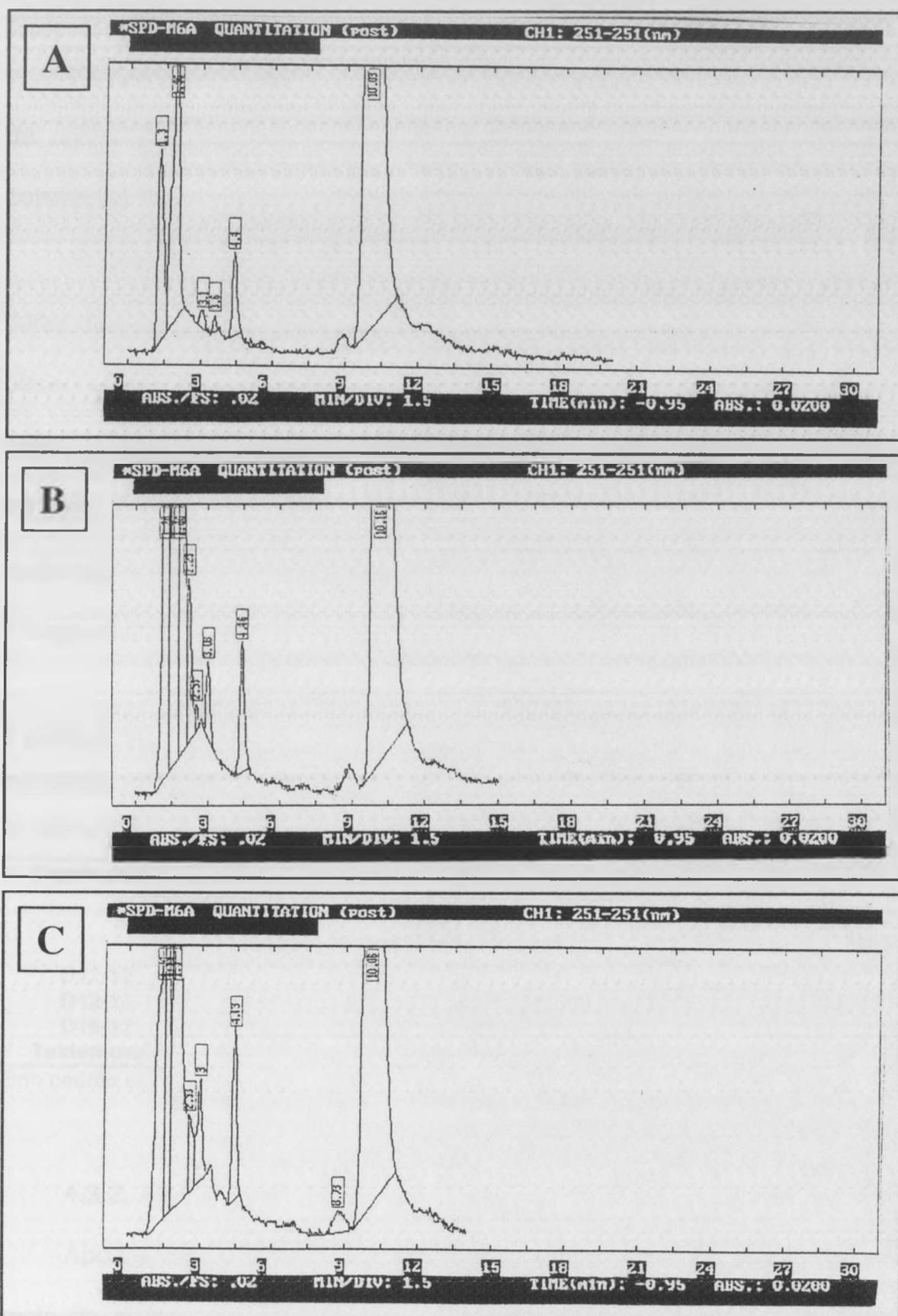


Figura 9. Cromatogramas das amostras: a) Controle; b) linhagem D12-12; c) Consórcio obtidos através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando coluna C<sub>18</sub>, detector ultravioleta operando a 251 nm e fluxo de 1,5 mL/minuto.



#### 4.3.1.2. Extração fase sólida (SPE)

Utilizando-se da técnica de extração fase sólida (SPE) para a construção da curva de calibração do herbicida diuron, obteve-se o coeficiente de correlação de 0,998.

A porcentagem de recuperação e de degradação do diuron nas concentrações de 20 e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são apresentados na Tabela 10. Pode-se observar que as linhagens D1-12, D12-14 e D16-12 quando inoculadas em meio de cultura com 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diuron, degradaram, respectivamente, 14,39%, 8,63% e 3,78%. No meio de cultura acrescido de 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do herbicida a taxa de degradação foi de 12,92%, 10,86% e 12,29% para as linhagens D1-12, D12-14 e D16-12, respectivamente.

**TABELA 10.** Porcentagem de recuperação e de degradação do diuron, nas amostras inoculadas com as linhagens D12-12, D12-18, D16-12 e na testemunha, após 32 dias de incubação

Tratamentos	% de recuperação do diuron		% de degradação do diuron	
	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g mL}^{-1}$
D12-12	85,57	87,07	14,39	12,92
D12-18	91,37	89,13	8,63	10,86
D16-12	96,21	87,71	3,78	12,29
Testemunha	88,84	90,16		

Erro padrão estimado = 0,992 , coeficiente de correlação = 0,998

#### 4.3.2. Análise do crescimento em 3,4-dicloroanilina (DCA).

Após 48 horas de incubação das linhagens D12-12, D12-18 e D16-12 em meio de cultura mineral J.E. suplementado com DCA (6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), somente D16-12 apresentou crescimento.



#### 4.4. AVALIAÇÃO DA MINERALIZAÇÃO DO HERBICIDA $^{14}\text{C}$ -DIURON

Os resultados da mineralização de  $^{14}\text{C}$ -diuron, expressos na Tabela 11 e Figura 10, estão em desintegrações por minuto e porcentagem de  $^{14}\text{CO}_2$  despreendido, respectivamente.

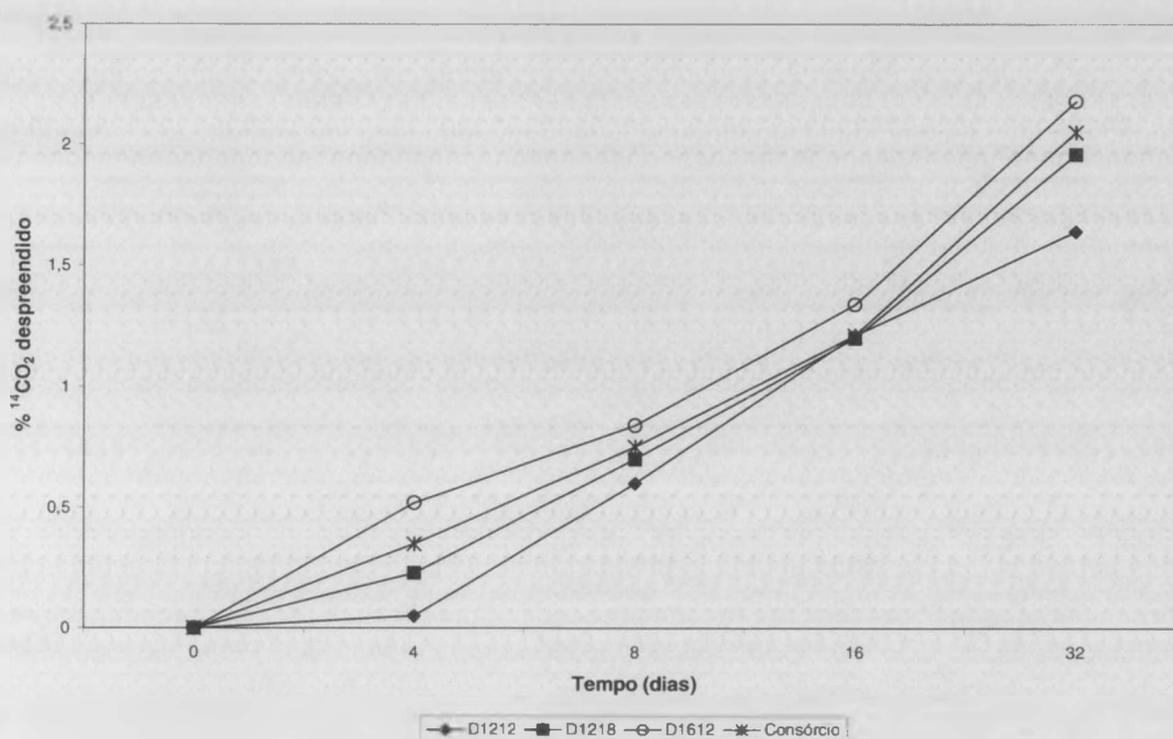
**TABELA 11.** Despreendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  do meio de cultura mineral J.E. inoculado com as linhagens D12-12, D12-18, D16-12 e um Consórcio dessas, em desintegração por minuto.

Linhagens	Dias de incubação			
	4	8	16	32
D12-12	664,91*	388,53	602,39	429,59
D12-18	824,82	363,40	449,65	842,04
D16-12	635,95	470,50	576,89	1111,35
Consórcio	508,86	441,55	537,07	1120,53

\* média de 4 repetições

As linhagens e o consórcio foram capazes de mineralizar o herbicida diuron, embora o despreendimento de  $^{14}\text{CO}_2$  tenha sido baixo (Figura 10). Após 32 dias a taxa de  $^{14}\text{CO}_2$  despreendido foi de 1,64%, 1,96%, 2,05% e 2,18% para as linhagens D12-12, D12-18, Consórcio e D16-12 respectivamente. Nesse experimento a molécula de diuron utilizada apresentava todos os carbonos do anel aromático radiomarcados, desta forma o  $^{14}\text{CO}_2$  liberado foi resultante da quebra do anel pelas linhagens bacterianas.





**FIGURA 10.** Porcentagem de  $^{14}\text{CO}_2$  desprendido (acumulado) após 32 dias de incubação, obtidas da degradação do diuron pelas linhagens D12-12, D12-18 D16-12 e consórcio dessas em meio mineral J.E. líquido suplementado com diuron na concentração de  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para a avaliação dos metabólitos, através de CCD, foram testados vários solventes de desenvolvimento para a corrida cromatográfica. A placa 1 (diclorometano/metanol) foi avaliada em analisador linear de CCD e a placa 2 (cloroformio/acetona/metanol) após visualização em UV, foi revelada em filme de raio X. Os resultados obtidos na placa 1 são apresentados na Tabela 12 e da placa 2 na Figura 11 e na Tabela 13.



**TABELA 12.** Valores de Rfs e proporção em cada tratamento após 32 dias de incubação, calculados a partir da placa desenvolvida com diclorometano/metanol.

