



# UFAL

**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

## **PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE BACTÉRIAS DE SOLO TOLERANTES A HERBICIDAS COM POTENCIAL PARA SUA DEGRADAÇÃO E PROMOÇÃO DE CRESCIMENTO VEGETAL**

**KELLY FERNANDA SEÁRA DA SILVA**

**ORIENTADORA: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Ana Maria Queijeiro López**

**MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS**

**Abril, 2015**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**

Campus A.C. Simões

Tabuleiro do Martins

57072-970 - Maceio-Al

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA-PPGQB**

**PROSPECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE  
BACTÉRIAS DE SOLO TOLERANTES A HERBICIDAS COM  
POTENCIAL PARA SUA DEGRADAÇÃO E PROMOÇÃO DE  
CRESCIMENTO VEGETAL**

**KELLY FERNANDA SEÁRA DA SILVA**

Tese apresentada ao Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, para obtenção do Título de Doutor em Ciências – área de concentração: Biotecnologia.

**ORIENTADORA: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Maria Queijeiro López**

**MACEIÓ, ESTADO DE ALAGOAS**

**Abril, 2015**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

- S586p Silva, Kelly Fernanda Seára da.  
Prospecção e identificação molecular de bactérias de solo tolerantes a herbicidas com potencial para sua degradação e promoção de crescimento vegetal / Kelly Fernanda Seára da Silva. – 2016.  
112 f.: il.
- Orientadora: Ana Maria Queijeiro López.  
Tese (doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2016.
- Bibliografia: f. 95-110.  
Apêndice: f. 111-125.
1. Microorganismo do solo. 2. Auxina. 3. Biodegradação. 4. Diuron.  
4. Fosfato. 5. Isoxaflutole. 6. Sulfentrazone. I. Título.

CDU: 543:579.222

*Dedico este trabalho a minha família.*

## **AGRADECIMENTOS**

*A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) e a S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, pela concessão da bolsa de estudos e financiamento deste projeto;*

*A Professora Dra. Ana Maria Queijeiro López, por todos esses onze anos de dedicação, orientação, paciência, senso de justiça e incentivo. Por seus valorosos conselhos e amizade. Apesar das minhas deficiências, em especial nos dois últimos anos, sempre se mostrou atenta e disposta a ajudar, por mais que eu criasse dificuldades para isso. Agradeço, sobretudo pelo voto de confiança que me deu um dia.*

*A Dra. Verônica Viana Vieira da Coleção de Bactérias do Ambiente e Saúde Fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz, pela inestimável colaboração na identificação molecular dos isolados apresentados neste estudo.*

*Às Mestres Elane Cristina Lourenço dos Santos e Amanda Lys dos Santos Silva, bem como aos demais colegas que passaram pelo Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA), pelos anos de companheirismo, momentos de trabalho e descontração ao longo dos últimos onze anos, apoio e ensinamentos compartilhados, mesmo quando não reconheci.*

*A todos que conheci na S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, em especial ao Cícero Augusto Bastos de Almeida, Valdir Gomes Costa, Allan Henrique Pedrosa, José Alexandre dos Santos Ramalho e Danielson dos Santos, por serem exemplo de profissionalismo, humildade, cooperação para o trabalho em equipe, e terem sempre sido muito prestativos, mesmo quando não solicitei.*

*Ao Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, e professores das disciplinas cursadas, pela estrutura física concedida e pelos ensinamentos transmitidos, em especial a professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino, coordenadora do curso no início do meu doutorado.*

*A todos que, direta ou indiretamente contribuíram para a execução deste trabalho.*

*Devemos promover a coragem onde há medo, promover o acordo onde existe conflito, e inspirar esperança onde há desespero... Quando eu saí em direção ao portão que me levaria à liberdade, eu sabia que, se eu não deixasse minha amargura e meu ódio para trás, eu ainda estaria na prisão.*  
*(Nelson Mandela)*

## RESUMO

---

---

O Brasil é o líder mundial em produção de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.), classificando-se entre os maiores fabricantes, consumidores e exportadores de açúcar e álcool combustível no mercado internacional. A produção vegetal é totalmente dependente do solo, da água, de minerais essenciais e de fitohormônios, sendo fundamental a preservação de tais recursos. No solo, microrganismos podem atuar na degradação de compostos utilizados para a proteção das culturas agrícolas além de auxiliarem no crescimento vegetal, como na solubilização de fosfatos e na produção de ácidos orgânicos e auxinas. Formulações a base de bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCVs) resultam em aumento da produção agrícola e são uma ferramenta ecoeficiente de manejo, em especial em solos degradados ou que receberam durante muitos anos grande carga de xenobióticos como herbicidas, que podem afetar várias formas de vida além dos organismos alvo. Este estudo visou: 1) isolar e identificar espécies bacterianas de solo com cultivo de cana-de-açúcar superior a 40 anos, capazes de tolerar altas concentrações dos três dos principais herbicidas com alta persistência utilizados nessa cultura (diuron, sulfentrazone e isoxaflutole); 2) avaliar a cinética de crescimento dos isolados selecionados em meio mínimo contendo diferentes concentrações dos herbicidas testados; 3) analisar o potencial desses isolados em solubilizar fosfato e produzir ácido-indol-acético; 4) verificar o efeito de isolados selecionados sobre a germinação e pré-emergência de plântulas de milho. Entre os 96 isolados obtidos, 4 foram selecionados por sua capacidade de se desenvolver em meio mínimo mineral sólido contendo até 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  destes herbicidas como fonte de carbono, e degradarem *in vitro* diferentes compostos orgânicos, entre eles alguns recalcitrantes. Estes foram identificados como *Bacillus toyonensis*, *Alcaligenes faecalis*, *B. megaterium*, *Lysinibacillus macroides*, sendo que os dois últimos apresentaram melhor tolerância e degradação dos três herbicidas (especialmente a 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). *B. megaterium* e *A. faecalis* foram capazes de solubilizar altas concentração de fosfato insolúvel e também produzir auxina na presença dos herbicidas. Porém, apenas *L. macroides* favoreceu a germinação de sementes de milho na presença de isoxaflutole e sulfentrazone. Estudos de outras variáveis são necessários, inclusive de formulações e consórcios de tais microrganismos, antes de recomendar-se sua utilização em processos de remediação de solos com resíduos de herbicidas, entre outros problemas, e para promoção de crescimento vegetal.

**Palavras-chave:** auxina, biodegradação, diuron, fosfato, isoxaflutole, sulfentrazone.

## ABSTRACT

---

---

Brazil is the world leader in production of sugarcane (*Saccharum* spp.), being ranked among the top manufacturers, consumers and exporters of sugar and ethanol in the international market. Plant production is totally dependent on soil, water, essential minerals and phytohormones, being essential to preserve these resources. In soil, the microorganisms can degrade compounds used for protecting agricultural crops, as well as assist in plant growth, as in the solubilization of phosphates and production of organic acids and auxins. Formulations based on plant growth-promoting bacteria (PGPB) result in increased agricultural production and are an eco-efficient tool of management, especially in soil that is degraded or has received a xenobiotic load for many years, which may affect several forms of life beyond the target organisms. This study aimed to: 1) isolating and identifying bacterial species of land cultivated for more than 40 years with sugarcane, able to tolerate high concentrations of three of the main herbicides with high persistence used on this crop (diuron, sulfentrazone and isoxaflutole); 2) evaluate the growth kinetics of selected isolates on minimal medium containing high concentrations of herbicides; 3) analyze the potential of these isolates in solubilize phosphate and produce indole acetic acid; 4) evaluate the effect of selected isolates on germination and pre-emergence corn seedlings. Among the 96 isolates obtained, four were selected for their ability to grow on solid minimal medium containing up to 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  of these herbicides as a carbon source, and for degrading different organic compounds, including some recalcitrant, *in vitro*. They were identified as *Bacillus toyonensis*, *Alcaligenes faecalis*, *B. megaterium* and *Lysinibacillus macroides*, with the latter two show better tolerance and degradation of the three herbicides (especially 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). *B. megaterium* and *A. faecalis* were able to solubilize high concentrations of insoluble phosphate, and they also produce auxin in the presence of herbicides. However, only *L. macroides* favored corn seed germination in the presence of isoxaflutole and sulfentrazone. Studies of other variables are needed, including of formulations and consortia of such microorganisms, before recommending their use to the remediation of soil with residues of herbicides, among other problems, and to promote plant growth.

**Key-words:** Auxin, biodegradation, diuron, isoxaflutole, phosphate, sulfentrazone.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Vantagens e desvantagens de diferentes níveis de testes de ecotoxicidade de agroquímicos. (Fonte: Adaptado de BROCK et al., 2000).....	08
<b>Figura 2-</b> Fórmula estrutural do Diuron. (Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2015).....	13
<b>Figura 3-</b> Via de degradação aeróbica do diuron e seus metabólitos (Fonte: BRITISH GEOLOGICAL SURVEY, 2005).....	15
<b>Figura 4-</b> Fórmula estrutural do Isoxaflutole. (Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2015).....	16
<b>Figura 5-</b> Passos iniciais na degradação isoxaflutole (IFT). Dicetonitrila (DKN) e ácido benzóico (BA) são abreviações para 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluorometilfenil)propan-1,3-diona e ácido 2-metil-4-trifluorometilbenzóico, respectivamente.	17
<b>Figura 6-</b> Fórmula estrutural de sulfentrazona . (Fonte: TORONTO RESEARCH CHEMICALS, 2015) .....	18
<b>Figura 7-</b> Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas.....	27
<b>Figura 8-</b> Esquema dos sítios de coleta de solo (a, b e c) próximos a lavoura canavieira e lagoas da estação de tratamento de efluentes (ETE) da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe – AL), com poços de monitoramento de águas subterrâneas (PMX,PMY,PMZ) e canais de captação de água para irrigação .....	28
<b>Figura 9-</b> Aspecto do local de coleta do solo próximos a lavoura canavieira da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe – AL). <b>a)</b> Ponto SG (saída de águas da lagoa G), <b>b)</b> PR (próximo ao canal PR) e <b>c)</b> Ponto ASG (anterior à saída de águas da lagoa G).....	29
<b>Figura 10-</b> Reação de redução parcial ou total do corante Resazurina em células vivas....	34
<b>Figura 11-</b> Ensaio para a avaliação da ação de bactérias (tolerantes a herbicidas e capazes de degradar compostos lignocelulolíticos, peróxido ou ureia), sobre a germinação e crescimento de plântulas de milho em papel de filtro embebido ou não com solução de um dos herbicidas estudados (100 µg.mL), sob condições de câmara escura a $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 7 dias.....	37
<b>Figura 12-</b> Percentual de bactérias capazes de tolerar diferentes concentrações de um dos três herbicidas testados do total de isoladas de solo argissolo amarelo distrófico distrófico abrupto fragipânico (10 cm de profundidade da superfície do horizonte A), com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil).....	39

<b>Figura 13-</b> Percentual de bactérias capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis, do total de isolados de solo (horizonte A) Argissolo Amarelo distrófico abrupto fragipânico, com histórico de 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas) tolerantes a altas concentrações de um dos herbicidas diuron, sulfentrazona e isoxaflutole.....	40
<b>Figura 14-</b> Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) de produtos de PCR (amplicons) do gene 16S rRNA dos quatro isolados bacterianos (dois deles em duplicata) obtidos de solos cultivados por longo tempo com cana de açúcar e selecionados pela tolerância a herbicidas e espectro de enzimas extracelulares. Colunas: L1 – APF.SG3 ( <i>Bacillus megaterium</i> ); L2 e L3- Papio.G2 ( <i>Alcaligenes faecalis</i> ); L4 – ACO.GLA Diu ( <i>Lysinibacillus macroides</i> ); L5 e L6 – ACO.PR1 Isox ( <i>Bacillus toyonensis</i> ); Coluna 7= Marcador Molecular (100, 200, 400, 800, 1200 e 2000 pb).....	45
<b>Figura 15-</b> Crescimento do isolado <i>Bacillus toyonensis</i> ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazona como fonte principal de carbono.....	51
<b>Figura 16-</b> Crescimento do isolado <i>Bacillus megaterium</i> ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazona como fonte principal de carbono.....	52
<b>Figura 17-</b> Crescimento do isolado ACO.G1a Diu ( <i>Lysinibacillus macroides</i> ) ao longo do tempo de cultura submersa em meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazona como fonte principal de carbono. ....	53
<b>Figura 18-</b> Crescimento do isolado Papio.G2 ( <i>Alcaligenes faecalis</i> ) ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazona como fonte principal de carbono.....	54
<b>Figura 19-</b> a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado <i>Bacillus megaterium</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	56

<b>Figura 20-</b> a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado <i>Lysinibacillus macroides</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	57
<b>Figura 21-</b> a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado <i>Bacillus toyonensis</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	58
<b>Figura 22.</b> a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) -emanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado <i>Alcaligenes faecalis</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados (10 µg.mL <sup>-1</sup> ). .....	59
<b>Figura 23-</b> Conteúdo de proteínas totais (eq. µg ASB.mL <sup>-1</sup> ) em cultura submersa em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas (10 µg.mL <sup>-1</sup> ), de: a) <i>B. megaterium</i> ; e b) <i>L. macroides</i> .....	61
<b>Figura 24-</b> Conteúdo de proteínas totais (eq. µg ASB.mL <sup>-1</sup> ) em cultura submersa em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas (10 µg.mL <sup>-1</sup> ), de:.a) <i>A. faecalis</i> ; e b) <i>B. toyonensis</i> .....	62
<b>Figura 25-</b> Conteúdo de uréia (µg.mL <sup>-1</sup> ), em caldo nutriente (1% da concentração original) com diuron (10 µg.mL <sup>-1</sup> ), ao longo do tempo de cultivo das quatro bacterias tolerantes a herbicidas selecionadas.....	63
<b>Figura 26-</b> Densidade Ótica (560 nm) e pH ao longo do tempo de cultivo dos isolados <i>B. megaterium</i> e <i>B. toyonensis</i> capazes de liberar uréia em caldo nutriente (1% da concentração original) contendo diuron (10 µg.mL <sup>-1</sup> ).....	63

<b>Figura 27-</b> Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazone em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado <i>B. megaterium</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10 µg.mL <sup>-1</sup> desse herbicida.....	64
<b>Figura 28-</b> Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazone em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado <i>B. toyonensis</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10 µg.mL <sup>-1</sup> desse herbicida.....	65
<b>Figura 29-</b> Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazone em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado <i>L. macroides</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10 µg.mL <sup>-1</sup> desse herbicida.....	65
<b>Figura 30-</b> Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazone em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado <i>A. faecalis</i> em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10 µg.mL <sup>-1</sup> desse herbicida.....	66
<b>Figura 31-</b> Aspecto da colônia e do halo de solubilização produzido pelo isolado <i>Bacillus megaterium</i> , tolerante a herbicidas e decompositor de lignocelulose, em meio contendo fósforo insolúvel (5mg.mL <sup>-1</sup> ) sem herbicida (controle). a) Meio de cultivo sem revelador; b) Meio acrescido de púrpura de bromocresol.....	68
<b>Figura 32-</b> Concentração de fosfato (mg.mL <sup>-1</sup> ) após 72 e 96 h de cultivo dos quatro isolados microbianos estudados em caldo NBRIP + herbicidas (100 µg.mL <sup>-1</sup> ) .....	69
<b>Figura 33-</b> Aspecto do crescimento dos isolados bacterianos selecionados em caldo Czapeck acrescido de L-triptofano, após 30 min da adição do reagente Salkowsky para detecção de ácido indol-acético (AIA). O teste negativo apresenta coloração amarelada, enquanto na presença de AIA o reagente torna a cultura vermelho-alaranjada. C= controle, SG3= <i>Bacillus megaterium</i> ; PR1= <i>B. toyonensis</i> ; G1a= <i>Lysinibacillus macroides</i> e G2= <i>Alcaligenes faecalis</i> .....	71
<b>Figura 34-</b> Desenvolvimento de radículas e mesocótilos estiolados de plântulas de milho ( <i>Zea mays</i> ) sete dias após a disposição das sementes em folhas de papel de filtro umedecidas em solução aquosa (100 µg.mL <sup>-1</sup> ) de sulfentrazone, depois de serem previamente embebidas (24 h) em suspensões aquosas dos isolados: 1) <i>B. megaterium</i> ; 2) <i>A. faecalis</i> ; 3) <i>B. toyonensis</i> ; e 4) <i>L. macroides</i> .....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Dinâmica/destino de agroquímicos no ambiente (Fonte: PIERZYNSKI, SIMS, VANCE, 1994).....	07
<b>Tabela 2-</b> Estimativa do produto interno bruto do setor sucroenergético na safra 2013/14 (Fonte: elaborada pela Markestrat a partir de diversas fontes, <i>apud</i> NEVES & TROMBIN, 2014).....	10
<b>Tabela 3-</b> Propriedades físico-químicas dos herbicidas diuron, isoxaflutole e sulfentrazone (Fonte: USEPA-Pesticides, 1995; 1996; 2001; ANVISA, s/d).....	12
<b>Tabela 4-</b> Aspectos morfo-bioquímicos dos quatro isolados bacterianos tolerantes as altas concentrações de três herbicidas e capazes de degradar compostos lignocelulolíticos, peróxido ou ureia, provenientes de solo argissolo amarelo distrófico, com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil).....	43
<b>Tabela 5-</b> Análise do sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de solo com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil) e selecionadas por serem tolerantes a altas concentrações de três herbicidas e capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis em meio sólido.....	46
<b>Tabela 6-</b> Diâmetros médios (mm) das colônias com ou sem halos e índices de solubilização (IS) de culturas dos isolados estudados de <i>B. megaterium</i> e <i>A. faecalis</i> em meio de cultura sólido contendo fósforo insolúvel ( $5\text{mg.mL}^{-1}$ ) e diferentes concentrações de herbicidas, após 7 dias de incubação.....	67
<b>Tabela 7-</b> Variação do pH ao longo do tempo em culturas submersas (caldo NBRIP) das estirpes bacterianas selecionadas, na presença de fosfato insolúvel ( $0,5\text{ mg.mL}^{-1}$ ) e um dos herbicidas estudados ( $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ ). .....	70
<b>Tabela 8-</b> Efeito sobre a germinação de sementes de milho tratadas (24 h) com suspensão aquosa de bactérias tolerantes a altas concentrações de herbicidas (diuron, isoxaflutole e sulfentrazone), e incubadas por sete dias sobre papel de filtro previamente umedecido em soluções aquosas desses produtos, em condições de temperatura ambiente, no escuro.....	73

**Tabela 9-** Efeito sobre parâmetros de pré-emergência de plântulas etioladas a partir de sementes de milho tratadas (24 h) com suspensão aquosa de bactérias tolerantes a altas concentrações de herbicidas (diuron, isoxaflutole e sulfentrazone), e incubadas por sete dias sobre papel de filtro umedecido com soluções aquosas desses produtos, em condições de temperatura ambiente, no escuro..... 75

## LISTA DE ACRÔNIMOS, SIGLAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

AIA	Ácido Indol Acético
AN	Agar Nutriente
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASB	Albumina de soro bovino
ATP	Adenosina Trifosfato
BA	Ácido Benzóico
BPCPs	Bactérias Promotoras do Crescimento de Plantas
BPCVs	Bactérias Promotoras do Crescimento Vegetal
CAS	Chemical Abstracts Service
CONAB	Companhia Nacional de Abastecimento
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
COT	Carbono Orgânico Total
DCA	3,4-dicloroanilina
DCMPU	3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia
DCPU	3,4-diclorofenilureia
DDT	diclorodifeniltricloroetano
DCN (DKN)	Dicetonitrila
DMS	3-desmetilsulfentrazona
dNTPs	Dinucleotídeos
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade Ótica
DQO	Demanda Química de Oxigênio
HMS	3-hidroximetilsulfentrazone
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis
IFT	Isoxaflutole
IS	Índice de Solubilidade
Meio J.E.	Meio Jones & Edington
MS	Ministério da Saúde
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NBRIP	National Botanical Research Institute's phosphate growth medium

OIT	Organização Internacional do Trabalho
OMS	Organização Mundial da Saúde
P	Fósforo
PGPB	plant growth-promoting bacteria
POA	Processos Oxidativos Avançados
QA	Quinona A
QB	Plastoquinona
rRNA	Ácido ribonucléico ribossomal
SCA	Ácido sulfentrazone-carboxílico
s/d	Sem data
TMPP	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>p</i> -fenilenediamino
USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	REVISÃO.....	4
2.1.	Agroquímicos.....	4
2.2.	A influência do uso de agroquímicos no cultivo de cana-de-açúcar.....	9
2.1.	Diuron.....	13
2.2.2.	Isoxaflutole.....	16
2.2.3.	Sulfentrazone.....	18
2.4.	Degradação microbiana de agroquímicos.....	20
2.5.	Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV) .....	24
3.	OBJETIVOS.....	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1.	Coleta de solo com antigo cultivo de cana-de-açúcar para isolamento de microrganismos .....	27
4.2.	Meios de cultivo para isolamento e manutenção de microrganismos.....	29
4.2.1.	Ágar nutriente (AN) .....	29
4.2.2.	Meio mínimo Jones & Edington (J.E.) líquido e sólido.....	29
4.3.	Isolamento de microrganismos de solo tolerantes a três herbicidas.....	29
4.4.	Avaliação da tolerância/degradação de agroquímicos.....	30
4.5.	Caracterização morfo-cultural e bioquímica dos microrganismos das linhagens tolerantes a altas concentrações dos herbicidas estudados.....	30
4.5.1.	Aspectos morfológicos.....	30
4.5.2.	Aspectos bioquímicos/fisiológicos.....	30
4.5.3.	Identificação molecular (análise das sequências do gene 16s rRNA) das linhagens selecionadas (mais tolerantes a altas concentrações dos herbicidas e capazes de degradar peróxido, uréia, celulose ou fenóis) .....	31
4.6.	Cinética de crescimento de bactérias tolerantes (meio líquido) aos herbicidas testados, em cultivo líquido em diferentes concentrações.....	32
4.6.1.	Conteúdo de matéria orgânica oxidável (demanda química de oxigênio).....	33
4.6.2.	Conteúdo de proteínas totais.....	34
4.6.3.	Avaliação da toxicidade dos herbicidas pelo método da resazurina.....	34

4.6.4.	Conteúdo de ureia em meio contendo o herbicida diuron.....	35
4.6.5.	Conteúdo de sulfentazona por espectrofotometria.....	35
4.7.	Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos selecionados em meio con- tendo diferentes concentrações de herbicidas.....	36
4.8.	Avaliação dos isolados selecionados frente a síntese de ácido indol-acético.....	36
4.9.	Bioensaio para avaliação da ação das bactérias selecionadas sobre a germinação e crescimento de plântulas etioladas de milho.....	37
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1	Isolamento e identificação de microrganismos tolerantes a herbicidas em solo de cultivo antigo de cana-de-açúcar .....	38
5.2.	Caracterização morfo-cultural e bioquímica das linhagens tolerantes a altas concentrações dos herbicidas estudados capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis.....	40
5.3	Identificação molecular (análise das sequencias do gene 16s rRNA) das linhagens selecionadas.....	44
5.4	Crescimento das bactérias tolerantes previamente selecionadas em meio sólido em cultura submersa contendo diferentes concentrações dos herbicidas estudados	49
5.4.1.	Cinética de crescimento, conteúdo de matéria orgânica oxidável, proteínas totais e atividade de desidrogenase em culturas submersas contendo herbicidas.....	55
5.4.2.	Conteúdo de ureia em meio contendo o herbicida diuron.....	63
5.4.3.	Conteúdo de sulfentazona por espectrofotometria.....	64
5.5.	Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos selecionados em meio con- tendo diferentes concentrações de herbicidas.....	66
5.6.	Avaliação dos isolados selecionados frente a síntese de ácido indol-acético.....	70
5.7.	Bioensaio para avaliação da ação das bactérias selecionadas sobre a germinação e o crescimento de plântulas etioladas de milho.....	72
6.	<b>CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>79</b>
7.	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>

## 1. INTRODUÇÃO

---

---

Conforme dados da FAOSTAT (2015), o Brasil é principal produtor mundial de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*), destacando-se ainda, no mercado internacional, entre os maiores fabricantes, consumidores e exportadores dos subprodutos principais dessa cultura, isto é, açúcar e álcool combustível (SATOLO & BACCHI, 2009; MARIN & NASSIF, 2013). As estratégias de aumento da produtividade dessa planta, como para outras, esbarra no conhecimento de todos os aspectos que favoreçam seu vigor, entre eles, a fertilidade do solo (ROSSETO, DIAS, VITTI, 2008).

O solo e a água são recursos ambientais indispensáveis à sobrevivência da vida no planeta Terra, sendo a produção vegetal totalmente dependente destes, além de nutrientes minerais essenciais, como fósforo, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cloro, ferro, magnésio, zinco, cobre, molibdênio e níquel. O fósforo (P), como por exemplo fosfato ( $\text{HPO}_4^{2-}$ ), é um componente integral de importantes compostos da planta, incluindo glicídios-fosfato (glicose 6P, Frutose 6P, etc.), fosfolipídios de membranas, nucleotídeos usados como fonte de energia (ATP) e nos ácidos nucleicos (HOPKINS, 2000), sendo um dos elementos mais críticos para o crescimento vegetal (SIQUEIRA *et al.*, 2004), e se encontra em baixa quantidade nos solos brasileiros (BASTOS *et al.*, 2008).

Os principais fatores que afetam a disponibilidade de P no solo são o teor de matéria orgânica, o tipo de argila, a capacidade de troca de cátions, o poder tampão, os teores de cálcio, ferro e alumínio e a umidade interferindo, conseqüentemente, na sua absorção pelas plantas (KORNDÖRFER & MELO, 2009). Esta condição proporciona redução na saturação por bases, com aumento gradual na retenção de ânions, como o fosfato, o sulfato e o molibdato, entre outros (BENEDITO *et al.*, 2010). Em decorrência disto, os solos mudam gradualmente de fonte para dreno de fósforo inorgânico (NOVAIS & SMYTH, 1999). Na cana-de-açúcar, a falta de fósforo diminui o enraizamento e perfilhamento, as folhas velhas apresentam-se menores e com tons avermelhados (acúmulo de antocianina) nas pontas e

margens expostas a luz, e os colmos tornam-se menores e finos, e, portanto, há redução na produtividade final e no rendimento de açúcar (SANTOS, 2009). A deficiência de fósforo também é problemática, pois, segundo MAHADEVIAIAH *et al.* (2007), reduz a absorção de nitrogênio e dificulta a clarificação do caldo durante a fabricação do açúcar, elevando o custo de fabricação em virtude da necessidade de adição de fosfatos solúveis para atingir o teor ideal de  $P_2O_5$ , fundamental para uma clarificação eficiente.

Bactérias e fungos de solo geralmente são bastante eficazes na solubilização de fosfato devido a diferentes mecanismos, tais como a produção e secreção de ácidos orgânicos (GYANESHWAR *et al.*, 2002) e de outras substâncias que aumentam a dissolução do fosfato, tais como auxinas, ácido giberélico, vitaminas e outros hormônios, bem como de enzimas que aumentam a liberação de fosfato orgânico (HE *et al.*, 2002). Segundo MOREIRA & SIQUEIRA (2006), a utilização de bactérias promotoras do crescimento de plantas (BPCPs) será, provavelmente, uma das táticas menos onerosas, sustentáveis e importantes para o aumento da produção agrícola nas próximas décadas.

Ao longo dos anos, entretanto, o ambiente passou a receber uma enorme carga de poluentes a partir do descarte de esgotos domésticos ou industriais, resíduos de toda ordem provenientes da fabricação de algo útil à sociedade e lançados proposital ou acidentalmente (ASHRAF *et al.*, 2014). A modernização dos sistemas de produção agrícola, em especial da agricultura intensiva para elevar o rendimento de alimentos, por exemplo, lançou mão da utilização de várias estratégias (RIBAS & MATSUMURA, 2009), como substâncias sintéticas chamadas agroquímicos (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008; STEFFEN *et al.*, 2011). O mercado brasileiro desses produtos expandiu-se rapidamente na última década (190%), num ritmo de crescimento maior que o dobro do apresentado pelo mercado global (93%), situando-se desde 2008 em primeiro lugar no *ranking* mundial (RIGOTTO *et al.*, 2014).

Embora os agrotóxicos/defensivos agrícolas (agroquímicos utilizados no controle de pragas, doenças e ervas daninhas) sejam desenvolvidos/aprimorados visando potencializar seus diferentes grupamentos químicos de forma a erradicar ou inibir especificamente certos tipos de insetos, animais, plantas ou fungos em áreas agrícolas ou urbanas, muitos podem ser tóxicos a outros alvos (VEIGA *et al.*, 2006), especialmente porque, sendo muitos solúveis em água, tornam-se prevalentes nos sistemas hídricos superficiais e subterrâneos do mundo todo. A lixiviação dessas moléculas ou de seus metabólitos para camadas mais profundas do solo leva a contaminação do lençol freático, de modo que o comportamento do agroquímico será influenciado, entre outros fatores, pelas suas próprias características (PIRES *et al.*, 2003). Os processos de retenção, por exemplo, são resultantes da interação entre o princípio ativo e a

partícula do solo, e podem retardar ou acelerar o movimento do produto em diferentes profundidades, influenciando, dessa forma, na sua disponibilidade e associação com outros mecanismos, principalmente os relacionados a transformações químicas (catálise, fotoquímica), bioquímicas (ação de microrganismos) e a erosão. Os agroquímicos, portanto, apresentam diferentes graus de mobilidade, persistência (transformação e retenção) no solo, e potenciais tóxicos (mutagênico, teratogênico, carcinogênico ou algum efeito endócrino) a diversos organismos não alvos, inclusive o ser humano (ARMAS *et.al.*, 2007), podendo representar um problema de saúde pública quando permanece por mais tempo no solo sem ser adsorvido a seus coloides ou sem ser degradado e/ou mineralizado, visto que a possibilidade de lixiviação é maior.

Por outro lado, nas últimas décadas houve um aumento significativo da preocupação mundial referente às questões ambientais, sobretudo em relação à qualidade da água potável e a sanidade do solo. Há, portanto, certa urgência no controle da poluição desse ambiente, visando preservar sua fertilidade e elevar a produtividade agrícola (SILVA *et al.*, 2009). É sabido que muitos compostos químicos podem ser degradados por microrganismos através de seu complexo arsenal enzimático, e esse conhecimento tem proporcionado o uso direto desses em processos de remediação de solos e águas. A técnica tem se traduzido numa alternativa bastante ecoeficiente para reverter o quadro de ambientes contaminados por moléculas recalcitrantes.

O propósito deste trabalho foi avaliar o potencial de espécies microbianas isoladas de solo com cultivo de cana-de-açúcar superior a 40 anos, capazes de tolerar três dos principais herbicidas com alta persistência e solubilidade em água (Diuron, Sulfentrazone e Isoxaflutole) e frequentemente utilizados no mesmo, para solubilizar fosfato e produzir uma auxina reguladora do crescimento vegetal.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

---

### 2.1. Agroquímicos

Desde seu surgimento, a agricultura mundial cresceu em área de plantio, pois os vegetais cultivados passaram por modificações genéticas que auxiliaram sua adaptação a diferentes locais sem consequentes perdas da produtividade. O aprofundamento gradativo do conhecimento sobre o meio permitiu, aos poucos, o avanço no manejo das culturas, maior oferta de alimentos e melhora da dieta humana. No entanto, o crescimento acelerado da população, o aumento da urbanização das cidades, o grande desenvolvimento industrial e a intensa expansão das atividades agrícolas com uso de agroquímicos, especialmente os herbicidas, inseticidas e fungicidas, têm impactado acentuadamente o ambiente (LOPES-ASSAD & ALMEIDA, 2004) e a saúde humana (DE MIRANDA *et al.* 2007), sendo esta última responsável direta pela alteração de mais de um terço da superfície terrestre e seus respectivos biomas (ROSA, 1998).

A principal vantagem da utilização de agroquímicos em plantações é o controle eficaz de elementos nocivos às mesmas com crescimento da produção, suprimindo assim grande parte da demanda mundial. Em contrapartida, o uso indiscriminado dos mesmos tem provocado contaminação de águas, solos e produtos de consumo humano (TESFAMICHAEL & KALUARACHCHI, 2006).

Segundo o Decreto 4.074/2002, que regulamenta a Lei 7.802/1989, em seu artigo 1º, inciso IV, “agroquímicos são substâncias e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias de produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” (BRASIL, MAPA, 2002).

No início do século XIX, compostos inorgânicos à base de metais como cobre, enxofre

e mercúrio, eram utilizados na Europa para combater doenças causadas por fungos em hortaliças. Além destes, outros compostos a base de arsênico, selênio e chumbo, que caracterizaram a primeira geração de agroquímicos, foram aplicados no combate a pragas de plantas até o início do século XX, quando, então, devido a sua elevada toxicidade, foram substituídos (ALVES FILHO, 2002). Orgânicos contendo metais pesados diminuem a fertilidade e biodiversidade, exercendo pressão de seleção sobre a vegetação existente e até sua extinção (STEFFEN *et al.*, 2011), sendo que além de não biodegradáveis (COSTA *et al.*, 2004), estes elementos são bioacumuláveis.

Por pressão de ambientalistas, muitas moléculas novas foram sintetizadas ao longo dos anos, apresentando características físico-químicas com funcionalidades (toxicidade) e comportamentos ambientais (ecotoxicidade) distintos (ARMAS *et al.*, 2005). Alguns dos critérios mais comuns para classificação da toxicidade dos agroquímicos são baseados nos: (i) tipos de alvos preferenciais sobre os quais atuam (inseticidas, acaricidas, herbicidas, fungicidas, nematicidas, bactericidas, rodenticidas, entre outros); (ii) na categoria química a que pertencem (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, triazinas, etc); (iii) no grau de toxicidade aguda sobre os seres vivos, maior (classe I) ou menor (classe IV) (FERMAM, 2009).

Na década de 1960, o modelo de agricultura industrializada intensiva que se disseminara durante o período pós-guerra nos países ditos desenvolvidos, foi exportado para outros em desenvolvimento, que, num esforço para aumentar sua produtividade (Revolução Verde), incentivaram o uso de agroquímicos através de serviços de extensão rural (LEHTONEN, 2009) e subsídios agrícolas (DASGUPTA *et al.*, 2007; EVENSON & GOLLIN 2003; SILVA *et al.*, 2005). Daí o uso indiscriminado dessas substâncias ter se tornado mais problemático nesses países, visto que seus agricultores não receberam orientações institucionais suficientes para garantir a segurança tanto na manipulação quanto no lançamento, afetando ainda o meio ambiente e os consumidores dos produtos de origem animal e vegetal (SCHREIBER *et al.*, 2013). Além disso, o clima quente e úmido geralmente predominante nos países emergentes favorece a maior incidência de pragas e doenças, aumentando a necessidade de agroquímicos, de modo que embora consumam apenas 20% do mercado global dessas substâncias, registram cerca de 70% dos casos de intoxicação mundial (DE MIRANDA *et al.* 2007).

