
*Estratégias de Isolamento de
Microorganismos Envolvidos na
Degradação de Xenobióticos*

Itamar Soares de Melo e João Lúcio de Azevedo



Foto: I.S. Melo

1. Introdução

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários, entre outros.

Os estudos relativos às enzimas envolvidas no processo de biodegradação auxiliam a estabelecer correlações sobre estrutura-biodegradabilidade. Também, o isolamento pode explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo no ambiente, se catabólica (mineralização) ou cometabólica. Na mineralização, o substrato absorvido é quebrado em moléculas menores, que posteriormente serão metabolizadas por reações que geram energia. Conseqüentemente, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. A mineralização significa que a molécula é degradada completamente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal como: CO_2 , CO , H_2O , NH_3 , H_2S , HCl . É, portanto, o único meio de eliminar um composto xenobiótico do ambiente. Em alguns casos, uma porção da molécula pode ser degradada e outra porção pode se acumular no solo. Por outro lado, no cometabolismo, não há nenhum dispêndio de energia. Em geral, alta persistência no ambiente ocorre com pesticidas degradados por processos cometabólicos. No cometabolismo, o crescimento microbiano requer a presença de um outro substrato, isto é, um substrato secundário é requerido como fonte de carbono e energia. Desta forma, os microrganismos podem transformar a molécula sem dela retirar energia para o seu desenvolvimento.

Algumas características essenciais das estratégias pelas quais a microflora degrada os pesticidas são listadas por Fournier *et al.* (1993) e sumarizadas na Tabela 1.

Outros mecanismos utilizados pelos microrganismos na remoção de pesticidas são as reações de conjugação, as quais consistem na combinação da molécula do xenobiótico ou um de seus metabólitos com outros compostos como carboidratos ou aminoácidos, levando à formação de moléculas mais hidrossolúveis. O acúmulo do xenobiótico pode ocorrer dentro das células, por um processo ativo ou passivo, ocasionando uma remoção temporária da molécula do ambiente (MUSUMECI, 1992).

2. Estratégias de isolamento

Antes de passarmos a discutir sobre as etapas de isolamento de microrganismos é fundamental um amplo conhecimento sobre metabolismo microbiano,

TABELA 1. Estratégias microbianas para a degradação de pesticidas no solo.

Termo Usual	Metabolismo	Cometabolismo
Principal suporte para o crescimento	Pesticidas	Outros substratos
Número de pesticidas de interesse	Poucos	Muito
Fontes de carbono energia	Baixas quantidades mas específicas	Às vezes grandes quantidades mas alta competição com os demais microrganismo
Microflora envolvida	Poucas linhagens bacterianas específicas	Freqüentemente organismos omnívoros como os fungos
Principal problema agrícola	Adaptação à degradação após suplementação microbiana	Persistência acidental excessiva
Principal problema ambiental	Mobilidade	Excesso de pesticida ou persistência de metabólito e mobilidade

já que as tecnologias de biorremediação estão respaldadas na exploração do metabolismo microbiano que catalisam reações bioquímicas.

A biodegradação de um composto pode ser estudada de diversas maneiras. Uma delas é avaliar a atividade metabólica e dissipação do xenobiótico em condições ambientais bem definidas, sem, contudo, levar em consideração a comunidade microbiana envolvida no processo. Em contraste, colônias isoladas são usadas para identificar vias metabólicas específicas, enzimas envolvidas na transformação de moléculas e os mecanismos de controle genético.

Os processos envolvidos incluem: níveis de concentração do contaminante, metabolismo simultâneo de vários compostos, e degradação seqüencial de misturas químicas de enzimas não-específicas. Desse modo, sob condições favoráveis, microrganismos catalizam substratos complexos, fornecendo à célula C e energia. Segundo Atlas & Bartha (1981), as taxas de crescimento microbiano são, parcialmente, uma função das concentrações do substrato e da diversidade do substrato. Por exemplo, se o ambiente contém grandes quantidades de material prontamente degradável, não-tóxico, repressão catabólica pode ocorrer e por conseqüência a degradação também. Noutras circunstâncias, materiais prontamente biodegradáveis podem ser menos disponíveis e a repressão catabólica poderá ser reprimida. Em concentrações muito baixas do substrato, as taxas de crescimento microbiano tendem a ser mínima, mantendo-se o limite mínimo necessário para o metabolismo.¹

Muitos contaminantes são encontrados em concentrações extremamente baixas, as vezes, da ordem de ppb (parte por bilhão). Contudo, pode ser possível um organismo metabolizar contaminantes presentes em baixas concentrações se a população microbiana for suportada por um outro composto presente em concentrações adequadas. Por outro lado, é sabido que quando presente em altas concentrações, qualquer composto pode ser tóxico (KUNC & RYBAROVA, 1983)¹

Para propósito de biorremediação é interessante que o xenobiótico seja usado como fonte de carbono e energia para a microrganismo, que por sua vez induz à

síntese de enzimas apropriadas. Estas são, via de regra, altamente específicas, e outras não, isto é, uma dada enzima pode exibir atividade catalítica contra um análogo estrutural do composto alvo que, presumivelmente, fornece pressão seletiva para sua evolução. Mais adiante, neste capítulo, serão abordados ensaios para a seleção de microrganismos produtores de enzimas envolvidas na degradação de xenobióticos.

As estratégias básicas de isolamento de microrganismos degradadores são relativamente fáceis e diretas. As populações de microrganismos degradadores de pesticidas representam uma pequena fração da população total para muitos pesticidas. Partindo-se do princípio de que as populações microbianas capazes de metabolizar um determinado xenobiótico são encontradas em baixa frequência, estratégias especiais de isolamento devem ser adotadas para maximizar as chances de sucesso.

Amostras de solos, água, sedimentos ou de outras áreas contaminadas em que sabidamente existem microrganismos degradadores são coletadas. No caso de pesticidas, pode-se recorrer a áreas agrícolas com histórico de aplicações continuadas de determinado produto ou àquelas áreas onde se preparam as misturas de pesticidas para pulverização. Também pode-se coletar amostras de solo em regiões onde se faz tratamento de frutas com fungicidas, principalmente aqueles fungicidas protetores contra doenças que ocorrem em pós-colheita.

Certos fungos adquirem resistência a determinados fungicidas devido à pressão natural ocasionada por aplicações sucessivas. Citam-se os fungicidas sistêmicos como benomil, carbendazim, iprodione e vinclozolim, dentre outros, como os mais utilizados na agricultura e com maior número de casos de ocorrência de resistência. É possível que estes fungos possam estar utilizando o fungicida como fonte de carbono (MELO *et al.*, 1997) ou que outros fungos e actinobactérias possam, devido às constantes aplicações, estar degradando estes compostos.