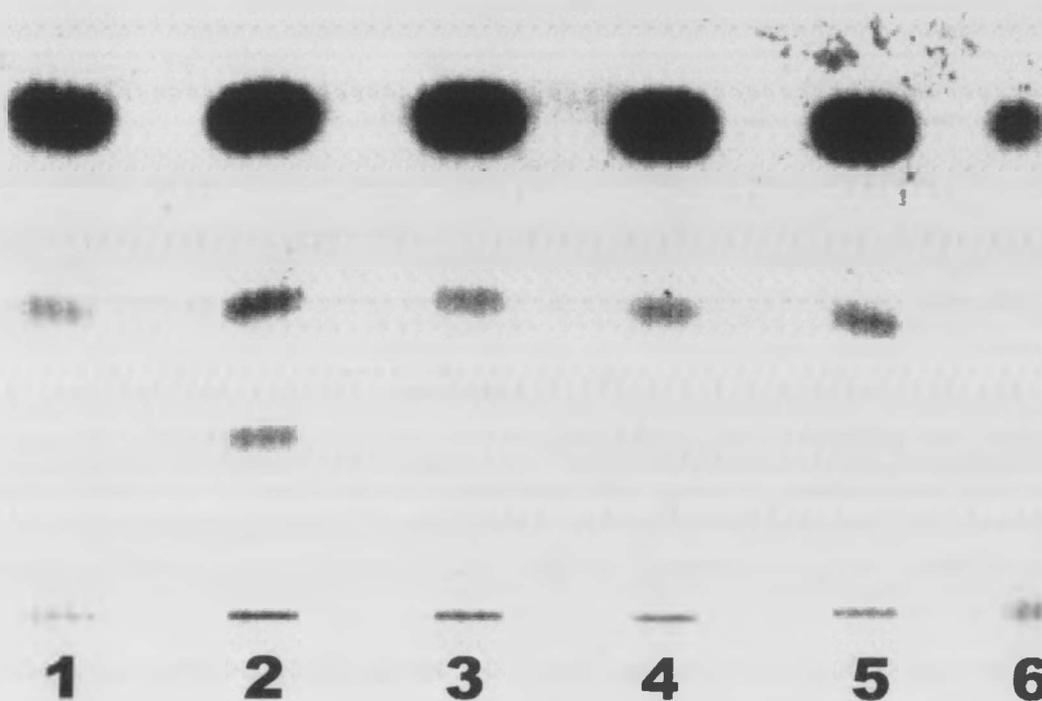
Tratamentos	Rf=0,50	Rf=0,31	Rf=0,18
D12-12	85,35%	3,47%	
D12-18	81,09%	5,88%	2,30%
D16-12	85,06%	4,03%	
Consórcio	86,90%	4,19%	
Controle	85,74%		0,63%

Os dados apresentados nas Tabelas 12 e 13 apresentam similaridade, onde os Rfs 0,50 e 0,49 representam o diuron, com uma atividade de 81,09% a 86,90%. Na Tabela 12 todos os tratamentos, menos o controle, apresentaram o metabólito 0,31 com 3,47% a 5,88% da atividade total. Além desses, outro metabólito com  $Rf = 0,28$  (Tabela 13) ocorrem todos os tratamentos. O metabólito de  $Rf = 0,18$  (Tabela 12) consistiu em 2,3% da atividade na linhagem D12-18 e 0,63% no Controle. Os dados da Tabela 13 foram calculados a partir do filme de raio X reproduzido na Figura 11.

**TABELA 13.** Valores de Rfs encontrados através da reprodução xerográfica do filme de raio X para os tratamentos e para a solução de aplicação inicial após 32 dias de incubação.

Tratamentos	Rf = 0,49	Rf=0,28	Rf=0,17
D12-12	+	+	
D12-18	+	+	+
D16-12	+	+	
Consórcio	+	+	
Controle	+	+	
Sol. Aplicação inicial	+		





**Figura 11.** Reprodução xerográfica do filme de raio-x da placa 2, onde 1=D12-12, 2=D12-18, 3=D16-12, 4=Consórcio, 5=Controle e 6=Solução de aplicação inicial.

#### 4.5. MONITORAMENTO DE *ACINETOBACTER BAUMANNII* GUS<sup>+</sup> NO SOLO E NA RIZOSFERA.

##### 4.5.1. Obtenção de transconjugantes de *A. baumannii*

Os resultados do número de células transconjugadas (unidades formadoras de colônias, u.f.c.), obtidas por conjugação de *Acinetobacter baumannii* são apresentados na Tabela 14.



**Tabela 14.** Número de células viáveis, após conjugação de *Acinetobacter baumannii*, utilizando como doadora a *E. coli* S-17.

Linhagens	u.f.c./100 µL		
	Diluição		
	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>
D12-12	43*	5,75	0
D12-18	18,5	0	0
D16-12	81,25	4,5	0

\* média de 4 repetições

#### 4.5.2. Monitoramento de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> no solo e na rizosfera de plantas de milho

Na Tabela 15 estão os resultados, em u.f.c./g de solo e de raízes, da recuperação da linhagem D16-12 GUS<sup>+</sup>, em meio seletivo mineral (item 3.4.1.). No solo e nas raízes, ocorreu um aumento do número de células do 7<sup>o</sup> para o 16<sup>o</sup> dia, demonstrando a eficiência da linhagem em colonizar e sobreviver nas raízes de plantas de milho.

**Tabela 15.** Recuperação de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> do solo e das raízes, em u.f.c./g, nos intervalos de 7 dias e 16 dias após plantio.

Dias após plantio	Número de u.f.c./g	
	Solo	Raízes
7 <sup>o</sup> dia <sup>†</sup>	8,1 x 10 <sup>5</sup> Ab <sup>**</sup>	8,67 x 10 <sup>4</sup> Bb
16 <sup>o</sup> dia <sup>††</sup>	1,82 x 10 <sup>6</sup> Aa	5,67 x 10 <sup>5</sup> Ba

\*\* médias seguidas da mesma letra maiúscula, na linha, e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

<sup>†</sup> média de 4 plantas e <sup>††</sup> média de 6 plantas



A massa da matéria seca (MMS) da parte aérea e das raízes não diferiu entre os tratamentos e nos intervalos analisados (Tabela 16).

**Tabela 16.** Massa da matéria seca (MMS) da parte aérea e das raízes de plantas de milho, em gramas, avaliada no 7° e 16° dia após o plantio, nos tratamentos 1 (semente não inoculada) e 2 (semente inoculada com *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup>).

Tratamento	Massa da matéria seca** (g)			
	7° dia		16° dia	
	Parte aérea	Raízes	Parte aérea	Raízes
1	0,0284 <sup>a</sup>	0,3206 a	1,1603 a	0,3431 a
2	0,0308 a	0,2493 a	1.2470 a	0,3735 a

\*médias seguidas da mesma letra na mesma coluna, não diferem entre si, teste de Tukey 5%.

\*\* média de 6 repetições.

A recuperação de *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup> do solo após a inoculação e no 7° e 16° dia foi avaliada através da contagem de unidades formadoras de colônias por grama de solo. Os resultados são média de 4 repetições e indicaram que na data da montagem do experimento o solo apresentava  $1 \times 10^7$  u.f.c./g de solo. No 7° e 16° dia foram encontradas, respectivamente,  $1 \times 10^6$  e  $6 \times 10^5$  u.f.c./g de solo.

#### 4.5.3. Recuperação de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> do solo

Após 7 dias de repouso, sem plantas, semeou-se milho com o objetivo de recuperar *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup>. Os resultados indicaram uma recuperação de  $9,2 \times 10^4$ ,  $1,9 \times 10^5$  e  $1,2 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por grama (u.f.c./g) de solo, raízes e macerados de raízes,

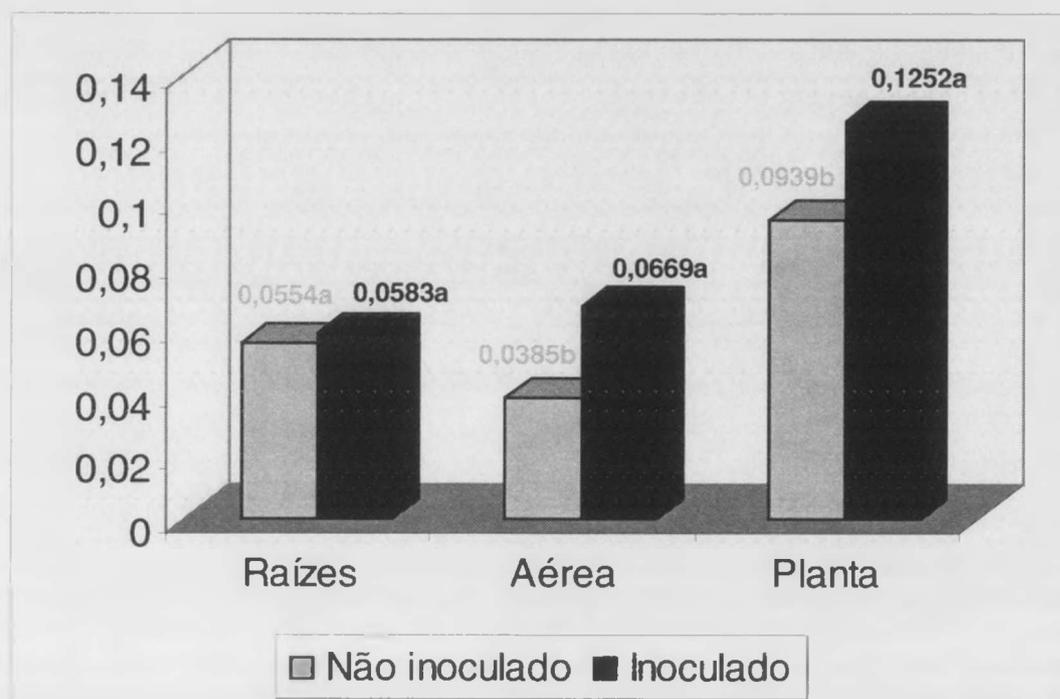


respectivamente. Estes resultados demonstraram a capacidade da bactéria em manter-se no solo na ausência de plantas e a possibilidade de reisolamento a partir de solo e raízes de novas plantas.

#### 4.6. AVALIAÇÃO DO EFEITO DE *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> NA PROTEÇÃO DE PLANTAS

##### 4.6.1. Efeito de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> (D16-12) na promoção do crescimento de plantas.

A massa da matéria seca (MMS) de plantas de milho inoculadas com a linhagem D16-12 de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> diferiu estatisticamente das plantas não inoculadas. A MMS da parte aérea e do total da planta foram maiores em 73,7% e 33,3%, enquanto que nas raízes não diferiu entre os tratamentos (Figura 12).



**Figura 12.** Média da massa da matéria seca de raízes, da parte aérea e do total da planta de milho inoculado com *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> D16-12 e não inoculado (controle) após 16 dias de cultivo em solo esterilizado. Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.



#### 4.6.2. Bioensaio com plantas de milho sensíveis ao diuron

Nesse bioensaio, demonstrou-se o efeito das dosagens de diuron no desenvolvimento das plantas de milho (Tabela 17). O herbicida, na concentração de  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , causou redução significativa no crescimento, embora as plantas mantiveram-se verdes durante o período do experimento. As plantas cultivadas em solos com as dosagens maiores ( $4$  e  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram redução do crescimento das plantas de forma proporcional à dosagem utilizada, inclusive manifestando sintomas de fitotoxicidade, tais como murcha severa e necrose.

**TABELA 17.** Efeito na massa da matéria seca de plantas de milho cultivadas em solos contaminados com o herbicida diuron ( $2$ ,  $4$  e  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), após 16 dias de plantio.

Dosagem Diuron ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Massa da matéria seca (mg) <sup>†</sup>		
	Raízes	Parte aérea	Planta
0	0,0510a	0,0733a	0,1246a
2	0,0388a	0,0607ab	0,0997ab
4	0,0332ab	0,0407b	0,0743b
40	0,0146b	0,0413ab	0,0564b

<sup>†</sup> Valores são médias de 3 repetições. Na mesma coluna, médias seguidas pela mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.6.3. Colonização de raízes e atividade microbiana

Os dados da atividade microbiana foram obtidos através da quantificação da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) a dimetilsulfeto (DMS) e apresentaram resultados diferenciados quando comparado ao tipo de solo (Tabela 18). O solo denominado adjacente por estar próximo às raízes demonstrou alta



atividade microbiana na presença do herbicida ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e da *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup>. Enquanto que para o solo rizosférico os resultados obtidos não diferiram estatisticamente.

Na avaliação da massa da matéria seca de plantas (Tabela 18) os tratamentos com a bactéria *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> apresentaram valores maiores que o controle. Para o tratamento com o herbicida ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ) a massa da matéria seca das raízes e do total da planta apresentou redução significativa.