A agricultura brasileira é um grande mercado para os agroquímicos, sendo que enquanto em 2013 esse setor da indústria química mundial faturou cerca de US\$ 51,9 bilhões (PANIGRAHI, 2014), a participação brasileira nesse mercado foi de cerca de 20%, isto é,

US\$ 11 bilhões, sendo suprido principalmente por produtores globais (FREITAS, 2014). No Brasil, o registro de agrotóxicos não tem prazo de validade, porém, segundo o Decreto MAPA nº 4.074/2002 (BRASIL, 2002), cabe ao Ministério da Saúde, por meio da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), junto com o Ministério do Meio Ambiente, por meio do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a importante tarefa de revalidar o registro dos princípios ativos utilizados em agrotóxicos no país. Esta deve ocorrer quando houver indícios da ocorrência de riscos à saúde, comparados aos riscos avaliados à época da concessão do registro de determinado princípio ativo ou, ainda, quando o Brasil for alertado por organizações internacionais responsáveis pela saúde, alimentação ou meio ambiente, das quais o país seja membro integrante ou signatário de acordos.

Segundo sugerem os estudos da OIT (Organização Internacional do Trabalho) o mau uso de agroquímicos provoca 14% dos acidentes de trabalho na agricultura e, em alguns países, até 10% das mortes (BRODESSER *et al.*, 2006). A OMS (Organização Mundial da Saúde) estima que, na década de 1990, entre 3 a 5 milhões de pessoas em todo o mundo sofreu com a contaminação por agroquímicos a cada ano (DE MIRANDA *et al.*, 2007), e, especial por lançamento em locais inadequados, como áreas de recarga de aquíferos e proximidades de rios e nascentes, de compostos aromáticos halogenados que apresentam alto grau de toxicidade e persistência (HENN, 2009).

Assim, a partir da aplicação do agroquímico, independente de que forma, este atinge o solo, seguindo diferentes rotas e interferindo na dinâmica dos ecossistemas (STEFFEN *et al.*, 2011). A dispersão deste e/ou seus metabólitos pode inativar enzimas e assim bloquear processos vitais como os de oxidação e geração de energia, iniciar alterações malignas nas células, acumular-se ao longo da cadeia alimentar por meio de biomagnificação, e afetar um desequilíbrio na simbiose natural entre duas ou mais espécies (SOARES & PORTO, 2007).

As propriedades físico-químicas dos agroquímicos, bem como a quantidade e a frequência de uso, métodos de aplicação, características bióticas e abióticas do meio, incluindo condições climáticas, determinarão seu destino (KLINGMAN; ASHTON; NOORDHOFF, 1982). Essas condicionais variam com o produto e com a forma de aplicação, não sendo suficientes para estabelecer um modelo de comportamento ou de interações com as partículas do solo e outros componentes do ambiente, a menos que se conheçam os processos de transporte, transformação e transferência, como velocidade de evaporação, solubilidade em água e bioacumulação (RIBAS & MATSUMURA, 2009, TANG *et al.*, 2012). Sua persistência no ambiente depende, portanto, da eficiência dos processos físico-químicos e

biológicos de sua transformação (MIZUBUTI; MAFFIA, 2006). Seus metabólitos também podem representar um perigo sanitário e ambiental, já que alguns desses são muitas vezes, mais tóxicos que os produtos originais (GRÜTZMACHER *et al.*, 2008).

O impacto de agroquímicos como, por exemplo, herbicidas, em águas subterrâneas e superficiais (drenagem, percolação lateral, escoamento superficial e subsuperficial, erosão ou volatilização), depende da concentração do princípio ativo disponível para transporte e degradação (Tabela 1) (SILVA *et al.*, 2009; TOMITA & BEYRUTH, 2002) e dos processos de biodegradação e sorção que influenciam nesse destino (REGITANO *et al.*, 2006).

**Tabela 1-** Dinâmica/destino de agroquímicos no ambiente.

<b>Processo</b>	<b>Consequência</b>	<b>Fatores</b>
<b>Transferência (processo que realoca a molécula sem alterar a sua estrutura)</b>		
Deriva Física	Movimento pela ação do vento	Velocidade do vento, tamanho das gotas;
Volatilização	Perda por evaporação do solo, da planta ou do ecossistema aquático	Pressão de vapor, velocidade do vento, temperatura;
Adsorção	Remoção pela interação com plantas, solo e sedimento.	Conteúdo mineral e matéria orgânica, tipo de mineral, umidade;
Absorção	Absorção pelas raízes ou ingestão animal	Transporte pela membrana celular, tempo de contato, suscetibilidade;
Lixiviação	Translocação lateral e vertical através do solo	Conteúdo de água, macroporos, textura do solo, conteúdo do mineral e de matéria orgânica;
Erosão	Movimento pela ação da água e do vento	Chuva, velocidade do vento, tamanho das partículas do mineral e da matéria orgânica com moléculas adsorvidas;
<b>Degradação (processo que altera a estrutura química)</b>		
Fotoquímica	Quebra da molécula devido a absorção de luz solar	Estrutura química, intensidade e duração da luz solar, exposição
Microbiana	Degradação microbiana	Fatores ambientais (pH, umidade, temperatura), conteúdo de matéria orgânica, condições nutricionais;
Química	Alteração por processos químicos como hidrólise e reações de oxidação-redução	Alto ou baixo pH e fatores ambientais;
Metabolismo	Transformação química após a absorção pelas plantas e animais	Capacidade de ser absorvido, metabolizado e bio-interagir

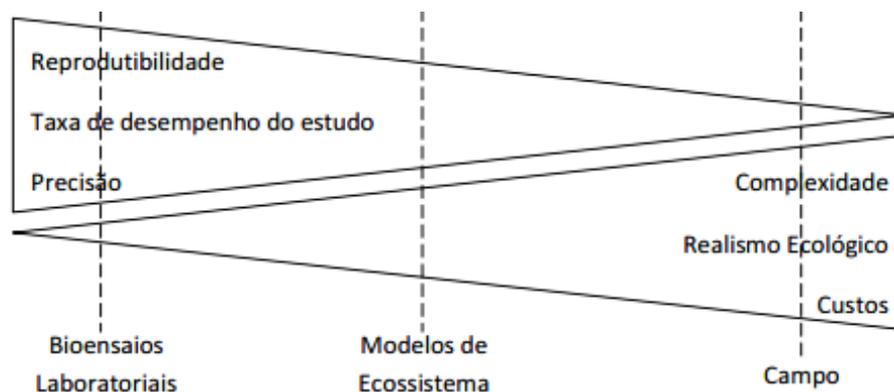
Fonte: PIERZYNSKI, SIMS, VANCE, 1994.

Herbicidas, portanto, provocam alterações não apenas na ciclagem de nutrientes no solo quando interferem no desenvolvimento de bactérias fixadoras de nitrogênio responsáveis

pela disponibilização desse mineral às plantas (CARLOS *et al.*, 2013), mas igualmente nos ciclos hidrológicos, com redução no volume de água disponível (UETA *et al.*, 1999), e constituindo-se uma das maiores preocupações em escala local, regional, nacional e global (KONSTANTINO *et al.*, 2006). O risco de ocorrência de agroquímicos nas águas subterrâneas também evidencia a necessidade de estudos de seus processos de lixiviação e de escoamento superficial (CEDERNEIRA *et al.*, 2005). De acordo com ARMAS *et al.* (2007), o caráter tóxico desses compostos é reflexo de grupos funcionais raros na natureza com propriedades distintas, o que confere diferentes graus de persistência ambiental, mobilidade e potenciais tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico ou algum efeito endócrino a diversos organismos, inclusive organismos não alvos, como o homem.

Nas últimas décadas, uma grande variedade de testes de toxicidade aquática tem sido desenvolvida e utilizada para determinar os efeitos colaterais provocados por agroquímicos, na estrutura e no funcionamento dos ecossistemas de água doce. Estes testes podem ir desde bioensaios de laboratório relativamente simples, a estudos de campo mais complexos. Nos bioensaios de laboratório, a toxicidade dos agroquímicos é avaliada geralmente com apenas uma espécie, sendo estes bastante precisos e eficientes. Por outro lado, estes são frequentemente contestados com o argumento de que utilizam número limitado de espécies e não reproduzem exatamente o ambiente real da espécie. Por outro lado, ao avaliar o destino e efeitos dos agroquímicos em condições de campo, a noção mais precisa da realidade ocorre, mas tais estudos são dispendiosos e dificultam a determinação das relações causa-efeito à medida que se tornam mais complexos. Outros testes utilizados para avaliar tal toxicidade são os modelos de ecossistema (microcosmos e mesocosmos), considerados uma ponte entre os bioensaios e os ensaios de campo, na medida em que permitem a replicação, são facilmente controláveis e fornecem realismo ecológico (Daam & Van den Brink, 2011) (Figura 1).

**Figura 1-** Vantagens e desvantagens de diferentes níveis de testes de ecotoxicidade de agroquímicos.



(Fonte: Adaptado de BROCK *et al.*, 2000).

No que se refere à contaminação dos recursos hídricos, e conseqüentemente da potencial presença destas substâncias químicas na água destinada ao consumo humano, existem divergências quanto à concentração máxima permissível dos agrotóxicos. Os países da Comunidade Européia consideram que a concentração máxima admissível (CMA) de um agrotóxico individual na água potável é de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$ , porém, se considerar-se a soma de todos os agrotóxicos detectados, esta não deve ultrapassar  $0,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Limites semelhantes são adotados por outros países, tais como Estados Unidos e Canadá (FILIZOLA *et al.*, 2002).

No Brasil, foi estabelecida, através da publicação da Portaria MS nº 36/1990, a obrigatoriedade do monitoramento de agrotóxicos na água destinada ao consumo humano. Tal diretriz continuou a ser disposta nas Portarias subsequentes: MS nº 1469/2000, MS nº 518/2004 e na vigente MS nº 2.914/2011 (BRASIL, 1990, 2000, 2004 e 2011). A Portaria MS nº 518/2004 (BRASIL, 2004) estabeleceu limites de alguns agroquímicos para o padrão de potabilidade de água destinada ao abastecimento de populações humanas. A Resolução CONAMA nº 357/2005 (BRASIL, 2005), por sua vez, estabeleceu limites máximos de contaminantes em águas dependendo da sua destinação; sendo que, dentre estes, estão alguns organoclorados, organofosforados e carbamatos. De acordo com a Portaria MS nº 2.914/2011, que dispõe sobre os procedimentos de controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, o plano de amostragem de agroquímicos deve considerar a avaliação dos seus usos na bacia hidrográfica, no manancial de contribuição, bem como a sazonalidade das culturas. Contudo, conforme já relatara Dores & De-Lamonica-Freire (2001), tais legislações ainda não contemplam a maioria dos pesticidas em uso, como muitos inseticidas piretróides e a maioria dos herbicidas.

## **2.2. A influência do uso de agroquímicos no cultivo de cana-de-açúcar**

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) tem especial significado econômico para o Brasil, que lidera a lista dos 80 países produtores, sendo sozinho responsável por 25% da produção mundial. Entre os dez maiores produtores de cana do mundo, oito são países emergentes ou em desenvolvimento, sendo a Austrália (8º) e os Estados Unidos da América (10º) os únicos países industrializados entre eles (LEHTONEN, 2009).

Segundo levantamento recente da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2014), a área brasileira cultivada com cana-de-açúcar e destinada a atividade sucroalcooleira na safra 2014/15 é de aproximadamente 9.130.100 ha, distribuída em todos Estados produtores. Os especialistas admitem que essa área representa um aumento de 3,6% (cerca de 318,7 mil ha) em relação à safra 2013/14, justamente refletindo o acréscimo de 4,5% (345,5

mil hectares) no território de plantio da Região Centro-Sul do país, em especial nos Estados de São Paulo (144,3 mil ha), Mato Grosso do Sul (57,9 mil ha), Goiás (59,9 mil ha) e Paraná (58,3 mil ha), o que compensou o decréscimo de 2,5% (26,9 mil ha) no cultivo de cana da Região Norte/Nordeste. Tal aumento deve-se não apenas a implantação de novas usinas sucroalcooleiras no país, mas também a permanência de cana que não foi colhida na safra anterior, isto é, a cana bisada (CONAB, 2014), sendo a produção total de cana-de-açúcar moída na safra 2014/15 estimada em 671,69 milhões ton, com aumento de 2,0% em relação à safra 2013/14 (658,82 milhões ton), com previsão para a produção de açúcar e etanol total de 39.456.070 ton e de 28.368.903,88 m<sup>3</sup>, respectivamente, em relação a 37.878.260 ton açúcar e de 27.956.711,51 m<sup>3</sup> etanol total da safra de 2013/14 (CONAB, 2014). O Brasil, portanto, é o maior exportador mundial de açúcar e detém cerca de metade das vendas internacionais dessa *commodity*, exportando, na safra 2013/14, 26,63 milhões ton açúcar - praticamente o mesmo volume exportado na safra anterior. O Produto Interno Bruto (PIB) do setor sucroenergético brasileiro na safra 2013/14 foi de cerca de US\$ 43,36 bilhões, conforme apresentado na Tabela 2, o que equivale a quase 2% do PIB nacional de 2013 (NEVES & TROMBIN, 2014).

**Tabela 2-** Estimativa do produto interno bruto (PIB) do setor sucroenergético na safra 2013/14.

Produto		Mercado Interno (MI)	Mercado Externo (ME)	Total (MI + ME)
		US\$ (milhões)	US\$ (milhões)	US\$ (milhões)
Etanol	Hidratado <sup>a</sup>	12.861,31	590,65	13.451,96
	Anidro <sup>b</sup>	8.890,08	1.075,71	9.965,79
	Não-energético <sup>c</sup>	654,85	-	654,85
Açúcar <sup>d</sup>		6.926,80	11.109,85	18.036,65
Bioeletricidade <sup>e</sup>		894,05	-	894,05
Bioplástico <sup>f</sup>		90,00	210,00	300,00
Leveduras e Aditivos <sup>g</sup>		21,20	34,13	55,33
Crédito de carbono <sup>h</sup>		-	0,27	0,27
Total		30.338,29	13.020,61	43.358,90

Fonte: elaborada por *Markestrat*, a partir de diversas agências, NEVES & TROMBIN, 2014.

*a-* Estimativa das vendas realizadas pelos postos de combustível.

*b-* Estimativa das vendas realizadas pelas usinas para as distribuidoras

*c-* Estimativa das vendas realizadas pelas usinas para a indústria de bebidas e cosméticos.

*d-* Estimativa das vendas de açúcar realizadas pelas usinas para ser utilizada como matéria-prima de produtos industrializados e vendas realizadas de açúcar in natura pelo varejo.

*e-* Estimativa das vendas realizadas pelas usinas.

*f-* Estimativa das vendas de bioplástico produzido a partir de etanol de cana-de-açúcar.

*g-* Estimativa das vendas realizadas pelas usinas para a indústria de ração animal.

*h-* Estimativa dos projetos no mercado de crédito de carbono realizadas pelas usinas.

A ampliação da área plantada com cana-de-açúcar no Brasil traz como consequência a elevação do consumo de agroquímicos usados no seu manejo, ainda que esta cultura seja bem menos exigente que outras no tocante ao uso de inseticidas e fungicidas, mesmo que massivamente cultivada em países emergentes (LEHTONEN, 2009). Em 2013 foi a terceira cultura que mais consumiu agroquímicos (9%) no Brasil, perdendo apenas para soja e o milho. No entanto, em termos de faturamento da indústria de agroquímicos, a cana perdeu apenas para soja, resultando em um montante de US\$ 1,24 bilhão (13%) a partir das vendas de 74 mil ton de produto comercial para esse cultivo no país (NEVES & TROMBIN, 2014). Tal discrepância entre o volume total comercializado pelas empresas de agroquímicos e o faturamento oriundo desse mercado para a cana, demonstra que esta cultura demanda produtos de maior valor comercial, como herbicidas (65% do total), seguida por 30% de inseticida, 1% de fungicidas e 4% de outros produtos). Isso se explica, visto que a cultura tem sua produtividade reduzida pela presença de plantas “*daninhas*” durante seu ciclo, em face da competição por nutrientes, água, luminosidade e também por hospedar insetos-praga e agentes fitopatogênicos (LORENZI *et al.*, 1994). Na fase adulta, estas se entrelaçam aos colmos e folhas da cana, interferindo nas práticas culturais e na colheita (AZANIA *et al.*, 2002).

Porém, a utilização indiscriminada de agroquímicos nessa cultura, assim como em qualquer outra, como já mencionado, acarreta em contaminação de solos, da atmosfera, das águas superficiais e subterrâneas, dos alimentos, levando a efeitos negativos a organismos aquáticos e terrestres, intoxicação ocupacional de trabalhadores e produtores rurais e de outros seres humanos por consumo direto de água e alimentos contaminados (SPADOTTO, 2006).

Os agroquímicos chegam ao solo canavieiro pela deposição direta no momento da aplicação, através das águas das chuvas que os removem das partes aéreas das plantas, ou pela incorporação da palhada após a colheita, e podem afetar a sobrevivência de microrganismos nesse ambiente, conforme o tipo de solo, da espécie vegetal cultivada, da microbiota e suas interações (LANZA, MONTEIRO & MALHEIROS, 2004; SANTOS *et al.*, 2005). Conforme os diferentes tipos de componentes dos solos, varia a capacidade de adsorção dessas moléculas, o que pode dificultar sua distribuição e restringir sua toxicidade (MOCHI, MONTEIRO e BARBOSA, 2005). O potencial de poluição de águas por herbicidas, a partir de um dado solo e clima, depende da meia-vida e da mobilidade dos produtos em tal ecossistema (MARTINEZ, 2006), conforme a características apresentadas na Tabela 3 para três herbicidas – diuron, isoxaflutole e sulfentrazone.

**Tabela 3-** Propriedades físico-químicas dos herbicidas diuron, isoxaflutole e sulfentrazone.

<b>Propriedades do Diuron</b>	<b>Valor</b>
Peso molecular, $pK_b=13,55$	233.10 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilidade em água	36,4 mg.L <sup>-1</sup> (25° C) (moderada)
Pressão de vapor	6,90 x 10 <sup>-8</sup> mm Hg (25° C)
Coeficiente octanol/água ( $K_{ow}$ )	589
Coeficiente de sorção ( $K_{oc}$ )	480 mL.g <sup>-1</sup> (moderado)
Hidrólise e meia-vida	1490 dias (pH 5) 1240-1330 dias (pH 7) 2020 dias (pH 9)
Fotólise aquática e meia-vida	43,1–2180 dias (pH 7 à 25° C)
Degradação aeróbica no solo	372 dias
Degradação anaeróbica no solo	995 dias
Fotólise no solo	173 dias
Padrão máximo de potabilidade em água sem risco à saúde (BRASIL, 2011 -Portaria MS N° 2914/ 2011)	90 µg.L <sup>-1</sup>
<b>Propriedades do Isoxaflutole</b>	<b>Valor</b>
Peso molecular, $pK_a=4,3$	359,32 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilidade em água	3,5-6,2 mg L <sup>-1</sup> (25° C) (baixa)
Pressão de vapor	7,5 × 10 <sup>-9</sup> mmHg (25° C)
Coeficiente octanol/água ( $K_{ow}$ )	219 (moderado)
Coeficiente de sorção ( $K_{oc}$ )	134
Hidrólise e meia-vida	11 dias (pH 5) 20 horas (pH 7) 3 horas (pH 9)
Fotólise e meia-vida em água	6,7 dias
Degradação aeróbica no solo	30-56 horas
Degradação anaeróbica no solo	2 horas em solo aquoso
Fotólise no solo	No solo, não depende da luz
Padrão máximo de potabilidade em água sem risco à saúde (ANVISA s/d)	20 µg.L <sup>-1</sup>
<b>Propriedades do Sulfentrazone</b>	<b>Valor</b>
Peso molecular, $pK_a=6,56$	387.19 g.mol <sup>-1</sup>
Solubilidade em água	490 (pH 6,5)-780 (pH 7,0) ou 1600 (pH 7,5) mg L <sup>-1</sup> (alta)
Pressão de vapor	1,0 x 10 <sup>-9</sup> mmHg (25° C)
Coeficiente octanol/água ( $K_{ow}$ )	1,48
Coeficiente de sorção ( $K_{oc}$ )	15-75 mL.g <sup>-1</sup> (fraco)
Hidrólise e meia-vida em pH 5, 7 ou 9,0	Não suscetível
Fotólise e meia-vida em água	12 horas (pH 5) 1 hora (pH 7) 1 hora (pH 9)
Degradação aeróbica no solo	1,5 ano
Degradação anaeróbica no solo	9 anos (em solo encharcado)
Fotólise no solo	129 dias
Padrão máximo de potabilidade em água sem risco à saúde (ANVISA s/d)	10 µg.L <sup>-1</sup>

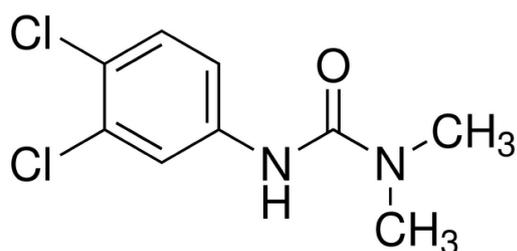
Fonte: USEPA-Pesticides, 1995; 1996; 2001; ANVISA, s/d.

O controle integrado baseado na somatória de medidas culturais (redução de espaçamentos de plantio e condução de soqueiras, para o rápido perfilhamento sombreando precocemente o solo nas fases iniciais de desenvolvimento da cultura, e uso de variedades de alto perfilhamento), mecânicas (utilização de arados e grades), físicas (operações de cultivo de soqueiras e de “quebra-lombo”, visando o combate a plantas daninhas em pós-emergência) e químicas (CHRISTOFFOLETI *et al.*, 2005; HERNANDEZ *et al.*, 2001), é a prática mais indicada para a agricultura atualmente, sendo o uso de herbicidas seletivos para a cultura da cana-de-açúcar, isto é, aqueles que não comprometem seu desenvolvimento e a produtividade, fundamental (VELINI *et al.*, 1993).

### 2.2.1. Diuron

O diuron (N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetilureia (C<sub>9</sub>H<sub>10</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O) - Figura 2, pertence à família química das fenilamidas e a subclasse das fenilureias. Apresenta número CAS: 330-54-1, e é um composto cristalino incolor na sua forma pura, não-iônico, com uma solubilidade moderada em água de 36 mg·L<sup>-1</sup> a 25°C. Permanece sólido à temperatura ambiente, com ponto de fusão de 158-159°C e pressão de vapor de 6,90 x10<sup>-8</sup> mm Hg a 25°C; sua constante calculada da lei de Henry é 0,000051 Pam<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>, caracterizando-se como não é volátil em água ou no solo (GIACOMAZZI, COCHET, 2004), e tem um coeficiente de adsorção ao solo relativamente baixo, enquanto a meia-vida por hidrólise e fotólise aquosa são relativamente longas. Consequentemente, é móvel e relativamente persistente, e portanto, propenso a um movimento para fora do local da aplicação através de um escoamento superficial, migrando assim para as águas subterrâneas (MONCADA, 2004). É um herbicida de amplo espectro vegetal utilizado no controle na pré-emergência de plantas daninhas em uma grande variedade de culturas (SORENSEN *et al.*, 2008).

**Figura 2-** Fórmula estrutural do Diuron.



Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2015.

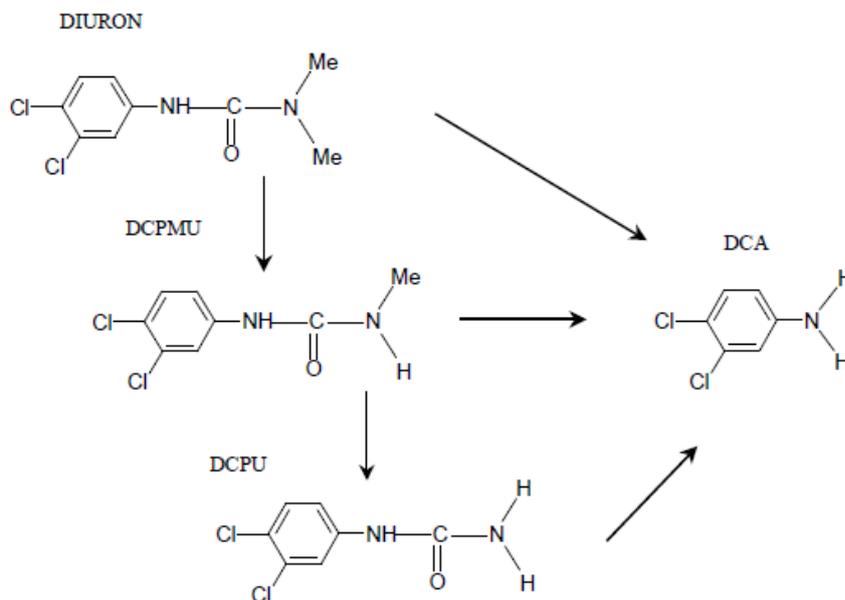
O diuron é facilmente absorvido pelo sistema radicular das plantas quando em solução aquosa no solo, sendo rapidamente translocado para caules e folhas, movendo-se essencialmente através do xilema. Atua principalmente na inibição da reação de Hill (fotólise da água) na fotossíntese, limitando a produção de moléculas de alta energia, tais como a adenosina trifosfato (ATP) utilizada em vários processos metabólicos dos fotoautotróficos. Este herbicida acopla-se ao sítio de ligação que seria da plastoquinona (QB) na proteína D1, do fotossistema II das membranas dos tilacóides de cloroplastos, bloqueando, assim, o transporte de elétrons da quinona A (QA) ligada à proteína D2, para QB não ocorre, impedindo a posterior síntese de ATP e fixação de CO<sub>2</sub> e produção de outros compostos de alta energia necessários para o crescimento das plantas. Além disso, a incapacidade de QA ser reoxidada promove a formação da clorofila no estado tripleto, que interage com o oxigênio no estado fundamental para formar oxigênio singleto. Tanto a clorofila tripleto como o oxigênio singleto podem extrair hidrogênio a partir de lipídios insaturados, iniciando a peroxidação lipídica das membranas e a oxidação de proteínas, resultando na perda de clorofila, carotenóides e água das células e de organelas celulares, levando à desintegração rápida das mesmas (HESS & WARREN, 2002).

Além da persistência, o diuron é considerado moderadamente tóxico e muito perigoso para o meio ambiente (RODRIGUES & ALMEIDA, 2005), visto que estudos de campo têm demonstrado que é altamente propenso a lixiviação, e, portanto, contaminante potencial dos recursos hídricos (RIBEIRO *et al.*, 2007), sendo frequentemente detectado em concentrações que variam de 2,7 µg·mL<sup>-1</sup> a 2849 µg·mL<sup>-1</sup> em águas superficiais e 0,34-5,37 µg·mL<sup>-1</sup> em águas subterrâneas (USEPA, 2013). A presença de diuron em ambientes aquáticos pode causar prejuízos aos organismos como é o caso de alterações comportamentais em peixes dourados (redução de agrupamento), em concentrações de 5 a 7 g·L<sup>-1</sup> (SAGLIO & TRIJASSE, 1998). Além destes, embriões de algumas espécies de sapos (*Pacific tree frog* e *Xenopus laevis*) demonstram deficiência no crescimento e deformações em concentrações de 20 mg·L<sup>-1</sup> (SCHUYTEMA & NEBEKER, 2004). Segundo TOMITA *et al.* (2004), a concentração efetiva mediana [CE (I)<sub>50</sub>] do diuron sobre o microcrustáceo *Daphnia similis* é de 1,49 mg L<sup>-1</sup> após 48 h.

Nas plantas, o diuron é metabolizado através de uma N-demetilização do átomo de nitrogênio, que pode ser a base da sua seletividade, e uma hidroxilação na posição 2 do anel de benzeno. Em mamíferos, o metabolismo ocorre principalmente através de hidroxilação e dealquilação. O metabólito predominante em cães é 3,4-dicloro-fenil ureia, sendo sua posterior decomposição similar em outros animais, plantas e solo, isto é, N-demetilização

seguida pela clivagem do anel (EXTOXNET, 1996; HESS & WARREN, 2002). As duas principais formas de degradação para o diuron são a fototransformação (sistema Foto-Fenton, UV 200-300 nm, ou por TiO<sub>2</sub>) e a biodegradação microbiana no solo (TIXIER *et al.*, 2011). Segundo MALATO *et al.* (2002), embora a fotodegradação possa ser utilizada para reduzir a contaminação, a mineralização completa do composto só pode ser obtida após um período muito longo de irradiação (acima de 200 min). Portanto, a remoção do diuron no ambiente se deve principalmente a processos bióticos, sendo o metabolismo microbiano aeróbio a principal forma de transformação do diuron (FIELD *et al.*, 2003; GIACOMAZZI & COCHET, 2004), que, segundo DALTON *et al.* (1996), inicia-se pela remoção de grupos N-metil. A perda do primeiro grupamento metila reduz em 50% a atividade herbicida, e a perda do segundo elimina sua toxidez aos organismos alvo. A decomposição é seguida pela remoção da ureia, o que resulta na formação de 3,4-dicloroanilina (DCA), amônia e CO<sub>2</sub>. A DCA exibe maior toxicidade e persistência no ambiente que o composto de origem (GIACOMAZZI & COCHET, 2004; SALVESTRINI *et al.*, 2002). Outros metabólitos resultantes destas demetilações são o 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU) e o 3,4-diclorofenilureia (DCPU), que se acumulam no ambiente e também podem ser mais tóxicos que o próprio diuron (TIXIER *et al.*, 2001) (Figura 3).

**Figura 3-** Via de degradação aeróbica do diuron e seus metabólitos.



Fonte: BRITISH GEOLOGICAL SURVEY, 2005.

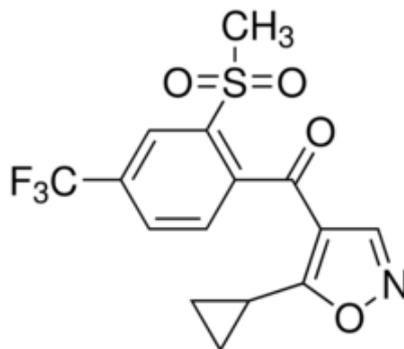
CULLINGTON & WALKER (1999) isolaram uma bactéria do solo (D47), capaz de degradar 20 mg.L<sup>-1</sup> de diuron em 48–72 h. Para a 3,4-DCA, demonstrou-se que a via de

degradação inclui uma desalogenação e uma hidroxilação do anel aromático seguida de uma clivagem pela enzima catecol 2,3-dioxigenase (TRAVKIN *et al.* 2003). DELLAMATRICE & MONTEIRO (2004), por sua vez, verificaram que *Acinetobacter johnsonii* cresceu em meio contendo diuron como única fonte de carbono, e BADAWI *et al.* (2009) isolaram fungos do gênero *Mortierella* de solos cultivados com plantas tratadas por diuron, clortoluron, isoproturon e linuron, capazes de degradar linuron a metabólitos dealquilados e 3,4-DCA. Contudo, até então, nenhum microrganismo tolerante a diuron foi capaz de mineralizar completamente a estrutura do anel fenílico ou a maioria dos metabólitos potencialmente prejudiciais oriundos da molécula e se acumulam no ambiente (SORENSEN *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Isoxaflutole

O isoxaflutole (IFT) ou 5-ciclopropil-4-(2-metilsulfonyl-4-trifluorometilbenzoi)-isoxaflutole (Figura 4), pertence ao grupo químico dos isoxazóis, é absorvido pelo sistema radicular e considerado um herbicida de pré-emergência. Apresenta solubilidade em água de 6,2 mg.L<sup>-1</sup>, sensibilidade a luz e a hidrólise, meia-vida em água de 9 h e no solo menor que 24 h (LIN *et al.*, 2002; MITRA *et al.*, 2000), sendo adsorvido pelos colóides, com baixa mobilidade - exceto nos solos arenosos ou com baixo teor de matéria orgânica (RODRIGUES & ALMEIDA, 1998; MITRA *et al.*, 1999).

**Figura 4-** Fórmula estrutural do Isoxaflutole.

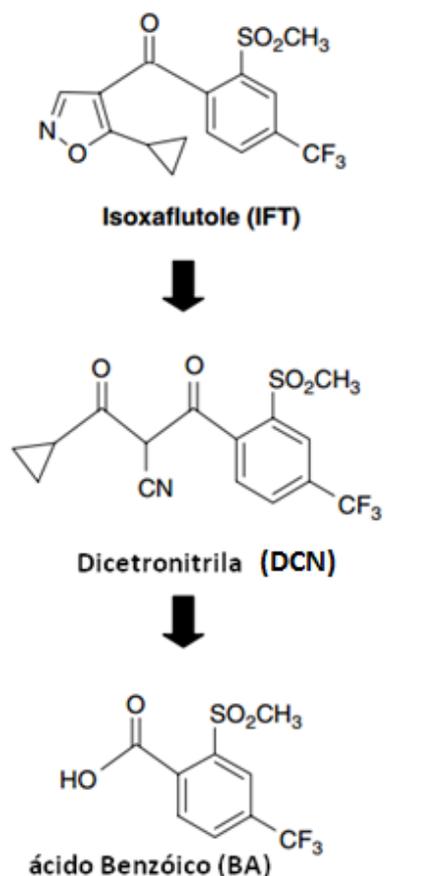


Fonte: SIGMA-ALDRICH, 2015.