Locais de tratamento de madeira que utilizam certos protetores, como PCP e creosoto, podem ser amostrados para isolamento seletivo desses compostos. Indústrias de papel e celulose podem também ser escolhidas para isolamento de microrganismos envolvidos na degradação de celulose, hemicelulose, dentre outros. Fungos ligninolíticos podem ser isolados a partir de podridões de raízes de árvores. Em virtude da natureza química complexa da lignina, muitos microrganismos degradadores desse polímero, dentre eles os basidiomicetos, têm se destacado como potentes biodegradadores de pesticidas do grupo dos organoclorados (BUMPUS *et al.*, 1985).

Um caminho mais rápido e direto é partir para o isolamento seletivo de um determinado grupo de microrganismos, sabidamente já testados como potentes agentes degradadores. Foi dentro desse enfoque que se isolou o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, agente causal da podridão branca da madeira. Esse fungo produz peroxidases que catalizam a despolimerização oxidativa da lignina.

O solo, contudo, permanece como o mais importante reservatório para o isolamento de microrganismos. A comunidade microbiana, o número e tipos de microrganismos presentes num solo em particular, são muito influenciados pela localização geográfica, temperatura, textura e estrutura, pH, conteúdo de matéria orgânica, cultivo, aeração e umidade. Por exemplo, as actinobactérias são encontradas em pequeno número em solos alagados com baixa tensão de oxigênio. Solos de florestas contêm uma predominância de *Streptomyces* que são tolerantes à acidez

(DAVIS & WILLIAMS, 1970), enquanto solos ácidos e solos alcalinos podem conter menor número de *Streptomyces* e maior número de *Actinoplanes* e *Streptosporangium*.

Como a biodegradação de muitos pesticidas tem sido aumentada na presença de raízes de plantas e exudados de raízes (HSU & BARTHA, 1979; REDDY & SETHUNATHAN, 1983; WALTON & ANDERSON, 1992) devido à grande biomassa e atividade microbiana, em função de substratos de carbono fornecidos pela rizodeposição, é possível, sem dúvida, amostrar solos rizosféricos à procura de microrganismos degradadores. Na rizosfera, análogos estruturais de vários xenobióticos presentes em exsudados, componentes de paredes celulares e lisados, assim como produtos secundários da decomposição desses materiais podem ser seletivos para microrganismos que metabolizam ou cometabolizam estes compostos xenobióticos. Nessa linha de pesquisa é que Hsu & Bartha (1979) relataram que a presença de plantas ou irrigação de solo com exsudados de raízes aumentaram a taxa de mineralização de paration em comparação a solo não cultivado. Em outro estudo, Sandman & Loos (1984) encontraram taxas mais elevadas de microrganismos degradadores de 2,4-D em solos da rizosfera de cana-de-açúcar do que em solos não-rizosféricos. Os autores explicam que os degradadores de 2,4-D parecem ter sido seletivamente favorecidos na rizosfera de cana-de-açúcar.

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

Sendo os xenobióticos substâncias orgânicas sintéticas, e, portanto, estranhas ao ambiente, eles são difíceis de serem degradados pelos microrganismos que evoluíram e adquiriram mecanismos genéticos para o catabolismo e reciclagem de produtos biossintéticos. Desse modo, a procura de microrganismos degradadores pode ser dirigida àqueles locais com problemas detectados de contaminação ou de uso intensivo de pesticidas. Porém, o insucesso no isolamento do microrganismo ideal pode estar relacionado à recalcitrância da molécula em estudo, fato este que incrementa ainda mais os problemas de poluição ambiental.

2.1 Coleta de amostras de solo

Quando o objetivo da coleta é somente o isolamento de microrganismos úteis com potencial para degradação, não é necessário, em geral, proceder à coleta de amostras representativas da área em estudo. Procedese, nesse caso, à coleta diretamente daquele local, tomando-se o cuidado de coletar pequenas sub-amostras, misturá-las e homogeneizá-las. Informações adicionais da área amostrada, tais como: tipo de solo, horizonte do solo, devem ser obtidas para referências futuras. Do mesmo modo, o transporte e armazenamento dessas amostras requerem alguns cuidados, podendo-se manter o solo à temperatura ambiente por vários meses antes do

isolamento. No entanto, as condições de armazenamento podem induzir mudanças nas populações microbianas chegando, sob condições extremas, a matar microrganismos úteis. O ideal seria manter as amostras de solo no laboratório conservando as mesmas características físicas, químicas e biológicas, tais como aquelas encontradas *in situ*. Isso é quase impossível e, assim, recomenda-se proceder ao isolamento imediatamente após as coletas ou poucos dias depois. É aconselhável, portanto, evitar o armazenamento de amostras de solo se os objetivos foram de avaliar a atividade enzimática e contagem de microrganismos. A secagem do solo durante o armazenamento resulta no aumento da acidez do solo, redução de Mn e aumento da solubilidade e oxidação da matéria orgânica (BARTLETT & JAMES, 1980).

Há evidências de mudanças na população microbiana dentro de poucas horas da amostragem e, portanto, as amostras deveriam ser analisadas dentro de, aproximadamente, 6 horas após a coleta (JENSEN, 1968). É, pois, questionável se solo armazenado mesmo em condições consideradas ótimas mantém suas propriedades. Estudos de Stotzky *et al.* (1962) mostraram que o número de microrganismos, excetuando-se actinobactérias, diminuiu após três meses de armazenamento. Já Wollum (1994), verificou que o armazenamento do solo por um período de 7 a 21 dias não alterou significativamente algumas propriedades fundamentais, tais como biomassa total, contagem de grupos microbianos específicos, N disponível e atividades enzimáticas. Desse modo, verifica-se que o armazenamento do solo a 4°C por um período curto, de até 3 semanas, no escuro, pode ser aceitável. Para minimizar as variações na aeração e conteúdo de umidade das amostras é preferível coletar grandes blocos de solo e subdividi-los em pequenas sub-amostras imediatamente antes do uso. Já para amostras de solo que serão utilizadas para análises químicas é mais satisfatório, em geral, congelar ou secar as amostras imediatamente. No entanto, há exceções como, por exemplo, no caso de análise de nitrito, em que a secagem não é recomendada. Para análise de nitrato, o solo deveria ser seco dentro de um período de 24 horas, do contrário, o nível de nitrato é aumentado durante o processo de secagem (PAUL & CLARK, 1989).

É comum acondicionar as amostras no laboratório em sacos de polietileno, os quais permitem uma razoável aeração. Para manter a umidade, estes sacos podem ser selados com outro saco, contendo algumas gotas de água (CASIDA *et al.*, 1964).