**TABELA 18.** Valores obtidos para a redução de DMSO no solo adjacente e na rizosfera e para MMS de plantas de milho (*Zea mays*) cultivadas em diferentes tratamentos.

Tratamento	Atividade Microbiana <sup>†</sup> (ng DMS g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )		Massa da matéria seca (g) <sup>††</sup>		
	Solo		Raízes	Parte aérea	Total
	adjacente	rizosfera			
Controle	290,76b	528,81a	0,0816a	0,0839a	0,1655ab
<i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	328,06ab	400,53a	0,1022a	0,0973a	0,1995a
Diuron $4\mu\text{g mL}^{-1}$	336,31a	526,29a	0,0314b	0,0510a	0,0824b
Diuron $4\mu\text{g mL}^{-1}$ + <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	354,69a	507,60a	0,0794a	0,0607a	0,1401ab

<sup>†</sup> Média de 3 repetições

<sup>††</sup> Média de 4 repetições.

\* Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A contagem do número total de microrganismos isolados da rizosfera de plantas de milho (Tabela 19) permitiu verificar que houve diferença entre os tratamentos, principalmente no inoculado com *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> em solo contaminado com diuron ( $4\mu\text{g mL}^{-1}$ ), onde ocorreu um aumento no número de



bactérias total, de bactérias fluorescentes, de leveduras e de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>.

A contagem de fungos foi maior nos solos inoculados com *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup>, diferindo dos outros tratamentos. Não foi encontrada diferença na contagem do gênero *Bacillus*.

**TABELA 19.** Efeito do herbicida diuron ( $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) no número de células de microrganismos da rizosfera de plantas de milho, inoculados ou não com a linhagem D16-12 de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>.

Tratamentos	Microrganismos (u.f.c./g)*					
	Bactérias (10 <sup>6</sup> ) <sup>aa</sup>	Bactérias Fluorescentes (10 <sup>6</sup> ) <sup>aa</sup>	Bacillus (10 <sup>4</sup> ) <sup>aa</sup>	Leveduras (10 <sup>4</sup> ) <sup>aa</sup>	Fungos (10 <sup>4</sup> ) <sup>aa</sup>	<i>A.baumannii</i> Gus <sup>+</sup> (10 <sup>6</sup> ) <sup>aa</sup>
Controle	0,61 bc	0,91	2,95	0,75	3,12	ND
<i>A.baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	0,35 c	0,46	4,05	2,05	6,38	0,15
Diuron $4 \mu\text{g mL}^{-1}$	2,34 b	5,90	6,12	1,20	3,40	ND
Diuron $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ + <i>A.baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	10,83 a	13,37	3,82	7,25	7,10	8,60

<sup>a</sup> média de 4 repetições; <sup>aa</sup> média de 2 repetições; **ND**, não determinado

\* Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Na avaliação da redução de DMSO, realizado no segundo experimento somente no solo da rizosfera, encontrou-se uma maior atividade no tratamento com *A. baumannii* D16-12 GUS<sup>+</sup> e o diuron ( $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), embora similar ao controle (Tabela 20). Esse resultado indica um efeito da bactéria na atividade microbiana do solo relacionado à concentração do herbicida.

A Tabela 20 contém os resultados da massa da matéria seca, nas dosagens de 1 e  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$  do herbicida diuron. Nos tratamentos inoculados com a bactéria em solo contaminado com o herbicida, ocorreu uma maior



massa da matéria seca para a parte aérea e para o total da planta, diferindo estatisticamente dos tratamentos onde somente o herbicida estava presente.

**TABELA 20.** Valores da redução de DMSO em solo da rizosfera de milho (*Zea mays*) e massa da matéria seca de plantas em diferentes tratamentos.

Tratamento	Atividade Microbiana <sup>†</sup>	Massa da matéria seca (g) <sup>††</sup>		
	(ng DMS g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	Raízes	Parte aérea	Total
Controle	314,84 *a	0,0541 *a	0,0750 ab	0,1291 a
<i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	124,44 b	0,0437 ab	0,0841 a	0,1278 a
Diuron 1µg mL <sup>-1</sup>	83,29 b	0,0498 ab	0,0702 ab	0,1200 ab
Diuron 2µg mL <sup>-1</sup>	99,35 b	0,0286 b	0,0465 b	0,0751 b
Diuron 1µg mL <sup>-1</sup> + <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	80,41 b	0,0543 a	0,0971 a	0,1514 a
Diuron 2µg mL <sup>-1</sup> + <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	294,40 a	0,0454 ab	0,0900 a	0,1354 a

<sup>†</sup> Valores são médias de 3 repetições <sup>††</sup> médias de 6 repetições.

\* Médias seguidas pela mesma letra, na mesma coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

A contagem de microrganismos foi realizada de forma similar ao experimento anterior, entretanto foram quantificados somente a população de *Bacillus*, fungos e *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>. Em relação ao número de células viáveis da bactéria degradadora do diuron, observou-se uma diferença significativa entre os tratamentos, sendo que as plantas cultivadas em solo contaminado com 2 µg mL<sup>-1</sup> do herbicida apresentaram uma população 200% acima do controle. O número de u.f.c./g de solo da população de *Bacillus* nesse mesmo tratamento foi maior, sendo que o solo contaminado com 1 µg mL<sup>-1</sup> de diuron teve uma população 300 vezes maior que o controle. Não foram



detectadas diferenças significativas entre os tratamentos quanto à contagem de propágulos fúngicos (TABELA 21).

**TABELA 21.** Efeito do herbicida diuron (1 e 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) no número de células de microrganismos da rizosfera de plantas de milho, inoculados ou não com a linhagem D16-12 de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>.

Tratamentos	Microrganismos (u.f.c./g <sup>†</sup> )		
	Bacillus (10 <sup>5</sup> )	Fungos (10 <sup>4</sup> )	<i>A.baumannii</i> Gus <sup>+</sup> (10 <sup>5</sup> )
Controle	0,68	0,4	ND
<i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	0,5	0,7	0,95
Diuron 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$	26,6	0,4	ND
Diuron 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$	0,6	0,1	ND
Diuron 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	0,65	0,06	0,46
Diuron 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ + <i>A. baumannii</i> GUS <sup>+</sup>	2,4	0,06	3,0

<sup>†</sup> unidades formadoras de colônia por grama de solo, valor médio de 2 repetições  
ND, não determinado



## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Caracterização de linhagens isoladas de solos contaminados com diuron**

A técnica de enriquecimento é um procedimento muito utilizado para o isolamento de microrganismos de solos contaminados por pesticidas (AISLABIE & LLOYD-JONES, 1995; BARBIERI, 1994). As linhagens provenientes desses solos podem apresentar, dependendo das características fisiológicas dos isolados e da estrutura química do pesticida, potencial para a degradação de compostos xenobióticos.

A aplicação de linhagens bacterianas é importante para a elucidação do mecanismo microbiano envolvido na degradação, incluindo transporte do composto para a célula microbiana, produção de enzimas extracelulares, ou ainda, dos genes envolvidos no processo (AISLABIE & LLOYD-JONES, 1995).

O tipo de solo e o histórico de aplicação de pesticidas pode influenciar o microrganismo a ser obtido em uma determinada área. Como pode ser observado na Tabela 3, o solo da rizosfera de plantas de cana-de-açúcar



apresentou um maior número de unidades formadoras de colônias por grama de solo e, conseqüentemente, de linhagens bacterianas, quando comparado ao solo das entrelinhas.

SMITH-GRENIER & ADKINS (1996) isolaram linhagens bacterianas, que degradam o herbicida diclofop, de solos provenientes do local de lavagem de embalagens. Esse fenômeno caracteriza-se pelo enriquecimento dos microrganismos nativos pela deposição freqüente do pesticida presente na água de lavagem. Para SANDMANN & LOOS (1984), o isolamento de linhagens bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D da rizosfera de cana-de-açúcar, foi resultado de aplicações contínuas do pesticida nas áreas de cultivo e a similaridade da estrutura química dos exsudatos radiculares com a do 2,4-D.

Nesse trabalho, os compostos fenólicos e outros nutrientes liberados pelas raízes podem ter participado do cometabolismo do herbicida, embora o potencial das linhagens para a degradação ter sido, provavelmente, um resultado da aplicação intensiva e repetida exposição ao composto, levando a uma adaptação genética e fisiológica das linhagens, através de mutação ou de outros processos evolucionários (KARNS, 1990; DAUBARAS & CHAKRABARTY, 1992).

Os dados obtidos para a caracterização das linhagens bacterianas nesse trabalho são resultado de observações em laboratório, o que pode representar um risco ao entendimento do processo, principalmente pelas condições ótimas de crescimento e pelo mínimo de interações ecológicas. Entretanto, para AISLABIE & LLOYD-JONES (1995), esse tipo de experimento pode fornecer



informações importantes sobre a fonte de carbono ou nitrogênio utilizada pelo microrganismo ou ainda, sobre o tipo de metabolismo envolvido.

O isolamento de cultura pura de bactérias, pode ser ideal para estudos genéticos e moleculares da degradação, como a atividade das enzimas degradadoras. Para que ocorra a degradação de xenobióticos por bactérias do solo é necessário que enzimas intracelulares e, principalmente, extracelulares estejam envolvidas. As enzimas extracelulares, secretadas pela biomassa do solo, apresentam uma condição ótima para a sua atuação e têm como principais funções solubilizar e/ou metabolizar substratos externos à célula; produzir nutrientes necessários aos microrganismos; detoxificar contaminantes ambientais e modificar o micro nicho, com o objetivo de aumentar a sobrevivência da célula. Por isso, a estabilidade da enzima é importante e, geralmente, ela ocorre devido a ligação com partículas do solo. TATE III (1995) descreveu que grande parte da atividade enzimática é resultado de enzimas ligadas ou adsorvidas na matéria orgânica e também a uma condição ótima de temperatura, pH e equilíbrio iônico.

A avaliação do crescimento das linhagens em meio mineral suplementado com o herbicida diuron demonstrou, como pode ser observado no item 4.2.1. e na Tabela 4, que houve diferença entre as linhagens nas diversas dosagens testadas. Um crescimento atípico foi encontrado na linhagem D5-6, que cresceu em meio de cultura suplementado com 10 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do diuron, mas não em 5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e nos isolados D12-18, D13-7 e D16-12 que cresceram somente nas concentrações de 5 e 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do herbicida. Essa diferença de



crescimento, encontrada em dosagens intermediárias, pode estar relacionada as condições de incubação das culturas.

Quanto ao experimento desenvolvido para avaliar o crescimento da linhagem D12-12 em meio líquido com diferentes fontes de carbono e nitrogênio, os resultados obtidos demonstraram que a linhagem necessita de uma fonte extra de nitrogênio para o seu crescimento, não podendo ser substituída pelo herbicida. Esses dados estão de acordo com o encontrado por SHELTON *et al.* (1996), que descreveram a importância de uma fonte de nitrogênio para a degradação do diuron por *Streptomyces*. Segundo os autores a taxa de degradação aumentou de 19% com casamino ácido para 55% com o sulfato de amônia.

Quando utilizou-se uma fonte alternativa de carbono, sem o diuron, não ocorreu o crescimento da linhagem D12-12, mas na presença de glicose, suplementado com o herbicida, ocorreu uma diminuição no período de adaptação (Figura 6 e 7). Os dados não foram conclusivos para a ocorrência de cometabolismo, principalmente porque a dosagem utilizada foi alta ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), e geralmente cometabolismo ocorre em dosagens baixas ou em quantidades traços do composto xenobiótico (WANG *et al.*, 1985).

As linhagens foram identificadas como *Acinetobacter baumannii*, gênero comumente observado em amostras ambientais (DHAKEPHALKAR & CHOPADE, 1994; DEMNEROVA *et al.*, 1994) e caracterizado pela alta variabilidade genética e fenotípica, com representantes capazes de degradar compostos xenobióticos em cultura pura e em consórcio (SMITH-GRENIER &



ADKINS, 1996; SAKAI *et al.*, 1994; BOUCABEILLE *et al.*, 1994) como observado no decorrer desse trabalho.