Uma vez no solo, na água e na planta, o IFT é rapidamente convertido a dicetonitrila (DCN) (3-ciclo-propil-1-( $\alpha\alpha\alpha$ -trifluoro-2-metil-p-tolil)-1,3-dioxo-propano-2-nitrilo), que é a molécula biologicamente ativa no controle de plantas daninhas, por meio da clivagem do anel isoxazole (CEZARINO, 1997), sendo mais polar do que o IFT e consideravelmente mais estável, ligando-se fortemente aos solos com elevado teor de matéria orgânica, onde permanece mais retida. A hidrólise de IFT a DCN no solo parece ser influenciada pelo teor de

umidade, temperatura, pH e, principalmente, por processos químicos, ao passo que uma maior degradação de DCN a BA (Figura 5) resulta de processos bioquímicos da microbiota. Em pH 9,3 a velocidade de degradação é 100 vezes mais rápida do que em pH 3,8; mas a degradação do isoxaflutole em tampões orgânicos (RCOOH/RCOONa) é consideravelmente mais rápida do que nos inorgânicos, dependendo do número e da posição dos grupos CH<sub>3</sub> substituintes (BELTRAN *et al.*, 2003). Esse derivado DCN é o princípio ativo do herbicida com meia-vida e solubilidade em águas maiores que o IFT (MITRA *et al.*, 2000), e inibe a enzima 4-hidroxifenil piruvato dioxigenase. Esta é específica para a síntese de carotenóides, conduzindo a sinais de clareamento das plantas suscetíveis, seguido pela supressão do crescimento e necrose, já que essa classe de pigmentos acessórios da fotossíntese deixa de ser produzida. Nas plantas, o metabólito DCN é rapidamente convertido ao derivado inativo BA (ácido benzóico).

**Figura 5-** Passos iniciais na degradação isoxaflutole (IFT). Dicetonitrila (DCN) e ácido benzóico (BA) são abreviações para 2-ciano-3-ciclopropil-1-(2-metilsulfonil-4-trifluoro-metilfenil)propan-1,3-diona e ácido 2-metil-4-trifluorometilbenzóico, respectivamente.



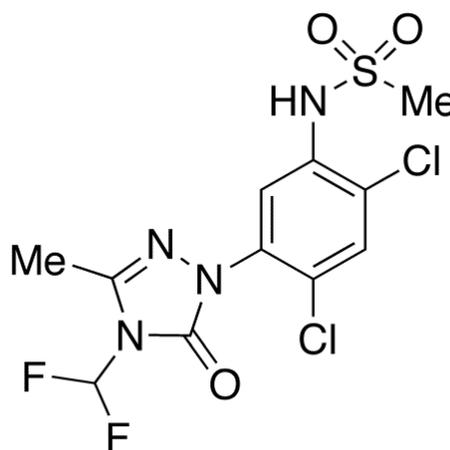
Fonte: AUTOR, 2015.

O IFT e os seus metabolitos têm o potencial para lixiviar através do solo em condições de alta pluviosidade, mas a rápida degradação sob condições de campo reduz a probabilidade deste atingir as águas subterrâneas (LUSCOMBE & PALLETT, 1996), ainda que as agências federais americanas apontem tal produto como um carcinógeno com alto potencial contaminante de águas superficiais e subterrâneas, assim como seus dois derivados de decomposição primária- DCN e BA (NELSON & PENNER, 2005).

### 2.2.3. Sulfentrazona

Sulfentrazona (grupo das aril-triazolinonas com nome químico N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3metil-5-oxo-1H- 1,2,4-triazol-1-yl]-fenil]-metanossulfo-namida (Figura 6), é registrado no Brasil para utilização nos cultivos de soja, cana-de-açúcar, café e citrus (NANDIHALLI & DUKE, 1993). Apresenta solubilidade de até 780 mg.L<sup>-1</sup> (pH 7), pressão de vapor 1.10<sup>-9</sup> mmHg (25 °C), e é um ácido fraco com uma constante de dissociação (pKa) de 6,56. Logo, pode estar nas formas neutra (em pH < 6,56) e aniônica (em pH>6,56) em solos agrícolas (HESS, 1993; RODRIGUES e ALMEIDA, 2005; TOMLIN, 1994). O herbicida sulfentrazona atua sobre a planta daninha pela inibição da ação da protoporfirinogênio oxidase (PROTOX), causando o acúmulo de protoporfirinogênio IX e formando o oxigênio singlete responsável pela peroxidação das membranas (SCALLA *et al.*, 1990). Além disso, inibe a produção de clorofila pelo bloqueio da rota (DUKE *et al.*, 1991).

**Figura 6-** Fórmula estrutural de sulfentrazona.



Fonte: TORONTO RESEARCH CHEMICALS, 2015.

A aplicação de sulfentrazona geralmente é feita por pulverização, e este pode ser parcialmente absorvido por partículas coloidais do solo, lixiviar e degradar através de processos físicos, químicos e biológicos, ou ser absorvido pelas plantas (VELINI, 1992).

Todos estes processos são dependentes do solo, das condições climáticas e também das características do herbicida. Devido a suas características físico-químicas, o sulfentrazona não necessita ser incorporado mecanicamente, uma vez que não ocorrem perdas significativas por volatilização e, por outro lado, em razão de sua classe de solubilidade, a incidência normal de chuvas é suficiente para incorporar o produto na camada superficial do solo onde está concentrada a maior parte das sementes de plantas daninhas com potencial de germinação, mesmo em situações de grande cobertura de palha (plantio direto) (GREY *et al.*, 2000).

A adsorção é um dos processos que controlam a degradação de sulfentrazona, e tem sido extensivamente caracterizada em solos de climas não-tropicais. No entanto, há pouca informação sobre o processo de adsorção do mesmo em solos tropicais (MARTINEZ *et al.*, 2008). Em solos arenosos com valores de pH que excedem seu pKa, sua adsorção diminui e cresce sua susceptibilidade a lixiviação e escoamento superficial (GREY *et al.*, 2000). O herbicida é altamente persistente e móvel nos solos brasileiros, e portanto, percola atingindo as águas subterrâneas (POLUBESOVA *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2008), sendo considerado perigoso ao meio ambiente (USEPA, 1996; AGROFIT, 2004).

A molécula de sulfentrazona não é suscetível a fotodecomposição após sua aplicação no solo e apresenta resistência a hidrólise química (KABLER & WILLIAMSOM, 1991; SCHOCKEN, 1994) mas a fotólise em água resulta em produtos desclorados hidroxilados. A exposição prolongada a luz solar causa a clivagem dos anéis aromático e triazol resultando em fragmentos de triazol e resorcinol, bem como a CO e CO<sub>2</sub> (WILLUT *et al.*, 1997).

Alguns estudos revelaram que a meia-vida deste herbicida pode variar de 110 a 280 dias, dependendo do solo e das condições ambientais (HATZIOS, 1998). REDDY & LOCKE (1998) estudaram a interação de sulfentrazona e microrganismos do solo utilizando o método do carbono marcado no radical da molécula de fenol, e constataram que após 77 dias de incubação, apenas 2,1% de sulfentrazona-14C foram degradados a 14CO<sub>2</sub> por respiração, concluindo que a população microbiana edáfica nativa apresentou uma pequena adaptação ao herbicida, não sendo possível dissipar e degradar o produto. Isso sugeriu que tal via não era a mais eficiente para a sua remoção do meio ambiente. Da mesma forma, segundo JOHNSEN *et al.* (2001), o produto pode atuar negativamente sobre a diversidade microbiana de solos.

Por outro lado, RODRIGUES & ALMEIDA (1998) afirmaram que a decomposição microbiana parece ser a via mais importante de degradação desse produto no solo, resultando primariamente, segundo SINGER & SCHOCKEN (1991), em hidroximetil-sulfentrazona que é oxidado a sulfentrazona-3-ácido carboxílico. OHMES *et al.* (2000) também relataram que a biodegradação microbiana é um mecanismo importante na dissipação de sulfentrazona uma

vez que solos autoclavados apresentaram uma decomposição muito lenta desse produto. Segundo BEULKE *et al* (2004), sua disponibilidade para a microbiota depende de fatores como temperatura e umidade do solo, já que ambos afetam a sua adsorção e, portanto, sua bioatividade e persistência. O metabolismo de sulfentrazona em animais e plantas é similar. O maior metabólito em plantas é o 3-hidroximetilsulfentrazona (HMS), sendo ainda formados o 3-desmetilsulfentrazona (DMS) e o ácido sulfentrazona-carboxílico (SCA).

### 2.3. Degradação microbiana de agroquímicos

O consumo de agrotóxicos em vários países depende do tipo de planta cultivada e da área agrícola total (VERMA *et al.*, 2014), porém, o uso intenso e frequente leva a sua maior concentração no solo, tornando-se parte do húmus ou entrando na cadeia alimentar (biomagnificação), e também à seleção de populações de microrganismos, reduzindo ou eliminando algumas e elevando outras (ORTIZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Isso altera o intervalo disponível para degradação desses produtos (ODUKKATHIL & VASUDEVAN, 2013). Em algumas situações, o aumento na atividade de certos microrganismos acelera a degradação (LEWIS *et al.*, 1978; POZO *et al.*, 1994).

Vários outros fatores influenciam a velocidade de decomposição, tais como a estrutura química dos poluentes, pH, concentração de cálcio, peróxido de hidrogênio e a carga orgânica. Devido ao grande potencial de contaminação por resíduos dessas moléculas e a variação no tempo necessário para a degradação natural, vários são os processos utilizados para remediação dos ambientes afetados, tais como adsorção, filtros, tratamento biológico, e degradação por processos oxidativos avançados (POA) que utilizam como catalisador  $TiO_2/UV$ , reagentes de foto-Fenton (FR) (LEGRINI *et al.*, 1993), e os processos de ozonização com  $O_3$   $O_3/UV$ , e  $O_3/H_2O_2$  (MASTEN & DAVIES, 1994; CARDEAL *et al.*, 2011). Por outro lado, devido a capacidade degradadora de muitas espécies de microrganismos resistentes a estes, os mesmos tem sido rastreados para eliminar ou reduzir de forma acentuada os níveis de agrotóxicos (biorremediação) utilizados na agricultura (UETA *et al.*, 1999; CARDEAL *et al.*, 2011).

Os rótulos das embalagens dos herbicidas frequentemente registram as frequências das aplicações conforme a textura e o teor de matéria orgânica do solo, com a finalidade de dispor produto suficiente para superar as limitações de sua biodisponibilidade para as plantas causada pela sorção (BASF, 2011). De fato, a concentração do composto em solução é bastante importante para predizer tanto a atividade do herbicida quanto a sua cinética de degradação (SIMS *et al.*, 2009)

Os herbicidas e seus metabólitos constituem uma importante classe de contaminantes do solo e das águas superficiais e subterrâneas. Seu destino é regido principalmente por interações entre os componentes presentes no solo e, em particular, com minerais argilosos e com a fração orgânica. Vários estudos, particularmente nas áreas da química e da agronomia, investigaram a adsorção desses poluentes por argilas, substâncias húmicas e sedimentos (BOURAS *et al.*, 2007). Enquanto as interações químicas e físicas com o solo são propriedades intrínsecas de um herbicida, os efeitos resultantes sobre as taxas de biodegradação dependem do tamanho da população microbiana, e, portanto, podem estar sujeitas a alterações (SIMS, 2014).

A estrutura molecular de cada agroquímico determina, pelo menos parcialmente o grau com o que ele afeta o ambiente. A presença de grupos funcionais contendo oxigênio, nitrogênio e enxofre tendem a tornar os compostos orgânicos mais reativos, tanto química quanto biologicamente, mais solúveis em água e menos voláteis quando comparados aos hidrocarbonetos com o mesmo número de carbonos. A presença de halogênios também torna o composto menos solúvel em água, mais volátil e menos reativo, tornando-o mais estável e persistente no ambiente (SILVA & FAY, 2004).

A decomposição biológica de agroquímicos é a forma mais importante e eficaz para remover estes compostos do ambiente. Os microrganismos têm a capacidade de interagir, tanto quimicamente como fisicamente, com substâncias levando a alterações estruturais ou a degradação completa da molécula alvo (RAYMOND *et al.*, 2001; WIREN-LEHR *et al.*, 2002).

Alguns agroquímicos são moléculas quirais. Dessa forma, os estudos ambientais têm historicamente negligenciado a determinação dos efeitos adversos associados em particular a enantiômeros, incluindo persistência no meio ambiente. A assinatura racêmica permanece inalterada por mecanismos de remoção físico-química. No entanto, a biodegradação e o metabolismo biológico podem ser enantioseletivos, e resultarem em diferentes efeitos e destinos no ambiente (LI *et al.*, 2001; MONKIEDJE *et al.*, 2003)

Processos físicos, químicos e biológicos regulam a mobilidade dos herbicidas e sua degradação no solo: águas das chuvas e de irrigação podem mover os herbicidas ao longo do perfil do solo; locais com minerais argilosos e/ou matéria orgânica de cargas negativas podem adsorver os herbicidas em sua forma catiônica no pH do solo. A atividade microbiana pode promover a transformação do herbicida, diferentes processos de transferência e de degradação controlam a movimentação e o destino do produto no meio (BRASCHI *et al.*, 2011).

O tempo necessário para a degradação do agroquímico é importante para avaliar se os

poluentes apresentam persistência no meio ambiente. O desaparecimento desses compostos está relacionado a diversos fatores, tais como, pH, temperatura, luz, oxigênio e quantidade de matéria orgânica, que alteram a cinética de degradação (DYSON *et al.*, 2002). Porém, algumas razões podem levar à persistência dos agroquímicos, como por exemplo, a inibição da síntese de enzimas microbianas que atuam na degradação desses compostos; a impossibilidade do agroquímico penetrar na célula microbiana pela falta de enzimas adequadas; a insolubilidade do composto na solução do solo, indisponibilizando-o para as reações bioquímicas, e o alto poder de adsorção do agroquímico às partículas do solo, entre outras (MUSUMECI, 1992).

Os herbicidas, por exemplo, variam quanto a sua persistência no solo uma vez que são quimicamente heterogêneos, e suas estruturas determinam seu grau de estabilidade, como no caso de alguns anéis aromáticos substituídos (-F, -Cl, -NO<sub>2</sub>, -NH<sub>2</sub>, -CF<sub>3</sub>, -SO<sub>3</sub>H) que ocorrem em picloram, atrazina, flazasulfuron e outros herbicidas. Além disso, as moléculas insolúveis em água são menos susceptíveis ao ataque microbiano, porque estas podem adsorver-se fortemente às partículas e, assim, ficar menos disponíveis (GAVRILESCU, 2005; CHOWDHURY *et al.*, 2008).

Os estudos cinéticos para avaliar a degradação de contaminantes orgânicos podem ser efetuados e avaliados através da taxa de mineralização do composto (DYSON *et al.*, 2002). Esta taxa de mineralização é determinada pelo monitoramento de compostos inorgânicos, como CO<sub>2</sub>, Cl<sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> e PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>. O método mais comum de análise é a determinação do carbono orgânico total (COT). É uma medida rápida de elevada confiabilidade e sensibilidade em níveis de pg.L<sup>-1</sup> (CARDEAL *et al.*, 2011).

Existem diferentes origens para microrganismos capazes de degradar agroquímicos. Uma vez que são aplicados principalmente nas culturas agrícolas, o solo é o meio que mais recebe esses produtos químicos, além de efluentes da indústria, lodo de esgoto, lodo ativado, águas residuais, águas naturais, sedimentos, áreas em torno de fábricas de pesticidas, e até mesmo alguns organismos. Vários microrganismos foram caracterizados e identificados por crescerem e degradarem pesticidas. O isolamento e caracterização destes abre a possibilidade de se obter novas ferramentas para restaurar ambientes poluídos ou tratar resíduos antes da disposição final (ORTIZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Os microrganismos do solo decompõem coletivamente vários compostos xenobióticos e retornam os produtos na forma de sais minerais que serão utilizados pelas plantas. Assim, elas desempenham um papel importante na dissipação de pesticidas no solo. Os *microrganismos*, especialmente bactérias, devido à exposição contínua a este tipo de estresse

ambiental, desenvolveram um sistema geneticamente determinado contra estes agentes tóxicos (PARSEK *et al.*, 1995).

As populações microbianas tanto de solo ou de ambientes aquáticos são compostas de diversas comunidades, sinérgicas ou antagonistas, em vez de uma única cepa. Em ambientes naturais, a biodegradação envolve a transferência de substratos e produtos para dentro da comunidade microbiana de forma bem coordenada, um processo conhecido como a cooperação metabólica. Os microrganismos têm a capacidade de interagir, química e fisicamente, com as substâncias e conduzem alterações estruturais ou a degradação completa da molécula-alvo. Entre as comunidades microbianas, bactérias, fungos e os actinomicetos são os principais transformadores e degradadores de pesticidas (ABRAHAM *et al.*, 2002; BRICEÑO *et al.*, 2007). Os fungos geralmente biotransformam pesticidas e outros xenobióticos através de alterações estruturais mínimas na molécula, tornando-as não tóxicas. O pesticida biotransformado é então liberado para o meio ambiente, onde estará suscetível ainda mais a uma degradação mediada pelas bactérias (DIEZ, 2010).

O metabolismo de agroquímicos pode envolver três fases. Na Fase I, as propriedades iniciais do composto original são transformadas através de reações de oxidação (hidroxilação, dealquilação, deaminação e formação de sulfóxidos), redução (azo-redução e adição de hidrogênio) e hidrólise. Estas reações expõem ou introduzem um grupo funcional (-OH, -NH<sub>2</sub>, -SH ou -COOH), geralmente resultando em um pequeno aumento na hidrofiliabilidade, ou na produção de um modo geral de um produto menos tóxico que o composto original. A Fase II envolve a conjugação do pesticida ou de seu metabólito a um açúcar ou aminoácido, isto aumenta a solubilidade em água e reduz a toxicidade em comparação com o composto original. E a Fase III envolve a conversão dos metabólitos da Fase II em conjugados secundários, que também não apresentam toxicidade. Nestes processos, fungos e bactérias estão envolvidos na produção de enzimas intra- ou extracelulares, incluindo hidrolases, peroxidases, oxigenases, etc. Os co-fatores para estas reações reagem com os grupos funcionais que estão presentes nos xenobióticos ou são introduzidas/expostas durante a Fase I do processo de biotransformação (Van EERD *et al.*, 2003; PARKINSON & OGILVIE, 2010; ORTIZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2011).

Devido à diversidade de produtos químicos utilizados na composição dos pesticidas, os processos bioquímicos envolvidos na biorremediação requerem uma grande variedade de mecanismos catalíticos, e, portanto, uma grande variedade de classes enzimáticas (ORTIZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Os microrganismos envolvidos neste processo estão altamente adaptados e têm a capacidade de degradar os compostos recalcitrantes através da introdução

de novos genes, que codificam enzimas que podem usar esses compostos como substratos primários (SUENAGA *et al.*, 2001). Os genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de degradação estão localizadas nos plasmídeos (plasmídeos anti-catabólicos) (LAEMMLI *et al.*, 2000).

A degradação de compostos xenobióticos, tais como a atrazina e nitrotolueno ocasionalmente é mediada através da troca de material genético entre cepas bacterianas, que carregam os genes responsáveis por diversas funções na rota catabólica (De SOUZA *et al.*, 1998). A degradação depende principalmente da resposta adaptativa das comunidades microbianas que incluem tanto o enriquecimento seletivo (resultando na amplificação dos genes) e nas alterações genéticas (que incluem principalmente a transferência de genes ou mutação). Com a mobilização de sequências silenciosas em rotas catabólicas funcionais e o aumento da variedade do substrato por mutações graduais ou espontâneas, a recalcitrância de vários poluentes tóxicos sintéticos certamente decrescerá (SINHA *et al.*, 2009).

Entre as diferentes reações que um composto xenobiótico pode sofrer no ambiente, a mineralização é a mais desejável, uma vez que ela gera carbono e energia para o crescimento microbiano e previne o acúmulo de intermediários potencialmente perigosos no ecossistema natural. Dada a grande diversidade dos xenobióticos e dos microrganismos degradadores, espera-se que diferentes reações de transformação, catalisadas por microrganismos, estejam envolvidas no processo de degradação. Essas reações podem ser agrupadas em: oxidativas, redutivas, hidrolíticas ou polimerização (SILVA & FAY, 2004). Assim, a disponibilidade de tais microrganismos sob estresse ocasionados pelos agroquímicos podem fornecer uma solução eficiente, mais barata e ambientalmente correta para a biorremediação de solos contaminados por estes compostos (PALLUD *et al.*, 2004).

#### **2.4. Bactérias promotoras do crescimento vegetal (BPCV)**

Bactérias podem favorecer o crescimento vegetal (BPCV) de diferentes formas, seja protegendo-as contra patógenos e pragas potenciais, seja favorecendo a assimilação de nutrientes e substâncias vitais. No caso de bactérias utilizadas no controle biológico de patógenos, pragas ou ervas daninhas, os mecanismos envolvidos incluem o antagonismo através da disputa por espaço e nutrientes ou a antibiose direta (produção de toxinas, anti-toxinas ou anti-metabólitos, enzimas hidrolíticas, etc) e através da indução de mecanismos de defesa da planta (SOUZA, 2001; WEYENS *et al.*, 2009). Por outro lado, o crescimento vegetal pode também ser estimulado de forma mais direta pelo aumento na disponibilidade de certos nutrientes para as plantas, como a fixação biológica de nitrogênio ou a solubilização de

fosfato inorgânico (espécies de *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Agrobacterium*), a mineralização de fosfato orgânico (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999) ou a produção de fitormônios como o denominado ácido indolacético (AIA) ou auxina (atua no desenvolvimento da raiz e na divisão celular), o etileno, as citocininas, o ácido abscísico e as giberelinas, influenciando o equilíbrio hormonal da planta (BERG, 2009). O AIA, por exemplo, é sintetizado por várias vias bioquímicas, mas a principal rota presente em bactérias é a que utiliza o triptofano como precursor (PATTEN & GLICK, 1996), e evidência para tal foi obtida a partir da detecção de intermediários, de enzimas capazes de converte-los *in vivo* novamente em AIA e atividade biológica. Esses microrganismos realizam uma conversão oxidativa quando na presença de peroxidases e de radicais livres (SILVA, 2010).

As BPCV representam uma potencial alternativa contra o uso intensivo de fertilizantes artificiais e de agrotóxicos nos sistemas agrícolas de importância econômica (CARVALHAIS *et al.*, 2013), e tem sido utilizadas especialmente para promover a biodisponibilidade de fósforo para as plantas, pois ainda que o solo seja um grande reservatório deste, as concentrações das formas solúveis disponíveis de fósforo para as plantas [os íons monobásico ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) e dibásico ( $\text{HPO}_4^{2-}$ )] são geralmente muito baixas, visto que a maior parte encontra-se sob as formas insolúveis não absorvíveis. Tais bactérias, portanto, atuam como substitutos ideais de fertilizantes químicos fosfatados (KHAN *et al.*, 2009) e a solubilização de fósforo inorgânico decorre tipicamente da ação de ácidos orgânicos de baixo peso molecular por elas secretados, como o ácido glucônico e o ácido cítrico. Por outro lado, a mineralização de fósforo orgânico ocorre através da síntese de várias fosfatases, que catalisam a hidrólise de ésteres fosfóricos. É importante ressaltar que a solubilização de fosfatos e a mineralização podem coexistir na mesma estirpe bacteriana (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999; RODRÍGUEZ *et al.*, 2004; TAO *et al.*, 2008), e que grupos bacterianos que possuem mais de um dos mecanismos promotores do crescimento vegetal são almejados e rastreados para uma possível aplicação no campo, visando o aumento da produção agrícola (VERMA *et al.*, 2001).

No entanto, alterações ambientais podem modificar o efeito exercido por determinado grupo de BPCV. Uma população bacteriana fixadora de nitrogênio ou solubilizadora de fósforo (elementos que muitas vezes estão presentes em quantidades muito limitadas em vários solos), pouco provavelmente gera qualquer benefício as plantas na presença de quantidades significativas de fertilizantes químicos no solo. Além disso, é possível que atue de formas distintas em diferentes plantas (DUBEIKOVSKY *et al.*, 1993).

### 3. OBJETIVOS

---

---

#### 3.1. Geral:

Isolar microrganismos de solo oriundo de lavoura canavieira (S.A Usina Coruripe Açúcar e Álcool) que sejam tolerantes aos herbicidas diuron, isoxaflutole e sulfentrazone e avaliar sua capacidade de promover crescimento de plantas.

#### 3.2. Específicos:

**3.2.1.** Selecionar entre os microrganismos isolados aqueles capazes de crescer em meios contendo como fontes de carbono apenas um dos herbicidas testados [Diuron (3-(3,4-dicloro-fenil)1,1-dimetilureia); Sulfentrazone (2',4'-dicloro-5'-(4-difluorometil-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-il)meta-no-sulfonilida); Isoxaflutole (5-ciclopropil-1,2-oxazol-4-il, $\alpha,\alpha,\alpha$ -trifluoro-2-metil-*p*-tolil metanona)], nas concentrações de 0-1000  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

**3.2.2.** Submeter os isolados selecionados a provas bioquímicas que favoreçam sua identificação presuntiva e avaliar sua capacidade em degradar compostos recalcitrantes.

**3.2.3.** Identificar molecularmente as espécies selecionadas através da amplificação e sequenciamento da subunidade maior do rDNA (16S).

**3.2.4.** Avaliar a cinética de crescimento dos microrganismos isolados frente a diferentes concentrações dos herbicidas (10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) em cultura submersa, analisando a toxicidade via atividade desidrogenase dos herbicidas aos microrganismos.

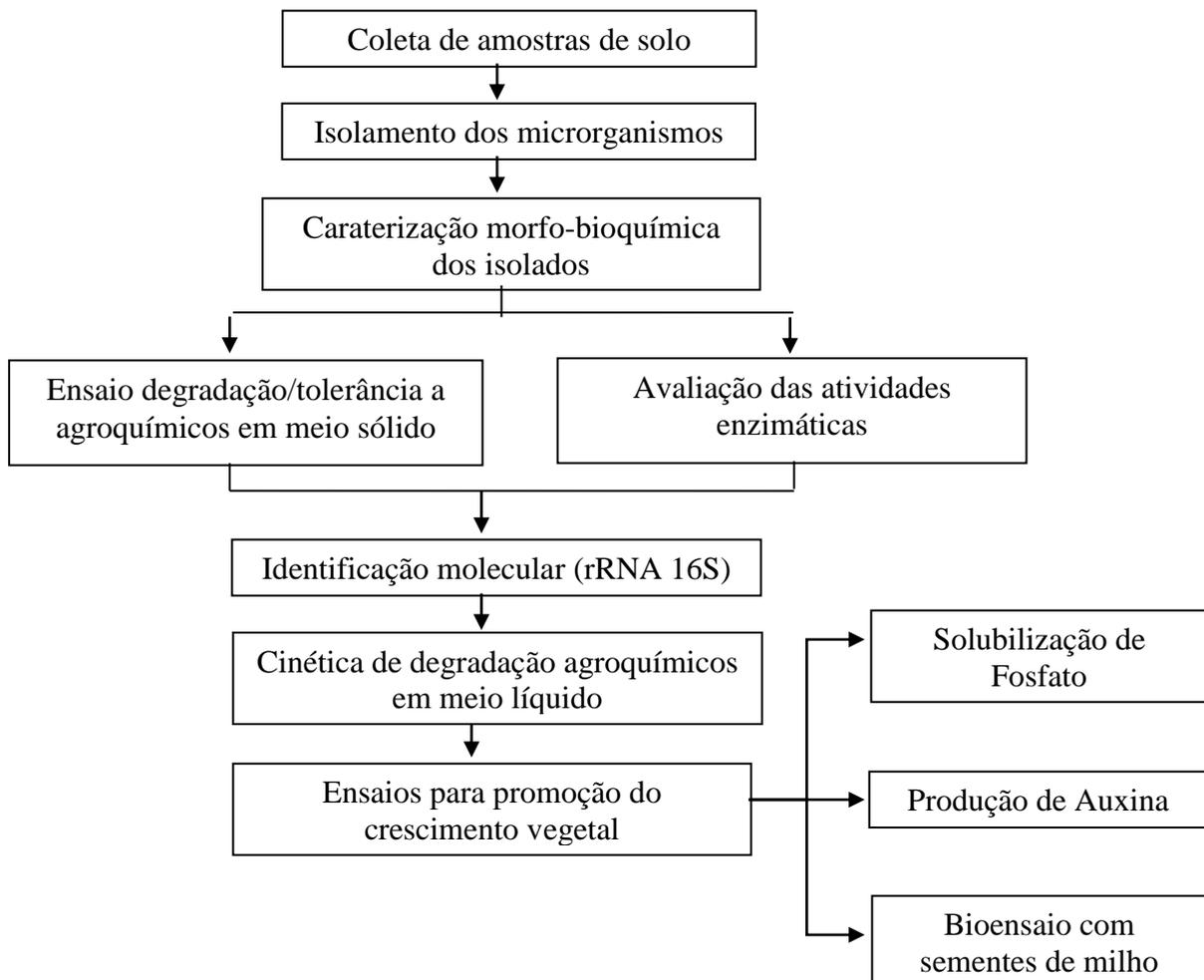
**3.2.5.** Avaliar a possível atividade dos isolados bacterianos selecionados na solubilização de fosfato em presença de diferentes concentrações dos herbicidas testados, e sua possível produção de auxina (AIA- ácido indol acético) *in vitro*.

**3.2.7.** Avaliar se os isolados bacterianos selecionados são capazes de promover a germinação de sementes e crescimento vegetal de plântulas milho na presença dos herbicidas testados.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

A Figura 7 abaixo sintetiza as atividades experimentais desenvolvidas neste estudo.

**Figura 7-** Fluxograma das etapas experimentais desenvolvidas.



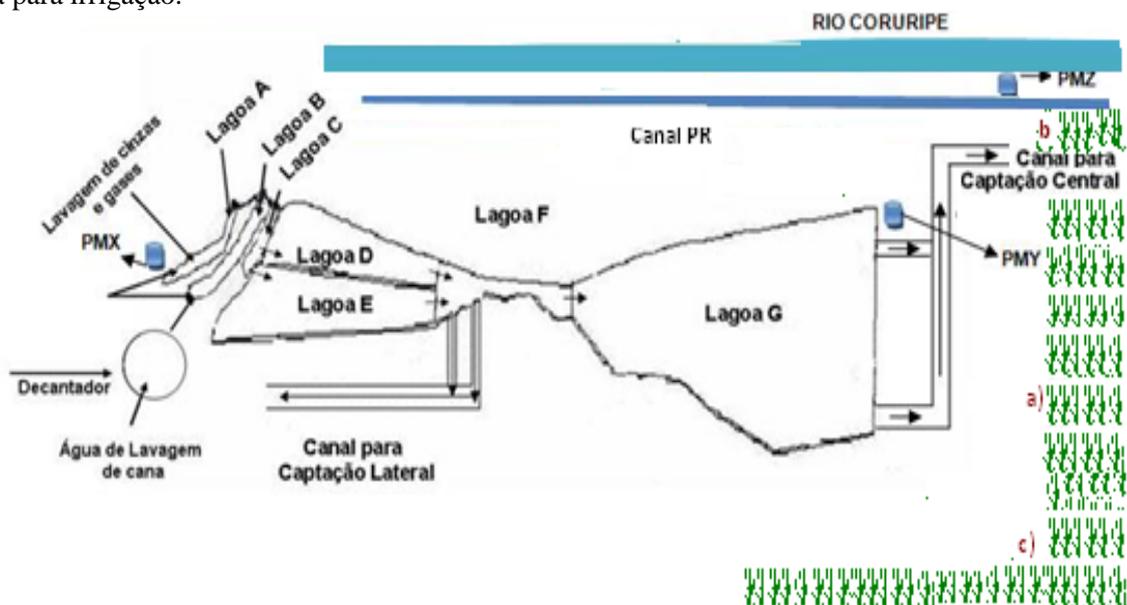
Fonte: AUTOR, 2015.

##### 4.1. Coleta de solo com antigo cultivo de cana-de-açúcar para isolamento de microrganismos

Amostras de solo do tipo Argissolo Amarelo distrófico abrupto fragipânico (areia:silte:argila = 800:70:130g.Kg<sup>-1</sup>, carbono orgânico Total= 1,22 g.Kg<sup>-1</sup>, conforme estudos de MAIA & RIBEIRO, 2004), com histórico de 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar e tratamento com herbicidas, foram coletadas a 10 cm de profundidade (horizonte A), em três sítios de lavoura canavieira (S. A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool) localizada em Coruripe,

Estado de Alagoas, Brasil. Todos os sítios situados entre a saída da última lagoa (G) da estação de tratamento de efluentes (ETE) (Figura 8) e o canal receptor de águas percoladas (-10°7'31.5264"S; -36°15'37.1088"O). Os pontos de coleta foram denominados ASG (anterior a lagoa G), SG (saída de águas da lagoa G) e PR (próximo ao canal receptor) (Figura 9). As amostras foram transportadas imediatamente, sob refrigeração, para o Laboratório de Bioquímica do Parasitismo e Microbiologia Ambiental (LBPMA) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), onde foram acondicionadas até o uso.

**Figura 8-** Esquema dos sítios de coleta de solo (a, b e c) próximos a lavoura canieira e lagoas da estação de tratamento de efluentes (ETE) da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe – AL), com poços de monitoramento de águas subterrâneas (PMX,PMY,PMZ) e canais de captação de água para irrigação.



Fonte: AUTOR, 2015.

**Figura 9-** Aspecto do local de coleta do solo próximos a lavoura canieira da matriz da S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool (Coruripe – AL). a) Ponto SG (saída de águas da lagoa G), b) PR (próximo ao canal PR) e c) Ponto ASG (anterior à saída de águas da lagoa G).



Fonte: AUTOR, 2015.

## **4.2 Meios de cultivo para isolamento e manutenção de microrganismos**

### **4.2.1. Ágar- nutriente (AN)**

O meio AN foi preparado e esterilizado conforme descrito por NEDER (1992) (Apêndice I), e posteriormente utilizado na repicagem individual das colônias de bactérias previamente isoladas ou para a manutenção das culturas.

### **4.2.2. Meio mínimo Jones & Edington (J.E.) (líquido e sólido)**

O referido meio de cultura (Apêndice I) foi preparado e esterilizado como descrito por (JONES & EDINGTON, 1968), excetuando-se a adição de ágar bacteriológico no caso do caldo J.E. Após resfriamento, diferentes volumes de soluções estoque (em acetona) filtradas (membrana 0,22  $\mu\text{m}$ ) de cada um dos três herbicidas comerciais utilizados neste estudo foram acrescentados a frascos contendo tal meio, para gerar concentrações de 25,50,100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . No tratamento controle acrescentou-se apenas o mesmo volume de acetona.

## **4.3. Isolamento dos microrganismos de solo tolerantes a três herbicidas**

O isolamento de microrganismos foi efetuado no intuito de obter uma população microbiana cultivável e com a habilidade de tolerar e biodegradar compostos xenobióticos recalcitrantes, tais como os herbicidas utilizados no cultivo de cana-de-açúcar. As amostras de solo (5 g) foram individualmente inoculadas em 95 mL de meio mínimo J.E., preparado conforme item 4.2.2 e suplementado com um dos herbicidas (Diuron, Sulfentrazone e Isoxaflutole) utilizados neste estudo (concentração final de 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), contido em Erlenmeyers (250 mL), os frascos foram homogeneizados antes de serem submetidos a agitação orbital (120 rpm) em Banho-Maria ( $30 \pm 1$  °C) por 2 h.