Quando o objetivo da coleta também inclui estudos sobre dinâmica de populações, biomassa de microrganismos e enumeração de microrganismos degradadores, é essencial que os procedimentos de amostragem sejam planejados a fim de que os erros de amostragem sejam minimizados. No mínimo, mais de duas amostras deveriam ser tomadas a partir de uma área e analisadas separadamente para evitar qualquer erro ocasionado pela variabilidade. Várias pequenas sub-amostras de um local são preferíveis a uma grande amostra de solo. A umidade do solo deveria ser muito homogênea. Quando a área em estudo é heterogênea, com horizontes de solos distintos, aconselha-se subdividi-la em unidades menores, mais homogêneas e analisá-las separadamente. Na impossibilidade de se processar amostras de solos trazidas do campo, é recomendado que todas as amostras sejam pré-incubadas por 5 – 7 dias em condições de laboratório antes da análise. Essa prática atenua alguns dos distúrbios associados com a amostragem, mas, no entanto, permite mensuração de situações dinâmicas.

Via de regra, amostras deveriam ser coletadas nos primeiros 5⁻¹⁰ cm do perfil do solo, já que é nesta profundidade que tem lugar a maior atividade microbiana. Se na área amostra da não se encontrar um grande número de microrganismos, pode-se recorrer ao isolamento a partir de solo rizosférico ou de raízes. É nesta zona que ocorre a maior atividade microbiana. Ademais, há preferência de certos microrganismos pelas raízes de plantas. Bactérias, em geral, são colonizadoras de raízes e são capazes de utilizar glucose, alanina, acetato etc.

Solos secos ao ar e homogeneizados devem ser peneirados através de uma peneira de 2 mm de malha. Peneiramento do solo é indicado para remover restos de material vegetal, grandes torrões de terra, pedra, diminuindo a heterogeneidade da amostra. Amostras de solo pequenas (20 gr) são preferidas devido à economia de coleta, espaço e armazenamento, mas, aumenta-se a variância da amostra, quando comparado com amostras maiores. Amostras de 50 gramas, obtidas a partir de sub-amostras compostas bem misturadas são indicadas. Uma porção do solo (1-10 g) é diluída em solução salina (0,85%) ou tampão Tris e agitada por alguns minutos, a 100-150 rpm. Uma leve agitação da mistura (solo + sol. tampão), realizada em um banho-maria ultrasônico, de baixa energia, pode ser usada para liberar microrganismos de partículas de solo.

Homogeneização mecânica do solo com auxílio de um liquidificador tem sido mais eficiente na dispersão das partículas do que a agitação em *shaker* (KANAZAWA *et al.*, 1986). Segundo Strickland *et al.* (1988), este procedimento foi mais útil para um solo altamente orgânico, devido à natureza da agregação, comparado com solos minerais. Estes procedimentos têm tido muito sucesso e são ideais para o isolamento de bactérias.

Para facilitar a liberação de microrganismos durante a agitação, Mac-Donald (1986) usou uma resina quelante de troca iônica e um detergente aniônico para quelar cátions di e polivalentes que causam floculação e evitar as interações adesivas entre as partículas do solo.

Um procedimento proposto por Hopkins *et al.* (1991) incorpora alguns passos a fim de maximizar a dispersão de agregado do solo e liberar microrganismos (Figura 1). Depois de cada etapa do processo, as células liberadas são coletadas no sobrenadante, seguindo a baixa centrifugação (500 xg por até 2 minutos). O material precipitado após cada etapa é reextraído na etapa seguinte. O sobrenadante de cada etapa constitui o extrato e o "pellete" final representa o resíduo.

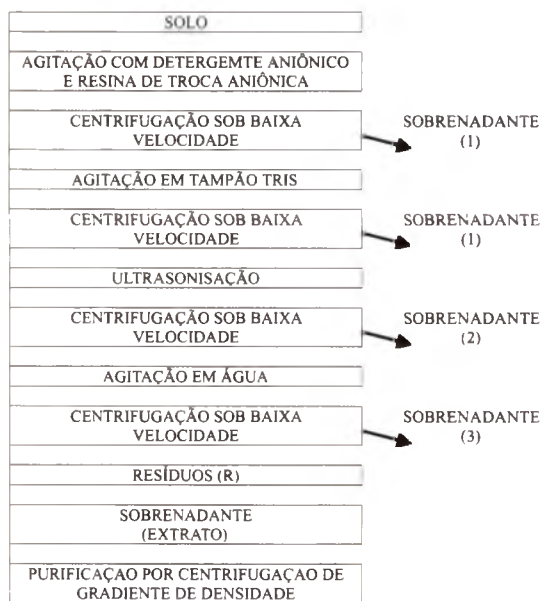


FIGURA 1. Fluxograma mostrando as etapas para máxima dispersão de agregados do solo e centrifugação diferencial proposto por Hopkins *et al.* (1991).

Existem técnicas especiais para recuperação de fungos não-esporulantes do solo. Geralmente as hifas tendem a aderir às partículas mais pesadas no solo e, nesse caso, a semeadura de 5 a 10 mg de solo diretamente na superfície do meio de cultura solidificado pode resultar em maior número de colônias.

2.2 Meios de cultivo e seleção de colônias

Existem muitos meios de cultivo seletivos e semiseletivos descritos para o isolamento de espécies individuais ou grupos de bactérias e de fungos.

Técnicas de enriquecimento do solo e suplementação do meio de cultivo com o xenobiótico em estudo têm sido usadas com sucesso para isolar microrganismos degradadores. Essas técnicas têm a vantagem de estimular os microrganismos com potencial de utilização do composto, como fonte de nutriente, dando-lhes uma vantagem seletiva em detrimento dos microrganismos mais abundantes naquele solo. Segundo Bartha (1990), o carbono orgânico utilizável se encontra em amostras do ambiente em pequenas quantidades, e no caso mais simples, o composto xenobiótico é oferecido como uma fonte seletiva de carbono e energia. O autor cita que, quando o composto xenobiótico contém outros elementos críticos tais como fósforo (inseticidas fosfatados) ou nitrogênio (aminas, anilinas, herbicidas a base de fenilamidas) estes nutrientes podem ser também utilizados como agentes seletivos o que é feito, geralmente, quando o esqueleto de carbono da molécula é resistente à mineralização. Neste caso, contudo, a fonte de carbono e energia não é o pesticida, mas outras substâncias do solo. Este é o fenômeno de “cometabolismo”.