A presença de DNA plasmidial em 46,6% das linhagens testadas nesse trabalho pode ter sido influenciada pelo método de lise e isolamento de plasmídeo utilizado (ANDERSON & McKAY, 1983; BARBIERI, 1994). Segundo DEMNEROVA *et al.* (1994), bactérias isoladas de áreas poluídas, incluindo o gênero *Acinetobacter*, podem possuir plasmídeos responsáveis pela degradação desses poluentes. BARBIERI (1994), também descreveu a presença de plasmídeos em 41,5% das linhagens isoladas de solo contaminado com creosoto, relacionados com a degradação. Nesse trabalho a presença de plasmídeos não foi correlacionada com a degradação do herbicida. Para isso, seria necessário a utilização de outras metodologias para testes de curagem dos plasmídeos e avaliação do crescimento na presença do diuron.

Linhagens isoladas de amostras ambientais, como *A. baumannii*, podem apresentar metabolismo fortuito para fontes alternativas de carbono (KNIGHT *et al.*, 1995) e/ou alta taxa de transferência e recebimento de DNA exógeno que pode carregar informações genéticas específicas como a resistência a antibióticos (NIELSEN *et al.*, 1997a).

## 5.2. Biodegradação do diuron

O teste colorimétrico utilizado para avaliação do aparecimento da 3,4-dicloroanilina (DCA), metabólito primário do diuron, não foi significativo na faixa de dosagem testada (2 a 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Embora tenha ocorrido uma coloração



que pode estar correlacionada com a capacidade da linhagem em cometabolizar o composto.

A avaliação, nesse trabalho, da biodegradabilidade do herbicida  $^{14}\text{C}$ -diuron é um resultado da quebra do anel aromático, devido a molécula utilizada apresentar todos os carbonos do anel radiomarcados. A baixa degradação do  $^{14}\text{C}$ -diuron, como pode ser observada na Figura 10, pode estar relacionada com a complexidade da quebra do anel em cultura pura. Segundo ROBERTS *et al.* (1993), a quebra da estrutura do anel, por ser mais resistente à degradação, pode fazer com que a degradação do composto xenobiótico ocorra lentamente.

Ao se analisar as taxas de degradação do diuron técnico encontraram-se valores entre 3,78 e 14,39%, enquanto que a biodegradabilidade do  $^{14}\text{C}$ -diuron variou entre 1,64 e 2,18%. Os valores mais altos observados na degradação do diuron técnico podem estar relacionados com a utilização de outro carbono presente na molécula, tal como o radical metil ( $\text{CH}_3$ ) (Figura 1), que não pôde ser quantificado no experimento com  $^{14}\text{C}$ -diuron, por não estar radiomarcado.

A cromatografia de camada delgada do  $^{14}\text{C}$ -diuron revelou um metabólito com  $R_f = 0,31$  presente nas amostras inoculadas (Figura 11, Tabela 12), enquanto que no experimento com o diuron técnico pode ser observado (Figura 9) um pico anterior ao diuron (8.73 minutos). Estes dados podem estar relacionados a presença de 3, 4-dicloroanilina, o que não pôde ser confirmado em razão da não injeção da DCA nos dois experimentos.

A taxa observada de mineralização do  $^{14}\text{C}$ -diuron, em torno de 2%, pode estar relacionada com as condições de cultivo das linhagens bacterianas,



principalmente por ter sido utilizado meio mineral líquido. Talvez a utilização de um outro meio de cultura semi-sólido ou o próprio extrato de solo poderiam prover melhores condições de aumento do inóculo e maior degradação.

### 5.3. Ecologia de *Acinetobacter baumannii* GUS<sup>+</sup>

Nessa etapa do trabalho, foram obtidos transconjugantes GUS<sup>+</sup> das linhagens D12-12, D12-18 e D16-12, mas somente a D16-12 foi utilizada nos experimentos de monitoramento no solo e na rizosfera. Essa linhagem, na ausência e na presença de plantas de milho, permaneceu no solo por um período de 16 dias (item 4.5.2.).

Segundo ALVEY & CROWLEY (1996), a sobrevivência de um consórcio de microrganismos degradadores na rizosfera pode estar relacionado ao papel das plantas em auxiliar na manutenção desses organismos, suprimindo a ausência do herbicida, ou ainda quando esse está presente em baixa concentração.

No bioensaio com plantas de milho, o herbicida diuron afetou o crescimento causando redução da massa da matéria seca (MMS). O aumento da concentração do herbicida no solo resultou em diminuição desse crescimento (Tabela 17). Foram observados também, sintomas de fitotoxicidade como murcha e tombamento, nas concentrações de 4 e 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

A bactéria *Acinetobacter baumannii* GUS<sup>+</sup>, degradadora do herbicida diuron foi capaz de promover um crescimento de 33,3% em relação ao controle



(Figura 12) e de proteger plantas de milho quando cultivadas em solos contaminados com 1 e 2  $\mu\text{g g}^{-1}$  de solo de diuron.

Em experimentos com bactérias degradadoras de 2,4-D na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar, SANDMANN & LOOS (1984) também sugeriram um efeito de proteção das plantas, causado pelas linhagens bacterianas devido, principalmente, a redução da concentração desse herbicida no solo.

A avaliação do crescimento de plantas, através da MMS, apresentou um efeito significativo da bactéria em solos tratados com o herbicida diuron (Tabela 18 e 20). A maior MMS, na presença de *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>, está em concordância com o aumento da concentração da linhagem na rizosfera (Tabela 19 e 21). A contagem de outros grupos de microrganismos também apresentou variação, relacionada com a presença do herbicida e da *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>, talvez por beneficiar grupos resistentes (Tabela 19 e 21).

A rizorremediação de tricloroetileno (TCE) por um recombinante de *Pseudomonas fluorescens* expressando o *tomA*<sup>+</sup> (tolueno- $\sigma$ -monoxigenase) foi viabilizada pelo plantio de sementes de trigo inoculadas com a bactéria (YEE *et al.*, 1998). Segundo AJITHKUMAR *et al.* (1998), a inoculação de *Pseudomonas aeruginosa* possibilitou uma germinação normal e vigorosa de plantas de tomate cultivadas em solos contaminados por clorobenzoatos. O vigor das plantas foi proporcional ao aumento do inóculo por metabolizar algum fator de promoção de crescimento ou destruir alguma substância inibitória.

A atividade microbiana no solo, avaliada através da redução de dimetilsulfóxido (DMSO) para dimetilsulfeto (DMS), pode ser um indicativo da alteração provocada por compostos tóxicos, o que depende da dosagem e do



tipo de substância química. A presença do crômio (Cr) afetou a redução de DMSO linearmente, ou seja, a maior dosagem propiciou uma menor atividade, enquanto que o Arsênio (As) apresentou maior efeito em uma dosagem média (SPARLING & SEARLE, 1993).

A aplicação de  $4 \mu\text{g g}^{-1}$  de solo do herbicida não afetou a atividade microbiana da rizosfera, mas afetou significativamente a atividade do solo adjacente no primeiro experimento, com um aumento de 15,6% da atividade em relação ao controle (Tabela 18). Para as dosagens menores ( $1$  e  $2 \mu\text{g g}^{-1}$  de solo de diuron) o solo testado (rizosfera) apresentou uma maior atividade microbiana no controle e no tratamento com diuron ( $2 \mu\text{g g}^{-1}$ ) + *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> (Tabela 20). Essa linhagem se estabeleceu na rizosfera, nas dosagens maiores de diuron (Tabela 19 e 21), aumentando em número e, conseqüentemente sua atividade. Desse modo, pode-se afirmar que o herbicida agiu como um fator de crescimento para *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>.

A rizosfera é relativamente favorável para bactérias auxotróficas que requerem fatores de crescimento contidos nos exsudados das raízes ou que são produzidos por outros microrganismos. Isso pode resultar em enriquecimento fortuito de organismos degradadores. A rizodeposição de carbono pelas raízes causa um aumento na atividade microbiana do solo e, sobretudo, no número da população microbiana. Em certos casos, esse aumento tem sido correlacionado com a mineralização de xenobióticos. Análogos naturais podem ocorrer nos exsudatos e lisados das raízes ou em materiais estruturais como a lignina, para os quais os microrganismos têm



desenvolvido uma larga quantidade de enzimas específicas, capazes de metabolizar ou cometabolizar esses compostos.

A capacidade de degradação de um pesticida ou a resistência ao composto, pode ser útil na etapa de seleção de bactérias para a inoculação de sementes. A veiculação adequada da bactéria degradadora pode resultar em uma elevada população na rizosfera e, devido a capacidade de promoção de crescimento de plantas e um maior desenvolvimento das raízes (YEE *et al.*, 1998), propiciar uma maior área de contato para a degradação.

A técnica de inoculação de sementes pode influenciar a dispersão da bactéria em solos contaminados o que pode ter implicações na biorremediação do solo. Um microrganismo, para ser utilizado na remediação deve combinar a capacidade de degradar com a habilidade para colonizar um nicho específico. A presença de 2,4-D estimulou a colonização da rizosfera de cevada por *Burkholderia cepacia*, bactéria degradadora do herbicida (JACOBSEN, 1997). A exemplo disso, *A. baumannii* GUS<sup>+</sup> também apresentou um aumento na colonização da rizosfera, denominado como vantagem seletiva por JACOBSEN (1997).

Na ausência de plantas, outras estratégias de sobrevivência podem beneficiar a população de um determinado microrganismo, como os colóides do solo e a capacidade de metabolizar uma maior gama de substratos. No experimento realizado, a linhagem D16-12 de *Acinetobacter baumannii* foi capaz de sobreviver no solo por 7 dias após a retirada da planta, provavelmente por encontrar condições favoráveis no ambiente, tais como



temperatura, umidade e substratos provenientes do solo ou de resíduos de plantas adequados à sua permanência.

É sabido que o uso de sistemas biológicos para a remediação ou detoxificação de solos contaminados por xenobióticos, tem como característica principal o papel natural dos microrganismos na transformação, formação de complexos químicos ou mineralização de contaminantes. Na natureza esses processos ocorrem de forma lenta e gradual, principalmente pela necessidade de adaptação do metabolismo microbiano. O que ocorre devido à evolução de genes necessários para a produção enzimática; de estruturas análogas naturais, como a lignina que induzem enzimas semi-específicas, ou da transferência desses genes de um microrganismo para outro.

Para a biorremediação de solos contaminados, a aceleração desses processos naturais é importante e pode ser realizada pela estimulação da atividade da microbiota natural, pela adição de nutrientes, de aceptores de elétrons, pela correção do pH e do potencial redox do solo. Outras metodologias envolvem a inoculação de microrganismos com atividade específica de degradação e a aplicação de enzimas imobilizadas. As plantas, de forma indireta, também podem ser utilizadas, principalmente por estimular a atividade microbiana e estabilizar a estrutura do solo.

Microrganismos capazes de degradar pesticidas apresentam uma vantagem ecológica na colonização e na competição em solos contaminados, podendo acelerar a biodegradação. Outro mecanismo envolve a capacidade desses microrganismos de colonizar ambientes específicos, como a rizosfera, e metabolizar compostos químicos complexos, como os exsudatos das raízes.



Nesse trabalho, *A. baumannii* apresentou capacidade de degradar o herbicida diuron e de colonizar a rizosfera de plantas sensíveis a esse contaminante, proporcionando proteção e induzindo crescimento diferenciado.

A fitoremediação pode ser uma alternativa para o tratamento de solos contaminados. A possibilidade da utilização de plantas ornamentais e forrageiras, inoculadas com bactérias promotoras de crescimento de plantas e degradadoras de herbicidas, pode possibilitar a descontaminação do solo e o concomitante uso agrícola, agregando valor econômico ao processo de remediação.