Em seguida, as culturas foram diluídas com água destilada estéril (1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>2</sup> e 1:10 v/v) e retiradas alíquotas de 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição para serem inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar nutriente (AN), contido em placas de Petri. Esse material foi incubado a uma temperatura de  $30 \pm 1$  °C (escuro). Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas para cada amostra.

As placas foram submetidas a diferentes intervalos de tempo de incubação (18, 24, 48 e 72h). Em seguida foram efetuadas avaliações macroscópicas das culturas para a detecção de unidades formadoras de colônias (UFC). Realizou-se, então, a repicagem individual das diferentes colônias presentes para novas placas de meio AN, incubando-se as mesmas em condições similares ao já descrito. Cada isolado recebeu uma identificação preliminar baseada

no local de coleta, sendo estes preservados em meio contido em placas de Petri e tubos com AN submetidos a condições de refrigeração ( $6 \pm 2$  °C) e incubadora ( $30 \pm 1$ °C). Os isolados mantidos sob refrigeração foram reativados a temperatura ambiente e reinoculados a cada 4 meses, sendo utilizados sempre após 24h de incubação ( $30 \pm 1$ °C,escuro).

#### **4.4. Avaliação da tolerância/degradação de agroquímicos**

As bactérias isoladas foram inoculadas em meio mineral J.E. sólido contendo um dos três agroquímicos citados como única fonte de carbono. Foram empregadas diferentes concentrações (25, 50, 100, 250, 500 e 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) em placas de Petri, em triplicatas. As culturas foram incubadas ao abrigo da luz ( $30 \pm 1$  °C) e a avaliação do crescimento foi realizada através do monitoramento do crescimento da colônia bacteriana de 120 a 168h após a inoculação.

Os microrganismos com melhor crescimento sobre os três agroquímicos foram selecionados para os ensaios da cinética de crescimento, determinação de algumas atividades enzimáticas extracelulares e caracterização microscópica e bioquímica, através de distintas colorações e inoculações em meios diferenciais (item 4.6).

#### **4.5. Caracterização morfo-cultural e bioquímica das linhagens tolerantes a altas concentrações dos herbicidas estudados**

##### **4.5.1. Aspectos morfológicos**

Foram utilizadas as colorações diferenciais para determinação da constituição da parede celular de bactérias (Gram, utilizando cristal de violeta, lugol e safranina), da existência de endosporos (verde-malaquita) e da álcool-ácido resistência das paredes (Fuccina fenolada, de Ziehl-Nielsen), conforme descrito por NEDER (1992). Utilizou-se, ainda, o método descrito por SUSLOW *et al.* (1982), o qual visa a confirmação do método de Gram.

##### **4.5.2. Aspectos bioquímicos/fisiológicos**

A caracterização bioquímica dos isolados que apresentaram maior tolerância aos três herbicidas testados foi efetuada através do cultivo em meios diferenciais, tanto contidos em placas de Petri quanto em tubos de ensaio. Os meios utilizados, conforme descrito por SILVA (1996), foram: Ágar MacConkey, Três Glicídios e Ferro (T.S.I.), Ágar Citrato de Simons, Ágar-Ureia, e SIM (Sulfito-Índol-Motilidade). Também foram efetuadas provas para detectar atividade de Catalase (SILVA, 1996), celulase (RYCKEBOER *et al.*, 2003), ligninase

(DHOUIB *et al.*, 2005) e de fenoloxidase (CONCEIÇÃO *et al.*, 2005). Para esta última, ao meio AN acrescentou-se 0,5% de ácido gálico, e após esterilização (120°C, 1 atm, 10 min), o meio vertido em placas de Petri e posteriormente solidificado foi inoculado conforme nos demais ensaios (100 µL de suspensão aquosa com  $1 \times 10^6$  células.mL<sup>-1</sup>, cultura com 24 h), e incubado por 7 dias (30 ± 1 °C, no escuro), em triplicata para cada isolado.

#### **4.5.3. Identificação molecular (análise das Sequencias do Gene 16S rRNA) das linhagens selecionadas (mais tolerantes a altas concentrações dos herbicidas e capazes de degradar peróxido, uréia, celulose ou fenóis)**

Das linhagens bacterianas isoladas de solo com longo histórico de cultivo de cana, que, além da capacidade de tolerar as altas concentrações dos herbicidas estudados, também foram hábeis em degradar peróxido, uréia, celulose ou fenóis, quatro foram selecionadas e submetidas a extração de seu DNA total utilizando a lise térmica e a série comercial de reagentes Quiagen® (QIAamp, DNA Mini Kit), conforme instruções do fabricante. Uma vez verificada a quantidade e pureza do DNA extraído através da medida da absorção espectrofotométrica a 260 e 280 nm, realizou-se o processo de amplificação do gene universal amplamente utilizado para identificação de bactérias em geral, o 16S rRNA. Para tanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada no volume final de 50 µL. As reações individuais foram compostas de água ultrapura estéril isenta de DNase e RNase, tampão de reação 1X, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de cada dNTP ([dATP, dCTP, dGTP, dTTP] 10 mM), 100 ng de cada iniciador direto e reverso [PA-*forward* (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e PH-*reverse* (5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3')] e 1,5 U da enzima *Taq* polimerase (Promega), totalizando 45µL dessa mistura para serem acrescidos de 5 µL do DNA alvo extraído. Todo o procedimento foi realizado sob gelo. As reações seguintes, utilizando termociclador, foram realizadas mediante a programação das condições descritas: pré-desnaturação a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 s, 55°C por 1 min e 72°C por 1,5 min e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 min.

Após o término do processo de amplificação, a verificação da eficiência da reação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose [1% (p/v) em tampão TBE 1X com brometo de etídio 0,5 µg.mL<sup>-1</sup>], adicionando-se aos poços do gel 5 µL do DNA amplificado na PCR ou de um marcador de 100 a 2000 pares de bases (Invitrogen), adicionados de 2 µL de tampão de carregamento [0,025% (v/v) de azul de bromofenol e 50% (v/v) de glicerol] para verificação do segmento amplificado (cerca de 1200 pb). A corrida foi realizada por 40

min a 70V. O produto da PCR foi visualizado em um transiluminador sob luz ultravioleta (UV), sendo observada a possível presença de contaminantes. A imagem foi capturada e registrada em fotocodocumentador Gel Logic 100 (Imaging System) com o auxílio do programa *Molecular Imaging* (Kodak). Os produtos da PCR foram armazenados em freezer a -20°C até a etapa seguinte.

Para purificação dos produtos da PCR, foi utilizado o *kit GFX PCR DNA Illustra* (GE Healthcare), para digestão dos restos de iniciadores e dNTPs não utilizados na amplificação, e posterior utilização como molde de DNA para a reação de sequenciamento em microplacas com 96 poços (*MicroAmp Optical 96 Well Reaction Plate* da Applied Biosystems) com o *kit* comercial *BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems), utilizando como iniciadores diretos [PA-F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 926-F (5'-AACTCAAAGGAATTGACGG-3')] e reversos [PH-R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3'), 519-R (5'-G(AT)ATTACCGCGGC(GT)GCTG-3') e 1093-R (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3'), além dos iniciadores universais 1831 (5'-GAGGAACACCGATGGCGAAGGC-3') e 1832 (5'-GCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTT-3')]. Em ambos os casos, seguiu-se as recomendações dos fabricantes.

Posteriormente, os produtos gerados em cada um dos poços de reação da microplaca foram incubados a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 15 min com 80 µL de uma solução com 75% de isopropanol v/v, precipitados e centrifugados (Centrifuga 5810R-Eppendorf) por 45 min a 4000 rpm (21°C), e o sobrenadante desprezado pela inversão cuidadosa da microplaca em papel de filtro. Após inverter novamente essa microplaca sobre novo papel de filtro, centrifugá-la por 1 min a 900 rpm (21°C) e levá-la ao termociclador para secagem a 75°C por 5 min, os precipitados foram ressuspensos em 10 µL de formamida para desnaturação, e as microplacas centrifugadas por 1 min a 900 rpm (21°C), incubadas para secagem por 5 min a 95°C, e então imediatamente submetidas a choque térmico em banho de gelo antes da submissão ao sequenciador automático. A separação dos fragmentos nucleotídicos do DNA foi realizada no sequenciador (*ABI PRISM 3100 DNA Sequencer* da Applied Biosystem), utilizando-se a voltagem de 1,6 kV por 10 s na injeção da amostra, sendo cada corrida realizada a 60°C, por 2800 s, a 5 µAmp e 13,4 kV. As sequências totais do rRNA 16S foram editadas utilizando o programa SeqMan versão 7.0 (*DNASTAR Lasergene*), e comparadas àquelas depositadas no banco de dados de sequências do GenBank, EzTaxon e Ribosomal Database Project II.

#### **4.6. Cinética de crescimento de bactérias tolerantes (meio líquido) aos herbicidas testados, em cultivo líquido em diferentes concentrações**

Foram selecionadas as 4 bactérias que apresentaram os melhores desempenhos frente aos mesmos em meio sólido (maiores concentrações testadas) e capazes de produzir três ou mais enzimas extracelulares. Para a avaliação da cinética dos isolados foi utilizado o meio Caldo nutriente na concentração de 1% de seus constituintes (meio descrito no item 4.11 sem a adição de ágar) contendo um dos três herbicidas estudados (10, 25, 50 100  $\mu\text{g/mL}$ ). O cultivo foi realizado tubos Falcon contendo 30 mL de meio, após inoculação de suspensão aquosa com  $1 \times 10^6$  células  $\text{mL}^{-1}$  do isolado estudado. As culturas foram incubadas sob agitação orbital (150 rpm) em Banho-Maria a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , no escuro durante 240h. Imediatamente após a inoculação e em intervalos de 48 h durante todo o período de incubação, alíquotas (1,1 mL) destas culturas foram colhidas tanto para a contagem de células ( $\cong 100\mu\text{L}$ ), com o auxílio de câmara de Neubauer sob microscopia óptica binocular (640 X), quanto para a mensuração de sua densidade óptica. O volume restante (29,9mL) após a coleta das alíquotas foi centrifugado a 10.000 g (centrífuga SIGMA, modelo 2K15) por 10 min ( $10^\circ\text{C}$ ), sendo o sobrenadante reservado sob refrigeração para posterior uso nas análises químicas, e o precipitado microbiano foi resuspenso e lavado (duas vezes) em água destilada estéril para mensuração da absorvância a 560 nm, visando verificar a biomassa em base úmida. O pH do meio ao longo do tempo também foi monitorado com o auxílio de medidor de pH (PHTEK<sup>TM</sup>, modelo pH-100).

Esse ensaio totalmente casualizado com réplicas dos tratamentos foi repetido três vezes.

##### **4.6.1. Conteúdo de matéria orgânica oxidável (demanda química de oxigênio)**

Com a finalidade de avaliar o conteúdo de matéria orgânica oxidável presente no meio de cultivo, a partir de 2 mL das amostras do sobrenadante foi determinada a demanda química de oxigênio conforme metodologia descrita no “*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*” (APHA-AWWA-WEF, 1998). A este volume foram acrescentados 1,5 mL da solução digestora ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HgSO}_4$ ) e 3,5 mL de solução catalisadora ( $\text{H}_2\text{SO}_4$  +  $\text{Ag}_2\text{SO}_4$ ) em tubo de vidro com tampa. A solução resultante foi digerida por 2 h a  $150^\circ\text{C}$  e as medidas das absorvâncias a 620 nm foram efetuadas em espectrofotômetro.

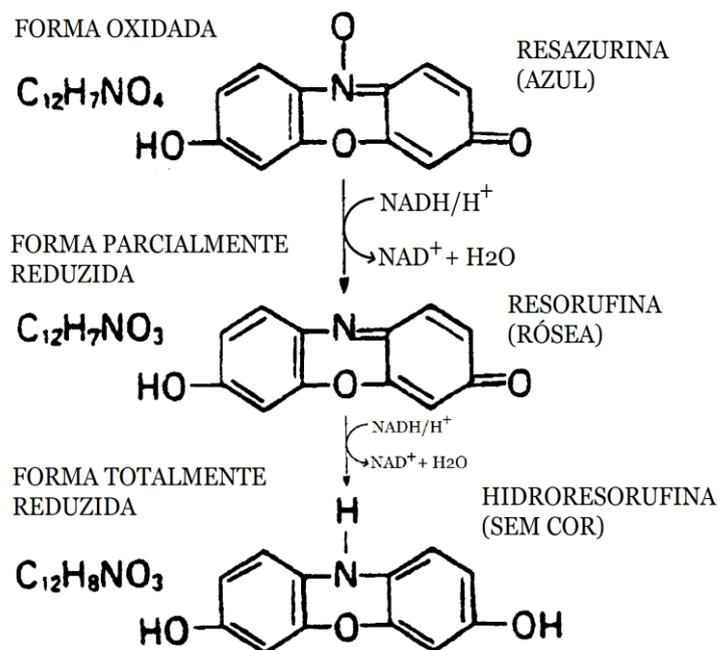
#### 4.6.2. Conteúdo de Proteínas Totais

A concentração de proteínas totais nas amostras foi determinada através do método descrito por LOWRY *et al.* (1951). Alíquotas de 200  $\mu\text{L}$  das amostras centrifugadas foram transferidas para tubos de ensaio e a este volume foram adicionados 1 mL da mistura reativa composta por uma solução A (4  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de NaOH + 20  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e solução B (10  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de tartarato de sódio e potássio + 5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de  $\text{CuSO}_4$ ) e agitados. A mistura reativa foi preparada na proporção de 50:1 das soluções A e B, respectivamente. Os tubos de ensaio foram incubados a temperatura ambiente no escuro por 15 min. Em seguida a estes foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  do reagente Folin 1N sob agitação e após 30 min de incubação foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 750 nm. As absorbâncias obtidas foram analisadas em uma curva-padrão de albumina de soro bovino nas concentrações de 0 a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  em solução salina.

#### 4.6.3. Avaliação da toxicidade dos herbicidas pelo método da resazurina

O ensaio para a verificação da toxicidade utiliza a resazurina para verificar a presença de crescimento microbiano, sendo que a alteração da coloração original desse corante de azul para róseo (resorufina) indica a presença de células viáveis em crescimento, produzindo enzimas que catalisam a redução (desidrogenases) da substância, e a manutenção da coloração azul indica ausência de viabilidade celular (Figura 10).

**Figura 10-** Reação de redução parcial ou total do corante Resazurina em células vivas.



Fonte: Adaptado de BROUWER, 1991.

O teste foi efetuado conforme descrito por Brouwer (1991). Para tanto, preparou-se inicialmente três misturas de reação para avaliar o efeito dos herbicidas sobre a viabilidade das culturas microbianas: a) Controle reagente - solução reagente resazurina (400 µL), meio de cultura (1,5 mL) e água destilada estéril (100 µL); b) Controle Cultivo - meio de cultivo (1,1 mL) inoculado com suspensão aquosa (400 µL) de células microbianas ( $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ) com 24 h, resazurina (400 µL) e água destilada estéril (100 µL); c) Solução testada: meio de cultivo (1,1 mL) inoculado com suspensão aquosa (400 µL) de células microbianas ( $1 \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$ ), resazurina (400 µL) e solução do herbicida (100 µL) na concentração de 10 µg.mL.

Após o estabelecimento das misturas de reação, os tubos foram incubados (32°C, 24 h, ao abrigo da luz) e, então, acrescidos de 3 mL de etanol absoluto, para cessar a atividade microbiana. As amostras foram centrifugadas (1000 g, 5 min) e as absorbâncias dos sobrenadantes mensuradas a 580 nm, utilizando-se como branco o Reagente controle (A).

#### 4.6.4. Conteúdo de ureia em meio contendo o herbicida diuron

Para amostras do sobrenadante do herbicida diuron, o teor de ureia foi determinado através da reação enzimático-colorimétrica através do *kit* comercial Labtest® Ureia-CE. A 1 mL de uma solução de urease tamponada ( $268 \text{ KU.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $10 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) foram adicionados 10 µL do sobrenadante, esta solução foi incubada a 37°C durante 5 min. Em seguida foi adicionada a essa solução uma alíquota de 1 mL do reagente oxidante (NaOH  $2,8 \text{ mol.L}^{-1}$  e NaClO  $121 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e novamente incubada a 37°C durante 5 min. O mesmo procedimento foi adotado para o “branco” utilizado na calibração do espectrofotômetro e para o padrão de ureia fornecido no *kit*, a leitura foi efetuada a 600 nm. Os resultados foram plotados em uma equação previamente estabelecida e fornecidos em µg.mL<sup>-1</sup> de ureia.

$$\text{Ureia } (\mu\text{g.mL}^{-1}) = \frac{\text{Absorbância da amostra}}{\text{Absorbância do padrão}} \times 70 \quad \text{equação (1)}$$

#### 4.6.5. Conteúdo de sulfentrazone por espectrofotometria

Inicialmente procedeu-se a determinação das absorção máxima ( $\lambda$ ) de solução aquosa de sulfentrazone ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) através de uma varredura por espectrofotometria na região do ultravioleta (UV), na faixa de 200 a 400 nm (FEMTO modelo XI 800; cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico). Então, efetuou-se a medida as absorvâncias dos sobrenadantes de culturas que continham sulfentrazone a partir do ajuste do comprimento de onda compatível (230 nm) para esse herbicida, contra uma curva-padrão de 0-0,05 µg · mL<sup>-1</sup> de padrão.

#### 4.7. Solubilização de fosfato pelos isolados bacterianos selecionados em meio contendo diferentes concentrações de herbicidas

Os quatro isolados selecionados foram submetidos a avaliação da capacidade de solubilização de fosfato em meios de cultura sólido e líquido acrescidos de um dos três herbicidas utilizados neste estudo. Antes, porém, foram ativados em meio caldo nutriente durante 24h ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 120 rpm), e alíquotas (50  $\mu\text{L}$ ) desses cultivos ( $\cong 1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>) foram inoculadas no meio específicos NBRIP (*National Botanical Research Institute's phosphate growth medium*) adaptado de NAUTYAL, 1999 – conforme descrito no Apêndice I). Para as culturas sólidas de meio NBRIP com ágar (em placas de Petri) e um dos herbicidas nas concentrações de 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , triplicadas das placas foram centralmente inoculadas com as suspensões dos isolados testados, e incubadas ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , escuro) por 7 e 15 dias de cultivo. O índice de solubilidade foi calculado dividindo-se o diâmetro da colônia + halo claro ao redor pelo diâmetro da colônia, sendo classificado como baixo ( $\text{IS} < 2$ ), médio ( $2 < \text{IS} < 3$ ) e alto ( $\text{IS} > 3$ ) (SILVA FILHO & VIDOR, 2000).

Para o meio NBRIP líquido (sem ágar), a concentração estabelecida de herbicida foi de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , monitorando-se também o pH após 3 e 7 dias de cultivo ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ , 120 rpm). O teor de fosfato das amostras foi detectado utilizando-se para tal o *kit* comercial Labtest®, conforme instruções do fabricante. O princípio do teste é a reação dos íons fosfato com molibdênio em meio ácido, formando um complexo amarelo, o qual, por ação de um tampão alcalino, é reduzido a azul-molibdênio que é medido colorimetricamente a 650 nm.

#### 4.8. Avaliação dos isolados selecionados frente a síntese de ácido indol-acético

Os níveis de auxina (AIA) secretados pelas bactérias no meio de cultura foram avaliados cultivando-as em meio Czapek líquido suplementado com L-Triptofano (Merck). Um pré-inóculo com as culturas foi mantido a  $30^\circ\text{C}$ , no escuro, sob agitação constante a 120 rpm durante 24 h. O inóculo bacteriano foi transferido para tubos Falcon de 50 mL contendo 20 mL do mesmo meio, suplementado com 200  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  de triptofano. Após 48 h de cultivo sob as mesmas condições, as culturas líquidas foram centrifugadas a 7.000g, durante 10 min a  $15^\circ\text{C}$ , e os sobrenadantes coletados. A quantidade de AIA por mL de cultura foi estimada conforme o protocolo de GORDON & WEBER (1951) com algumas modificações, e consistiu da mistura de 2 mL de reagente de Salkowski ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  2% +  $\text{H}_2\text{SO}_4$  37%) com 1 mL do sobrenadante da cultura, a qual foi reservada por 30 min em ambiente escuro para reação e manifestação de cor vermelha, mais intensa quanto maior a quantidade de AIA.

#### 4.9. Bioensaio para avaliação da ação das bactérias selecionadas sobre a germinação e crescimento de plântulas etioladas de milho

Para a avaliação da capacidade dos isolados em promover ou não o crescimento vegetal, 600 sementes de milho comercial foram selecionadas e previamente desinfestadas através da imersão com etanol a 70%, durante 5 min seguida da lavagem com água destilada esterilizada por três vezes, e nova imersão em solução de hipoclorito 2% seguida da lavagem com água destilada esterilizada em abundância. Posteriormente as sementes foram imersas durante 24 h a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  ou em água destilada estéril (120 sementes), ou em solução aquosa ( $1 \times 10^8$  células.mL<sup>-1</sup>) contendo uma das bactérias testadas (120 sementes para cada microrganismo), em erlenmeyers. As sementes tratadas com os isolados bacterianos (120 para cada microrganismo, sendo 30 por herbicida e controle com água destilada estéril) ou com água estéril (experimento fatorial totalizando 20 tratamentos), foram dispostas horizontalmente com espaçamento de 2 cm entre si, a 3 cm da borda de 3 folhas de papel de filtro (60 cm de largura  $\times$  30 cm de comprimento). Essas folhas foram umedecidas com água destilada estéril (Controle) ou com solução aquosa dos herbicidas (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Em seguida, a margem oposta de cada folha foi dobrada ao meio e emparelhada com a primeira para cobrir as sementes, iniciando-se a rolagem da lateral longitudinal esquerda para direita, formando um rolo. Cada rolo de sementes para germinação foi inserido em copos plásticos contendo cerca de 20 mL de água (Figura 11) e incubado por 7 dias ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , escuro), quando mensurou-se as taxas de germinação e do crescimento de radículas e de mesocótilos.

**Figura 11-** Ensaio para a avaliação da ação de bactérias (tolerantes a herbicidas e capazes de degradar compostos lignocelulolíticos, peróxido ou ureia), sobre a germinação e crescimento de plântulas etioladas de milho em papel de filtro embebido ou não com solução de um dos herbicidas estudados (100  $\mu\text{g.mL}$ ), sob condições de câmara escura a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  por 7 dias.



Fonte: AUTOR, 2015.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

---

### 5.1 Isolamento de microrganismos tolerantes a herbicidas em solo de cultivo antigo de cana-de-açúcar

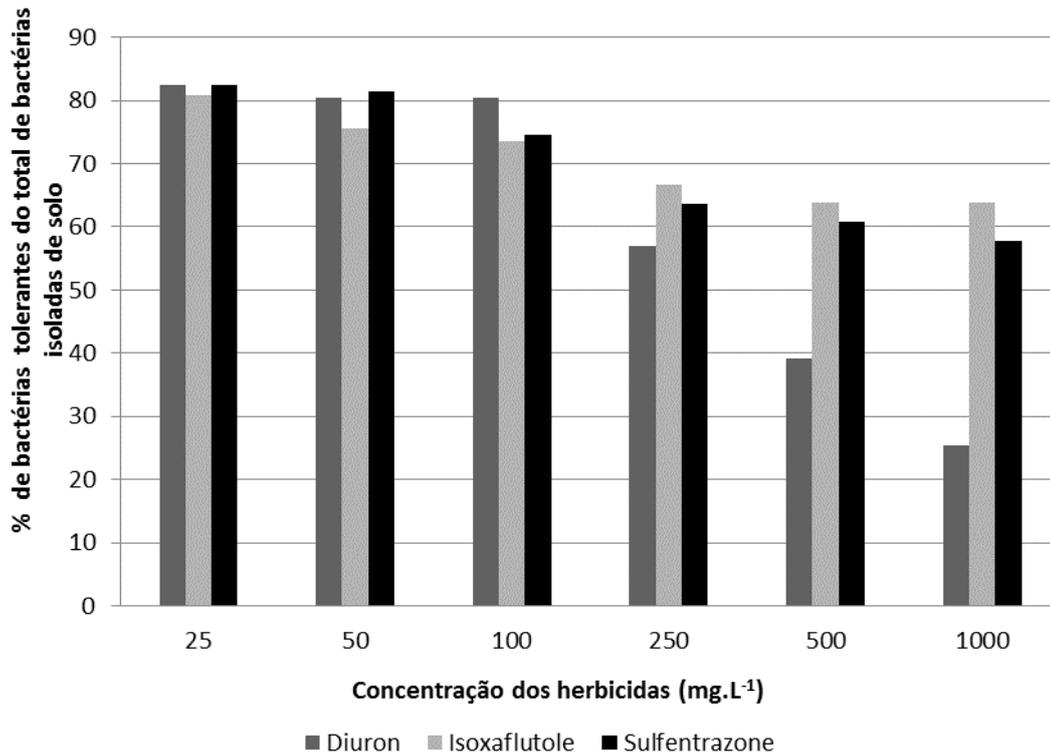
O isolamento de bactérias a partir de diferentes amostras de solo com histórico de 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar e tratamento com herbicidas, de agroindústria situada em Coruripe-AL (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool), resultou em 96 colônias bacterianas distintas, sendo que após purificação e análises microscópicas e bioquímicas, a maioria apresentou-se negativa para a reação de oxidase (86) e positiva para catalase (54 isolados). Dos 96 isolados, 53 mostraram-se bastonetes Gram negativos, e dos bastonetes Gram positivos, 23 são produtores de endosporos.

A maioria das cepas isoladas (62) apresentaram bom desenvolvimento *in vitro* na presença de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos três herbicidas testados - diuron, isoxaflutole e sulfentrazone, como principal fonte de carbono e energia, sendo tolerantes a teores de até 1000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  dos mesmos (Figura 12).

Alguns autores comprovam que bactérias podem apresentar crescimento sob teores elevados de distintos herbicidas. SETTE *et al.* (2005) demonstraram que seis linhagens do gênero *Streptomyces* foram capazes de crescer e degradar em 7 dias mais de 50% da concentração de 72  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do herbicida clorado alaclor (2-cloro-2',6'- dietil-N-metoximetilacetanilida). Dentre essas, somente as linhagens *Streptomyces* sp. LS166, LS177, e LS182 foram capazes de crescer na mais alta concentração testada, isto é, 144  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Da mesma forma, microrganismos isolados de solos com histórico de aplicação do herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) para o controle de invasoras de folhas largas que infestam pastagens e culturas na Região Amazônica, foram capazes de degradar e tolerar concentrações até 200  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  do mesmo, revelando-se resistentes a toxicidade do 2,4-D. Estes foram identificados como *Methylobacterium* sp., *Xanthobacter autotrophicus*, *Burkholderia cenocepacia*, *Aurantimonas* sp., *Campylobacter jejuni* e *Methylobacterium chloromethanicum* (MUSSY *et al.*, 2013). No presente estudo, cerca de 25%, 57% e 60% dos 96 microrganismos

isolados (Figura 12) foram capazes de crescer em meio mineral sólido contendo a concentração de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  respectivamente de diuron, sulfentrazone e isoxaflutole.

**Figura 12-** Percentual de bactérias capazes de tolerar diferentes concentrações de um dos três herbicidas testados do total de isoladas de solo argissolo amarelo distrófico abrupto fragipânico (10 cm de profundidade da superfície do horizonte A), com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil).



Fonte: AUTOR, 2015.

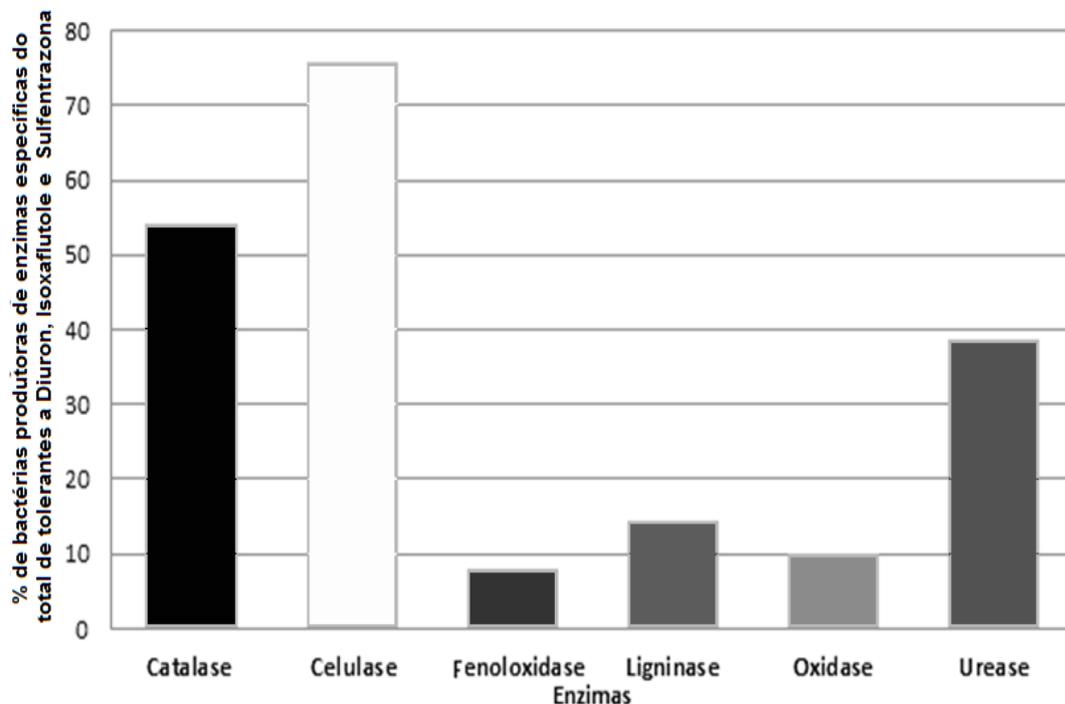
Os herbicidas diuron e sulfentrazone, assim como os herbicidas alaclor e 2,4-D estudados por SETTE *et al.* (2005) e MUSSY *et al.* (2013), apresentam ligações covalentes entre cloro e carbono em sua molécula, o que lhes confere persistência pela estabilidade das mesmas, contudo, ambos os grupos de pesquisa isolaram bactérias tolerantes e prováveis decompositoras de altas concentrações dos mesmos. No presente trabalho, 70% das cepas toleraram todos os herbicidas testados em concentrações extremamente maiores do que os limites estabelecidos pela legislação para estarem presentes na água sem trazerem riscos à saúde humana e animal (ANVISA, s/d; BRASIL, 2011; USEPA, 1995; 1996; 2001), isto é, acima de  $90 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para diuron,  $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para isoxaflutole e  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  para sulfentrazone. É possível que as recorrentes intervenções no solo estudado, com diferentes agroquímicos ao longo de 40 anos, tenha conduzido, por pressão de seleção, a tal resultado, e embora existam

muitos estudos acerca da biodegradação de diuron, poucos são os relatos referentes à capacidade de microrganismos tolerarem/ isoxaflutole e sulfentrazone.

## 5.2. Caracterização morfo-cultural e bioquímica das linhagens tolerantes a altas concentrações dos herbicidas estudados capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis

Assim, das 96 bactérias isoladas (Apêndice II), entre as 62 que apresentaram tolerância a altas concentrações dos herbicidas testados, verificou-se aquelas com maior perfil para degradar peróxido, uréia, celulose e compostos fenólicos como únicas fontes de carbono *in vitro*. Para tais substratos, a atividade enzimática predominante entre esses isolados foi da celulase (75%), seguida pela catalase (54%), urease (38%), lignina-peroxidase (15%), citocromo-oxidase (10%) e fenoloxidase (8%), como pode ser observado na Figura 13.

**Figura 13-** Percentual de bactérias capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis, do total de isolados de solo (horizonte A) Argissolo Amarelo distrófico abrupto fragipânico, com histórico de 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas) tolerantes a altas concentrações de um dos herbicidas diuron, sulfentrazone e isoxaflutole.



Fonte: AUTOR, 2015.

A predominância de bactérias capazes de degradar compostos lignocelulósicos é explicada pelo grande conteúdo de matéria orgânica vegetal presente no solo amostrado.

Enzimas celulolíticas são produzidas por uma variedade de fungos e bactérias, aeróbios e anaeróbios, mesofílicos e termofílicos, visto que esse polissacarídeo é o principal componente da biomassa vegetal, sendo abundante nos ecossistemas terrestres e aquáticos (SHANKAR *et al.*, 2011). Contudo, relativamente poucos microrganismos produzem altos níveis de celulases extracelulares capazes de solubilizar extensivamente a celulose cristalina (BHAT & BHAT, 1997). Já as enzimas envolvidas na degradação de lignina - lacase, peroxidase, manganês-peroxidase, dioxigenases, oxidases, monoxigenases, glutationa-S-transferase, isomerases, hidrolases, ligases, entre outras (PERESTELO *et al.*, 1989; MASAI *et al.*, 2006), podem também ser secretadas para biodegradar agroquímicos (VERMA *et al.*, 2014). Tais enzimas convertem compostos orgânicos complexos e tóxicos (organoclorados, organofosfatos e carbamatos), de locais contaminados como solo, águas subterrâneas, lodo, sistemas de águas industriais e gás, em metabólitos geralmente menos tóxicos, e até favorecem a absorção de produtos inorgânicos simples (ABRAHAM *et al.*, 2002; YOU & LIU, 2004; WOOD, 2009; FINLEY *et al.*, 2010; PORTO *et al.*, 2011). Para tanto, catalisam hidrólises, oxidações com adição de átomos de oxigênio a duplas ligações, oxidações de um grupo amino (NH<sub>2</sub>) a um grupo nitro, adição de um grupo hidroxila a um anel de benzeno, desalogenação, redução de um grupo nitro (NO<sub>2</sub>) a um grupo amino, substituição de um átomo de enxofre por um átomo de oxigênio, enfim, o metabolismo de cadeias laterais ou a clivagem de anéis (VERMA *et al.*, 2014).