Um problema que surge no processo de enriquecimento de solos e nos respectivos meios de isolamento é o alto grau de toxicidade, insolubilidade em água, alta volatilidade ou instabilidade térmica das substâncias xenobióticas. Um ou mais desses fatores, segundo Bartha (1990), pode evitar ou inibir o crescimento no meio de cultura de tal modo que torna-se infrutífera qualquer tentativa de isolamento. Os solventes de baixo peso molecular (clorofórmio, piridina, hexano, ciclohexano, benzeno), os aldeídos (formaldeído), os fenólicos (fenol, cresol), aminas aromáticas (anilina, benzidina), ésteres do ácido hidroxibenzóico (paraben, metilparaben) e complexos organometálicos (naftaleno cúprico, fenilmercúrio e compostos alquilmercuriais) exibem alta toxicidade aos microrganismos (BARTHA, 1990), e concentrações normais ao redor de 1% desses compostos chegam a esterilizar a amostra e destruir potenciais microrganismos degradadores. Recomenda-se, portanto, para estes compostos, adicionar às amostras de solo ou de sedimento, baixas concentrações e aplicar repetidamente. Os solventes podem ser também fornecidos como vapor/

A seleção de microrganismos em meio de cultivo requer muita habilidade por parte do técnico, no sentido de distinguir colônias degradadoras daquelas oligocarbófilas acidentais. Os meios de cultura para isolamento geralmente são compostos de uma solução de sais minerais suplementada com o composto xenobiótico em estudo, que é usado, via de regra, como fonte de carbono. Em alguns casos, a identificação de colônias degradadoras pode ser melhor visualizada através de talos ao redor das colônias. Em meio para isolamento de celulolíticos é adicionado

carboximetilcelulose, cuja hidrólise é visualizada por meio de uma zona clara ao redor das colônias, após inundar as placas com solução aquosa de 1% de brometo de amônio hexadeciltrimetil (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). Para isolamento de quitinolíticos, por exemplo, Hsu & Lockwood (1975), empregaram um meio mineral suplementado com quitina coloidal.

Um diagnóstico rápido para identificar biodegradadores é observar a mudança de cor do meio de cultura, ou talo de degradação ao redor das colônias, em função do uso de indicadores ácido-base. A viragem é causada por um processo metabólico específico de linhagens degradadoras. Um exemplo ilustrativo pode ser apresentado com o herbicida atrazina, onde usa-se o indicador vermelho de bromocresol em um meio de sais minerais com 2,4-D como única fonte de carbono e extrato de levedura como fator de crescimento (SANDMAN & LOOS, 1984). A oxidação microbiana do 2,4-D resulta na produção de HCl, que muda a cor do meio de vermelho (pH 7.0) para amarelo (pH 5.2). Desse modo, esse ou outros indicadores ácido-base como: azul de bromotimol e eosina-azul de metileno, incorporados ao meio de cultura, podem ser usados para isolamento de microrganismos degradadores de pesticidas organoclorados. Utilizando reagentes indicadores, Bordeleau & Bartha (1969) isolaram microrganismos do solo que cometabolizam anitinas substituídas e azobenzenos. Os autores recorreram ao uso de p-anisidina ou p-anisidina-H₂O₂ que foram pulverizadas sobre as colônias de-senvolvidas em meio de cultura não seletivo após incubação das mesmas. A condensação oxidativa da p-anisidina é detectada através da descoloração marrom-avermelhada das colônias. O uso de indicadores em meio de cultura facilita e agiliza a seleção de um número considerável de microrganismos degradadores, ao mesmo tempo em que simplifica as determinações através do número mais provável de microrganismos degradadores e evita as quantificações futuras de centenas de prováveis microrganismos via cromatografia.

Em muitos casos, o próprio xenobiótico, usado no meio de cultura sólido, é usado para indicar e identificar colônias degradadoras. Isolamento de *Pseudomonas* sp. degradadoras do herbicida atrazina foi feito em um meio de cultivo sólido contendo sais minerais e 0,1% de citrato de sódio como fonte de carbono e atrazina (100 ppm) como única fonte de nitrogênio (MANDELBAUMET *et al.*, 1995). Como o meio contendo atrazina torna-se opaco como resultado de partículas finas, é possível visualizar zonas claras ao redor de colônias degradadoras. Outros substratos xenobióticos podem ser testados a despeito do objetivo de trabalho em estudo, no sentido de facilitar a etapa laboriosa de seleção de potenciais agentes degradadores.

Um método padrão que tem sido usado para isolamento de microrganismos degradadores ou resistentes é proceder à mistura do solo com igual quantidade de água e agitar por aproximadamente duas horas. Deixa-se as partículas de solo precipitarem-se por aproximadamente dois minutos. O sobrenadante é usado com inóculo para suplementação (enriquecimento) de culturas em frascos Erlenmeyer contendo o meio basal de crescimento que, geralmente, é um meio mineral e vitaminas, suplementado com baixa concentração de glucose (100 mg/L⁻¹), extrato de levedura (100 mg/L⁻¹), antibióticos para impedir o crescimento de muitas bactérias e o próprio composto xenobiótico que poderá ser ainda acrescentado gradualmente aos frascos.

Verificado seu crescimento microbiano no meio de cultura, pode-se transferir 2 mL da cultura em pleno crescimento para o mesmo meio, porém sem glucose. As culturas são incubadas e, em seguida, procedesse à quantificação da utilização do substrato. Caso se observe ao microscópio células de bactérias, leveduras e actinomicetos, sugere-se fazer estrias com auxílio de uma alça de platina em placas de Petri contendo o meio de cultura apropriado para esses microrganismos.

Dependendo do grau de toxicidade e recalcitrância do composto, torna-se difícil a obtenção de microrganismos efetivos na utilização da molécula como fonte de carbono ou nitrogênio. O isolamento em duas etapas pode ser efetuado usando-se análogos de composto mais fáceis de serem degradados. Assim, uma estratégia interessante para isolamento efetivo de linhagens de *Pseudomonas* tolerantes a tolueno foi adotada por Nakajima *et al.* (1992), utilizando-se um método de seleção que consiste em duas etapas. Na primeira etapa, uma pequena quantidade de solo e 2,5 mL de p-xileno foram adicionados a 5 mL do primeiro meio de seleção (0,5% de bactotripton e 0,05% de extrato de levedura), que foi incubado aerobicamente à temperatura ambiente por 5 dias.

Microrganismos capazes de crescerem na presença de p-xileno foram obtidos em 85% das 760 amostras de solo. Exposição ao xileno parece melhorar a tolerância ao solvente orgânico para as linhagens potenciais.

Na segunda etapa, 50 µL de cada uma das 10 culturas com bom crescimento foram adicionados a 5 mL do segundo meio de seleção (1,5% de extrato de solo de jardim fervido e filtrado foi adicionado ao primeiro meio de seleção) contendo 2 mL de tolueno. Essas subculturas foram incubadas aerobicamente à temperatura ambiente por 4 dias. 50 mL de cultura foram então vertidos no segundo meio de seleção, contendo 1,5 de ágar. O ágar, vertido sobre as culturas, apresentava uma fina camada de 2 mm de tolueno. Com esse procedimento, os autores isolaram 26 linhagens de microrganismos tolerantes a tolueno.