Se a ecologia microbiana for compreendida, pode-se aplicar esse conhecimento para se definir estratégias de bioremediação, ou ainda, de proteção de plantas que, em condições normais, não poderiam ser cultivadas em solos contaminados. Dentro do modelo atual de agricultura intensiva, torna-se interessante esse tipo de estratégia, por respeitar o sistema e promover a descontaminação do meio ambiente.



## 6. CONCLUSÕES

1. Bactérias com potencial para degradação do herbicida diuron foram predominantes e mais abundantes na rizosfera de plantas de cana-de-açúcar.
2. Linhagens de *Acinetobacter baumannii* foram capazes de biotransformar e mineralizar o  $^{14}\text{C}$ -diuron.
3. O método de conjugação utilizado para a transformação de *A. baumannii* foi eficiente na inserção do gene marcador *gusA* com a efetiva expressão do fenótipo nas linhagens receptoras.
4. A linhagem D16-12 de *A. baumannii* foi capaz de sobreviver no solo e na rizosfera e de promover o crescimento de plantas de milho, em solos contaminados com diuron.
4. Em solos contaminados com diuron a linhagem D16-12 de *A. baumannii* apresentou uma vantagem seletiva na colonização da rizosfera e proteção de plantas de milho contra os efeitos fitotóxicos do pesticida.



## 7. RESUMO

O uso do herbicida diuron para o controle de plantas invasoras é importante para a cultura da cana-de-açúcar. Entretanto, essa atividade pode gerar efeitos negativos como a contaminação do composto ou de seus derivados no ambiente. Microrganismos do solo são capazes de degradar pesticidas e diminuir seus possíveis efeitos deletérios. Para este trabalho, amostras de solos foram coletadas em propriedades agrícolas com histórico de aplicação do diuron e utilizadas para isolamento de bactérias com potencial para degradação. Linhagens bacterianas foram caracterizadas e monitoradas no solo e na rizosfera de plantas de milho. O solo da rizosfera propiciou um maior número de isolados quando comparado ao solo não rizosférico. A mineralização do diuron por *Acinetobacter baumannii* foi de até 2,18% (D16-12) e a biotransformação foi de aproximadamente 14% para a linhagem D12-12. Posteriormente, o gene marcador *gusA* foi inserido na linhagem D16-12, que foi avaliada quanto à sua capacidade de promoção de crescimento e de proteção de plantas. *A. baumannii* GUS<sup>+</sup>, D16-12, colonizou a rizosfera e promoveu um aumento de 33,3% no crescimento de plantas de milho. As plantas, cultivadas em solos contaminados com diuron, não apresentaram sintomas de fitotoxicidade e cresceram normalmente, quando inoculadas com a bactéria. Esses resultados demonstram que a capacidade de degradação e de colonização da rizosfera por linhagens degradadoras pode proteger plantas sensíveis em solos contaminados com o herbicida diuron.



## 8. SUMMARY

The use of diuron to control weeds is important for the growth of sugarcane. However, this method may cause negative effects, such as contamination and persistence in the environment. Soil microorganisms can degrade pesticides, reducing the deleterious effects. Soil samples were collected from sugarcane farms in which the herbicide had been applied. So, bacterial strains were isolated and characterised with relation to biodegradation and monitoring of degrading bacteria in the soil. The rhizosphere showed a larger number of strains than the non-rhizospheric soil. The mineralization of diuron by strains identified as *Acinetobacter baumannii*, was until 2,18% for the strain D16-12, and the biotransformation was of approximately 14% in the strain D12-12. After that, the marker gene *gusA* inserted in the strain D16-12 was evaluated in relation to the following parameters: plant growth promoting and plant protection against the damage effect of diuron. *Acinetobacter baumannii* GUS<sup>+</sup>, strain D16-12, was able to colonize the rhizosphere and promote 33,3% the growth. The corn plants, cultivated in contaminated soil, did not show phytotoxicity symptoms when inoculated with the strain D16-12. This results demonstrated that the capacity of degradation and the rhizosphere colonization by these strains can protect sensitive plants in contaminated soils.



## 9. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ADRIAENS, P.; FOCHT, D. D. Evidence for inhibitory substrate interactions during cometabolism of 3,4-dichlorobenzoate by *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 85, p. 293-300, 1991.
- AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. **Australian Journal of Soil Research**, v. 33, n. 6, p. 925-942, 1995.
- AJITHKUMAR, P. V.; GANGADHARA, K. P.; MANILAL, P.; KUNHI, A. A. M. Soil inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* 3MT eliminates the inhibitory effect of 3-chloro-and 4-chlorobenzoate on tomato seed germination. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 30, n. 8/9, p. 1053-1059, 1998.
- ALEF, K.; KLEINER, D. Rapid and sensitive determination of microbial activity in soils and in soil aggregates by dimethylsulfoxide reduction. **Biology and Fertility Soil**, v. 8, p. 349-355, 1989.
- ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**: recomendações para o uso adequado em plantio direto e convencional. Londrina, IAPAR, 1985, p.179-186.



- ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. **Environment Science and Technology**, v. 30, p. 1596-1603, 1996.
- ANDERSON, D. G.; MCKAY, L. L. Simple and rapid method for isolating large plasmids DNA from lactic Streptococci. **Applied Environmental Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 549-552, 1983.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. **Microbial Ecology - Fundamentals and Applications**. 3 ed., The Benjamin/Cummings Publishing Company Inc., 1992.
- ATTAWAY, H. H.; PAYNTER, M. J. B.; CAMPER, N. D. Degradation of selected phenylurea herbicides by anaerobic pond sediment. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B17, n. 6, p. 683-699, 1982.
- BARBIERI, S. M. **Estudos da biodegradação de compostos aromáticos por linhagens bacterianas**. São Carlos, 1994, 213p. Tese (doutorado). Universidade Federal de São Carlos, UFSCar.
- BARREDA, D. G. de; LORENZO, E.; GAMÓN, M.; WALKER, A.; RAMOS, C.; SAEZ, A.; CARBONELL, E. A.; CUADRA, J. G. de la; MUÑOZ, N.; BUSTO, A. del.; LIDÓN, A. L. Persistence and leaching of some residual herbicides in uncropped soils. **Bulletin Environment Contamination Toxicology**, v. 56, p. 219-224, 1996.
- BOSCH, M.; CLOETE, T. E. The identification and classification of *Acinetobacter* strains exhibiting variations in phosphate accumulation by SDS-PAGE and numerical analysis. **Current Microbiology**, v. 27, p. 169-175, 1993.



- BOUCABEILLE, C.; BORIES, A.; OLLIVIER, P. Degradation of thiocyanate by a bacterial coculture. **Biotechnology Letters**, v. 16, n. 4, p. 425-430, 1994.
- BOUVET, P. J. M.; GRIMONT, P. A. D. Taxonomy of genus *Acinetobacter* with the recognition of *Acinetobacter baumannii* sp. nov., *Acinetobacter haemolyticus* sp. nov., *Acinetobacter johnsonii* sp. nov. and sp. nov. and emended description of *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. **International Journal Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 228-240, 1986.
- BOYLE, J. J.; SHANN, J. R. Biodegradation of phenol, 2,4-DCP, 2,4-D, and 2,4,5-T in field-collected rhizosphere and nonrhizosphere soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 24, p. 782-785, 1995.
- BROWN, W. A.; COOPER, D. G. Hydrocarbon degradation by *Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1 using the self-cycling fermentation technique. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 797-805, 1992.
- CANNA-MICHAELIDOU, S.; NICOLAOU, A. S. Evaluation of the genotoxicity potential (by Mutatox<sup>TM</sup> test) of ten pesticides found as water pollutants in Cyprus. **The Science of the Total Environment**, n. 193, p. 27-35, 1996.
- CATTELAN, A. J.; HARTEL, P. G.; FUHRMANN, J. J. Bacterial composition in the rhizosphere of nodulating and non-nodulating soybean. **Soil Science Society American Journal**, v. 62, p. 1549-1555, 1998.
- CHASE, W. R.; NAIR, M. G.; PUTNAM, A. R.; MISHRA, S. K. 2,2'-oxo-1-1'-Azobenzene microbial transformation of rye (*Secale cereale* L.) allelochemical in field soils by *Acinetobacter calcoaceticus*: III. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 8, p. 1575-1585, 1991.



- CHATTERJEE, D. K.; KILBANE, J. J.; CHAKRABARTY, A. M. Biodegradation of 2,4,5 – trichlorophenoxyacetic acid in soil by a pure culture of *Pseudomonas cepacia*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 44, p. 514-516, 1982.
- CLARKSON, N.; LEFTLEY, J. W.; MELDRUM, D. T.; WATSON, J. W. An assessment of the cage-culture turbidostat as an alternative algal bioassay. **Water Research**. v. 32, n. 4, p. 1162-1168, 1998.
- COPLEY, S.D.; CROOKS, G. P. Enzymatic dehalogenation of 4-chlorobenzoyl coenzyme A in *Acinetobacter* sp. strain 4-CB1. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 1385-1387, 1992.
- CRIPPS, R. E.; ROBERTS, T. R. Microbial degradation of herbicides. In: HILL, I. R.; WRIGHT, S. J. L. **Pesticide Microbiology**: microbiological aspects of pesticide behavior in the environment. Academic Press, London, 1978, 844p.
- CULLINGTON, J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 677-686, 1999.
- DALTON, R. L.; EVANS, A. W.; RHODES, R. C. Disappearance of diuron from cotton field soils. **Weeds**, v. 14, p. 31-33, 1966.
- DAUBARAS, D.; CHAKRABARTY, A. M. The environment, microbes and bioremediation: microbial activities modulated by the environment. **Biodegradation**, v. 3, p.125-135, 1992.
- DEMNEROVA, K.; KRALOVA, B.; McBETH, D. L. Introduction of biodegradative plasmids to indigenous bacteria from polluted sites in the Czech Republic. **International Biodeterioration & Biodegradation**, p. 311-318, 1994.



- DENTON, C. S.; BARDGETT, R. D.; COOK, R.; HOBBS, P. J. Low amount of root herbivory positively influence the rhizosphere microbial community in a temperate grassland soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 155-165, 1999.
- DEVLIEGHER, W.; SYAMSUL ARIF, M. A.; VERSTRAETE, W. Survival and plant growth promotion of detergent-adapted *Pseudomonas fluorescens* ANP15 and *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 3865-3871, 1995.
- DHAKEPHALKAR, P. K.; CHOPADE, B. A. High levels of multiple metal resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter*. **BioMetals**, v. 7, p. 67-74, 1994.
- DI CELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from the maize rhizosphere at different plant growth stages. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 4485-4493, 1997.
- DOORN, W. G.; WITTE, Y. de; HARKEMA, H. Effect of high numbers of exogenous bacteria on the water relations and longevity of cut carnation flowers. **Postharvest Biology and Technology**, v. 6, p. 111-119, 1995.
- DURAND, G.; BARCELÓ, D.; ALBAIGÉS, J.; MANSOUR, M. Utilization of liquid chromatography in aquatic photodegradation studies of pesticides: a comparison between distilled water and seawater. **Chromatography**, v. 29, n. 3/4, p. 120-124, 1990.