Segundo SCHALLMEY *et al.* (2004), a habilidade de cepas do gênero *Bacillus* em sintetizar e secretar grandes quantidades de enzimas, entre elas celulases e ligninases (lignina-peroxidases), em temperaturas elevadas e numa ampla faixa de valores de pH, torna-as muito utilizadas nos processos fermentativos. Quanto a catalase e a oxidase, além de sua função protetora contra o estresse oxidativo, como já foi evidenciado em diferentes espécies de *Bacillus*, também desempenham papéis importantes em diversos processos microbianos (MLIKI & ZIMMERMANN, 1992), como na oxidação de compostos aromáticos, incluindo os de substâncias recalcitrantes.

Estudos de BÁCMAÇA *et al.* (2015), evidenciam que a aplicação no solo de uma mistura de herbicidas (diflufenican + mesosulfuron-metil + iodosulfuron-metil-sódio), é capaz de estimular a produção de catalase, urease e fosfatase ácida na comunidade microbiana local.

Vários gêneros de microrganismos, portanto, estão adaptados para crescer em solos contaminados com xenobióticos, e estes, em geral, participam de processos de acumulação ou degradação daqueles (biotransformação, biomineralização, biorremediação) por metabolismo ou co-metabolismo (SHAKOORI *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2003; FINLEY *et al.*, 2010). O

processo de biodegradação é frequentemente complexo e envolve uma série de reações bioquímicas, e vários genes/enzimas que favorecem esse processo já foram identificados e caracterizados. Portanto, as enzimas secretadas pelos microrganismos isolados podem atuar em uma série de processos, principalmente aqueles de desprendimento das moléculas recalcitrantes das partículas do solo, e então de sua decomposição. As enzimas fenoxidases são bastante importantes neste processo uma vez que auxiliam na degradação de compostos aromáticos persistentes no solo.

Uma compreensão mais abrangente das rotas degradativas requer estudos mais aprofundados, visto que a maioria visa apenas a remoção de um composto particular, negligenciando os metabólitos oriundos deste e o seu destino no ambiente (PORTO *et al.* 2011), bem como sua relação com este (AISLABIE & LLOYD-JONES 1995). Além disso, alguns aspectos fisiológicos, ecológicos, bioquímicos e moleculares desempenham um papel importante na transformação microbiana dos poluentes (IRANZO *et al.* 2001; VISCHETTI *et al.* 2002), que é executada pela necessidade energética ou de detoxificação, ou pelo cometabolismo (PAUL *et al.* 2005). Esses caminhos dependem tanto da acessibilidade quanto da disponibilidade dos agroquímicos aos microrganismos (RAMAKRISHNAN *et al.* 2011).

Assim, dos 62 isolados mais tolerantes aos herbicidas estudados, quatro foram selecionados pelo maior espectro positivo das atividades enzimáticas testadas, além de tolerarem simultaneamente os três herbicidas. Todos produziram fenoxidase, dois secretaram ligninase e três expressaram urease *in vitro* (Tabela 4). Esta última atividade pode atuar na remoção da ureia presente na estrutura do herbicida diuron, auxiliando na biodegradação do composto. A caracterização presuntiva dessas quatro bactérias a partir de análises morfo-bioquímicas (Tabela 4) permitiu constatar que três delas são bastonetes Gram positivos e produzem endosporos, apresentando metabolismo aeróbio facultativo ou estrito, sugerindo se tratarem de espécies de *Bacillus*.

**Tabela 4-** Aspectos morfo-bioquímicos dos quatro isolados bacterianos tolerantes as altas concentrações de três herbicidas e capazes de degradar compostos lignocelulolíticos, peróxido ou ureia, provenientes de solo argissolo amarelo distrófico, com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil).

Aspectos Morfo-Bioquímicos	Isolados Bacterianos			
	ACO PR1 Isox	ACO G1a Diu	APF SG3 Isox	Papio G2
Gram	+	+	+	-
Forma	bastonete	bastonete	bastonete	bastonete
Presença de endosporo	+	+	+	-
Aspecto das colônias (Ágar Nutriente)	Circulares, grandes e planas, bordas inteiras a onduladas com anéis, cor creme-amarelada e superfície granulada opaca.	Circulares, mucóides, bordas irregulares, branco-cremosas, superfície brilhante.	Forma irregular, grandes, elevação convexa, de margem ondulada, cor branco-creme opaca.	Circulares, pequenas, bordas inteiras, elevação pouco convexa a plana, branco-amarelas superfície opaca.
Motilidade (Meio SIM)	+	+	+	+
Produção de H <sub>2</sub> S (Meio SIM)	-	-	-	-
Produção de Indol (Meio SIM)	-	+	-	-
Utilização de Citrato como única fonte de Carbono	+	+/-	+	+
Fermentação de glicose (TSI)	+, aeróbio ou facultativo	+, aeróbio	+, aeróbio ou facultativo	-, aeróbio
Fermentação de sacarose (TSI)	+	-	+	-
Oxidação da sacarose e peptona (TSI)	+	+	+	+
Produção de Gás (TSI)	-	-	-	-
Produção de FeS (TSI)	-	-	-	-
Fermentação de lactose (Ágar McConkey)	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+
Citocromo <i>c:o</i> Oxidase*	-*	-	-*	+
Ligninase	-	+	-	+
CMCase	+	+	+	+
Fenoloxidase	+	+	+	+
Urease	+	-	+	+

(-\*) teste subjetivo, em tiras de papel contendo reagente de Kovacs; (-) negative; (+) positive

No entanto, uma característica importante para definir tal gênero, a expressão positiva de oxidase no teste utilizado, não foi obtida. Relatos de JURTSUK & LIU (1983), já haviam

indicado que *Bacillus* spp. fornecem respostas variáveis ao teste qualitativo de oxidase em tiras de papel embebidas na solução de Kovacs, em especial porque a avaliação da resposta da mudança da coloração do reagente num prazo de 30-45 s, como preliminarmente concebido para espécies de *Pseudomonas* que exibem rapidamente altas concentrações de oxidase, não se aplica ao gênero *Bacillus*. Isto porque muitas estirpes desse gênero apresentam baixos níveis dessa atividade enzimática, requerendo mais tempo (superior a 1 min) para a oxidação do reagente. Tais autores também evidenciaram, através do teste quantitativo colorimétrico utilizando o reagente *N,N,N',N'*-tetrametil-*p*-fenilenediamino (TMPP) e extratos de membranas das células dos isolados, que estirpes de *Bacillus* respondem com níveis variados de produção de oxidase. A partir de 342 cepas analisadas, verificou-se que 159 (48%) previamente classificadas pelo teste de Kovacs como oxidase-indeterminadas, visto responderem negativamente aos 45s e positivamente após 1 min, oxidaram o reagente TMPP com atividades variando de 0.001 a 0.399 U nas condições utilizadas. A maioria das cepas de *B. subtilis*, por exemplo, enquadrava-se nessa situação, e apresentaram atividade de oxidase no teste quantitativo com o TMPP variando de 0.01 U a 0.144U. Por outro lado, as estirpes de *B. subtilis* originalmente consideradas oxidase-positivas após 45 s no teste de Kovacs, exibiram atividades específicas iguais ou superiores a 0.400 U no método do TMPP. Análises de membranas de estirpes de *Bacillus* originalmente consideradas oxidase-positivas e oxidase-indeterminados pelo teste de Kovacs, revelaram que todas continham citocromo-c oxidase, sugerindo que o teste quantitativo é o mais indicado nos estudos de identificação de *Bacillus*.

Atualmente, o teste de Kovacs é raramente indicado para estirpes mesofílicas ou psicrófilas de *Bacillus*, mas ainda é usado rotineiramente no estudo de espécies de *Bacillus* termofílicos e de muitos outros gêneros de bactérias aeróbias.

Assim, para esclarecer com mais precisão a identidade dos isolados selecionados, estes foram submetidos a extração de seu DNA e amplificação da região intragenômica 16S rRNA, bastante utilizada por estar presente em todos os microrganismos e permitir que se estabeleçam relações de parentesco e identificação, sendo considerada o “*gold standard*” da filogenia (CASE *et al.*, 2007).

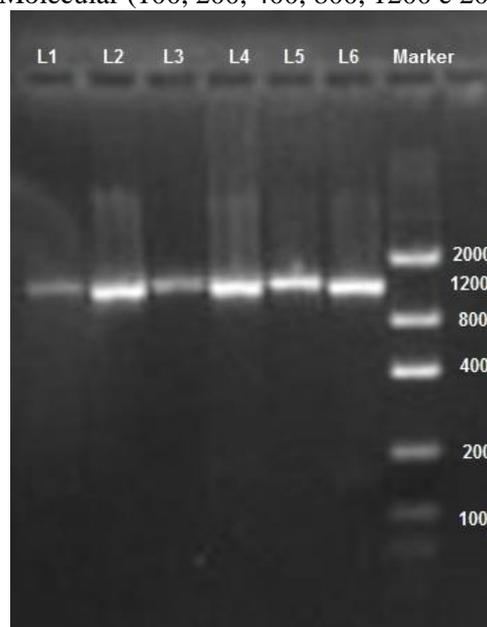
### **5.3. Identificação molecular (análise das sequências do gene 16s rRNA) das linhagens selecionadas**

Solos apresentam composição heterogênea e constituem-se nos principais reservatórios de carbono orgânico da Terra, além de representarem um dos mais importantes habitats para os mais diversos tipos de microrganismos). Ainda que, no caso particular deste

trabalho, as amostras para isolamento de bactérias sejam oriundas de solo de longo tempo de monocultivo de cana-de-açúcar, selecionando populações, as práticas culturais de adubação, correção de pH, etc., ainda favorecem alguma variabilidade. A evolução dos estudos genômicos, com técnicas cada vez mais precisas, rápidas e sensíveis de sequenciamento de ácidos nucleicos, têm gerado muitas informações de fragmentos gênicos, as quais são depositadas em bancos de dados e favorecem imensamente a bioprospecção e a elucidação da diversidade do solo e sua filogenia, permitindo a compreensão da funcionalidade das populações microbianas e suas interações com outros seres como plantas.

Após o sequenciamento dos fragmentos nucleotídicos obtidos dos produtos da amplificação do gene 16S rRNA, estes foram analisados, editados e comparados àqueles depositados no banco de dados de sequências do GenBank, EzTaxon e Ribosomal Database Project II (Figura 14; Tabela 5), e somando-se a essas comparações as características morfo-bioquímicas previamente analisadas (Tabela 4), demonstrou-se que as estirpes selecionadas correspondem a *Bacillus megaterium*, *Bacillus toyonensis*, *Lysinibacillus macroides* e *Alcaligenes faecalis*, sendo suas sequências depositadas no GenBank (NCBI) sob os códigos de acesso respectivamente: KX129778, KX12981, KX129780 e KX129779.

**Figura 14-** Perfil eletroforético em gel de agarose (1%) de produtos de PCR (amplicons) do gene 16S rRNA dos quatro isolados bacterianos (dois deles em duplicata) obtidos de solos cultivados por longo tempo com cana de açúcar e selecionados pela tolerância a herbicidas e espectro de enzimas extracelulares. Colunas: L1 – APF.SG3 (*Bacillus megaterium*); L2 e L3- Papio.G2 (*Alcaligenes faecalis*); L4 – ACO.GLA Diu (*Lysinibacillus macroides*); L5 e L6 – ACO.PR1 Isox (*Bacillus toyonensis*); Coluna 7= Marcador Molecular (100, 200, 400, 800, 1200 e 2000 pb).



Fonte: AUTOR, 2015.

**Tabela 5-** Análise do sequenciamento dos amplicons do gene 16S rRNA das bactérias isoladas de solo com longo histórico de cultivo de cana-de-açúcar (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, Coruripe, Alagoas, Brasil) e selecionadas por serem tolerantes a altas concentrações de três herbicidas e capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis em meio sólido.

<b>Código dos Isolados LBPMA</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Similaridade (%) com sequências da espécie tipo</b>		
ACO. G1a Diu	1517	<b>1494/1504</b>	<b>99,34%</b>	<b><i>Lysinibacillus macroides</i> AJ628749</b>
		1333/1349	99,18%	<i>Lysinibacillus xylanilyticus</i> FJ477040
ACO. PR1 Isox	1512	1305/1306	99,92%	<i>Bacillus anthracis</i> AB190217
		1511/1512	99,92%	<i>Bacillus anthracis</i> NC_007530
		1511/1512	99,92%	<i>Bacillus cereus</i> AE016281
		1481/1486	99,92%	<i>Bacillus thuringiensis</i> D16281
		<b>1507/1512</b>	<b>99,93%</b>	<b><i>Bacillus toyonensis</i> CP006863</b>
APF. SG3 Isox	1523	1515/1517	99,87%	<i>Bacillus aryabhatai</i> EF114313
		1482/1446	99,73%	<i>Bacillus megaterium</i> D16273
		<b>1494/1495</b>	<b>99,93%</b>	<b><i>Bacillus megaterium</i> GU2522112</b>
PapiroG2	1501	177/1492	98,99%	<i>Alcaligenes aquatilis</i> JX986974
		<b>1460/1473</b>	<b>99,12%</b>	<b><i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>faecalis</i> D88008</b>
		1399/1416	98,80%	<i>Alcaligenes faecalis</i> subsp. <i>parafaecalis</i> AJ242986

Segundo ARABET *et al.* (2014), espécies pertencentes aos gêneros *Lysinibacillus*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, e *Paenibacillus*, são amplamente encontradas como altamente resistentes a herbicidas do tipo sulfonilureia. MALGHANI *et al.*, em 2008, haviam relatado o isolamento e identificação molecular (sequenciamento do gene 16S rRNA) de bactérias degradadoras de profenofós (O-4-bromo-2-clorofenil O-etil S-propil fosforotioato) em solo, concluindo que os tolerantes obtidos mostraram 96% de similaridade com *Pseudomonas putida* e 99% de similaridade com *Burkholderia gladioli*. Por outro lado, DELLAMATRICE & MONTEIRO (2004) estudaram a biodegradação de diuron em solos com e sem histórico de aplicação do mesmo, por um consórcio microbiano formado por duas espécies de *Bacillus* spp e uma de *Acinetobacter johnsonii*. Quando avaliadas individualmente, apenas *A. johnsonii* foi capaz de crescer em meio contendo diuron como única fonte de carbono, sugerindo uma relação simbiótica que favoreceu o crescimento das cepas de *Bacillus*. SILVA *et al.* (2008) avaliaram o efeito de herbicidas sobre células e esporos de *B.thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* (Btk) *in vitro*, constatando que este varia conforme a técnica de avaliação empregada,

o estágio/fase do ciclo de vida do patógeno (célula e esporo), e as concentrações dos produtos. Verificaram também que sulfentrazone e imazetapir foram metabolizados pela bactéria.

As dicloroanilinas (DCAs), amplamente utilizadas na síntese de vários produtos (azocorantes, tintas, cosméticos, herbicidas e outros produtos químicos) são também os principais metabólitos derivados da decomposição de herbicidas do grupo fenilamida, como o diuron, linuron e propanil, sendo detectadas com maior frequência em amostras ambientais do que os herbicidas originais (YAO *et al.*, 2011). *B.megaterium* IMT21 foi capaz de mineralizar vários isômeros de DCAs: 2,3-, 2,4-, 2,5-, 3,4- e 3,5-DCA como fontes únicas de carbono e energia em meio mínimo. As 2,3-, 2,4- e 2,5-DCA foram degradadas em taxas comparáveis, e a degradação completa foi observada dentro de 20 dias. No entanto, foram necessários 30 dias para a degradação completa de 3,4- e 3,5-DCA (YAO *et al.*, 2011). Segundo HONGSAWAT & VANGNAI (2011), apesar dos inúmeros trabalhos sobre a genética envolvida na biodegradação da anilina, os genes específicos para a degradação de cloroanilinas ainda não foram descritos. Sendo portanto prematuro afirmar que exista um sistema enzimático único envolvido na degradação e compostos contendo anilina em sua composição.

FAN *et al.* (2012) isolaram de solo contaminado uma cepa capaz de degradar altas concentrações do herbicida glifosato, sendo essa identificada, através da análise do rRNA 16S, como *B. cereus*. Segundo os autores, a concentração ótima para a degradação do glifosato por este microrganismo foi de 6 gL<sup>-1</sup>, sendo, porém, observada taxa de degradação de 79,6% quando a concentração presente era de 12 gL<sup>-1</sup> (solubilidade máxima de glifosato em água a temperatura ambiente). Duas vias são relatadas para a degradação do glifosato. Uma envolve a clivagem da ligação C-N pela enzima glifosato-oxidoreductase com a formação de glioxilato e ácido aminometilfosfônico (AMPA) (KISHORE & BARRY, 1992). E a segunda dá-se pela clivagem inicial da ligação C-P gerando sarcosina, glicina e formaldeído pela ação de uma enzima C-P liase (SVIRIDOV *et al.*, 2011).

WU *et al.* (2009), por sua vez, relataram que a bactéria *Lysinibacillus sphaericus* WH22 foi capaz de degradar diclorometano utilizando-o como única fonte de carbono e energia, bem como de se desenvolver em muitos outros halocarbonetos encontrados em gases residuais de efluentes industriais, tais como 1,2-dicloroetano, clorobromometano, brometo de metileno, 1,1,1-tricloroetano, tricloroetileno, e hexaclorobenzeno. Em trabalhos realizados por LIANG *et al.* (2009), *Lysinibacillus* sp ZB-1, foi isolada de solos agrícolas contaminados com fomesafen, um herbicida tipo éter difenila utilizado especificamente na pós-emergência de soja e feijão para o controle de espécies invasoras, esse herbicida é persistente durante um longo período de tempo no solo, e seus resíduos apresentam grande fitotoxicidade e danos em

rotação de culturas, o metabolismo microbiano representa o principal processo de degradação de éteres difenila no solo. A degradação de fomesafen por *Lysinibacillus* sp. ZB-1 é resultado da reação de redução e acetilação do grupo nitro e a posterior descloração do composto. Em outro estudo desenvolvido com uma cepa de *Lysinibacillus* (BY-1), Feng *et al.* (2012) verificaram que a via de degradação do fomesafen pode envolver a redução do grupo nitro para se obter um composto amino, seguida pela acetilação dos grupos aminoderivados, uma descloração, desfluoração e, por fim, a clivagem da ligação S-N.

MIRITI *et al.* (2014) também isolaram, entre as bactérias capazes de degradar linuron [3-(3,4-Diclorofenil)-1-metoxi-1-metilureia] em 4 regiões hortícolas do Kenia, uma *Lysinibacillus* sp. LOG-8<sup>a</sup>. Esta apresentou uma taxa de redução de 62,7% no conteúdo do produto após 70 dias de incubação em meio mínimo suplementado, que foi seguido por um declínio acentuado da biomassa, indicando sua morte celular.

Com relação às espécies de *Alcaligenes*, estas têm sido relacionadas a degradação de bifenilas policloradas com até 4 substituintes. O isolado *Alcaligenes* JB1 foi capaz de metabolizar três monoclorobenzoatos e diclorobenzoatos contendo apenas substituintes *meta* e *para* do cloro, mas não conseguiu metabolizar diclorobenzoatos com apenas um substituinte *orto* (COMMANDEUR *et al.*, 1996). De acordo com DEVERYSHETTY & PHALE (2010), *Alcaligenes* PPH utiliza fenantreno como única fonte de carbono. A atividade específica *versus* o perfil de crescimento e estabilidade térmica indicaram a presença de duas hidroxilases distintas, salicilato-1-hidroxilase e hidroxilase do ácido 1-hidroxi-2-naftóico nesta cepa. Estas enzimas são capazes de converter o 1-hidroxi-2-ácido naftóico (1-H2NA) a 1,2-dihidroxinaftaneno (1,2-DHN), ácido salicílico e catecol.

Segundo KONG *et al.* (2013) a cepa *A. faecalis* JBW4 foi capaz de degradar o pesticida organoclorado endosulfan [1,4,5,6,7,7-hexacloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ilenebis metileno) sulfito], através de uma via não oxidativa. Esta cepa foi capaz de degradar 87,5% de  $\alpha$ -endosulfan e 83,9% of  $\beta$ -endosulfan em 5 dias. Estas taxas de degradação são maiores que as reportadas para outras cepas bacterianas. O endosulfan é degradado por uma via hidrolítica tendo o endosulfan diol e endosulfan lactona como os principais metabólitos. O endosulfan e seu isômero são degradados por hidrólise para formar o endosulfan diol, um metabolito mais solúvel em água e não tóxico indicando que o organismo utiliza uma via hidrolítica no metabolismo do endosulfan.

#### 5.4 Crescimento das bactérias tolerantes previamente selecionadas em meio sólido em cultura submersa contendo diferentes concentrações dos herbicidas estudados

Os quatro isolados selecionados (*Bacillus toyonensis*, *B. megaterium*, *Lysinibacillus macroides* e *Alcaligenes faecalis*) por serem tolerantes *in vitro* a altas concentrações de diuron, sulfentrazone e isoxaflutole, obtidos de solo com histórico de 40 anos de cultivo de cana-de-açúcar de agroindústria do litoral sul de Alagoas (S.A. Usina Coruripe Açúcar e Álcool, e capazes de degradar peróxido, ureia, celulose ou fenóis, tiveram seu crescimento (respectivamente Figuras 15-18) em meio mínimo J.E. com diferentes concentrações dos herbicidas diuron (a), isoxaflutole (b) e sulfentrazone (c) mensurados ao longo do tempo em termos de unidade formadora de colônia (UFC). Durante as primeiras 48 h de cultivo na concentração de 10 µg.mL<sup>-1</sup> dos três herbicidas testados (Figuras 15-18), observou-se o crescimento efetivo de todos os isolados. No entanto, o mesmo não pode ser constatado para as demais concentrações desses produtos - possivelmente em face da toxicidade das mesmas em meio líquido. Para os isolados *B. toyonensis* (Figura 15) e *B. megaterium* (Figura 16) a fase *lag* foi postergada para até 144h nas concentrações de 25-100µg.mL<sup>-1</sup> de isoxaflutole, um herbicida com ligações carbono-fluor no meio de cultivo. Para os herbicidas com cadeias cíclicas cloradas (diuron e sulfentrazone), estes microrganismos não apresentaram crescimento satisfatório nas culturas contendo tais concentrações dos mesmos.

Conforme já foi mencionado, degradação de compostos aromáticos clorados e fluorados, como é o caso dos herbicidas estudados, é dificultada proporcionalmente pela quantidade de halogênios presentes na molécula, os quais dificultam o acesso das enzimas às interações moleculares (BATISSON *et al.*, 2007). No entanto, segundo ROQUE & MELO (2000), muitos microrganismos são capazes de metabolizar parcialmente o diuron, ainda que maioria dos estudos aponte para sua conversão a compostos possivelmente mais tóxicos (GIACOMAZZI & COCHET, 2004) e que devem ser co-metabolizados por outros microrganismos. Esse fato, além da possibilidade do surgimento de mutações que permitam a resistência na presença das altas concentrações dos herbicidas, são determinantes para favorecer às espécies de microrganismos se multiplicarem perpetuando tal característica e vencendo a pressão de seleção.

Várias espécies de *Bacillus* têm sido descritas como degradadoras de xenobióticos como agroquímicos. DURAND *et al.* (2006) relataram pela primeira vez a biodegradação do herbicida mesotrione por uma linhagem de *Bacillus* sp. ZHOU *et al.*(2008) isolaram uma

estirpe de *Bacillus* e outra de *Salirhabdus* capazes de degradar o herbicida atrazina em filtros de areia e carvão ativado expostos a concentrações significativas desse herbicida na água.

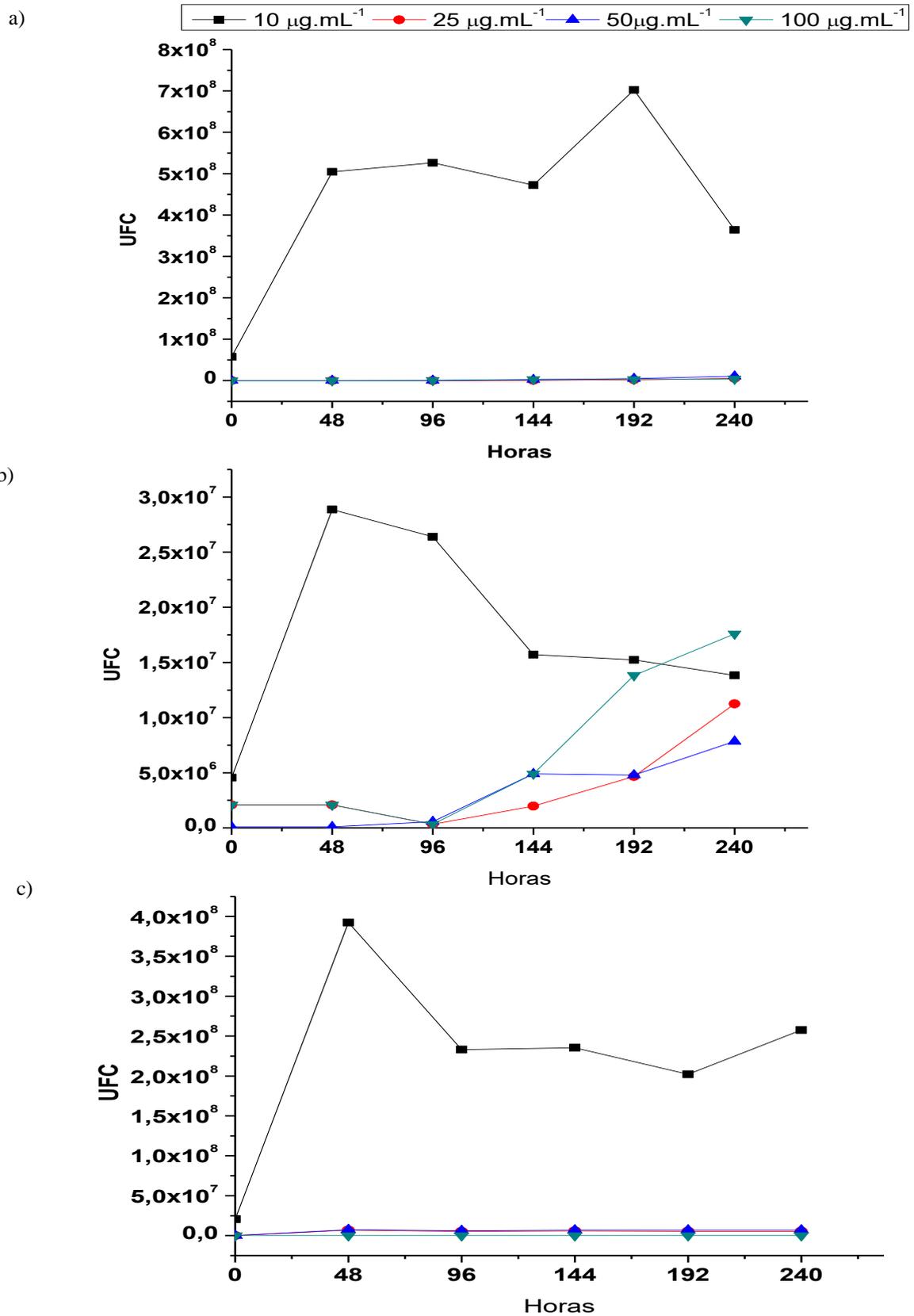
O isolado *Lysinibacillus macroides* foi uma exceção quando comparado aos demais microrganismos no tocante a tolerância às mais altas concentrações testadas dos herbicidas, reduzindo sua fase *lag* nas mesmas para as primeiras 48h de cultivo.

Entre os gêneros capazes de degradar linuron (um herbicida da mesma classe do diuron), MIRITI *et al.* (2014) isolaram de um solo usado na prática agrícola no Kenia uma espécie de *Lysinibacillus*, além de outras de *Pseudomonas*, *Arthrobacter* e *Flavobacterium*. Segundo estudos de LIANG *et al.* (2009), a estirpe de *Lysinibacillus* ZB-1 isolada em amostras de solo foi capaz de degradar cerca de 81,32% do herbicida fomesafem em altas concentrações, o qual é altamente fitotóxico. Portanto, esse gênero de bactérias já tem histórico de apresentar potencial genético para tolerar e/ou degradar xenobióticos recalcitrantes.

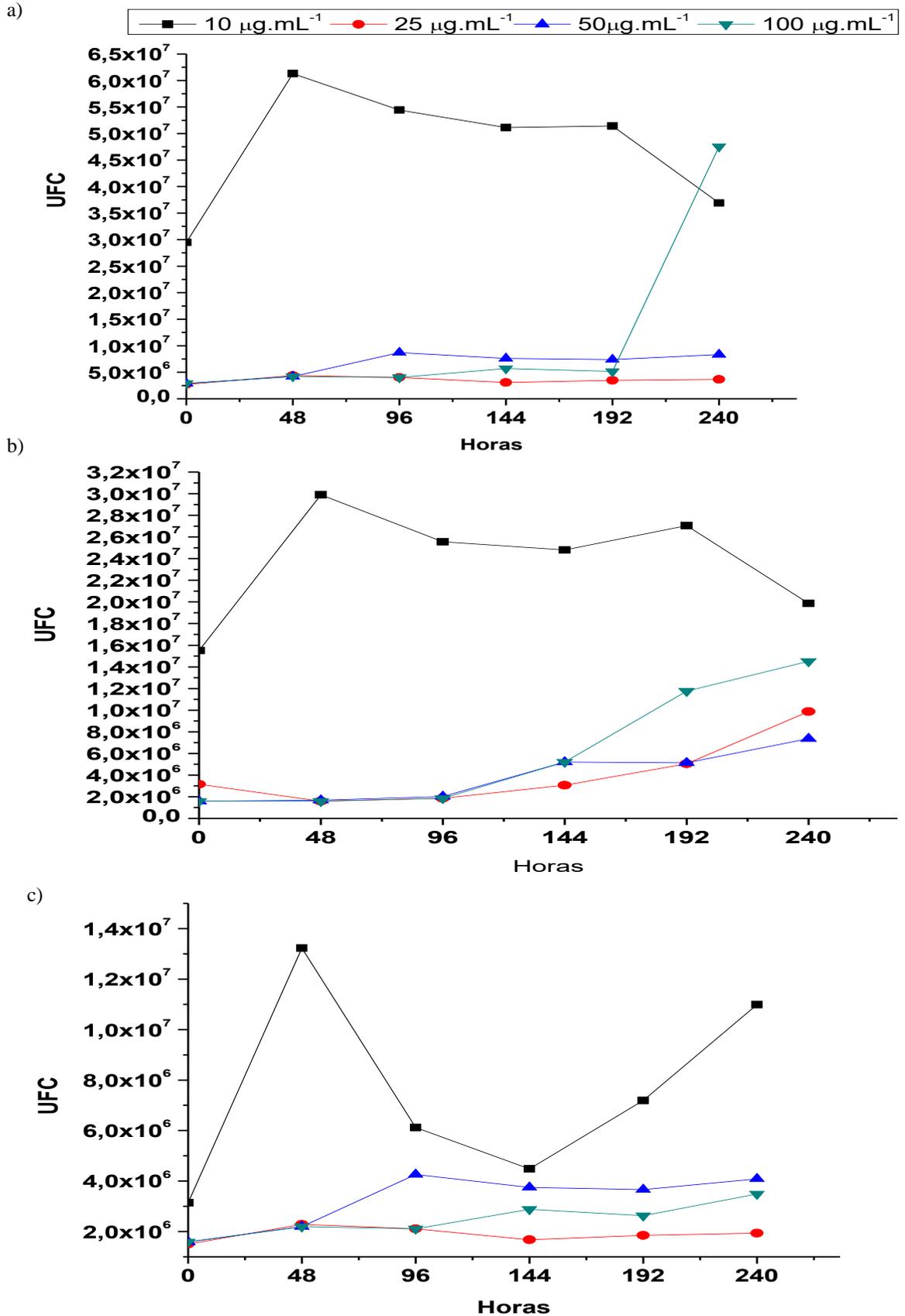
Por outro lado, o isolado *Alcaligenes faecalis* (PAPIO.G2), além de crescer bem na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  dos três herbicidas, também desenvolveu-se na concentração de  $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de diuron (a) ou isoxaflutole (b), porém com o final da fase *lag* postergado para até 96h e 144h de cultivo, respectivamente. Mas o mesmo não foi detectado em tal concentração do herbicida sulfentrazone (c). Observou-se ainda que o isolado *A. faecalis* apresentou-se melhor adaptado ao herbicida diuron, visto que seu crescimento foi mais acentuado.

GAO *et al.* (2011) relatam uma “adaptação ambiental” pela estirpe de *Alcaligenes* sp. DG-5, anteriormente isolada de solos contaminados pelo pesticida DDT (diclorofenil-tricloroetano), visto que esta apresentou a habilidade de metabolizar os derivados do inseticida quando cultivada em meio rico em nutrientes como  $5 \text{ g L}^{-1}$  de peptona e extrato de levedura ou 20 mM de formate, mas só após as fontes primárias do meio rico terem se esgotado.