O isolamento de microrganismos capazes de degradarem polímeros tem sido possível em laboratório. Os polímeros estão entre os compostos orgânicos mais recalcitrantes. Todavia, muitos deles, incluindo nylon, borracha vulcanizada, muitos plásticos e corantes poliméricos são suscetíveis ao ataque microbiana sob condições apropriadas. O biodegradação de corantes poliméricos, por exemplo, está relacionada ao sistema de degradação de lignina por muitos fungos. Assim, muitos fungos, principalmente os basidiomicetos, têm sido usados com sucesso para descoloração

de corantes da indústria têxtil. Enzimas envolvidas no processo de degradação de muitos corantes, como, por exemplo, Poly B-411, Poly R-478 e Remazol Brilliant Blue-R, pertencem ao sistema ligninolítico (Os capítulos 13, 14 e 16 tratam com maior profundidade sobre as enzimas envolvidos nesse processo).

A seleção de um grande número de isolados fúngicos capazes de degradar corantes poliméricos pode ser



FIGURA 2. Visualização da descoloração do corante remazol pelo fungo *Ganoderma* sp.

avaliada diretamente em placas de petri contendo meio de cultivo contendo o corante. Fungos que apresentam o sistema enzimático inespecífico atuando na degradação do corante formam halo visível de descoloração (Figura 2).

2.3 Avaliação da atividade enzimática

A presença de diversas enzimas microbianas, incluindo as pirocatecases e peroxidases, envolvidas na quebra de muitos compostos orgânicos sintéticos tem sido usado como indicador de degradação. As peroxidases, [lignina-peroxidase(LiP) e manganês-peroxidase(MnP)], por exemplo, catalisam reações na presença de peróxido de hidrogênio. Podem ser dependentes, ou não, do manganês e estão envolvidas na degradação da lignina e muitos xenobióticos. A LiP catalisa reações de degradação da lignina e poluentes aromáticos na presença de H_2O_2 . Essas reações incluem oxidação do álcool benzílico, quebra de cadeias laterais, reações de abertura de anéis aromáticos, demetilações e descolorações oxidativas. Todas elas são compatíveis com o mecanismo envolvido na degradação não-específica desta enzima. A atividade de LiP é determinada pela oxidação do álcool veratrílico.

As MnPs participam de reações de despolimerização de cloroligninas, desmetilação de ligninas e branqueamento de polpa. Tanto a LiP como a MnP têm despertado interesse por causa dos possíveis aplicações para descontaminação de efluentes e de solo. A atividade do MnP é avaliada pelo vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio.

2.3.1 Fenol – Oxidase

A obtenção de microrganismos produtores de fenol-oxidases, enzimas envolvidas na degradação de substâncias fenólicas, pode ser feita em meio de cultivo sólido contendo ácido gálico. A seleção de linhagens produtoras é acompanhada por meio do halo de intensidade da cor marrom, característica da “reação de Bavendamm” que indica a presença de fenol-oxidases (NOBLE, 1965).

As fenoloxidases são sub-divididas em duas classes: tirosinases e lacases, ambas reagem com oxigênio, não necessitando, todavia, de co-fatores. São enzimas que têm menor finalidade com os substratos do que as hidrolases.

A maioria dos substratos usados *in vitro* para medir a atividade da fenol-oxidase não é adequada para uso em amostras ambientais por causa da baixa solubilidade ou por causa de necessidade de se medir a absorbância em espectrofotômetro. Os ensaios para determinação de fenol-oxidase envolvem a oxidação de L-3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA), que pode ser medido com ou sem a adição de peróxido de hidrogênio.

A lacase (bengenediol: oxigênio oxidoreductase), uma polifenoloxidase, catalisa a oxidação via transferência de elétrons de radicais fenóis por radicais fenoxila. A especificidade da enzima ao substrato, todavia, depende da origem da lacase. Assim, lacases produzidas por fungos diferentes podem oxidar diversos substratos, incluindo, corantes fenólicos, fenóis, clorofenóis, HAPs, organofosforados, dentre outros.

2.3.2 Pirocatecases

O metabolismo do catecol pode ocorrer tanto por clivagem entre os grupos hidroxida (clivagem orto ou intradiol), como por clivagem adjacente a um dos grupos hidroxida (clivagem meta ou extradiol). Com relação à clivagem orto, algumas linhagens bacterianas que metalizam as cloroanilinas produzem altos níveis da enzima pirocatecase II, que atua na via metabólica da degradação das cloroanilinas. Por outro lado, a presença da enzima pirocatecase I está envolvida na degradação da anilina evidenciando a existência de duas enzimas isofuncionais que atuam clivando orto desses compostos aromáticos.

A avaliação de atividade da pirocatecases é baseada na formação do ácido cismucônico a partir da oxidação do catecol da metodologia de cultivo bacteriano, sonicação de células para extração intracelular e avaliação da pirocatecase podem ser encontrados em Scramin *et al.* (2003).

3. Biodegradação acelerada

A adaptação de microrganismos a muitos compostos orgânicos exerce um importante fator nas taxas de degradação. A adaptação se refere a mudanças na comunidade microbiana que, por sua vez, incrementa a taxa de transformação de um dado composto como resultado de uma exposição prévia a esse composto. Respostas adaptativas têm sido observadas em culturas puras, ambientes aquáticos, solos e aquíferos (MOORMAN, 1990). Quando os microrganismos são expostos a um determinado xenobiótico, há geralmente um período inicial de adaptação e nenhuma transformação ocorre.

Essa fase é crucial com relação à persistência do composto no ambiente, principalmente se a fase de adaptação for longa. Muitos xenobióticos onde uma fase de adaptação foi verificada são citados por Alexander (1994) e entre eles estão: herbicidas (2,4-D, Mecoprop, 4-(2,4-DB), TCA, dalapon, monuron, chlorprophan, endotal, pirazon), inseticidas (paration metílico e azinfhos metílico), compostos quaternários de amônia (cloreto de dodeciltrimetilamônio), hidrocarbonetos policíclico aromáticos (naftaleno e antraceno) e outros (fenol, 4-clorofenol, 4-nitrofenol, 1,2 e 1,4-diclorobenzeno).

Alguns compostos chegam a ter um período de adaptação extremamente curto (24 horas), como o cloreto de dodeciltrimetilamônio, outros têm um período mais longo, de seis meses, como por exemplo, os halobenzenos (LINKFIELD *et al.*, 1989). A fase de adaptação finaliza quando o início do período de biodegradação é detectado.

Estratégias genéticas e bioquímicas para adaptação e biodegradação acelerada incluem indução enzimática, mudanças de população, mutação, transferência e rearranjo de material genético. Estes mecanismos isolados ou em combinação contribuem para uma mudança nas taxas de biodegradação, observadas depois que as comunidades microbianas naturais são expostas a novos substratos. Spain & Vanveld (1983) citam que, quando compostos xenobióticos são adicionados a concentrações

abaixo de 100 ppb 000 ng/mL), as taxas de degradação podem ser mil vezes superiores em populações que são pré-expostas ao composto. Um longo período de adaptação poderia acomodar mudanças genéticas como um mecanismo de adaptação microbiana.