- ENGELEN, B.; MEINKEN, K.; VON WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of a pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic finger printing in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 8, p. 2814-2821, 1998.
- FEAKIN, S. J.; BLASKBURN, E.; BURNS, R. G. Inoculation of granular activated carbon in a fixed bed with S-triazine-degrading bacteria as a water treatment process. **Water Research**, v. 29, n. 3, p. 819-825, 1995a.
- FEAKIN, S. J.; GUBBINS, B.; MCGHEE, I.; SHAW, L. J.; BURNS, R. G. Inoculation of granular activated carbon with s-Triazine-degrading bacteria for water treatment at pilot-scale. **Water Research**, v. 29, n. 7, p. 1681-1688, 1995b.
- FEIDIEKER, D.; KÄMPFER, P.; DOTT, W. Microbiological and chemical evaluation of a site contaminated with chlorinated aromatic compounds and hexachlorocyclohexanes. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 15, p. 265-278, 1994.
- FIELD, J. A.; REED, R. L.; SAWYER, T. E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction and in-vial elution. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 45, p. 3897-3902, 1997.
- FRANKLIN, F. C. H. Molecular and functional analysis of TOL plasmid pWWO from *Pseudomonas putida* and cloning of the entire regulated aromatic ring meta cleavage pathway. **Proceedings of Academy Science. USA**, v. 78, p. 7458-7462, 1981.



- FREIRE, J. R. J. Fixação do nitrogênio pela simbiose rizóbio/leguminosas. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**. Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, Campinas, SP, 1992, p. 121-140.
- FREITAS, S. S. Rizobactérias promotoras do crescimento de plantas (RPCPs). In: Hungria, M.; Araújo, R. S. (eds.). **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa-SPI, Brasília, DF, 1994, p. 369-376.
- GALLAGHER, S. R. **GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression**. Academic Press, Inc., San Diego, California, 1992.
- GAILLARDON, P. Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon by soil. **Pesticide Science**, v. 47, p. 347-354, 1996.
- GEISSBÜHLER, H.; MARTIN, H.; VOSS, G.; Phenylureas. In; KEARNEY, P. C.; KAUFMAN, D. D. **Herbicides: chemistry, degradation and mode of action**. 2nd, edition, v. 1, Marcel Dekker, Inc. New York, 1975.
- GENNARI, M.; LOMBARDI, P. Comparative characterization of *Acinetobacter* strains isolated from different foods and clinical sources. **Zbl. Bakt.** v. 279, p. 553-564, 1993.
- GONZÁLEZ, B.; ACEVEDO, C.; BREZNY, R.; JOYCE, T. Metabolism of chlorinated guaiacols by a guaiacol-degrading *Acinetobacter junii* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 3424-3429, 1993.
- HASSINK, J.; KLEIN, A.; KÖRDEL, W.; KLEIN, W. Behaviour of herbicides in non-cultivated soils. **Chemosphere**, v. 28, n. 2, p. 285-295, 1994.



- HERNÁNDEZ, M. M. A.; VIEIRA, R. M.; URDANIVIA, M. A. Decomposición del herbicida diurón por acción de los microorganismos de um suelo ferralítico amarillento lixiviado. **Ciências de la Agricultura**, p. 97-104, 1984.
- HOUSE, W. A.; LEACH, D.; LONG, J. L. A.; CRANWELL, P.; SMITH, C.; BHARWAJ, L.; MEHARG, A.; RYLAND, G.; ORR, D. O.; WRIGHT, J. Micro-organic compounds in the Humber rivers. **The Science of the Total Environment**, v. 194/195, p. 357-371, 1997.
- HOYLE, B. L.; SCOW, K. M.; FOGG, G. E.; DARBY, J. L. Effect of carbon: nitrogen ratio on kinetics of phenol biodegradation by *Acinetobacter johnsonii* in saturated sand. **Biodegradation**, v. 6, p. 283-293, 1995.
- HUERTAS, M.; DUQUE, E.; MARQUÉS, S.; RAMOS, J. L. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 38-42, 1998.
- JACOBSEN, C. S. Plant protection and rhizosphere colonization of barley by seed inoculated herbicide degrading *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia* DB01 (pRO101) in 2,4-D contaminated soil. **Plant and Soil**, v. 189, p. 139-144, 1997.
- JONES, J. G.; EDINGTON, M. A. An ecologic survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. **Journal of Genetic Microbiology**, v. 52, p. 381-390, 1968.
- JUNI, E. Genus III. *Acinetobacter* Brison e Prevot 1954. In: KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, The Willians and Wilkins CO., Baltimore. p. 303-307, 1984.



- 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**, p. 1121-1128, 1994.
- KARNS, J. S. Molecular Genetics of pesticide degradation by soil bacteria. In: RACKE, K. D.; COATS, J. R. Enhanced biodegradation of pesticides in the environment. **ACS Symposium Series 426**, American Chemical Society, Washington, 1990.
- KARU, A. E.; SCHMIDT, D. J.; RICHMAN, S. J.; COOPER, C.; TRAN, D.; HSU, J. Validation of a monoclonal immunoassay for diuron in groundwater. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 42, p. 310-315, 1994.
- KINKENNON, A. E.; GREEN, D. B.; HUTCHINSON, B. The use of simulated or concentrated natural solar radiation for the TiO<sub>2</sub> –mediated photodecomposition of basagran, diquat, and diuron. **Chemosphere**, v.31, p. 3663-3671, 1995.
- KNIGHT, G. C.; SEVIOUR, R. J.; SODDELL, J. A.; McDONNELL, S.; BAYLY, R. C. Metabolic variation among strains of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. **Water Research**, v. 29, n. 9, p. 2081-2084, 1995.
- KOSDRÓJ, J. Survival of lux-marked bacteria introduced into soil and the rhizosphere of bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 12, p. 261-265, 1996.
- KRIEG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. Baltimore: The Willians & Wilkins Co., 1984, v.1.
- KRÝSOVÁ, H.; KRÝSA, J.; MACOUNOVÁ, K.; JIRKOVSKÝ. Photocatalytic degradation of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea] on the layer of



- TiO<sub>2</sub> particles in the batch mode plate film reactor. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 72, p. 169-175, 1998.
- LI, D. M.; ALEXANDER, M. Factors affecting co-inoculation with antibiotic-producing bacteria to enhance rhizobial colonization and nodulation. **Plant and Soil**, v. 129, p. 195-201, 1990.
- LIPPMANN, B.; LEINHOS, V.; BERGMANN, H. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I. Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. **Angewandte Botanik**, v. 69, p. 31-36, 1995.
- LIU, L.; KLOPPER, J. W.; TUZUM, S. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. **Phytopathology**, v. 85, n. 10, 1064-1068, 1995.
- LOFFHAGEN, N.; HÄRTIG, C.; BABEL, W. Fatty acid patterns of *Acinetobacter calcoaceticus* 69-V indicate sensitivity against xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 526-531, 1995.
- LOPRETTI, M. I.; MATHIAS, A. L.; RODRIGUES, A. E. Activity of ligninase peroxidase from *Acinetobacter anitratus* and the degradation of *Pinus pinaster* lignin. **Process Biochemistry**, v. 28, p. 543-547, 1993.
- LORENZ, M. G.; REIPSCHLÄGER, K.; WACKERNAGEL, W. Plasmid transformation of naturally competent *Acinetobacter calcoaceticus* in non-sterile



- soil extract and groundwater. **Archives of Microbiology**, v. 157, p. 355-360, 1992.
- LUPWAYI, N. Z.; RICE, W. A.; CLAYTON, G. W. Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. **Soil Biology Biochemistry**, v. 30, n. 13, p. 1733-1741, 1998.
- MARTINS, J. M.; MONROZIER, L. J.; CHALAMA, A.; BARDIN, R. Microbial response to repeated applications of concentration of pentachlorophenol in an alfisol under pasture. **Chemosphere**, v. 35, n. 8, p. 1637-1650, 1997.
- McCORMICK, L. L.; HILTBOLD, A. E. Microbiological decomposition of atrazine and diuron in soil. **Weeds**, v. 14, n. 1, p. 77-82, 1966.
- McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn. **Plant and Soil**, v. 173, p. 337-342, 1995.
- NAKAMURA, Y. A DNA probe suitable for monitoring genetically engineered microorganisms in the environment. **Journal of Genetic Applied Microbiology**, v. 38, p. 237-245, 1992.
- NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G. S. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater cladocerans, amphipods, midges, minnows, worms, and snails. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 35, p. 441-446, 1998.
- NEMES-KÓSA, S.; CSERHÁTI, T. Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil micro-organisms. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 79, p. 483-491, 1995.
- NEWMAN, A. Ranking pesticides by environmental impact. **Environmental Science and Technology**, v. 29, p. 324a-326a, 1995.



- NIELSEN, K. M.; BONES, A. M.; van ELSAS, J. D. Induced natural transformation of *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 10. p. 3972-3977, 1997a.
- NIELSEN, K. M.; GEBHARD, F.; SMALLA, K.; BONES, A. M.; van ELSAS J. D. Evaluation of possible horizontal gene transfer from transgenic plants to the soil bacterium *Acinetobacter caocoaceticys* BD413. **Theoretical Applied Genetic**, v. 95, p. 815-821, 1997b.
- NIELSEN, K. M.; van WEERELT, M. D. M.; BERG, T. N.; BONES, A. M.; HAGLER, A. N.; van ELSAS, J. D. Natural transformation and availability of transforming DNA to *Acinetobacter calcoaceticus* in soil microcosms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5. p. 1945-1952, 1997c.
- NITSCHKE, L.; SCHÜSSLER, W. Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants. **Chemosphere**, v. 36, n. 1, p. 35-41, 1998.
- PAL, S.; CHOWDHURY, A.; MITRA, S. R. Fate and behaviour of diuron in the soils of Cooch behar and Kalyani, West Bengal. **Indian Journal of Agricultural Sciences**, v. 55, n. 12, p. 747-750, 1985.
- PFENDER, W. Bioremediation bacteria to protect plants in pentachlorophenol-contaminated soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 25, p. 1256-1260, 1996.
- PORTIER, R. J.; HOOVER, D. G.; MILES, M. S. Microbial-assisted remediation of creosote- and pentachlorophenol-treated wood products. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 105, 1996.



- PROSSER, J. I. Molecular marker systems for detection of genetically engineered micro-organisms in the environment. **Microbiology**, v. 140, p. 5-17, 1994.
- ROBERTS, S. J.; WALKER, A.; PAREKH, N. R.; WELCH, S. J.; WADDINGTON, M. J. Studies on a mixed bacterial culture from soil which degrades the herbicide linuron. **Pesticide Science**, v. 39, p. 71-78, 1993.
- SAKAI, Y.; MAENG, J. H.; TANI, Y.; KATO, N. Use of long-chain n-Alkanes (C<sub>13</sub> – C<sub>44</sub>) by an isolate, *Acinetobacter* sp. M-1. **Bioscience Biotech Biochemical.**, v. 58, n. 11, p. 2128-2130, 1994.
- SAMSON, G.; POPOVIC, R. Use of algal fluorescence for determination of phytotoxicity of heavy metals and pesticides as environmental pollutants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 16, p. 272-278, 1988.
- SANDEY, H.; WILLETTS, A. Biotransformation of cycloalkanones: controlled oxidative and reductive bioconversions by an *Acinetobacter* species. **Biotechnology Letters**, v. 14, n. 12, p. 1119-1125, 1992.
- SANDMANN, E. R. I. C.; LOOS, M. A. Enumeration of 2,4-D-degrading microorganisms in soils and crop plant rhizospheres using indicator media; high populations associated with sugarcane (*Saccharum officinarum*). **Chemosphere**, v. 13, n. 9, p. 1073-1084, 1984.
- SAYLER, G. S.; LAYTON, A. C. Environmental application of nucleic acid hybridization. **Annual Review Microbiology**, v.44, p. 625-648, 1990.
- SCHUYTEMA, G. S.; NEBEKER, A. V. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog and african clawed frog



- embryos and tadpoles. **Archives Environmental Contamination Toxicology**, v. 34, p. 370-376, 1998.
- SESSITSCH, A.; JJEMBA, P. K.; HARDARSON, G.; AKKERMANS, A. D. L.; WILSON, K. J. Measurement of the competitiveness index of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 derivatives marked with the *gusA* gene. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 7, p. 1099-1110, 1997.
- SHELTON, D. R.; KHADER, S.; KARNS, J. S.; POGELL, B. M. Metabolism of twelve herbicides by *Streptomyces*. **Biodegradation**, n. 7, p. 129-136, 1996.
- SHIMP, J. F.; TRACY, J. C.; DAVIS, L. C.; LEE, E., HUANG, W., ERICKSON, L. E. Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials. **Critical Review in Environmental Science and Technology**, v. 23, n. 1, p.41-77, 1993.
- SMITH-GRENIER, L. L.; ADKINS, A. Isolation and characterization of soil microorganisms capable of utilizing the herbicide diclofop-methyl as a sole source of carbon and energy. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, p. 221-226, 1996.
- SPARLING, G. P.; SEARLE, P. L. Dimethyl sulphoxide reduction as a sensitive indicator of microbial activity in soil: the relationship with microbial biomass and mineralization of nitrogen and sulphur. **Soil Biology Biochemistry**, v. 25, n. 2, p. 251-256, 1993.
- STEFFAN, R. J.; ATLAS, R. M. Polymerase chain reaction: applications in environmental microbiology. **Annual Review of Microbiology**, v. 45, p.137-161, 1991.