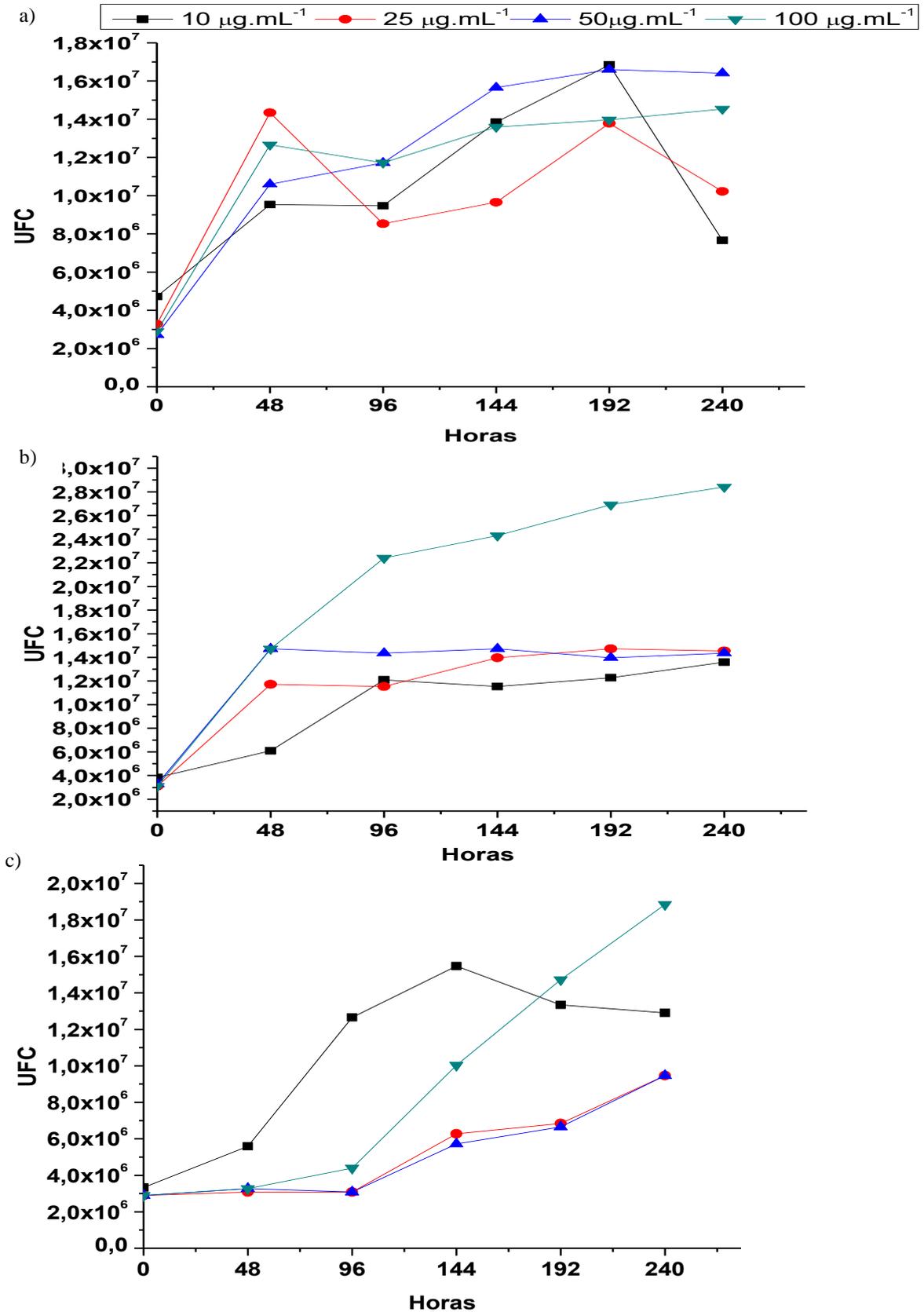
**Figura 15-** Crescimento do isolado *Bacillus toyonensis* ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazone como fonte principal de carbono.



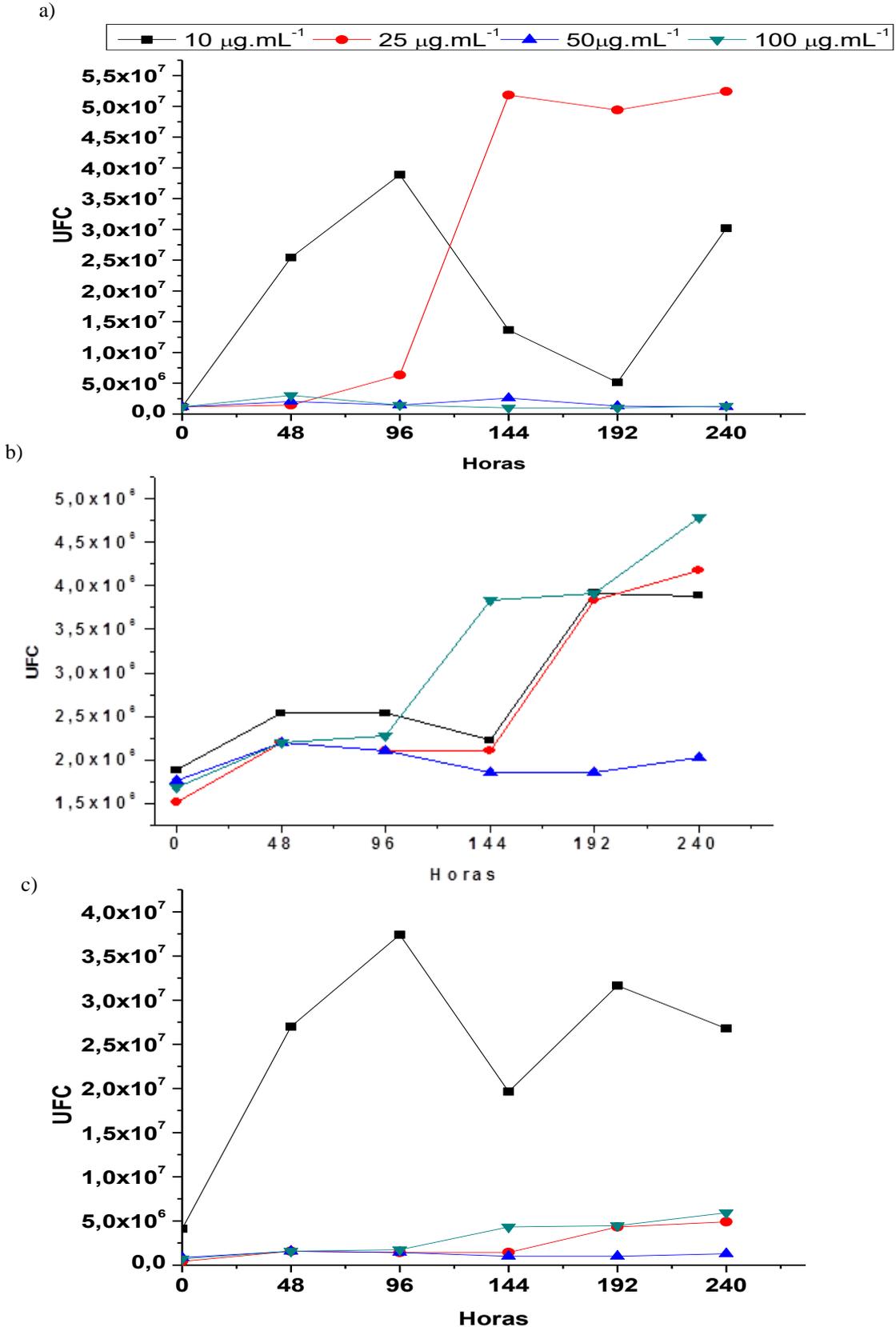
**Figura 16-** Crescimento do isolado *Bacillus megaterium* ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazone como fonte principal de carbono.



**Figura 17-** Crescimento do isolado *Lysinibacillus macroides* ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazone como fonte principal de carbono.



**Figura 18-** Crescimento do isolado *Alcaligenes faecalis* ao longo do tempo em cultura submersa de meio mínimo J.E. contendo diferentes concentrações dos herbicidas: a) diuron, b) isoxaflutole e c) sulfentrazone como fonte principal de carbono.



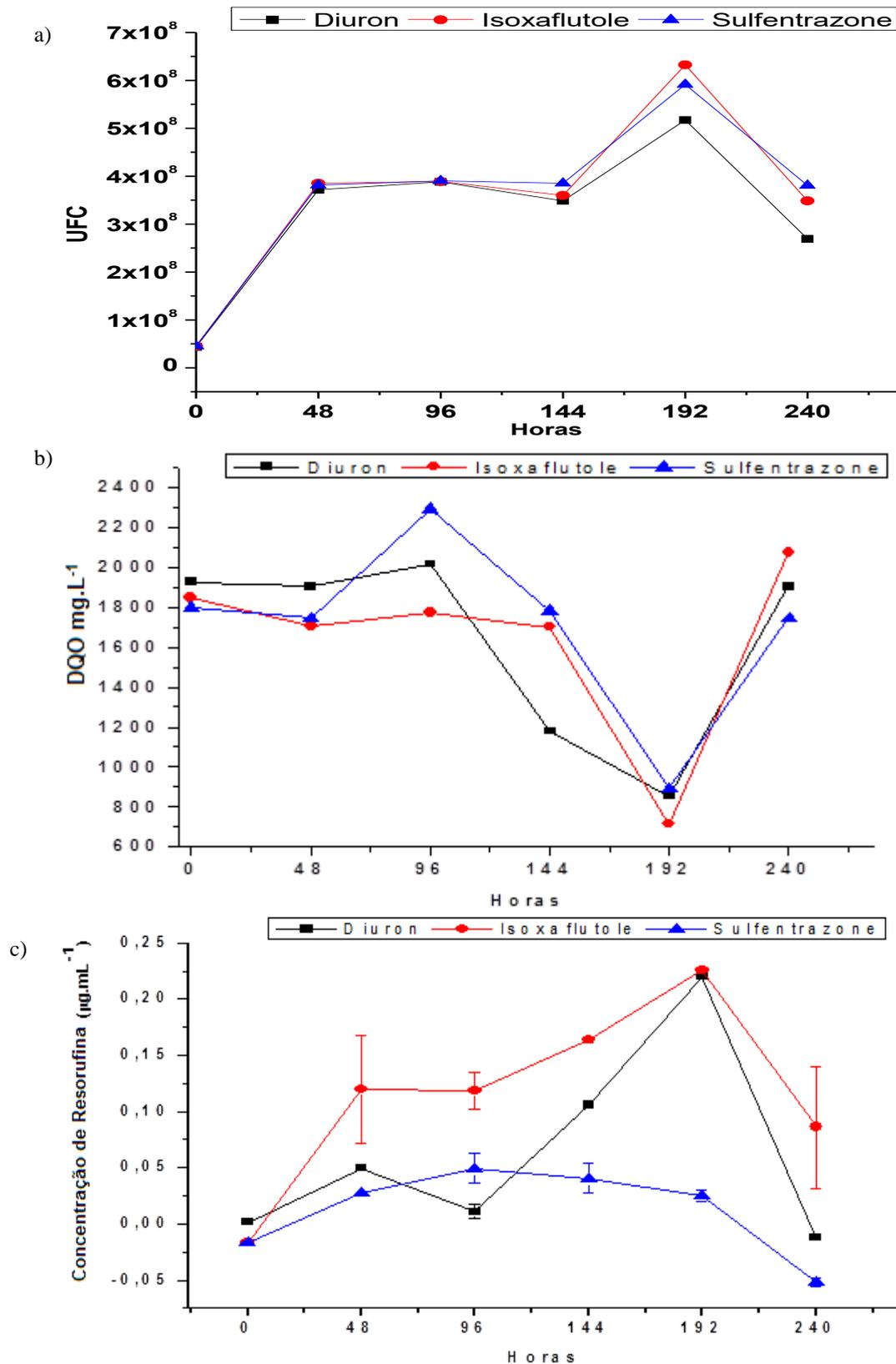
#### 5.4.1. Cinética de crescimento, conteúdo de matéria orgânica oxidável, proteínas totais e atividade de desidrogenase em culturas submersas contendo herbicidas

Os isolados *B. megaterium* (Figuras 19) e *L. macroides* (Figuras 20) apresentaram melhores crescimentos (em termos de UFC, unidades formadoras de colônia) nas culturas submersas com um dos três herbicidas na concentração de  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  do que os demais isolados. Com relação a evolução da oxidação da matéria orgânica (diminuição da DQO) presente no meio do cultivo de *B. megaterium* (Figura 19 b) foi inversamente proporcional ao crescimento, e provavelmente o aumento da DQO após 192 h de incubação, no início da fase de declínio celular, seja decorrente das moléculas orgânicas oriundas da morte celular. Para este isolado a diminuição dos teores de DQO pode ser também indicador da biodegradação dos herbicidas presentes nos meios de cultivo. Quanto a redução de resazurina (figura 19 c), verificou-se o pico da atividade da desidrogenase inversamente proporcional ao conteúdo de DQO. Tal enzima atua na detoxificação celular e para esse isolado sua ação foi menor nas culturas com sulfentrazona - a molécula com ligações carbono-cloro e carbono-flúor.

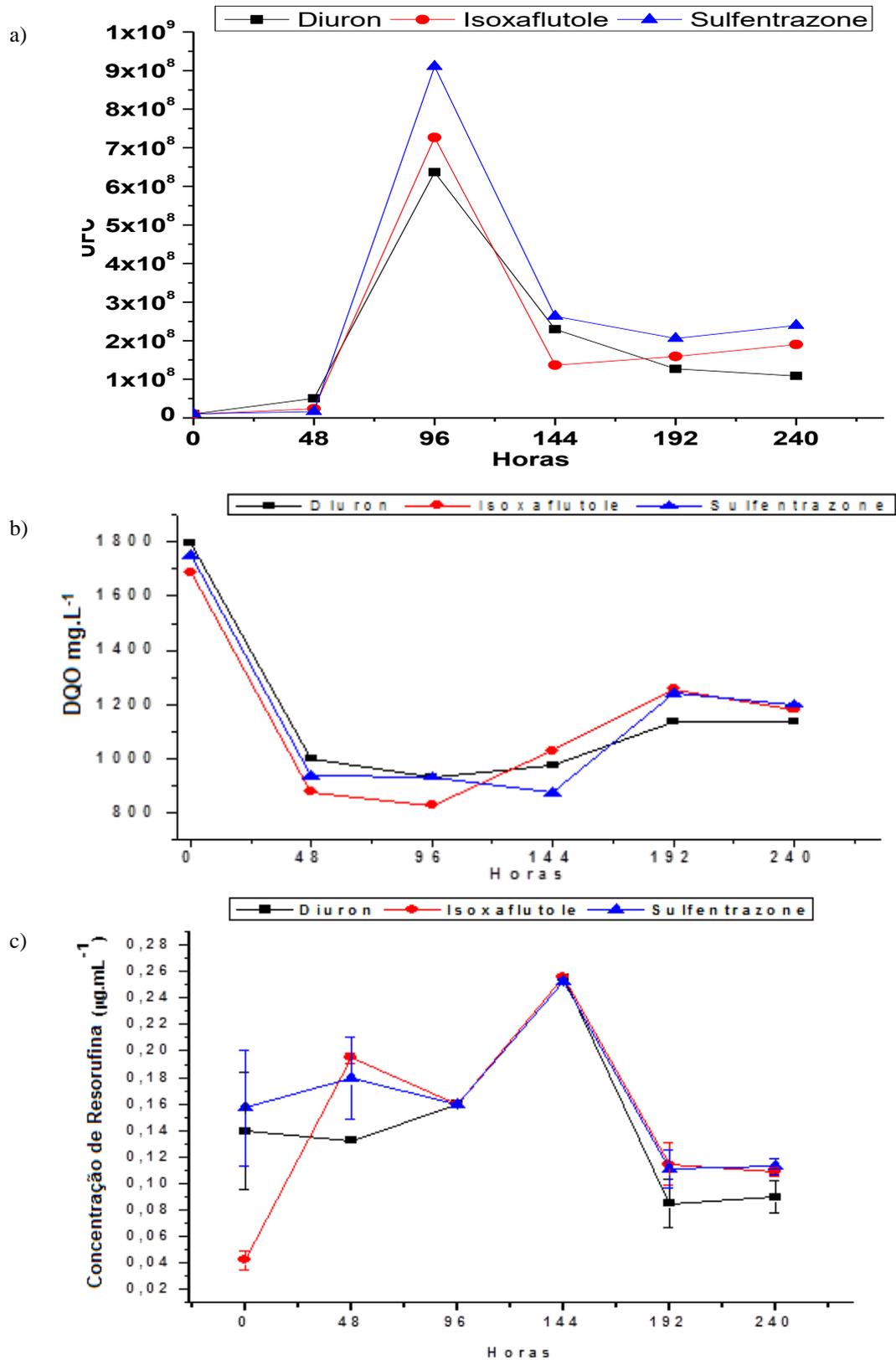
O isolado *L. macroides* (Figura 20) apresentou rápida adaptação aos meios de cultura utilizados, tendo sua *fase lag* caracterizada nas primeiras 48 h de cultivo, e daí até 96 h ocorreu o pico do crescimento inversamente proporcional ao conteúdo de matéria orgânica oxidável. A partir de 96 h, a população decaiu exatamente quando a DQO fora mais consumida, sugerindo utilização dos herbicidas avaliados como fonte de carbono. O pico de redução da resazurina em resorufina pela atividade desidrogenase ocorreu na fase de declínio celular e quando a DQO iniciava um aumento, não havendo diferença do perfil de atividade da enzima entre as culturas nos diferentes herbicidas.

Com relação aos perfis de crescimento dos isolados de *B. toyonensis* (Figura 21), e *A. faecalis* (Figura 22), ambos foram similares durante as primeiras 96 h do cultivo perante os três herbicidas, porém, com relação ao perfil de consumo da DQO, apenas na presença de Isoxaflutole o isolado *B. toyonensis* (Figura 21) assemelhou-se ao de *A. faecalis* (Figura 22) frente a todos os herbicidas, isto é, decaimento inversamente proporcional ao aumento da população no período e elevação gradativa da atividade da desidrogenase até 144h diante de todos os herbicidas - justamente no momento de redução da velocidade de morte celular destes. Com sulfentrazone, a morte celular de *B. toyonensis* foi paralela à redução da DQO, de 96-144 h da inoculação, quando esta última aumentou novamente. Na presença de diuron, esse isolado provavelmente secretou enzimas e metabólitos a partir do primeiro contato, elevando a DQO, que descreceu com a população mais lentamente a partir de 96 h (Figura 21).

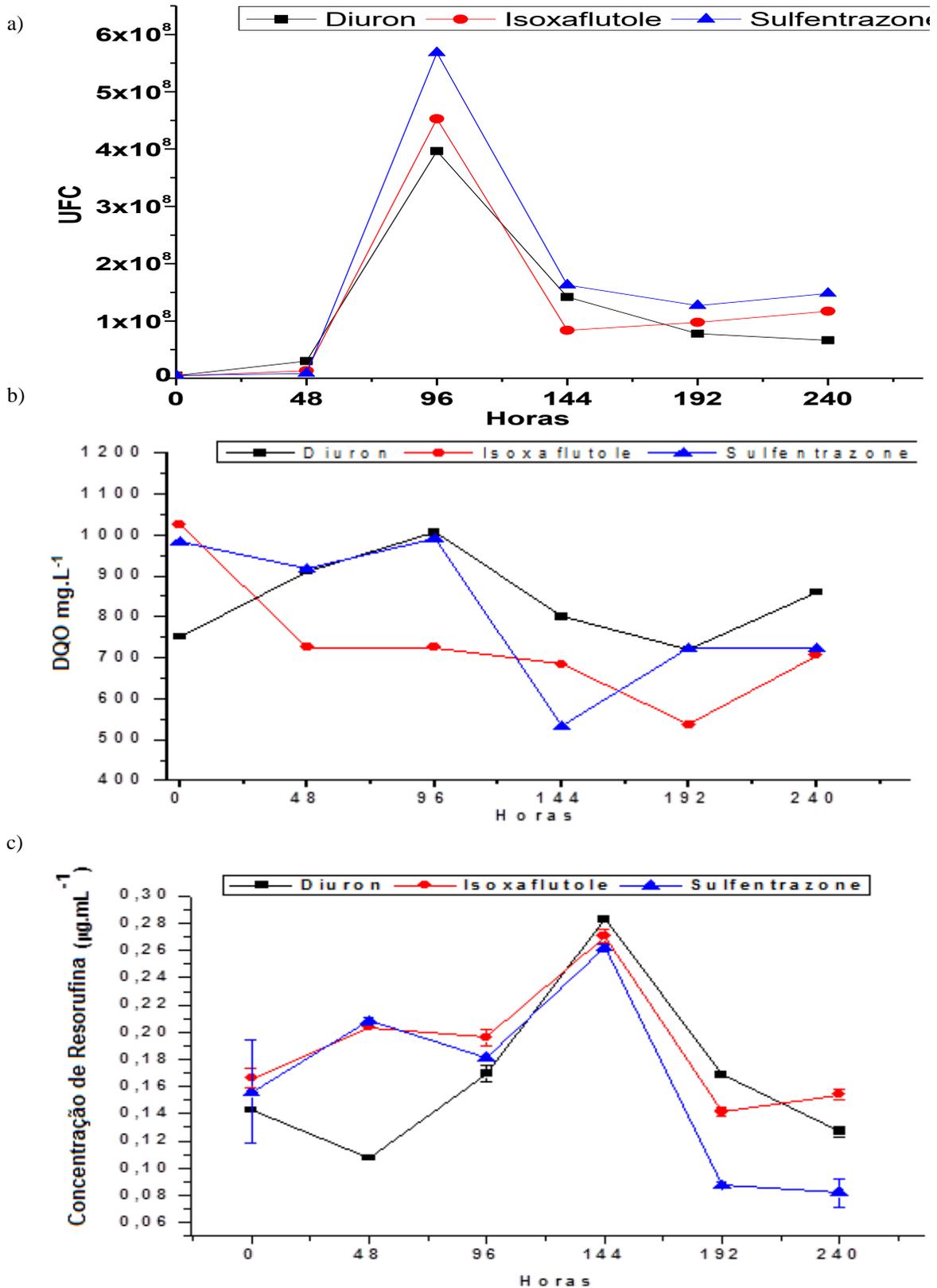
**Figura 19-** a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado *Bacillus megaterium* em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



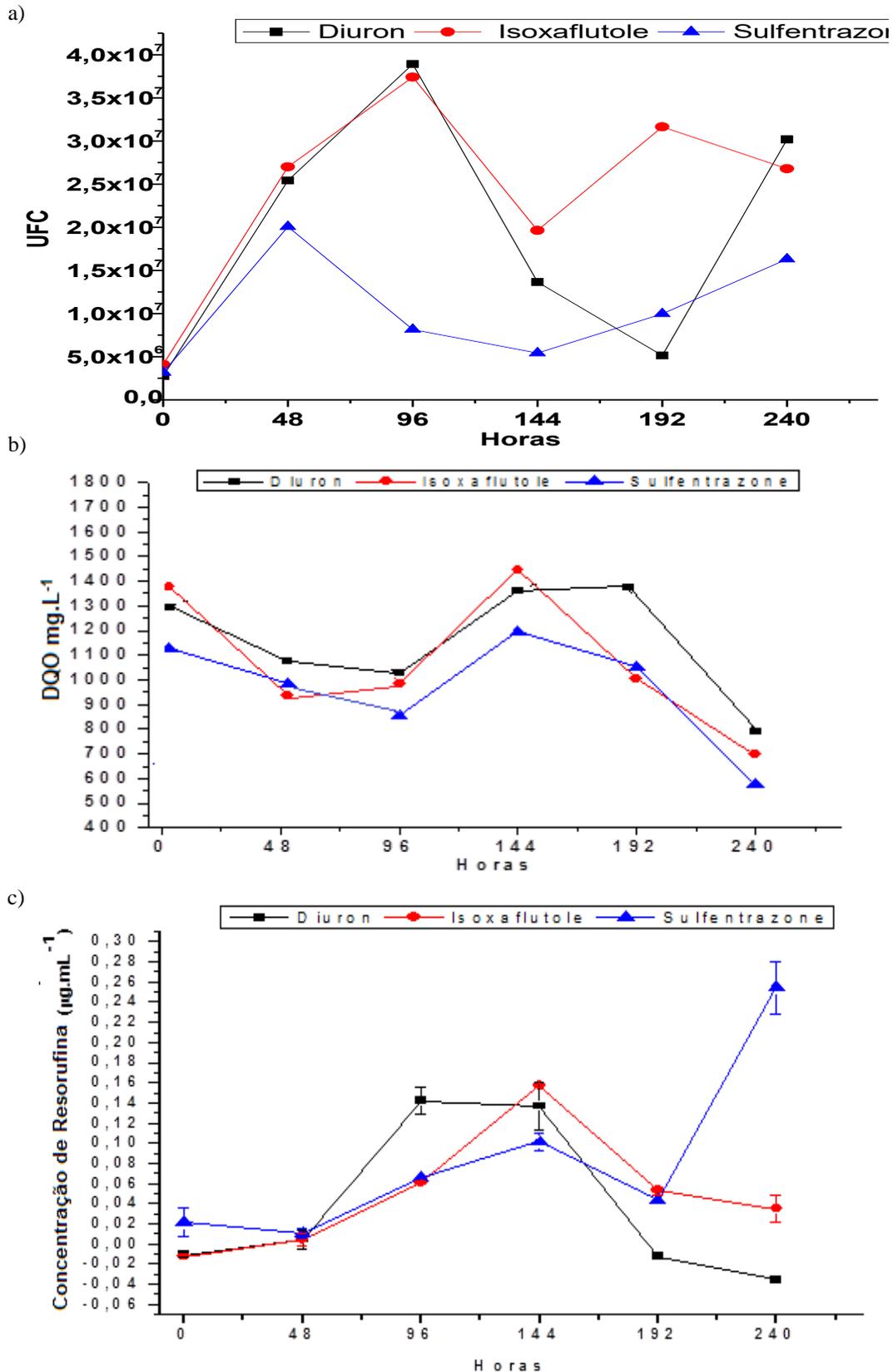
**Figura 20-** a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado *Lysinibacillus macroides* em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



**Figura 21-** a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado *Bacillus toyonensis* em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).



**Figura 22-** a) Cinética de crescimento (número de unidades formadora de colônias - UFC), b) demanda química de oxigênio (DQO) e c) concentração de resorufina como reflexo da atividade desidrogenase em cultura submersa do isolado *Alcaligenes faecalis* em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas estudados ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



As Figuras 23 (*B. megaterium* e *L. macroides*) e 24 (*A. faecalis* e *B. toyonensis*) apresentam os conteúdos estimados de proteínas totais ao longo dos cultivos dos diferentes isolados selecionados, em culturas submersas contendo um dos três herbicidas.

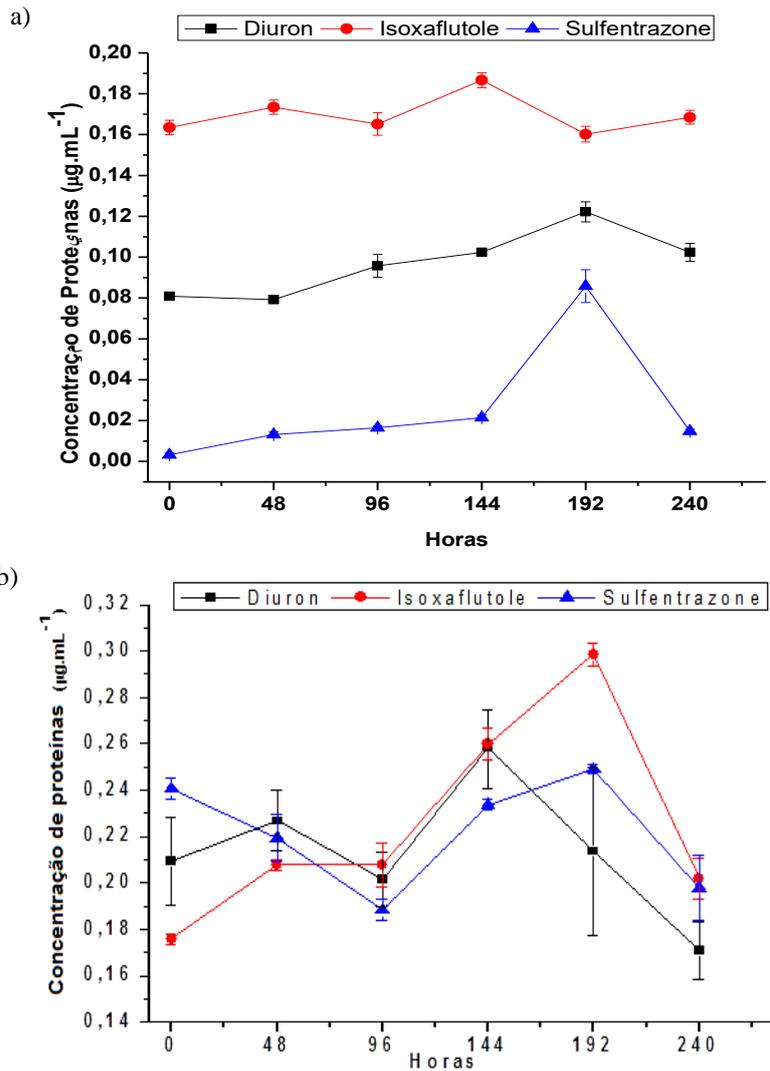
O método utilizado para tal quantificação, proposto por LOWRY *et al.* (1951) baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com cadeias laterais de alguns aminoácidos (tirosina, triptofano, cisteína, asparagina e histidina) de proteínas, os quais contribuem com quatro elétrons, ou através da retirada de dois elétrons de cada unidade tetrapeptídica de ligações peptídicas de proteínas, a qual é facilitada pelo catalisador cobre (II), com formação do quelato entre o cobre (II) e peptídeos/proteínas. Porém, seu limite mínimo e máximo de detecção varia de 10-1000 eq.µg.mL<sup>-1</sup> de albumina de soro bovino (ASB). Em concentrações menores e em soluções que contenham outros agentes redutores - tais como derivados tióis, compostos fenólicos, bases púricas, glicídeos redutores, além de detergentes, os quais reagem com o reativo de Folin-Ciocalteu, esse método não é indicado por superestimar a concentração protéica.

Considerando, então, que o meio original das culturas submersas só continha 1% do conteúdo total de proteínas do caldo nutriente (cerca de 80 µg.mL<sup>-1</sup>), mas nem todos os aminoácidos dessa massa protéica possuem cadeias laterais que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu, e, por outro lado, os herbicidas testados e presentes em concentração maior possuem estruturas com grupamentos capazes de interferir no teste, é possível concluir que as concentrações de proteínas totais determinadas em todos os ensaios (inferiores a 0,25 eq.µg.mL<sup>-1</sup> de ASB) não refletem a realidade dos ensaios e não são precisas a ponto de se propor firmemente que os microrganismos estudados degradaram diuron, isoxaflutole ou sulfentrazone como única fonte de carbono, nitrogênio e energia. Enzimas utilizadas para tal são proteínas sintetizadas mediante estímulo para tal, porém, são secretadas em baixíssimas concentrações, sendo reutilizadas ao longo do tempo enquanto as condições para as reações forem favoráveis a sua atuação, incluindo a concentração do substrato e o pH.

No entanto, pelo perfil dessa quantificação nas culturas do isolado *B. megaterium* (Figura 23 a.), é possível observar que os herbicidas interferiram nos testes, visto que as concentrações detectadas são relativamente baixas e constantes (em especial para diuron e isoxaflutole) desde o tempo zero, embora bem diferentes já no momento da inoculação. No caso de sulfentrazone, para esse isolado cujo pico de crescimento e consumo de DQO se deu às 192 h do cultivo (Figura 19), um ligeiro aumento foi observado nesse suposto conteúdo de proteínas (Figura 23 a). Por outro lado, apesar de não haver diferença acentuada entre os

teores quantificados, é possível verificar que o pico de crescimento de *L. macroides* (Figura 20) se dá 96 h após a inoculação, quando a DQO já foi consumida e a suposta concentração de proteína está ainda mais baixa no meio.

**Figura 23-** Conteúdo de proteínas totais (eq.  $\mu\text{g ASB}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) em cultura submersa em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas ( $10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), de: a) *B. megaterium*; e b) *L. macroides*.

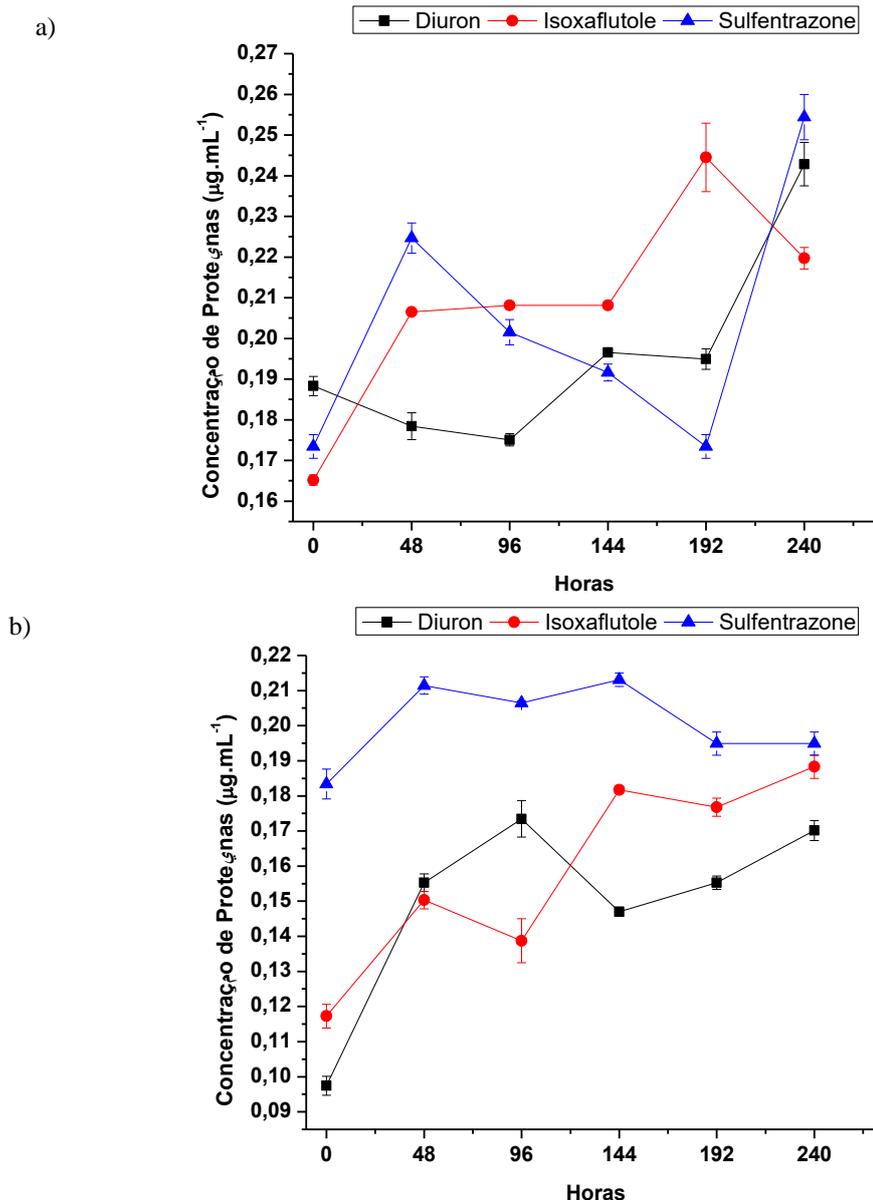


Fonte: AUTOR, 2015.

Para *A. faecalis* (Figura 24 a), verificou-se que o perfil dessa baixa concentração relativa de proteínas pelo método utilizado aumentou nas primeiras 48 h na presença de isoxaflutole e sulfentrazone, provavelmente na forma de enzimas para degradar a matéria orgânica e preparar as células para o crescimento (48-96 h). A partir daí, apesar dos valores não diferirem acentuadamente, a tendência foi desse conteúdo aumentar a partir de 144-192 h de forma inversa ao consumo de matéria orgânica (Figura 22). Por sua vez, *B. toyonensis* (Figura 24b) desenvolveu-se com mais intensidade na presença de sulfentrazone do que nos

demaís herbicidas (Figura 22), e também apresentou ao longo de todo o período de cultivo aparentemente mais conteúdo protéico perante esse herbicida do que na presença dos demais, em que o aumento da concentração de ordem protéica foi proporcional ao consumo da DQO em isoxaflutole e em diuron.