As informações genéticas podem ser transferidas entre populações através da transdução, transformação e conjugação, assistidas por plasmídeos. A principal forma pela qual as bactérias se adaptam aos poluentes no ambiente é através da aquisição de plasmídeos, que codificam genes envolvidos na resistência ou catabolismo.

Bactérias degradadoras de herbicidas do grupo dos carbamatoatos apresentam plasmídeos que contêm genes para degradação; linhagens sem plasmídeos não degradam esses herbicidas (TAM *et al.*, 1987; MUELLER *et al.*, 1988).

Plasmídeos são moléculas de fitas circulares de DNA que se replicam como entidades independentes do cromossomo do hospedeiro. Em geral, o tamanho dos plasmídeos varia de 1 Kb a 500 Kb (pares de base). Plasmídeos menores são mantidos em cópias múltiplas, de até 40 por organismo. Genes codificando para o metabolismo de pesticidas e outros compostos xenobióticos são freqüentemente, mas nem sempre, localizados em plasmídeos.

Plasmídeos catabólicos são principalmente encontrados em *Pseudo-monas* fluorescentes e uma característica comum desses plasmídeos é que eles são freqüentemente muito grandes. As funções especializadas desses megaplasmídeos, tais como resistência a metais pesados, são codificadas por somente pequenas porções do conteúdo total. Por exemplo, no plasmídeo pMOL30 de 240 Kb de *Alcaligenes eutrophus*, cerca de 40 Kb parecem estar envolvidos na resistência a metais pesados e 40 Kb em funções básicas como transferência, replicação e manutenção. A função da porção restante ainda não foi identificada.

Plasmídeos que codificam para degradação podem ser transferidos entre bactérias da mesma espécie e de diferentes espécies. Desse modo, estudos sobre a ocorrência e impacto das interações genéticas na comunidade microbiana são considerados de grande importância, no sentido de predizer o destino da disseminação no solo de novas combinações genéticas introduzi das.

Em geral, as falhas ou ineficiência advindas das aplicações de pesticidas para o controle fitossanitário têm sido atribuídas ao desenvolvimento de resistência dos organismos-alvo. Para muitos pesticidas, essas falhas são devidas à rápida degradação microbiana que se manifesta após aplicações continuadas do mesmo pesticida, cujo fenômeno é chamado de degradação acelerada, justamente porque tem-se verificado uma taxa mais rápida de degradação em campos agrícolas previamente tratados, do que em campos não tratados. Uma degradação acelerada por populações microbianas adaptadas tem resultado num reduzido controle de pragas (ROETH, 1986; FELSOT, 1989). Esse fenômeno tem sido verificado para muitos pesticidas suscetíveis à degradação acelerada (Tabela 2). Falha no controle de insetos por carbofuran foi verificada quando o composto foi previamente aplicado, por 2 a 4 anos (FELSOT *et al.*, 1981). O herbicida butilato é mineralizado mais rapidamente em solos que têm sido repetidamente tratados com este produto, do que em solos sem exposição prévia (SKIPPER *et al.*, 1986).

É possível também observar populações microbianas envolvidas na degradação acelerada com relação a um pesticida degradarem uma outra molécula estruturalmente similar. Esse fenômeno tem sido denominado de adaptação cruzada. (Obrigawitch *et*

TABELA 2. Relação parcial de pesticidas suscetíveis à degradação acelerada.

Pesticidas	Referências
2,4-D	Audus (1949)
Carbofuran	Felsot <i>et al.</i> (1981) 1989
Iprodione, vinclozolin	Walker (1987)
Procimidone	Slade <i>et al.</i> (1992)
Diazinon	Forrest <i>et al.</i> (1981)
Fensulfotion	Read (1983)
Isfoenfós	Racke & Coats (1990)
Butilato	Skipper <i>et al.</i> (1986)
EPTC	Tal <i>et al.</i> (1982)
Atrazina	Assaf & Turco (1994)
Trialato	Cotterill & Owen (1989)
Carbendazim, benomil	Yarden <i>et al.</i> (1985)
Aldicarb	Suett & Jukes (1993)
Diphenamid	Avidov <i>et al.</i> (1990)
Isotociamato de metila	Smelt <i>et al.</i> (1989)
Fenamifós	Davis <i>et al.</i> (1993)
Napropamide	Walker <i>et al.</i> (1996)

al. (1983) observaram que vernolato e butilato foram degradados mais rapidamente em solos com uma população microbiana adaptada ao EPTC, do que em um solo não exposto a este herbicida. Há casos, no entanto, em que a adaptação cruzada tem sido verificada com moléculas que não são estruturalmente similares. Por exemplo, populações microbianas de solos adaptadas ao herbicida trialato degradaram o herbicida EPTC em taxas aumentadas, mas também degradaram o inseticida carbofuran em taxas superiores (COTTERILL & OWEN, 1989).

Aplicações repetidas de certos pesticidas podem também acelerar a degradação dos seus produtos formados. O fungicida carbendazim, um produto da hidrólise do benomil, foi degradado mais rapidamente em solos com histórico de aplicações de benomil do que em um solo não exposto ao produto (YARDEN *et al.*, 1985). A meia vida do carbendazim foi reduzida de 11 para 4 dias em solos tratados com benomil. Do mesmo modo, carbendazim foi rapidamente degradado em solos previamente tratados com seu metabólito 2-aminobenzimidazole (AHARONSON *et al.*, 1990).

4. Avaliação da biodegradação

Tradicionalmente, os estudos de biodegradação freqüentemente envolvem o enriquecimento de culturas, seguindo-se o isolamento de culturas puras de microrganismos capazes de crescerem no xenobiótico como única fonte de carbono e energia.

Os principais problemas associados com o enriquecimento convencional incluem: 1 – isolados obtidos podem ou não ser importantes na degradação do xenobiótico em ambientes naturais pobres em nutrientes, porque a pressão de enriquecimento, submetida na fermentação das culturas a altas concentrações do composto, está relacionada às máximas taxas de crescimento específico para os vários microrganismos; 2 – alguns xenobióticos podem empreender uma degradação parcial ou extensiva por cometabolismo e, portanto, a população microbiana ativa deverá requerer um substrato para crescimento; 3 – a degradação do xenobiótico pode requerer a interação complexa de vários membros de um consórcio microbiano que, freqüentemente, conduz à tentativas frustradas para se isolar culturas puras capazes de degradar o poluente; 4 – em níveis relativamente altos do xenobiótico, geralmente empregados para culturas enriquecidas, o xenobiótico e/ou seus produtos de transformação podem ser tóxicos aos microrganismos presentes no inóculo; e 5 – interfaces ambientais, alternando mudanças na aeração ou potencial redox do ambiente e/ou gradientes podem ser necessários para promover a biodegradação.