- STEPP, T. D.; CAMPER, N. D.; PAYNTER, M. J. B. Anaerobic microbial degradation of selected 3,4-dihalogenated aromatic compounds. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, c. 23, p. 256-260, 1985.
- STREIT, W.; BOTERO, L.; WERNER, D.; BECK, D. Competition for nodule occupancy on *Phaseolus vulgaris* by *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* strains can be efficiently monitored in an ultisol during the early stages of growth using a constitutive gus gene fusion. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 8, p. 1075-1081, 1995.
- STURZ, A. V. The role of endophytic bacteria during seed piece decay and potato tuberization. **Plant and Soil**, v. 175, p. 257-263, 1995.
- SWAIN, N.; RATH, B.; ADHIKARY, S. P. Growth response of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* to herbicides and pesticides. **Journal Basic Microbiology**, v. 34, n. 3, p. 197-204, 1994.
- TATE III, R. L. **Soil microbiology**. 1ed. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, 398p.
- THOMPSON, J. A. Cellular fluorescence capacity as an endpoint in algal toxicity testing. **Chemosphere**, v. 35, n. 9, p. 2027, 2037, 1997.
- TOMLIM, C. **The pesticide manual**, 10th ed., BCPC, Farnham, Surrey, 1994.
- VASUDEVAN N.; MAHADEVAN, A. Degradation of lignin and lignin derivatives by *Acinetobacter* sp. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 70, p. 169-176, 1991.
- van VEEN, J. A.; van OVERBEEK, L. S.; van ELSAS, J. D. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 2, p. 121-135, 1997.



- VRIES, K. de; WACKERNAGEL, W. Detection of *nptII* (kanamycin resistance) genes in genomes of transgenic plants by marker-rescue transformation. **Molecular Genetics**, v. 257, p. 606-613, 1998.
- VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGLE-MURANDI, F.; BENOIT-GUYOD, J. L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three substituted phenylurea herbicides (chlortoluron, diuron, and isoproturon) by soil fungi. A comparative study. **Chemosphere**, v. 33, n. 10, p. 2045-2056, 1996.
- WALKER, A. Enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil: a simple calorimetric test for identification of rapid-degrading soils. **Pesticide Science**, v. 21, p. 233-240, 1987.
- WANG, Y. S.; MADSEN, E. L.; ALEXANDER, M. Microbial degradation by mineralization or cometabolism determined by chemical concentration and environment. **Journal Agricultural and Food chemistry**, v. 33, p. 495-499, 1985.
- WILLIAMSON, M. Environmental risks from the release of genetically modified organisms (GMOs) the need for molecular ecology. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 3-8, 1992.
- WILSON, K. J. Molecular techniques for the study of rhizobial ecology in the field. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 27, n. 4/5, p. 501-514, 1995.
- YEE, D. C.; MAYNARD, J. A.; WOOD, T. K. Rhizoremediation of trichloroethylene by a recombinant, root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain expressing toluene *ortho*-monooxygenase constitutively. **Applied and Environmental Microbiology**, v.64, n. 1, p. 112-118, 1998.



# APÊNDICE



**APÊNDICE 1.** Número total de isolados, discriminados por amostras de solos:

Solo 1 (D1)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11								
Solo 2 (D2)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	9	10	11							
Solo 4 (D4)	1	2	4	6	8	9	10	11	12	13	15								
Solo 5 (D5)	2	3	5	6															
Solo 6 (D6)	1	2	3	5															
Solo 11 (D11)	2	4	5	6	7	8	9	10											
Solo 12 (D12)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Solo 13 (D13)	3	4	5	6	7	8	10	11											
Solo 15 (D15)	1	2	3	4	5	6	8	10											
Solo 16 (D16)	1	2	3	4	6	7	9	10	12	13	14	16							
Solo 18 (D18)	4	7																	



**APÊNDICE 2.** Meios de Cultura e soluções utilizadas**Meio Mínimo**

$K_2HPO_4$	0,5g
$(NH_4)_2SO_4$	0,5g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,5g
$FeCl_2 \cdot 1H_2O$	10mg
$CaCl_2$	10mg
$MnCl_2$	0,1mg
$ZnSO_4$	0,01mg
Sol. de vitaminas	2,0ml
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Meio mineral J.E. (MM), (JONES & EDINGTON, 1968)**

$K_2HPO_4$	2g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,1g
$NaCl$	0,1g
$FeCl_3$	0,01g
$NH_4NO_3$	0,5g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Meio LB**

Triptona	10g
Extrato de lavedura	5g
$NaCl$	5g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Meio mineral M9 \***

$Na_2HPO_4$	6,0g L <sup>-1</sup>
$KH_2PO_4$	3,0g L <sup>-1</sup>
$NaCl$	0,5g L <sup>-1</sup>
$MgSO_4 \cdot 7H_2O / 0,1M$	10mL L <sup>-1</sup>
$CaCl_2$ 1M	10mL L <sup>-1</sup>
ágar	15,0g L <sup>-1</sup>



\* Fazer solução estoque:

#### Solução A

Em 1 litro:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>            60g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            30g

NaCl                    05g

#### Solução B<sub>1</sub>

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O/0,1M 10mL L<sup>-1</sup>

#### Solução B<sub>2</sub>

CaCl<sub>2</sub> 1M            10mL L<sup>-1</sup>

As soluções devem ser autoclavadas separadas.

Para fazer um litro de meio de cultura utiliza-se:

100 mL da Solução A

10 mL da Solução B<sub>1</sub>

10 mL da Solução B<sub>2</sub>

Completa-se com água e com o diuron.

#### Meio de conservação

- meio LB ou seletivo        0,85mL

- glicerol                    0,15mL

Em eppendorf autoclavado com 0,15 mL de glicerol, colocar 0,85mL de meio LB ou seletivo, após 24 horas de incubação das células bacterianas.

Conservar em congelador.

#### Solução Tampão fosfato salino com proteína

NaCl                    8,5 g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>            0,3 g

NaO<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>        0,6 g

Peptona                0,1 g

H<sub>2</sub>O destilada        1000 mL

[The page contains extremely faint, illegible text, likely bleed-through from the reverse side of the document. The text is too light to transcribe accurately.]

110  
111  
112  
113  
114  
115

116  
117

118  
119  
120  
121  
122  
123  
124

**Meio seletivo para fungo - Meio de Martin**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,0 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g
Peptona	5,0 g
Dextrose	10,0 g
Rosa bengala	0,03 g
Agar	16,0 g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

Após esterilização em autoclave adicionar estreptomicina 0,1 g L<sup>-1</sup>

**Meio seletivo para bactérias - King's B**

Proteose peptona n° 03	10,0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Glicerol	10 mL
Ágar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Meio seletivo para bactérias - Nutriente ágar**

Peptona	5,0 g
Extrato de carne	3,0 g
Ágar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

**Meio seletivo para leveduras - YMA + C + T**

Extrato de levedura	3,0 g
Extrato de malte	3,0 g
Peptona	5,0 g
Glicose	10,0 g
Ágar	15,0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000 mL

Após autoclavagem: cloranfenicol (100 mg), tetraciclina (100 mg).



**APÊNDICE 3.** Protocolo conjugação

Bactéria doadora: *Escherichia coli* S17-1/ $\lambda$ -pir

Meios de cultura e soluções utilizadas:

## 1) Meio LB:

- triptona = 10g
- extrato de levedura = 5g
- NaCl = 5g
- Ágar = 15g
- Água bidestilada = 1000 mL

## 2) meio mínimo BD

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  = 0,72g
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  = 2,8g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  = 0,5g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  = 0,04g
- NaCl = 0,4g
- $\text{NH}_4\text{Cl}$  = 1,4g
- Ágar = 30g
- Água bidestilada deionizada = 2000 mL

## 3) Solução 1 BD

- $\text{FeCl}_3$  = 6,6 mg mL<sup>-1</sup>
- EDTA = 0,15 mg mL<sup>-1</sup>

## 4) Solução 2 BD

- Thiamina HCl = 1 mg mL<sup>-1</sup>
- Ca Pantotenato = 2 mg mL<sup>-1</sup>
- Biotina = 1  $\mu\text{g}$  mL<sup>-1</sup>

5) Solução de Sacarose = 10g 100 mL<sup>-1</sup>6) Solução de Glicerol = 10 g 100mL<sup>-1</sup>7) Solução de espectinomicina = 100 mg mL<sup>-1</sup>



Etapas da conjugação:

- Preparar meio LB + espectinomicina  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  = LB/spec
- Cultivar *E. coli* S17 em LB/spec por 24 h a 37 °C
- Inocular uma colônia isolada em 5 mL de LB/spec (-ágar) e incubar por 12 h a 37 °C

Preparar meio BD com diferentes fontes de carbono

Itens 2, 3, 4 e 5.

Após esfriar:

A) BD-SACAROSE

90 mL meio BD

10 mL solução sacarose

100  $\mu\text{L}$  solução 1 BD

100  $\mu\text{L}$  solução 2 BD

Verter em placas de petri.

B) BD-GLICEROL

90 mL meio BD

10 mL solução glicerol

100  $\mu\text{L}$  solução 1 BD

100  $\mu\text{L}$  solução 2 BD

Verter em placas de petri.

REPICAR AS LINHAGENS A SEREM CONJUGADAS E A *E.coli* PARA OS DOIS MEIOS BD/SACAROSE E BD/GLICEROL.

Incubar por 24 h. Selecionar uma fonte de C onde as linhagens receptoras cresçam bem e a *E.coli* não cresça.



## A CONJUGAÇÃO:

Preparar :

5 mL LB/spec + *E.coli*, incubar 24h/37°C

5 mL LB + Linhagem receptora, incubar 48h/32°C

Em tubos para centrifugação:

- Centrifugar as células 4000 rpm/10 min.
- Remover o sobrenadante e ressuspender as células em LB
- Centrifugar novamente as células 4000 rpm/10 min.
- Remover todo o sobrenadante e ressuspender:

*E.coli* em 1 mL de meio LB

Linhagem receptora em 0,25 ml de meio LB

- Inocular 100 µL de cada suspensão de células em placas de LB, espalhar com o auxílio de uma alça de Drigalsky.
- 5 repetições
- Inverter as placas e incubar a 28°C.

## Seleção de transconjugantes marcados com GUS<sup>+</sup>

- Preparar suficientes placas de BD com a fonte de C onde somente a receptora cresça, 4 placas por repetição, adicionar solução 1 BD, solução 2 BD e ESPECTINOMICINA 100 µg mL<sup>-1</sup>.
- Com as placas cobertas com uma densa camada de células, pipetar 2 mL de H<sub>2</sub>O destilada esterilizada, ressuspender as células com o auxílio de uma alça e transferir 1,5 mL desta suspensão para tubos de Eppendorf.
- Fazer uma diluição seriada a partir da suspensão de células original = 10 X, 100 X e 1000 X.
- Plaquear 100 µL de cada diluição no meio seletivo BD + Fonte de C + espectinomicina 100 µg mL.
- Inverter as placas e incubar a 28 °C.
- Selecionar todas as colônias obtidas
- Checar as placas, o ideal é quando mostrarem de 20-50 colônias dispersas e isoladas.
- Repicar até obter colônias puras.