**Figura 24-** Conteúdo de proteínas totais (eq.  $\mu\text{g ASB.mL}^{-1}$ ) em cultura submersa em caldo nutriente (1% da concentração original) acrescido de um dos três herbicidas ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), de: a) *A. faecalis*; e b) *B. toyonensis*.



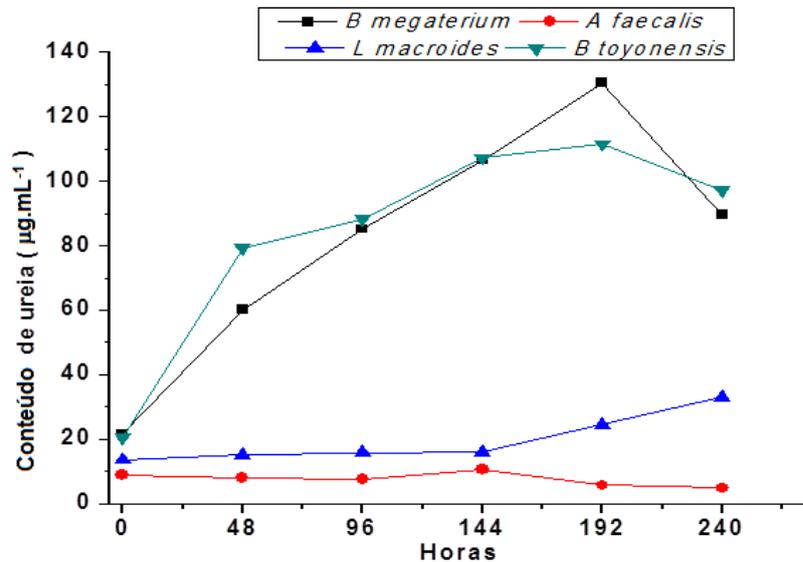
Fonte: AUTOR, 2015.

#### 5.4.2. Conteúdo de ureia em meio contendo o herbicida diuron

Dos quatro isolados estudados, apenas *B. megaterium* e *B. toyonensis* apresentaram mais altos conteúdo de ureia (Figura 25) e pH (Figura 26) ao longo das primeiras 144-192

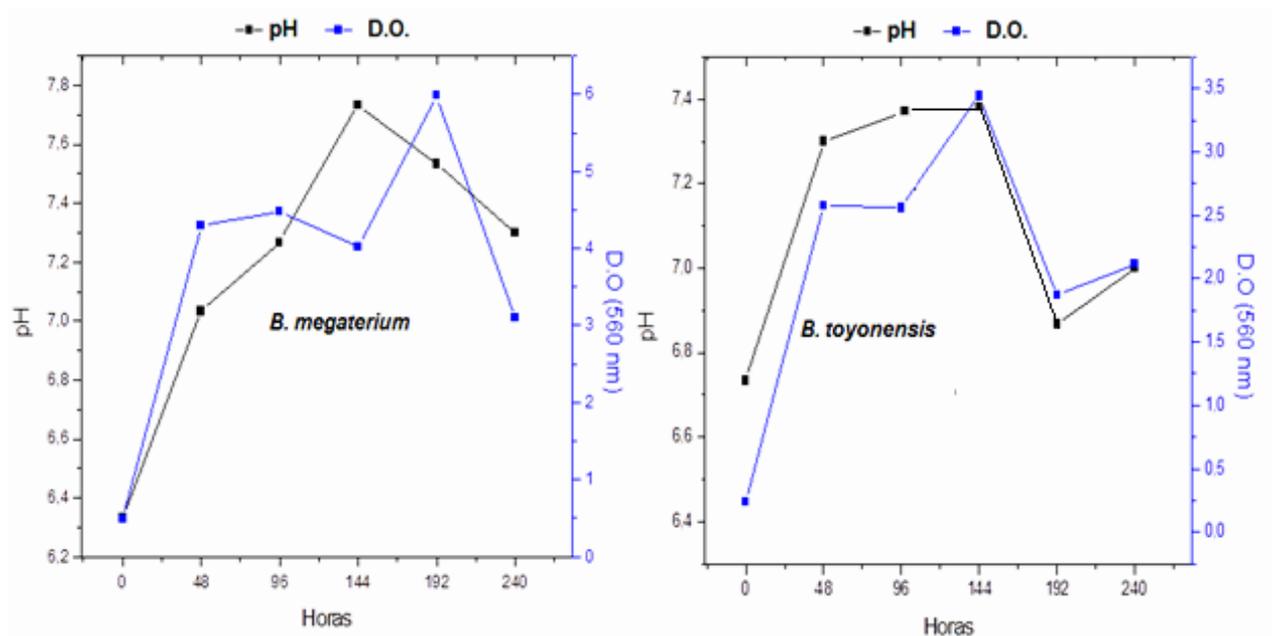
horas de cultivo em meio contendo diuron, sugerindo possível hidrólise dessa fenilureia. Os dados de crescimento em UFC e DQO de culturas de ambos os microrganismos (Figuras 19 e 21) corroboram possível degradação do herbicida.

**Figura 25-** Conteúdo de uréia ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em caldo nutriente (1% da concentração original) com diuron ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), ao longo do tempo de cultivo das quatro bactérias tolerantes a herbicidas selecionadas.



Fonte: AUTOR, 2015.

**Figura 26-** Densidade Ótica (560 nm) e pH ao longo do tempo de cultivo dos isolados *B. megaterium* e *B. toyonensis* capazes de liberar uréia em caldo nutriente (1% da concentração original) contendo diuron ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



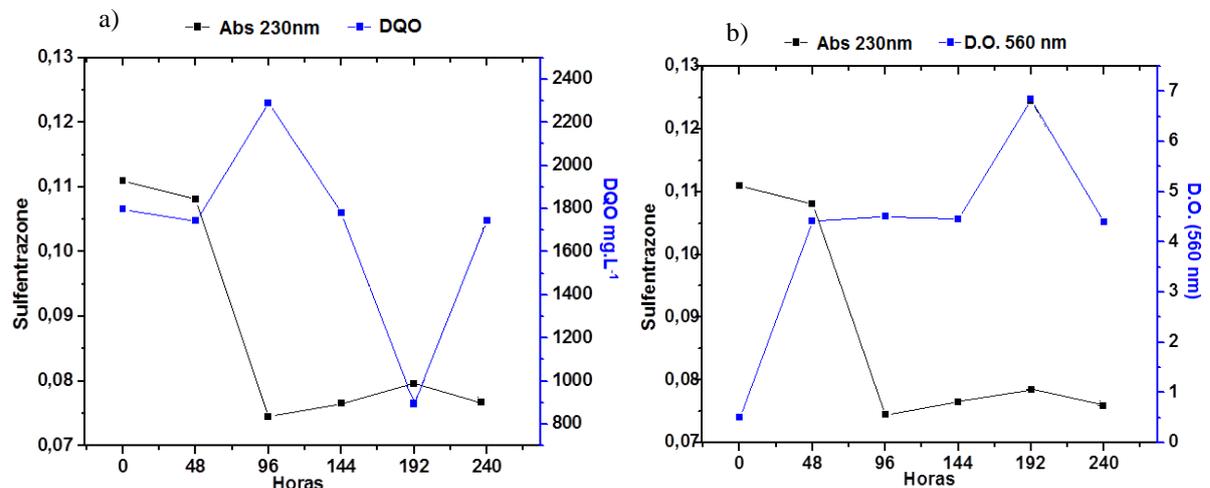
Fonte: AUTOR, 2015.

### 5.4.3. Conteúdo de sulfentrazone por espectrofotometria

As Figuras 27-29 apresentam os valores de DQO, crescimento celular (densidade ótica a 560 nm), e do espectro de absorção característico de sulfentrazone (máximo a 230 nm).

Para *B. megaterium* (Figura 27), nas primeiras 48 h de cultivo ocorreu ligiera diminuição da matéria orgânica oxidável (DQO) de forma proporcional ao decaimento na absorção do herbicida (230 nm), mas com intenso crescimento da população. A DQO aumentou de 48 até 96 h por conta do início da morte celular, refletindo-se a fase estacionária de densidade ótica populacional (multiplicação e morte em equilíbrio). A partir daí, a DQO diminuiu acentuadamente até 192 h, quando se deu outro pico de crescimento, pelo consumo da matéria orgânica oriunda das células mortas previamente além da decomposição de sulfentrazone, e novo declínio da população, quando uma vez mais a DQO começou a aumentarem face das células mortas.

**Figura 27-** Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazone em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado *B. megaterium* em caldo nutriente (1% da concentração original) e  $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$  desse herbicida.

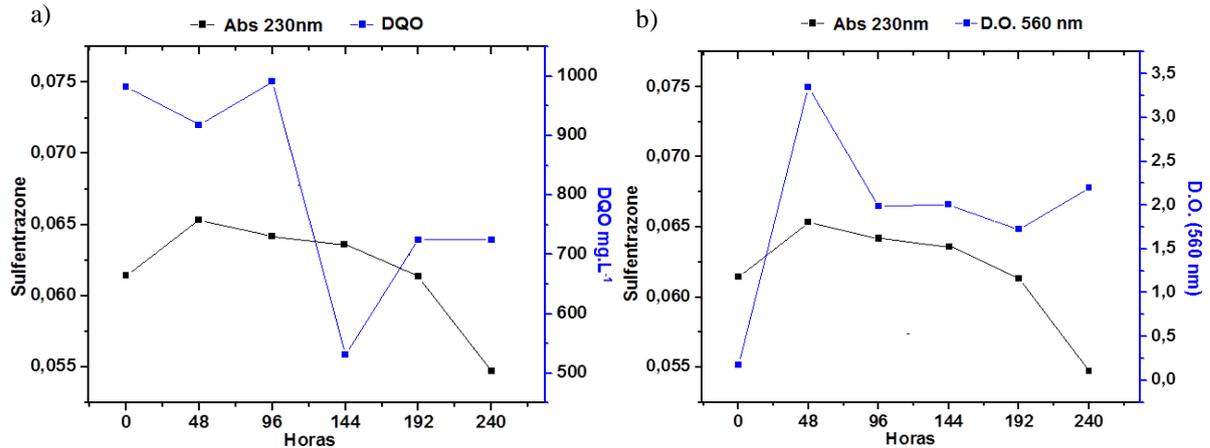


Fonte: AUTOR, 2015.

Para a estirpe de *B. toyonensis* (Figura 28), a medida que a matéria orgânica presente no meio é brandamente oxidada (48 h), há aumento acentuado da população do microrganismo. A partir desse período ocorre brando decaimento do espectro de absorção do meio a 230 nm, denotando alguma decomposição de sulfentrazone, mas não necessariamente o microrganismo cresceu no início às expensas desse produto, e sim dos poucos nutrientes do caldo original. A “adaptação” frente ao herbicida levou a relativa constância da DQO de 48 a 96 h, e rápida morte celular no mesmo período. Em seguida, proliferação e morte se

equilibraram até as 144h, período em que a DQO foi consumida acentuadamente, e de 144-192 h do cultivo, com o desequilíbrio entre morte e proliferação celular, a DQO começou a elevar-se outra vez.

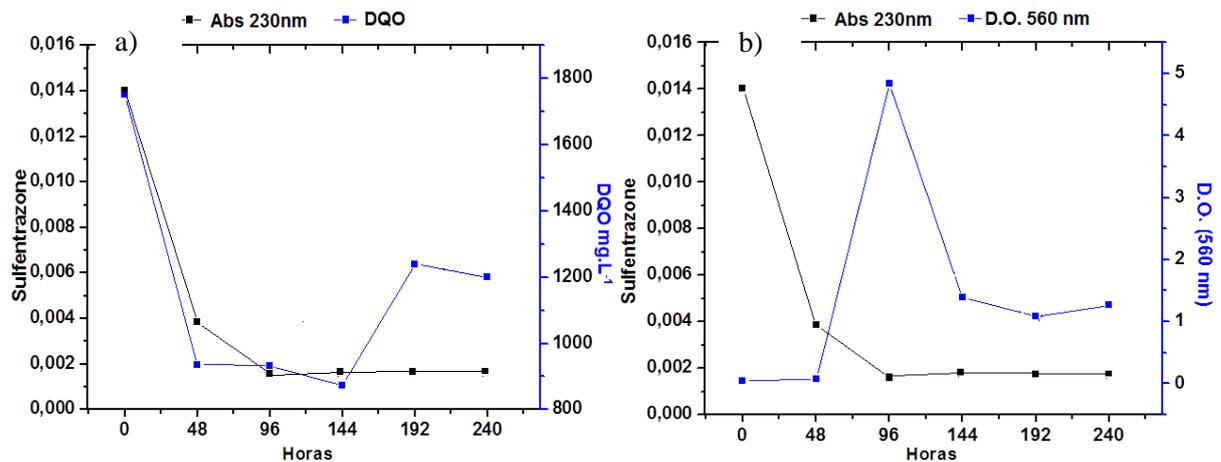
**Figura 28-** Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazona em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado *B. toyonensis* em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  desse herbicida.



Fonte: AUTOR, 2015.

Para o isolado *L.macroides* (Figura 29), constatou-se que o decaimento da absorção de sulfentrazone foi paralelo ao consumo da DQO nas primeiras 96 h de cultivo, culminando o pico máximo de crescimento celular com o do decaimento do composto.

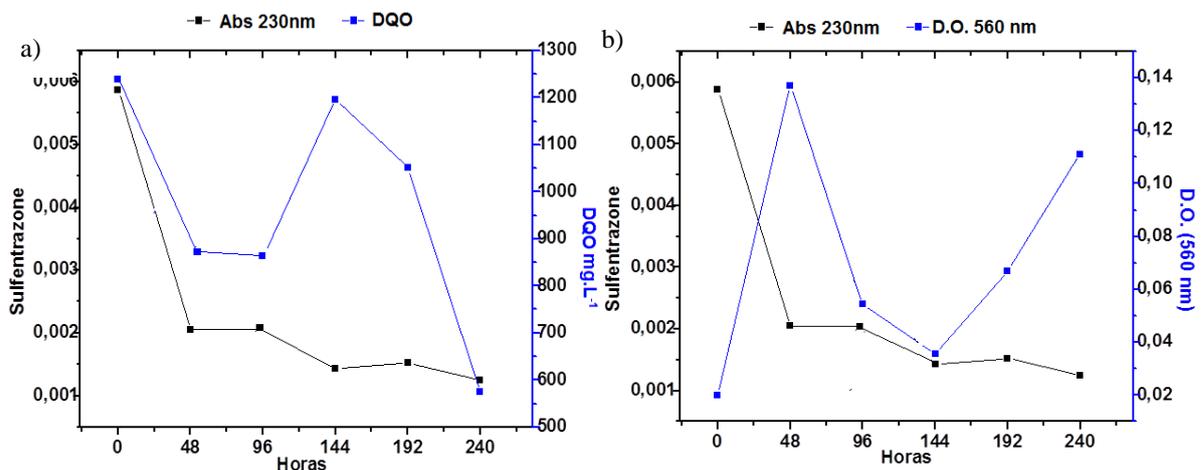
**Figura 29-** Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazona em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado *L.macroides* em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  desse herbicida.



Fonte: AUTOR, 2015.

Também o crescimento do isolado *A. faecalis* (Figura 30) em caldo nutriente contendo sulfentrazona aumentou acentuadamente nas primeiras 48 h, e isso ocorreu proporcionalmente ao consumo da DQO e decaimento do herbicida. A partir de então, a população diminuiu gradativamente até 144 h, pico máximo de decaimento do sulfentrazona mas momento em que a DQO havia aumentado – provavelmente em função da acentuada morte das células e liberação das biomoléculas das mesmas.

**Figura 30-** Decaimento do espectro de absorção (230 nm) do herbicida sulfentrazona em comparação com: a) demanda química de oxigênio (DQO) e b) crescimento celular (densidade ótica a 560 nm) ao longo do tempo de cultivo do isolado *A. faecalis* em caldo nutriente (1% da concentração original) e 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  desse herbicida.



Fonte: AUTOR, 2015.

Para compreender a forma de metabolismo e os mecanismos envolvidos na utilização de compostos xenobióticos por microrganismos, faz-se necessário um estudo aprofundado do crescimento das linhagens bacterianas, e da utilização do composto alvo como fonte de N ou carbono, além de outros parâmetros a serem considerados, como potencial redox e pH.

### 5.5. Solubilização de fosfato inorgânico pelos isolados bacterianos selecionados, em meio contendo diferentes concentrações de herbicidas

O crescimento vegetal pode ser estimulado pelo aumento na disponibilidade de nutrientes, e isso pode ser facilitado por via microbiana, tanto pela solubilização - como no caso de fosfato inorgânico em complexos P-Al, P-Ca ou P-Fe, quanto pela mineralização de compostos orgânicos (RODRÍGUEZ & FRAGA, 1999). Não são muitos os estudos, entretanto, avaliando a toxicidade de herbicidas sobre bactérias solubilizadoras de fosfato (MASSENSIN *et al.*, 2008).

Neste trabalho, portanto, verificou-se a influência dos herbicidas sobre a capacidade dos isolados tolerantes a eles em solubilizarem o fosfato inorgânico presente em meio NBRIP sólido ou líquido. No meio NBRIP-ágar, verificou-se que apenas *B. megaterium* e *A. faecalis* (Tabela 6, Figura 31) apresentaram discreta zona clara de solubilização ao redor das colônias na presença ou não das diferentes concentrações avaliadas dos herbicidas estudados. O Índice de solubilização (IS) de todos os tratamentos (Tabela 6) ficou abaixo de 1,5, sendo que valores moderados de IS situam-se entre 2 e 3 quando menores teores de fosfatos insolúveis são utilizadas e na ausência de herbicidas.

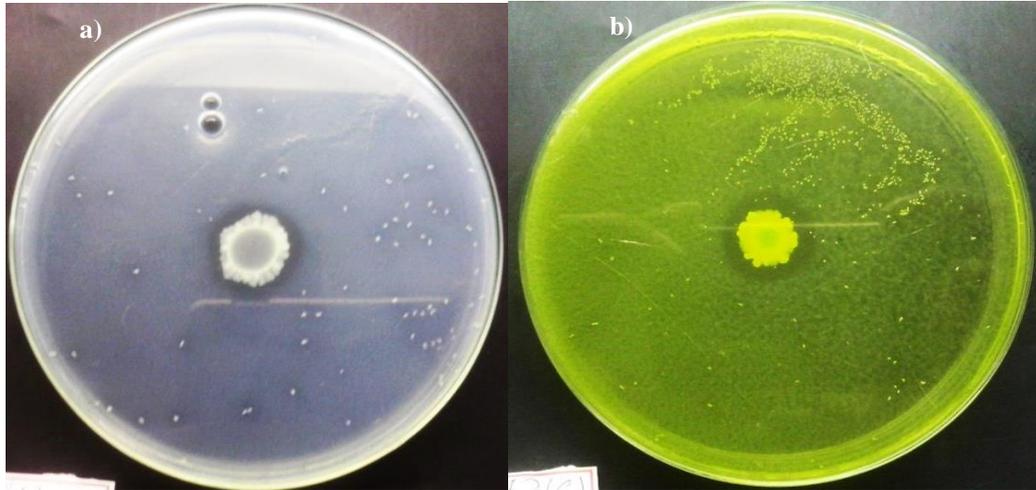
YADAV & SINGH (1990) constataram a capacidade de cepa de *B. megaterium* em solubilizar fosfato e favorecer o aumento na germinação e no rendimento da cana-de-açúcar em solos aluviais na região de Bihar, Índia, tratados com várias concentrações de fertilizantes fosfatados.

Os demais isolados bacterianos, tolerantes a herbicidas e degradadores de compostos lignocelulolíticos, não cresceram nesse meio sólido contendo 5 mg.mL<sup>-1</sup> de fosfatos insolúveis, 10 mg.mL<sup>-1</sup> de glicose e 5 mg.mL<sup>-1</sup> de MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O, mesmo quando herbicidas não foram acrescentados.

**Tabela 6-** Diâmetros médios (mm) das colônias com ou sem halos e índices de solubilização (IS) de culturas dos isolados estudados de *B. megaterium* e *A. faecalis* em meio de cultura sólido contendo fósforo insolúvel (5mg.mL<sup>-1</sup>) e diferentes concentrações de herbicidas, após 7 dias de incubação.

Herbicida µg.mL <sup>-1</sup>	<i>B. megaterium</i>		IS	<i>A. faecalis</i>		IS
	Colônia mm	Colônia + Halo mm		Colônia mm	Colônia + Halo mm	
diuron						
0	9	12	1,33	7	9	1,29
10	8	11	1,37	6	8	1,33
25	9	11	1,22	6	8	1,33
50	8	12	1,50	6	8	1,33
100	9	12	1,33	5	7	1,40
isoxaflutole						
0	8	11	1,35	7	9	1,29
10	8	11	1,35	6	8	1,33
25	7	10	1,42	6	8	1,33
50	9	11	1,22	6	8	1,33
100	7	9	1,28	7	8	1,14
sulfentrazone						
0	9	12	1,33	9	12	1,33
10	9	11	1,22	9	11	1,22
25	8	10	1,25	7	9	1,29
50	8	11	1,37	7	8	1,14
100	9	11	1,22	7	9	1,29

**Figura 31-** Aspecto da colônia e do halo de solubilização produzido pelo isolado *Bacillus megaterium*, tolerante a herbicidas e decompositor de compostos lignocelulolíticos, em meio contendo fósforo insolúvel ( $5\text{mg.mL}^{-1}$ ) sem herbicida (controle). a) Meio de cultivo sem revelador; b) Meio acrescido de púrpura de bromocresol.



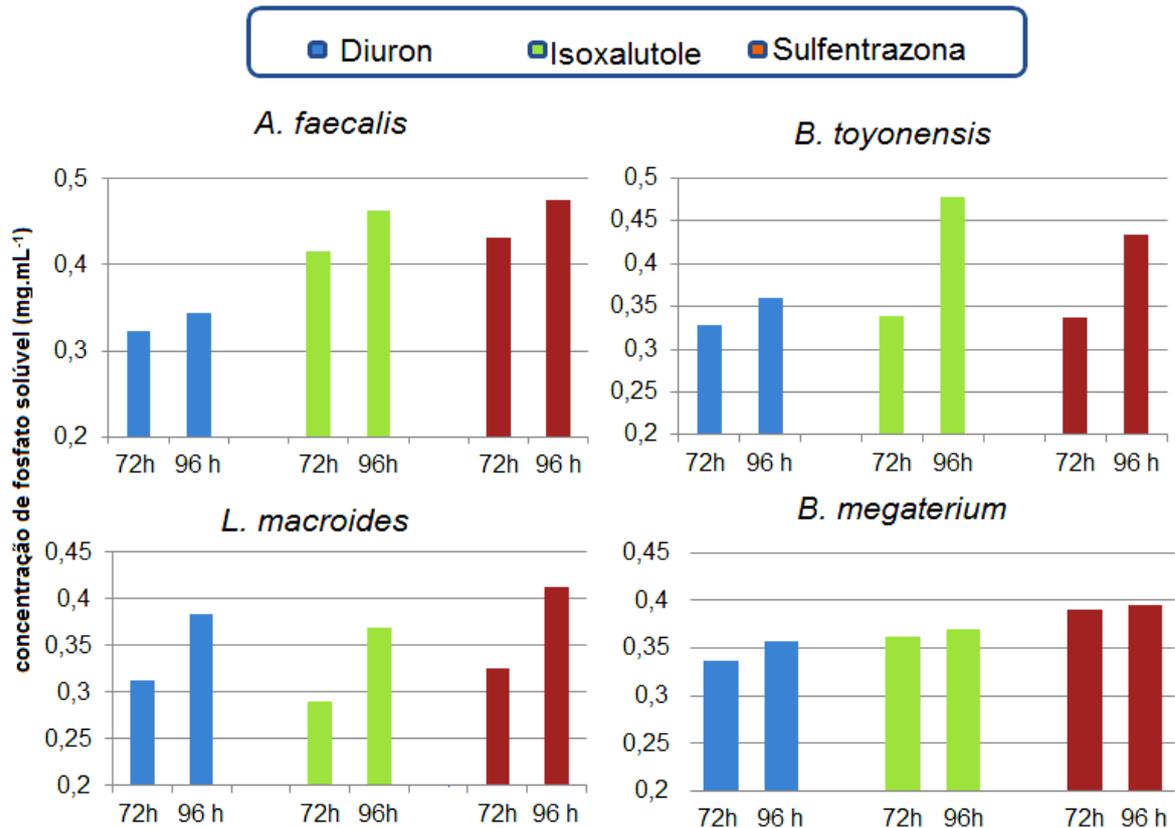
Fonte: AUTOR, 2015.

Diferentes gêneros bacterianos, como *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Mesorhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* e *Erwinia*, têm sido relatados como capazes de solubilizar fosfatos inorgânicos em meio NBRIP (NAUTIYAL, 1999; CERIGIOLI, 2005; MARDAD, SERRANO & SOUKRI, 2013), em função da secreção de ácidos orgânicos, incluindo ácido sulfúrico, reduzindo o pH do solo e resultando na troca de anions  $\text{PO}_4^{3-}$  ou na quelatização de íons de  $\text{Fe}^{2+/3+}$  e  $\text{Al}^{3+}$  associados com fosfatos (STAMFORD *et al.*, 2002; MIKANOVÁ & NOVÁKOVÁ, 2002; HARA & OLIVEIRA, 2005; SARAVANAN *et al.*, 2007), entre outros mecanismos (GYANESHWAR *et al.*, 2002). Por outro lado, conforme estudos de NAUTIYAL (1999), comparando o comportamento de diferentes bactérias em meio NBRIP sólido e líquido, muitos isolados que não mostram qualquer halo claro de solubilização de fosfato inorgânico em meio sólido, apresentaram essa capacidade em culturas submersas, concluindo-se que a triagem de microrganismos de solo eficientes na solubilização de fosfato deve ser feita em caldo NBRIP e não em NBRIP-Ágar. DASGUPTA *et al.* (1994) já havia constatado que muitos microrganismos que não parecem solubilizar fosfato em meio sólido, o fazem em meio líquido.

A Figura 32 apresenta os valores de fosfato solubilizado em cultura submersa após 72h e 96h de incubação. Os dados revelam a capacidade dos quatro isolados em solubilizar fosfato ao longo do tempo, mesmo na presença de um dos herbicidas estudados, o que

corroborar as observações de NAUTIYAL (1999) e DASGUPTA et al. (2007), quanto à maior eficiência do meio líquido para a triagem de solubilizadores de fosfato inorgânico.

**Figura 32-** Concentração de fosfato ( $\text{mg.mL}^{-1}$ ) após 72 e 96 h de cultivo dos quatro isolados microbianos estudados em caldo NBRIP + herbicidas ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).



Fonte: AUTOR, 2015.

Conforme se observa na Tabela 7, ocorreu uma redução nos valores de pH das culturas submersas em caldo NBRIP ao longo do tempo, sugerindo que os isolados de solo aqui selecionados utilizam o mecanismo de secreção de ácidos orgânicos para a solubilização de fosfato inorgânico quando presente nesse meio em concentração dez vezes menor do que a utilizada no meio sólido e na presença de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de um dos herbicidas estudados.

Entretanto, nos ensaios de cinética de crescimento das estirpes de *Bacillus* aqui estudadas em 1% de caldo nutriente contendo o herbicida diuron, observou-se um aumento do pH ao longo do tempo (Figura 26) de cerca de uma unidade, e este só foi reduzido para próximo do original com a diminuição da população. Isso ocorreu por que, diferente do meio NBRIP, que contém glicose como fonte primária de carbono e energia, favorecendo a formação de ácidos, o meio utilizado para a cinética praticamente não dispunha de outra fonte de carbono além do herbicida, cujo pK<sub>b</sub> é muito alto, e provavelmente foi parcialmente

degradado, alcalinizando ligeiramente aquele meio. De fato, a Figura 25 revelou que na presença de diuron, *B. megaterium* e *B. toyonensis* liberam uréia no meio, o que justifica tal aumento do pH naquelas circunstâncias.

**Tabela 7-** Variação do pH ao longo do tempo em culturas submersas (caldo NBRIP) das estirpes bacterianas selecionadas, na presença de fosfato insolúvel ( $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) e um dos herbicidas estudados ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Isolados	Herbicida								
	Diuron			Isoxaflutole			Sulfentrazone		
	0h	72h	96h	0h	72h	96h	0h	72h	96h
<i>A. faecalis</i>	6,0	4,6	4,5	6	4,7	4,4	6,0	4,7	4,7
<i>B. megaterium</i>	6,0	5,0	4,5	6	4,7	4,4	6,0	4,6	4,6
<i>B toyonensis</i>	6,0	4,6	4,6	6	4,6	4,4	6,0	4,6	4,6
<i>L. macroides</i>	6,0	4,7	4,4	6	4,7	4,4	6,0	4,8	4,4

MARDAD, SERRANO & SOUKRI (2013) também selecionaram, em caldo NBRIP, três bactérias solubilizadoras de fosfato inorgânico, aos quais foram identificadas molecularmente (16S rRNA) como *Enterobacter hormaechei* subsp. *steigerwaltii*, *Enterobacter* sp. e *Bacterium* sp., e que secretaram no meios os ácidos glucônico, succínico, acético, glutâmico, oxaloacético, pirúvico, málico, fumárico e  $\alpha$ -cetoglutárico, os quais foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência. MASSENSINI (2007) relata variação dos valores finais do pH de culturas de microrganismos avaliados na solubilização de fosfato de ferro, entre 3,7 e 3,9. NONGKHLAW & JOSHI (2014) isolaram estirpe de *L. xylanilyticus* C21 com capacidade de promover o crescimento vegetal através da solubilização de fosfato na proporção de 9,59 ppm após 72 hs de incubação, e atividade fosfatase ácida em torno de 0,047 U, com valores de pH na faixa de 4-5,5. Espécies pertencentes a este gênero têm sido associadas como promotoras do crescimento de ginseng (VENDAN *et al.*, 2010). Porém, a secreção de ácidos não é o único mecanismo possível para que microrganismos solubilizem fosfato (GYANESHWAR *et al.*, 2002).

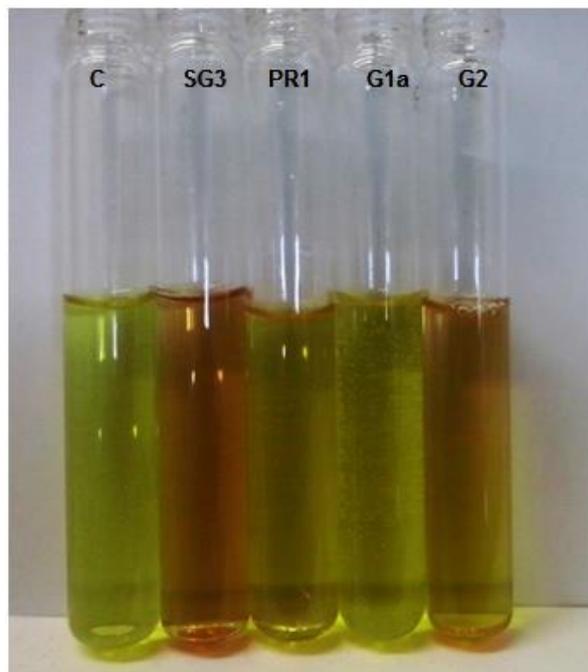
MASSENSINI *et al.* (2008), avaliaram os efeitos da aplicação de formulações comerciais ( $60 \text{ mg. L}^{-1}$ ) do herbicida glifosato (Roundup Transorb<sup>®</sup>, Zapp QI<sup>®</sup>, Roundup NA<sup>®</sup> e Scout<sup>®</sup>) na capacidade de dois isolados bacterianos (“To 11” e “To 66”) de solo rizosférico de plantas de eucalipto (*Eucalyptus grandis* x *Eucalyptus urophylla*) em solubilizar diferentes fontes inorgânicas de fosfato (fosfato de cálcio, de alumínio e de ferro)

em meio líquido. Os autores constataram que nenhum dos isolados foi capaz de solubilizar fosfatos de ferro e alumínio. As formulações de glifosato impuseram diferentes efeitos para cada isolado, sendo que Roundup Transorb® e Zapp QI® reduziram a capacidade de solubilização de fosfato de cálcio pelo isolado “To 66”, enquanto a formulação Scout® aumentou essa capacidade e Roundup NA® não afetou a mesma. Por sua vez, o isolado “To 11” não teve sua capacidade de solubilização impactada pelas formulações comerciais testadas. Sugeriu-se que as diferenças no efeito tóxico das formulações de glifosato devam-se às diferentes substâncias químicas presentes nas formulações, como solventes, surfatantes e agentes molhantes, que podem modificar a ação do equivalente ácido do princípio ativo (N-(fosfometil) glicina).

### 5.6. Avaliação dos isolados selecionados frente a síntese de ácido indol-acético

A Figura 33 destaca a produção de ácido indol acético em meio de cultura líquido sem a presença dos herbicidas testados.

**Figura 33-** Aspecto do crescimento dos isolados bacterianos selecionados em caldo Czapeck acrescido de L-triptofano, após 30 min da adição do reagente Salkowsky para detecção de ácido indol-acético (AIA). O teste negativo apresenta coloração amarelada, enquanto na presença de AIA o reagente torna a cultura vermelho-alaranjada. C= controle, SG3= *Bacillus megaterium*; PR1= *B. toyonensis*; G1a= *Lysinibacillus macroides* e G2= *Alcaligenes faecalis*.



Fonte: AUTOR, 2015.

Os isolados de *B. megaterium* e *A. faecalis*, além de apresentarem uma discreta solubilização de fosfato inorgânico em meio de cultura sólido, conforme discutido no item anterior, também foram capazes de produzir auxina (AIA) a partir do precursor L-triptofano em cultura submersa. O principal efeito da auxina vegetal é promover o crescimento de raízes e caules, através do alongamento das células recém-formadas nos meristemas. Esse efeito depende, no entanto, da concentração do hormônio. Em alguns tecidos as auxinas controlam a divisão celular. As técnicas de cultivo de tecidos foram possíveis graças à ação das auxinas sobre a divisão celular. Em concentrações muito altas, esse fitohormônio inibe o alongamento celular e, portanto, o crescimento do órgão. A sensibilidade das células à auxina varia nas diferentes partes da planta. O caule, por exemplo, é menos sensível à auxina que a raiz.