Quase sempre, nos estudos de biodegradação de muitas substâncias orgânicas avaliadas em condições de laboratório, se valia de concentrações químicas exageradamente superiores àquelas encontradas no campo. Portanto, uma extrapolação de resultados obtidos nessas condições pode não refletir a situação real sob condições naturais. Nesse sentido, é que o uso de radioisótopos, têm possibilitado as pesquisas sobre transformação com informações seguras sobre a mineralização e/ou cometabolismo em concentrações comumente encontradas em ambientes naturais. O isótopo ^{14}C possui meia-vida de 5770 anos, permitindo a sua utilização como traçador em experimentos de longa duração. Sua desintegração se dá através da emissão de partículas beta negativas de 156 Kev de energia.

A conversão do xenobiótico ^{14}C para $^{14}\text{CO}_2$ (mineralização) serve como um indicador de biodegradação. Atualmente, são utilizados alguns métodos de estudo para quantificação das taxas de mineralização. Em todos eles a substância química radiomarcada é incubada no solo, em frascos que são continuamente amostrados. Os dois sistemas mais usados são o frasco de cal sodada e frasco de Bartha–Prammer. O CO_2 é coletado em armadilhas especiais contendo KOH 0,2M ou NaOH 0,2M ou monoetanolamina pura ou diluída em água. O dióxido de carbono desprendido é medido por espectrometria de cintilação líquida. A molécula original e os metabólitos formados devem ser determinados frente a padrões, por meio de cromatografia. Maiores detalhes sobre avaliação da mineralização são encontrados em Monteiro (2000).

5. Considerações finais

Solos, sedimentos e águas contaminadas com compostos xenobióticos são substratos adequados para isolamento de microrganismos já adaptados. Geralmente esses xenobióticos são moléculas sintéticas novas, o que fornece uma oportunidade para se estudar a evolução microbiana de novas vias de degradação.

O uso de microrganismos isolados tem a sua finalidade, em muitos casos, na biorremediação cujo objetivo é estimular o crescimento de microrganismos

indígenas ou introduzidos em áreas contaminadas e, assim, fornecer um contato direto entre microrganismos e contaminantes. Para alguns contaminantes orgânicos que podem ser usados como substratos primários, a biodegradação acelerada é mais fácil de ser alcançada. Esta, por sua vez, está ligada a constantes aplicações do mesmo ou de compostos estruturalmente similares no ambiente.

Não tem sido fácil isolar microrganismos que metabolizam compostos xenobióticos que não são persistentes no ambiente, mesmo sabendo-se da existência de microrganismos biologicamente ativos naquela área em estudo. É de se esperar que sinergismo ou cometabolismo estejam envolvidos na degradação. As técnicas de enriquecimento do solo e isolamento usando tal molécula, neste caso, não são tão eficazes. Um método alternativo seria o enriquecimento com uma substância análoga, sem, contudo apresentar os substituintes xenóforos que poderiam bloquear a biodegradação.

Ainda considerando-se a importância do cometabolismo e sinergismo na transformação de xenobióticos, os estudos de biodegradabilidade deveriam ser realizados com comunidades microbianas ou consórcio de microrganismos e não com linhagens individuais.

Referências

- AHARONSON, N.; KATAN, J.; AVIOOVE, E.; YAROEN, O. The role of fungi and bacteria in the enhanced degradation of the fungicide carbendazim and the herbicide diphenamid. In: RACKE, K.O.; COATS, R. (Ed.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.113-127 (ACS Symposium Series, 426).
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. New York: Academic Press, 1994. 302p.
- ASSAF, N.A.; TURCO, R.F. Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. **Biodegradation**, v.5, p.29-35, 1994.
- AUDUS, L.J. The biological detoxification of 2,4 - dichlorophenoxyacetic acid in soil. **Plant and Soil**, v.2, p.31-36, 1949.
- AVIOOV, E.; AHARONSON, N.; KATAN, J. Involvement of soil microorganisms in the accelerated degradation of diphenid. **Weed Science**, v.38, p.186-193, 1990.
- BARLETT, R.; JAMES, B. Studying dried, stored soil samples - some pitfalls. **Soil Science Society of America Journal** v.44, p.721-724.
- BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In: LABAOA, O.P., ed. **Isolation of Biotechnological Organisms from Nature**. McGraw Hill, 1990. p.283-307.
- BOROELAU, M.; BARTHA, R. Rapid technique for enumeration and isolation of peroxidase - producing microorganisms. **Applied Microbiology**, v.18, p.274-275, 1969.
- BUMPUS, J.A.; TIEN, M.; WRIGHT, O.; AUST, S.O. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. **Science**, v.228, p.1434-1436, 1985.
- CASIDA, L.E.; KLEIN, O.A.; SATORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v.98, p.371, 1964.
- COTTERIL, E.G.; OWEN, P.G. Enhanced degradation in soil of tri-allate and other carbamate pesticides following application of tri-allate. **Weed Research**, v.29, p.65-68, 1989.
- DAVIS, R.F.; JOHNSON, A.W.; WAUCHOPE, R.O. Accelerated degradation of fenamiphos and its metabolites in soil previously treated with fenamiphos. **Journal of Nematology**, v.25, p. 679-685, 1993.
- FELSOT, A.E.; MADDOX, J.V.; BRUCE, W. Enhanced microbial degradation of carbofuran in soils with histories of carbofuran use. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.26, p.781-788, 1981.
- FELSOT, A.S. Enhanced biodegradation of insecticides in soil: implications for agroecosystems. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.453-476, 1989.