Detecção do gene GUS na linhagem marcada.

- Componentes:

**IPTG:** dissolver 50 mg em 1 mL de água destilada esterilizada, filtroesterilizar e estocar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Espectinomicina** =  $100\text{ mg mL}^{-1}$ , filtroesterilizada.

**X-glc:** dissolver 50 mg em 1mL de DMF (N,N-dimetilformamida) e estocar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sensível a luz e ao aquecimento.

Concentrações finais no meio de cultura:

IPTG =  $40\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$

X-glc =  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$

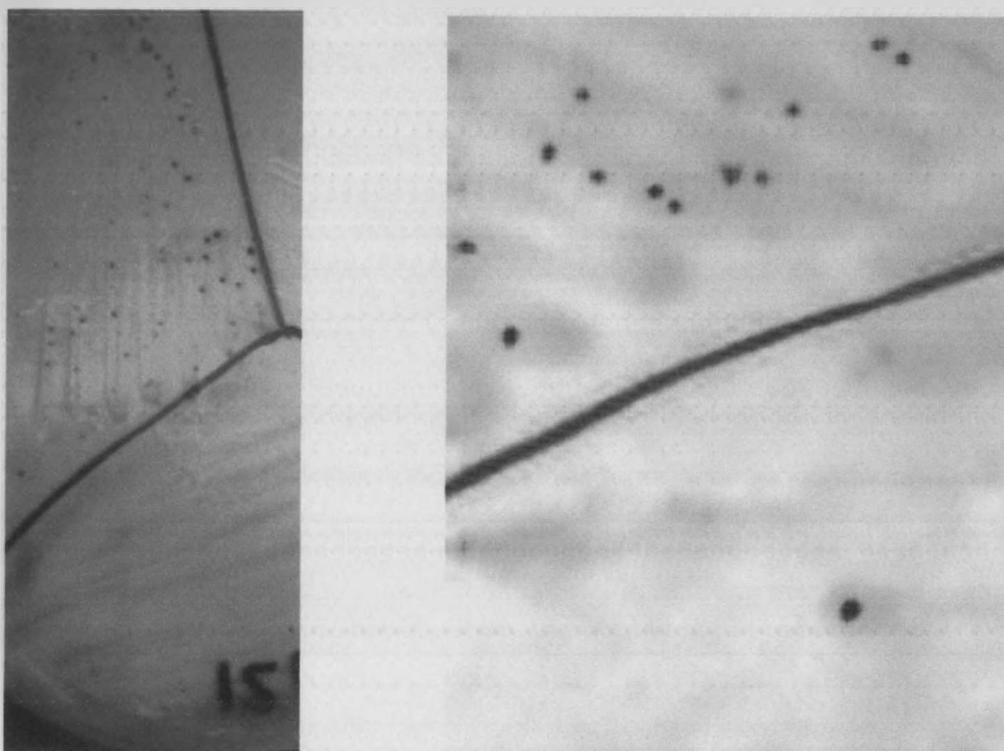
Espectinomicina =  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$

Preparar meio BD + IPTG + X-glc + espectinomicina + Fonte de C.

Repicar as linhagens marcadas para as placas.

Linhagens Gus<sup>+</sup> apresentarão colônias azuis no meio de cultura.





**Figura 13.** Recuperação da linhagem de *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> D16-12, em meio de cultura suplementado com X-glc e IPTG.

1870

1870

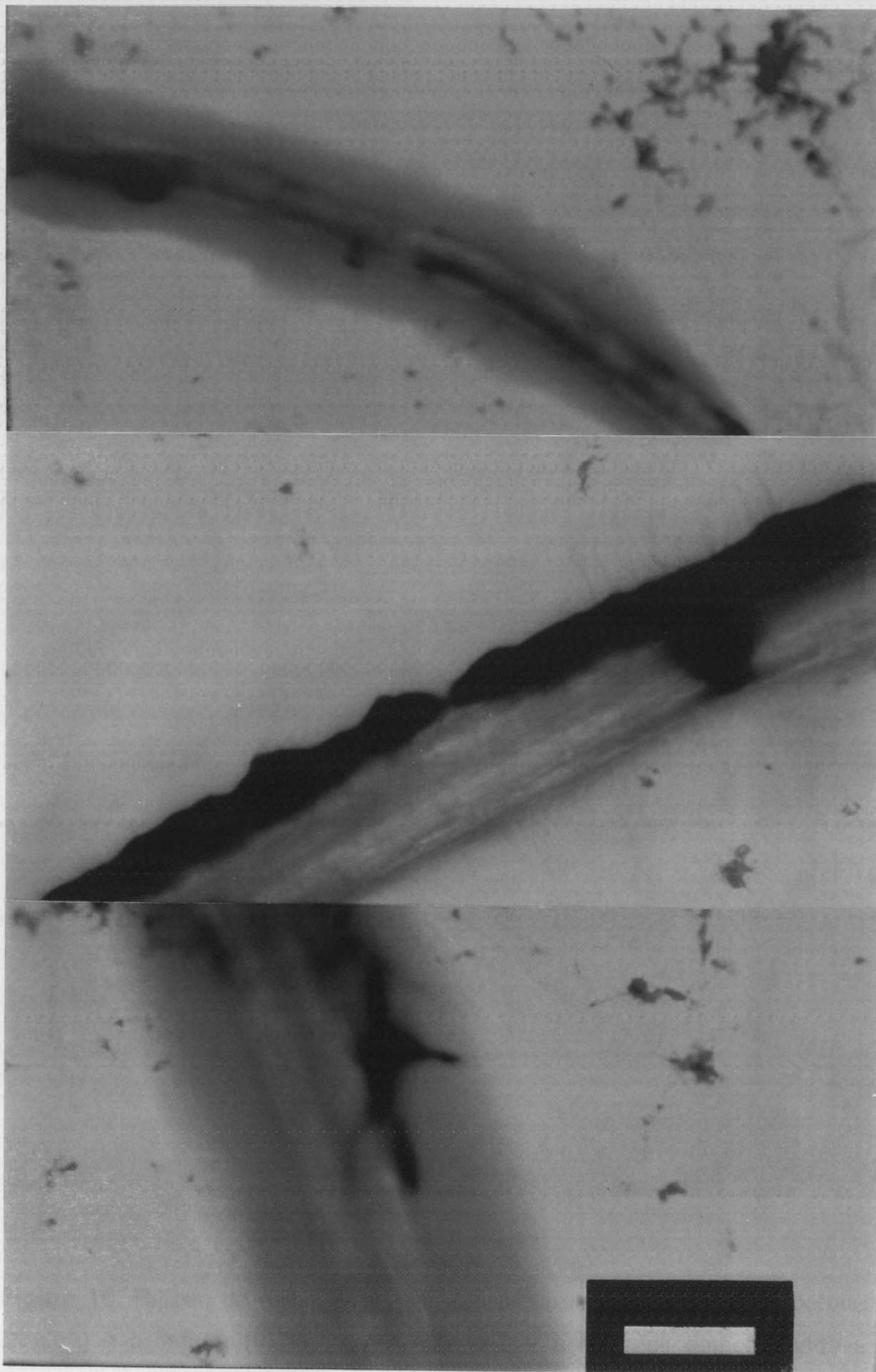
1870

1870



1870

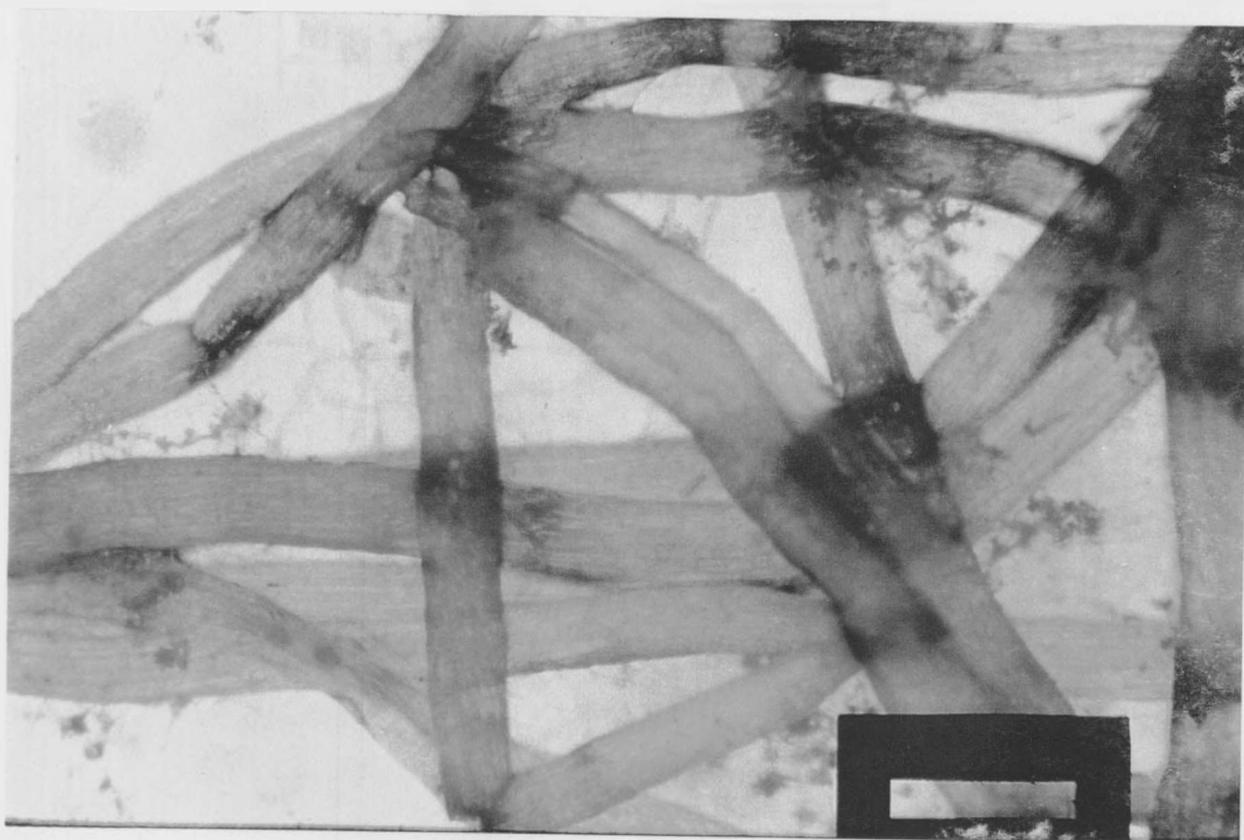
1870



**Figura 14.** Detalhes da colonização de raízes de milho por *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> D16-12, na superfície e no interior das raízes.



The following information was obtained from the  
 records of the Department of the Interior  
 and is being furnished to you for your information.  
 The information is being furnished to you for your information.  
 The information is being furnished to you for your information.



**Figura 15.** Raízes de milho incubadas em meio de cultura com o substrato (X-glcA) e o indutor (IPTG), apresentando coloração azul, demonstrando a presença do gene GUS e a distribuição da *A. baumannii* Gus<sup>+</sup> D16-12, nas raízes.



...de ...  
...  
...  
...  
...

<b>EMBRAPA</b>	
(Tese de Doutor.) <sup>437</sup>	
FICHA DO LIVRO	
AUTOR ROQUE, Milton Ricardo de Abreu	
TÍTULO: Isolamento, caracterização e ecologia de Acinetobacter baumannii degradadora...	
DEVOLVER EM	NOME DO LEITOR
14.07.00	EEB - CNPTIA