- FORREST, M.; LORO, K.A.; WAKER, N.; WOOVILLE, H.E. The influence of soil treatments on the bacterial degradation of diazinon and other organophosphorus insecticides. **Environmental Pollut. Ser. A.**, v.24, p.93-104, 81.
- FOURNIER, J.C.; CATROUX, C.; CHARNAY, M.P.; GUNALAN, B. Behavior of soil microflora in pesticide degradation. In: MANSOUR, M. (Ed.) **Fate and prediction of environmental chemicals in soils, plants, and aquatic systems**. Boca Raton: Lewis, 1993, p.199-208.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect CX cellulose activity of microorganisms. **J. Gen. Microbiol.** v.98, n.1, p.109-115, 1977.
- HOPKINS, D.W.; MACNAUGHTON, S.J.; O'DONNELL, A.G. A dispersion and differential centrifugation technique for representatively sampling microorganisms from soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v.23, p.217-225, 1991.
- HSU, S.C.; LOCKWOOD, J.L. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. **Applied Microbiology**, v.29, p.422-426, 1975.
- HSU, T.S.; BARTHA, R. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides diazinon, parathion in the rhizosphere of the bush bean plant. **Applied and Environmental Microbiology**, v.37, p.36-41, 1979.
- JENSEN, V. The piare count technique. In: GREY, T.R.G.; PARKINSON, D. (Ed.). **The ecology of soil bacteria**. Liverpool: Liverpool University Press, 1968, p.158-170.
- KANAZAWA, S.; TAKESHIMA, S.; OHTA, K. Effects of waring blender treatment on the counts of soil microorganisms. **Soil Science and Plant Nutrition**, v.32, p.81-89, 1986.
- LINKFIELD, T.G.; SUFLITA, J.M.; TIEDJE, M. Characterization of the acclimation period before anaerobic dehalogenation of halobenzoates. **Applied and Environmental Microbiology**, v.55, p.2773-2778, 1989.
- Mac DONALD, R.M. Sampling soil microfloras: dispersion of soil by ion exchange and extraction of specific microorganisms by elutriation. **Soil Biology and Biochemistry**, v.18, p.399-406, 1986.
- MANDELBAUM, R.T.; DEBORAH, L.A.; WACKETT, L.P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sr. that mineralizes the s-Triazine herbicide Atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.61, n.4, p.1451-1457, 1995.
- MELO, L.S.; SILVA, C.M.M.S. Ocorrência de resistência a benomil em linhagens de *Colletotrichum gloeosporioides* isolados de *Orthezia praelonga*. In: **SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO**, 1996, Foz-do-Iguaçu, p.447.
- MONTEIRO, R.T.R. Biodegradação em Solos In: C.M.M.S. Silva, M.R.A. Roque e I.S. Melo (eds.) **Microbiologia Ambiental - Manual de Laboratório**. Jaguaruina: Embrapa Meio Ambiente, 2000, 98 p. (Documentos).
- MOORMAN, T.E. Adaptation of microorganisms in subsurface environmental: significance to pesticide degradation. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. ed. **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.167-180 (ACS Symposium Series, 426).
- MUELLER, J.G.; SKIPPER, H.D.; KLINE, E.L. Loss of butylate utilizing ability by a *Flavobacterium*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v.32, p.189-196, 1988.
- MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.e.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992, p.341-356.
- NAKAJIMA, H.; KOBAYASHI, H.; AONO, R.; HORIKOSHI, K. Effective isolation and identification of toluene tolerant *Pseudomonas* strains. **Bioscience, Biotechnology, Biochemistry**, v.56, n.11, p.1872-1873, 1992.
- NOBLE, M.K. Identification of cultures of wood inhabiting hymenomycetes. **Canadian Journal of Botany**, v.43, p. 1097-1139, 1965.
- OAVIS, F.L.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. In: The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. **Soil Biochemistry**, v.2, p.227-238, 1970.
- OBRIGAWITCH, T.; MARTIN, A.R.; ROETH, F.W. The influence of temperature, moisture and prior EPTC application on the degradation of EPTC in soils. **Weed Science**, v.30, p.175-181, 1983.
- PAUL, E.A.; CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1989, 275p.
- RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of insecticides in the midwestern com soil. In: KACKE, K.D.; COATS, J.R. (Ed.). **Enhanced biodegradation of pesticides in the environment**. Washington: ACS, 1990, p.68-81.
- READ, D.C. Enhanced microbial degradation of carbofuran and fensulphothion after repeated applications to acid mineral soil. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v.10, p.37-46, 1983.

- REDDY, B.R.; SETHUNATHAN, N. Mineralization of parathion in the rice rhizosphere. **Applied and Environmental Microbiology**, v.45, p.826-829, 1983.
- ROETH, F.W. Enhanced herbicide degradation in soil with repeat application. **Review of Weed Science**, v.2, p.45-65, 1986.
- 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.
- SKIPPER, H.D.; MURDOCK, E.C.; GOODEN, D.T.; ZUBLENA, J.P.; AMAKIRI, M.A. Enhanced herbicide biodegradation in South Carolina soils previously treated with butylate. **Weed Science**, v.34, p.558-563, 1986.
- SLADE, E.A.; FULLERTON, R.A.; STEWART, A.; YOUNG, G.H. Degradation of the dicarboximide fungicides iprodione, vinclozolin and procymidone in patimahoe clay loam soil New Zealand. **Pesticide Science**, v.35, p.427-438, 1992.
- SMELT, J.H.; CRUM, S.J.H.; TEUNISSEN, W. Accelerated transformation of the fumigant methyl isothiocyanate in soil after repeated application of metham-sodium. **Journal of Environmental Science and Health**, v.24, p.437-455, 1989.
- SPAIN, J.C.; VAN VELO, P.A. Adaptation of natural microbial communities to degradation of xenobiotic compounds: effects of concentration, exposure time, inoculum and chemical structure. **Applied and Environmental Mycology**, v.45, n.2, p.428-435, 1983.
- STRICKLANO, T.C.; SOLLINS, P.; SCHIMEL, O.S.; KEARLE, E.A. Aggregation and aggregate stability in front and range soils. **Soil Science Society of America Journal**, v.52, p.829-833, 1988.
- SUETI, O.L.; JUKES, A.A. Stability of accelerated degradation of soil applied insecticides: laboratory behaviour of aldicarb and carbofuran in relation to their efficacy against cabbage root fly in previously treated field soils. **Crop Protection**, v.12, p.431-442, 1993.
- TAL, A.; RUBIN, B.; KATAN, J.; AHARONSON, N. Fate of 14C-EPTC in a soil exhibiting accelerated degradation of carbamothioate herbicides and its control. **Weed Science**, v.37, p.434-439, 1989.
- TAM, A.C.; BEHKI, R.M.; KHAN, S.U. Isolation and characterization of an s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate-degrading *Anthrobacter* strain and evidence for plasmid-associated s-ethyl-N,N-dipropylthiocarbamate degradation. **Applied and Environmental Microbiology**, v.53, p.1088-1093, 1987.
- WALKER, A. Further observations on the enhanced degradation of iprodione and vinclozolin in soil. **Pesticide Science**, v.21, p.219-231, 1987.
- WALKER, A.; WELCH, S.J.; ROBERTS, S.J. Induction and transfer of enhanced biodegradation of the herbicide napropamide in soils. **Pesticide Science**, v.47, p.131-135, 1996.
- WALTON, B.T.; ANOERSON, T.A. Plant-microbe treatment systems for toxic waste. **Current Opinon in Biotechnology**, v.3, p.267-270, 1992.
- WOLLUM, G.A. Soil sampling for microbiological analysis. In: WEAVER, R.W.; ANGLE, J.S.; BOTTOMLEY, P.S. (Ed.). **Methods of soil analysis: microbiological and biochemical properties**. Madison: Soil Science Society of America, 1994, pt.2, p.2-13.
- YARDEN, O.; KATAN, J.; AHARONSON, N.; BEM-YEPHET, Y. Oelayed and enhanced degradation of benomyl and carbendazim in desinfested and fungicide treated soil. **Phytopathology**, v.75, p.763-767, 1985.