Nas últimas décadas, uma série de bactérias, incluindo espécies de *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Azospirillum*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Arthrobacter*, *Serratia*, *Burkholderia*, *Xanthomonas*, *Herbaspirillum*, *Bradyrhizobium*, *Stenotrophomonas*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Alcaligenes* e *Bacillus* foram descritos por promover o crescimento vegetal (PATTEN & GLICK, 1996; CERIGIOLI, 2005; AHMAD, AHMAD & KHAN, 2008). Estas bactérias sintetizam e liberam muitos fitohormônios, sendo o AIA aquele quantitativamente mais abundante e oriundo do metabolismo secundário para agir na diferenciação celular microbiana, sugerindo-se que atue em conjunto com o AIA endógeno das plantas, estimulando a proliferação celular, o alongamento, e aumento da absorção de minerais e nutrientes do solo (STEENHOUDT & VANDERLEYDEN, 2000; TEALE, PAPONOV & PALMA, 2006). Conforme o ambiente, o microrganismo seleciona uma rota particular para a biosíntese de AIA, dentre as várias que possui, sendo a maioria delas via triptofano (PATTEN & GLICK, 1996; CERIGIOLI, 2005).

Nesse sentido, os isolados de *B. megaterium* e *A. faecalis* tolerantes a herbicidas e aqui testados *in vitro*, apresentam potencial utilização em consórcios para inoculantes promotes de crescimento vegetal, devendo ser testados *in vivo* em outras culturas além daquela dos solos onde foram obtidos, isto é, da rizosfera de cana-de-açúcar. Assim, ensaios com outras gramíneas como o milho são indicados.

#### **5.7. Bioensaio para avaliação da ação das bactérias selecionadas sobre a germinação e crescimento de plântulas estioladas de milho**

A Tabela 8 apresenta os resultados do bioensaio de germinação de sementes de milho previamente embebidas (24 h) em água ou suspensões aquosas de células ( $1 \times 10^8$ . mL<sup>-1</sup>) de

uma das quatro bactérias de solo selecionadas (em face da tolerância a herbicidas), após 7 dias de serem utilizadas para produzir plântulas etioladas.

É possível observar que, nas condições em que o experimento foi proposto, as sementes tratadas com os isolados bacterianos antes da deposição sobre folhas de papel filtro umedecidas apenas com água, germinaram menos do que aquelas que apenas tinham sido tratadas com água destilada estéril. Da mesma forma, as sementes previamente tratadas com água e depois depositadas para germinar em folhas de papel de filtro umedecido com um dos três herbicidas, em geral germinaram mais do que aquelas previamente inoculadas com as bactérias.

**Tabela 8-** Efeito sobre a germinação de sementes de milho (*Zea mays*) tratadas (24 h) com suspensão aquosa de bactérias tolerantes a altas concentrações de herbicidas (diuron, isoxaflutole e sulfentrazone), e incubadas por sete dias sobre papel de filtro previamente umedecido em soluções aquosas desses produtos ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), em condições de temperatura ambiente, no escuro.

Tratamento Prévio	Germinação (%)			
	Herbicida			Controle Água
	Diuron	Isoxaflutole	Sulfentrazone	
<i>B. toyonensis</i>	100,00	61,02	69,49	100,00
<i>B. megaterium</i>	85,71	80,00	100,00	70,27
<i>L. macroides</i>	84,04	70,45	100,00	62,16
<i>A. faecalis</i>	69,23	100,00	80,76	78,38
Água	87,5	92,18	95,31	100,00

Comparando-se o perfil das sementes para os três herbicidas mediante prévia embebição apenas em água, verificou-se uma elevada taxa de germinação, embora ligeiramente menor àquela das sementes não depositadas em papel embebido nos mesmos (controle água-água). Em ordem decrescente, sulfentrazone estimulou mais esse parâmetro do que isoxaflutole e este mais do que diuron. Tal fato pode ser explicado pela característica de quebra de dormência de sementes de gramíneas atribuída a estes, em especial aos dois primeiros produtos. Por outro lado, o fato da embebição prévia das sementes com bactérias ter, em geral, resultado em menor germinação, pode ser explicado pelas próprias características do experimento, isto é, para sintetizarem fatores de promoção de crescimento as bactérias necessitam de condições apropriadas a seu desenvolvimento, além de certos nutrientes, e após serem inoculadas nas sementes, estas apenas contaram com a umidade ofertada ao papel de filtro no qual foram dispostas e mantidas no escuro a temperatura ambiente.

Em termos de sinergismo entre as bactérias e o herbicida presente no ambiente proposto para germinação das sementes, *B. toyonensis* foi mais eficiente para a germinação em diuron, seguido por *B. megaterium*, enquanto estes e *L. macroides* foram os mais eficientes em atuar sobre a germinação em combinação com sulfentrazone, seguidos por *A. faecalis* e inclusive proporcionando maior germinação do que quando foram utilizados sem o posterior embebimento das sementes nos herbicidas. *A. faecalis* também promoveu a maior germinação na presença de isoxaflutole, seguido por *B. megaterium*.

ABD EL-HAMED, ELWAN & SHABAN (2012), verificaram que *B. megaterium* promoveu um aumento de 59,32% na germinação de sementes de milho em relação ao lote de sementes não inoculadas, enquanto ALMAGHRABI *et al.* (2014) constataram que outra estirpe da mesma espécie, inoculada em sementes dispostas para germinar em folhas de papel filtro umedecido, promoveram apenas 7% a mais de germinação em relação ao controle não inoculado.

Quando as plantas encontram condições ambientais limitante ao seu crescimento, muitas vezes elas tentam ajustar os níveis de seus hormônios vegetais endógenos, com a finalidade de diminuir os efeitos negativos da pressão do ambiente. Embora esta estratégia seja, por vezes, bem-sucedida, os microorganismos presentes na rizosfera também podem produzir ou modular fitohormônios em condições *in vitro*, de modo que muitas bactérias promotoras do crescimento vegetal podem alterar os níveis dos hormônios vegetais e, assim, afetar o equilíbrio hormonal da planta e sua resposta ao estresse (PATTEN & GLICK, 1996).

Segundo AHMED & KHAN (2011), um aumento da liberação dos fatores promotores do crescimento vegetal pelo inoculante quando associados aos herbicidas pode ocorrer devido ao estresse submetido por estes compostos aos microrganismos. Em seu trabalho o autor destaca que ao efetuar o tratamento de sementes de feijão da China com um inoculante bradirrizobial e a dose de 1 X da concentração do herbicida houve um decréscimo da produção de nódulos, da massa seca de nódulos, de Leg-hemoglobina, da biomassa seca total, do conteúdo de nitrogênio e de fósforo nas raízes, e na produção de sementes e de proteínas dos grãos, quando comparados ao controle. Em contrapartida, houve um aumento significativo nesses parâmetros quando as sementes dessa espécie foram tratadas com o mesmo inoculante e uma dose 3X maior do mesmo herbicida.

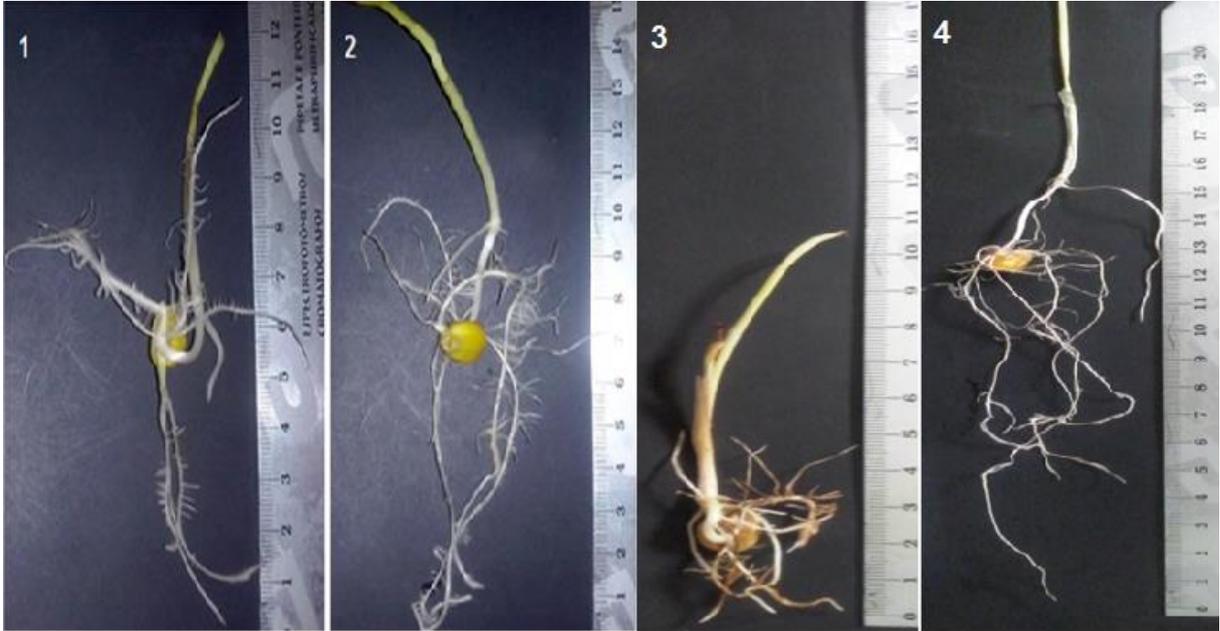
A Tabela 9 e a Figura 34, por sua vez, apresentam respectivamente os comprimentos médios de radículas e mesocótilos das plântulas etioladas obtidas, e seu aspecto.

**Tabela 9-** Efeito sobre parâmetros de pré-emergência de plântulas etioladas a partir de sementes de milho tratadas (24 h) com suspensão aquosa de bactérias tolerantes a altas concentrações de herbicidas (diuron, isoxaflutole e sulfentrazone), e incubadas por sete dias sobre papel de filtro umedecido com soluções aquosas desses produtos (100 µg.mL<sup>-1</sup>), em condições de temperatura ambiente, no escuro.

Tratamentos das Sementes de Milho 24 horas antes de Depositá-las em Papel de Germinação	Tratamentos do Papel de Filtro para Germinação de Sementes de Milho 7 dias antes da Avaliação do Crescimento*							
	diuron		Isoxaflutole		sulfentrazone		Água Destilada Estéril	
	Mesocótilo	Radícula	Mesocótilo	Radícula	Mesocótilo	Radícula	Mesocótilo	Radícula
<i>Bacillus toyonensis</i>	1,43 ±0,46 bc	6,95 ±1,69 a	1,66 ±0,42 c	7,11 ±1,40 d	1,35 ±0,29 a	6,76 ±1,33a	1,42 ±0,37 a	6,93 ±1,13 b
<i>Bacillus megaterium</i>	1,12 ±0,22 a	7,03 ±1,98 d	1,26 ±0,37a	6,78 ±1,62 c	1,45 ±0,40 b	7,19 ±1,47 c	1,56 ±0,44 b	6,81 ±1,51 a
<i>Lysinibacillus macroides</i>	1,56 ±0,49 bc	7,73 ±2,09 e	1,41 ±0,36 b	7,20 ±1,53 d	1,39 ±0,28 a	7,43 ±1,10 c	1,59 ±0,38 c	7,75 ±1,48 d
<i>Alcaligenes faecalis</i>	1,23 ±0,23 b	6,65 ±0,68 c	1,55 ±0,36 bc	6,70 ±0,95 b	1,36 ±0,27 a	8,31 ±2,24 d	1,67 ±0,39 e	7,57 ±0,98 e
Água Destilada Estéril	1,58 ±0,37c	7,17 ±1,39 b	1,48 ±0,35 b	6,51 ±1,30 a	1,58 ±0,33 b	7,04 ±1,05 b	1,63 ±0,39 d	6,85 ±0,93 c

\*Médias seguidas por letras minúsculas iguais na mesma coluna, não diferem significativamente ao nível de 5% (Teste de Tuckey, p>0,05).

**Figura 34-** Desenvolvimento de radículas e mesocótilos estiolados de plântulas de milho (*Zea mays*) sete dias após a disposição das sementes em folhas de papel de filtro umedecidas em solução aquosa ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) de sulfentrazone, depois de serem previamente embebidas (24 h) em suspensões aquosas dos isolados: 1) *B. megaterium*; 2) *A. faecalis*; 3) *B. toyonensis*; e 4) *L. macroides*.



Fonte: AUTOR, 2015.

Na presença de isoxaflutole, *B. toyonensis* induziu maior crescimento de radículas e mesocótilos de milho em relação ao controle, assim como *L. macroides*.

*B. megaterium* induziu o menor crescimento do mesocótilos e o maior crescimento de radículas em diuron, assim como *L. macroides*, embora este último não tenha levado a redução do crescimento dos mesocótilos, e mesmo em água essa bactéria tenha estimulado com mais intensidade o crescimento das radículas em comparação com o tratamento controle (água  $\times$  água). Por outro lado, em sulfentrazone *A. faecalis* induziu o maior aumento de radícula e o menor de mesocótilo.

LUCY *et al.* (2004) verificaram que a ação de *B. megaterium* sobre mudas de *Eucalyptus* sp, elevou a biomassa de mudas em vasos em cerca de 44%. Por outro lado, ALI *et al.* (2009) isolaram da rizosfera, histoplano e filosfera de diferentes espécies de plantas dezesseis estirpes de *Bacillus* que foram triados quanto a produção de AIA *in vitro*, bem como quanto a promoção do crescimento de *Vigna radiata* (L.) Wilczek. Os isolados da rizosférica exibiram relativamente mais síntese de AIA do que os do histoplano e da filosfera. Experimentos da interação entre sementes e *B. megaterium* Mir-4, *B. pumilus* NPR-1 e *B. subtilis* TPP-1, em condições controladas, conduziu a aumentos no comprimento da parte

aérea das plântulas de respectivamente 55,55, 46,46 e 46,20%. Inoculações com os isolados de *Bacillus* também aumentaram a massa fresca da parte aérea, sendo de 60,94% para o uso de *B. megaterium* Mir-4 3 37,76% para *B. pumilus* NPR-1, havendo correlação positiva altamente significativa entre a produção de auxina analisada por GC-MS e o comprimento da parte aérea ( $r = 0,687^{**}$ ,  $P = 0,01$ ) e massa fresca desta ( $r = 0,703^{**}$ ,  $P = 0,01$ ). Da mesma forma, correlação significativa também foi observada entre a produção de auxina pelas espécies de *Bacillus* e parâmetros de crescimento diferentes, como o comprimento da parte aérea ( $r = 0,495^*$ ,  $P = 0,05$ ), número de vagens ( $r = 0,498^*$ ,  $P = 0,05$ ) e peso de grãos ( $r = 0,537^*$ ,  $P = 0,05$ ) em plena maturidade, revelando que inoculação do solo de cultivo de *Vigna radiculata* com tais microrganismos é favorável ao desenvolvimento e aumento de produtividade da mesma.

ANGULO *et al.* (2014) avaliaram o crescimento de *Eucalyptus nitens* induzido pela espécie de *L. sphaericus* através da produção de ácido-indol-acético, solubilização de fosfato e produção da enzima aminociclopropano-1-carboxilato deaminase.

Em contrapartida, LIN *et al.* (1992) haviam isolado em 1980 a estirpe A1501 de *A. faecalis* de solo salino de cultivo de arroz no sul da China, constataram que tal isolado cresce bem em meio sólido ou líquido contendo  $0,8 \text{ mol.L}^{-1}$  de NaCl, além de produzir AIA, indicando tal bactéria para formulações biofertilizantes a serem utilizadas em solos degradados ou salinos para os cultivos de arroz e soja.

No presente estudo, entretanto, na presença dos herbicidas estudados somente o isolado de *B. megaterium* foi capaz de produzir o fitohormônio, de modo que possivelmente a rota para a produção do AIA em *A. faecalis* foi inibida na presença de altas concentrações desses agentes de controle de plantas daninhas e invasoras.

MEHNAZ & LAZAROVITS (2006), ao inocularem de sementes de milho com isolados bacterianos produtores de AIA, demonstraram que a estirpe que expressou a maior produção desse hormônio ( $16,8 \text{ g mL}^{-1}$ ) não foi a que promoveu o maior crescimento das plantas, mas a síntese da auxina foi considerada o principal mecanismo responsável pela promoção de crescimento encontrada. Da mesma forma, CERIGIOLI (2005), depois de isolar 75 estirpes de microrganismos de rizosfera de milho e verificar que seis, das 32 que apresentavam fatores de crescimento de plantas (18% *Stenotrophomonas* spp., 16% *Bacillus* spp., 10% *Ochrobactum* spp.), seis produziram AIA em quantidade razoável *in vitro* (*Pseudomonas putida*, *Microbacterium saperdae*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactum anthropi*, *A. faecalis* e *B. megaterium*), e apenas *S. maltophilia* e *M. saperdae* aumentaram em 64 e 23% respectivamente a massa das raízes de milho após 30 dias do

tratamento em solo esterilizado e suplementação com zinco e NPK, porém, esse parâmetro não foi promovido quando as sementes foram inoculadas com suspensões aquosas de pelo menos outras três dessas bactérias em solo não esterilizado e não suplementado ou suplementado apenas com zinco, como no caso da estirpe de *B. megaterium*. Esta fora selecionada pelo alto rendimento de AIA *in vitro* ( $14,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e só foi capaz de promover algum aumento na massa da parte aérea (15%), em plântulas obtidas em solo não esterilizado suplementado com zinco e NPK.

De fato, os solos brasileiros são pobres em zinco, elemento essencial para a conversão do triptofano em AIA. No caso da parte aérea de plântulas de milho com 30 dias, CERIGIOLI (2005) relatou que inclusive houve diminuição de sua massa para a maioria dos tratamentos, com exceção das sementes inoculadas com *A. faecalis* 14R1C/B, cujas plântulas pós-emergentes aumentaram de massa em relação ao controle, embora não significativamente.

PATTEN & GLICK (1996) sugerem que a entrada adicional de AIA microbiano pode modificar a auxina endógena para um nível ótimo ou acima do ótimo, resultando na indução ou inibição do crescimento da planta. A resposta da auxina depende do estágio de desenvolvimento da raiz da planta, o qual influi na composição e quantidade dos exsudatos liberados pela raiz, favorecendo assim seu desenvolvimento.

## 6. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

---

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que:

1. Embora o levantamento bibliográfico efetuado tenha permitido observar que existem muitos estudos de isolamento e identificação de bactérias promotoras de crescimento, poucos são os relatos que tendem a relacioná-las com a degradação de agroquímicos, em especial dos herbicidas isoxaflutole e sulfentrazone.
2. Muitos microrganismos (96) puderam ser isolados de solos oriundos de longo tempo de monocultivo de cana-de-açúcar, o que evidencia que apesar desses solos terem sido alvo de agricultura intensiva há tanto tempo, ainda servem como habitat para microbiota diversa, prevalecendo entre as cepas isoladas cerca de 25% de bastonetes Gram positivos formadores de endósporos (*Bacillus* spp.), e sugere-se a simbiose dessa diversidade com a rizosfera de cana-de-açúcar, promovendo seu crescimento.
3. A maioria das estirpes bacterianas isoladas (62) apresentou tolerância aos herbicidas diuron, isoxaflutole e sulfentrazone estudados *in vitro* mesmo em altas concentrações - estes dois últimos inclusive de até 1000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , quando o máximo permitido pela legislação sanitária e ambiental brasileira em águas de abastecimento, por exemplo, não ultrapassa respectivamente 90, 20 e 10  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , isto é, teores muito mais reduzidos. Portanto, apesar da pressão, essesolo ainda serve como habitat para certa microbiota.
4. Dessas estirpes tolerantes caracterizadas morfoquimicamente, selecionou-se quatro daquelas que apresentaram atividades enzimáticas extracelulares para degradar diferentes compostos, incluindo celulose, peróxido, uréia e compostos fenólicos, e submeteu-se as mesmas a testes de tolerância aos mesmos herbicidas em meio líquido, avaliando-se seu potencial também para degradá-los. Concluiu-se que ao menos na concentração de 10  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , as quatro bactérias toleraram bem esses produtos como única fonte de carbono em culturas submersas. A amplificação e análise comparativa das sequências do rRNA 16S do DNA extraído de cada uma delas permitiu sua

identificação molecular mais precisa, tratando-se de estirpes de *Bacillus megaterium*, *B. toyonensis*, *Lysinibacillus macroides* e *Alcaligenes faecalis*.

5. Os isolados *B. megaterium* e *Alcaligenes faecalis* foram capazes de solubilizar fosfato em meio sólido contendo diferentes concentrações dos herbicidas diuron, sulfentrazone e isoxaflutole, apesar de nos ensaios de germinação de sementes de milho na presença desses herbicidas não terem elevado esse parâmetro em relação aos controles, mas eventualmente terem aumentado o comprimento de radículas das plântulas de sementes tratadas frente a herbicidas específicos, como diuron e sulfentrazone, respectivamente. *In vitro*, esses isolados também foram capazes de produzir auxina (AIA) em meio contendo triptofano sem herbicidas, enquanto *B. toyonensis*, que não foi capaz de apresentar essa característica, induziu a germinação de sementes de milho na presença de diuron.
6. O isolado de *L. macroides*, que também solubilizou fosfato em meio líquido, assim como *B. megaterium*, apresentaram maior capacidade que os demais em promover o crescimento de radículas de plântulas de milho diante dos diferentes herbicidas nas condições dos bioensaios, isto é, apenas a quebra da dormência e germinação das sementes sem disponibilidade de nutrientes, já que estas estavam dispostas sobre rolos de papel filtro umedecido. Como a síntese de auxinas exige das bactérias alguns nutrientes, entre eles o zinco, é muito provável que o desempenho dessas bactérias associadas a cultivos de cana-de-açúcar possam também ter alguma atuação sobre outras culturas, em especial de solos degradados.
7. Estudos de outras variáveis são necessários, inclusive de quantificação dos metabólitos dos herbicidas para confirmar-se a atuação dos microrganismos não apenas na tolerância, mas também na degradação, e também de formulações e consórcios entre as bactérias para diferentes culturas antes de recomendar-se sua utilização em processos de remediação de solos com resíduos de herbicidas, entre outros problemas, e para promoção de crescimento vegetal.

## 7. REFERÊNCIAS

---

ABD EL-HAMED, K.E.; ELWAN, M.W.M. ; SHABAN, W.I. Enhanced sweet corn propagation: studies on transplanting feasibility and seed priming. **Vegetable Crops Research Bulletin**. v. 75, p. 31–50, 2012. DOI: 10.2478/v10032-011-0016-4

ABRAHAM, W.R. *et al.* Polychlorinated biphenyl-degrading microbial communities and sediments. **Current Opinion in Microbiology**, v.5, n.3, p. 246-253, 2002. DOI: 10.1016/S1369-5274(02)00323-5.

AGROFIT. (2004). Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 08 jun. 2014.

AHMAD, I. ; AHMAD, F. ; KHAN, M. S. Screening of free-living rhizospheric bacteria for their multiple plant growth promoting activities. *Microbiological Research*, v. 163, no. 2, p. 173–181, 2008.

AHEMAD, M.; KHAN, M.S. Insecticide-tolerant and plant growth promoting *Bradyrhizobium* sp. (*vigna*) improves the growth and yield of greengram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] in insecticide-stressed soils. **Symbiosis**, v. 54, p. 17–27, 2011.

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. DOI: 10.1071/SR9950925.

ALI, B.; SABRI, A.N.; LJUNG, K.; HASNAIN, S. Quantification of indole-3-acetic acid from plant associated *Bacillus* spp. and their phyto-stimulatory effect on *Vigna radiata* (L.). **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 519-526, 2009. DOI 101007/s11274-008-9918-9.

ALMAGHRABI, O.A.; ABDELMONEIM, T. S.; ALBISHRI, H.M. ; MOUSSA, T. A. A. Enhancement of maize growth using some plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) under laboratory conditions. **Life Sci J**, v. 11(11), p.764-772, 2014. doi:10.7537/j.issn.1097-8135

ALVES FILHO, J. P. **Uso de agrotóxicos no Brasil: controle social e interesses corporativos**. São Paulo: Annablume, 2002.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. I.18 Isoxaflutole. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/e7a64600474596899e48de3fbc4c6735/i18.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. S.9 Sulfentrazona. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/0841cf0047459762a024f43fbc4c6735/s09.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

APHA-AWWA-WEF, 1998. (American Public Health Association, American Water Works Association, Water; **Water Environment Federation**). **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington (USA): 1162 p.

ARABET, D. *et al.* Effects of a sulfonylurea herbicide on the soil bacterial community. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n 8, p. 5619–5627, 2014. DOI:10.1007/s11356-014-2512-9.

ARMAS, E. D. *et al.* Diagnóstico espaço-temporal da ocorrência de herbicidas nas águas superficiais e sedimentos do Rio Corumbataí e principais afluentes. **Química Nova**, v. 30, n.5, p. 1119-1127, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000500013.

ASHRAF, M. A.; MAAH, M.J.; YUSOFF, I. Soil Contamination, Risk Assessment and Remediation, Environmental Risk Assessment of Soil Contamination, Dr. Maria C. Hernandez Soriano (Ed.), ISBN: 978-953-51-1235-8, 2014, InTech, DOI: 10.5772/57287. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/environmental-risk-assessment-of-soil-contamination/soil-contamination-risk-assessment-and-remediation>. Acesso em 12 de dezembro de 2014.

AZANIA, A.A.P.M. *et al.* Interferência da palha de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.) na emergência de espécies de plantas daninhas da família *Convolvulaceae*. **Planta Daninha**, v.20, n.2, p.207-212, 2002. DOI: 10.1590/S0100-83582002000200006.

BAĆMAGA, M. *et al.* Microbial and enzymatic activity of soil contaminated with a mixture of diflufenican + mesosulfuron-methyl + iodosulfuron-methyl-sodium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n.1, p. 643–656, 2015. DOI 10.1007/s11356-014-3395-5

BADAWI, N. *et al.* Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. **Environmental Pollution**. v. 157, n.10, p. 2806-12, 2009. DOI: 10.1016/j.envpol.2009.04.019.

BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose Degrading Enzymes and Their Potential Industrial Application. **Biotechnology Advances**, v. 15 n. 3-4, p. 583-620, 1997. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2.

BASF. **Supplemental label for Verdict X herbicide**. NVA 2011-04-320-0219. BASF Corporation, Research Triangle Park, NC, USA, 2011.

BASTOS, A. L. *et al.* Influência de doses de fósforo no fluxo difusivo em solos de Alagoas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n. 2, p.136-142, 2008. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2.

BATISSON, I. *et al.* Isolation and characterization of diuron-degrading bacteria from lotic surface water. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 4, p. 761-770, 2007. DOI: 10.1007/s00248-007-9241-2.

- BELTRAN, E.; FENET, H.; COOPER, J.F.; COSTE, C.M. Fate of isoxaflutole in soil under controlled conditions. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p. 146-151, 2003. DOI: 10.1021/jf0207878.
- BENEDITO, D. S. *et al.* Eficiência agrônômica de compostos organominerais obtidos pelo processo humifert. **Bragantia**, v.69, n. 1, p.191-199, 2010. DOI: 10.1590/S0006-87052010000100024.
- BERG G. Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.84, n.1, p. 11-18, 2009. DOI : 10.1007/S00253-009-2092-7.
- BEULKE, S. *et al.* Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. **Chemosphere**, v. 57, n.6, p. 481-490, 2004. DOI: S0045653504004837.
- BHAT, M. K.; BHAT, S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial application. **Biotechnology Advances**, v. 15, n.3-4, p. 583-620, 1997. DOI: 10.1016/S0734-9750(97)00006-2.
- BORAL 500 SC. Campinas, 2000. *Folder*.
- BOURAS, O. *et al.* Adsorption of diuron and its degradation products from aqueous solution by surfactant-modified pillared clays. **Applied Clay Science**, v. 37, n.3-4, p. 240–250, 2007. DOI: 10.1016/j.clay.2007.01.009.
- BRASCHI, I.; GESSA, C.E.; BLASIOLI, S. 2011. The fate of herbicides in Soil, herbicides and environment. In: KORTEKAMP, A. (Ed.), ISBN: 978-953-307-476-4, Disponível em: <<http://www.intechopen.com/books/herbicides-and-environment/the-fate-of-herbicides-in-soil>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- BRASIL. Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA). Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, p. 58-63, 17 mar. 2005.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Regulamenta a Lei n. 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Decreto n. 4074/2002. Diário Oficial da União, 04 jan. 2002. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/decreto/2002/d4074.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm)>. Acesso em: 15 out. 2014.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Dispõe sobre as normas e padrões de potabilidade de água para consumo humano. Portaria n. 36/1990. Diário Oficial da União, 19 jan. 1990.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano Portaria n° 1469//2000. Diário Oficial da União, 29 dez. 2000.
- \_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de

potabilidade, e dá outras providências. Portaria n. 518/2004 - Diário Oficial da União, 25 mar. 2004.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde (MS). Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria n. 2914/2011 - Diário Oficial da União, 12 dez. 2011. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12)>\_. Acesso em: 18 out. 2014.

BRICEÑO, R.D. *et al.* Courtship behavior of different wild strains of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae). **The Florida Entomologist**, v. 90, n.1, p. 15-18, 2007. DOI: 10.1603/0013-8746(2000)093[1179:CASAWC]2.0.CO;2.

BROCK, T.C.M., LAHR, J.; VAN DEN BRINK, P.J. **Ecological risks of pesticides in freshwater ecosystems Part. 1: Herbicides**. Wageningen, Alterra, Green World Research, 2000.124p.

BROCK, T.C.M.; VAN WIJNGAARDEN, R.P.A. Acute toxicity tests with *Daphnia magna*, *Americanysis bahia*, *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex* and implications of new EU requirements for the aquatic effect assessment of insecticides. *Environmental Science Pollution Research*. v. 19, n.8, p. 3610-8, 2012. DOI: 10.1007/s11356-012-0930-0.

BRODESSER, J. *et al.* Pesticides in developing countries and the International code of conduct on the distribution and the use of pesticides. Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES). In: MEETING ON RISKS AND BENEFITS OF PESTICIDES, Vienna, Austria, 30 mar. 2006. Disponível em :< <http://www-naweb.iaea.org/nafa/fep/public/2006-AGES-CoC.pdf>>. Acesso em: 15 out. 2014.

BROUWER, H. Testing for chemical toxicity using bacteria. **J. Chem. Educ.**, v. 68 p.695–697., 1991. DOI: 10.1021/ed068p695

CARDEAL, Z. L.; SOUZA, A.I G.; AMORIM, L. C. A. Analytical methods for performing pesticides degradation studies in environmental samples. In: Iva Lipovic, Intech. (Org.). **Pesticides: formulations, effects, fate**. Rijeka, v. 1, p. 595-618, 2011.

CARLOS, E. A. *et al.* Simultaneous determination of the organochlorine and pyrethroid pesticides in drinking water by single drop microextraction and gas chromatography. **Chemical Society**, v. 24, n. 8, p. 1217-1227, 2013. DOI: 10.5935/0103-5053.20130155.

CARVALHAIS, L.C. *et al.* Linking plant nutritional status to plant-microbe interactions. **Plos One**, v. 8, n. 7, p. 8:e68555, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0068555.

CASE, R.J. *et al.* Use of 16S rRNA and *rpoB* genes as molecular markers for microbial ecology studies. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 278-288, 2007. DOI: 10.1128/AEM.01177-06

CEDERNEIRA, A. L. *et al.* Efeito de sistemas de cultivo com cana-de-açúcar sobre a lixiviação dos herbicidas do grupo das triazinas em região de recarga do aquífero Guarani. **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 32. Jaguariúna-SP: Embrapa Solos, 2005.

- CERIGIOLI, M.M. **Diversidade de bactérias endofíticas de raízes de milho** (*Zea mays* L.) **e potencial para promoção de crescimento**. 2005. 132f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2005.
- CEZARINO, V. Isoxaflutole - nova molécula herbicida para as culturas da cana-de-açúcar e do milho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA CIÊNCIA DAS PLANTAS DANINHAS, 21. 1997, Caxambu. Palestras. Caxambu: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, p. 79-93, 1997.
- CHEN, Y. *et al.* Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation process. **Bioresource Technology**, v. 123, p. 682-685, 2012. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.07.028.
- CHENG, H. H. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impact and modeling**. Madison: Soil Science Society of America, 168p, 1990.
- CHOWDHURY, A. *et al.* Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, n. 1, p.114-127, 2008. DOI: 10.1007/s12088-008-0011-8.
- CHRISTOFFOLETI, P.J. *et al.* Weed management in the culture of cane sugar: new herbicide molecules. In: TECHNOLOGY SYMPOSIUM SUGARCANE PRODUCTION, 2, 2005. Piracicaba. Conference. Piracicaba, SP: ESALQ/POTAFOS, 2005.
- COMMANDEUR, L.C.M. *et al.* Aerobic degradation of polychlorinated biphenyls by *Alcaligenes* sp. JB1: metabolites and enzymes. **Biodegradation**, v. 7, n. 6, p. 435-443, 1996, DOI: 10.1007/BF00115290.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. 2º Levantamento de safra. Disponível em:[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14\\_08\\_28\\_08\\_52\\_35\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_2o\\_lev\\_-\\_2014-15.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/14_08_28_08_52_35_boletim_cana_portugues_-_2o_lev_-_2014-15.pdf) . Acesso em: 12 dez. 2014.
- CONCEIÇÃO, D.M.; ANGELIS, D.A.; BIDOIA, D.; ANGELIS, F. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia, SP e Refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, p. 99-106, 2005.
- COSTA, C.N. *et al.* Contaminantes e poluentes do solo e do ambiente. In: MEURER, E. J. **Fundamentos de química do solo**. 2 ed. Porto Alegre, 290p, 2004.
- CULLINGTON, J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, n.5, p. 677-686, 1999. DOI: 0038-071799/S1900.
- DALTON, R.L.; EVANS, A.W.; RHODES, R.C. Disappearance of diuron from cotton field soils. **Weeds**, v. 14, n. 1, p. 31-33, 1996. DOI: 10.2307/4041118.
- DAAM, M.A., VAN DEN BRINK, P.J. Risk assessment of agrochemicals on irrigation water quality. **Acta Horticulturae**, v. 922, p. 41-47, 2011. ISSN: 0567-7572.
- DASGUPTA, P. Nature and the economy. **Journal of Applied Ecology**, v. 44, n. 3, p. 475-487, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2664.2007.01316.x.

DE MIRANDA, A. C. *et al.* Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciências e Saúde Coletiva**, v.12, n.1, p. 7-14, 2007. DOI: 10.1590/S1413-81232007000100002.

DE SOUZA, M. *et al.* Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n.1, p. 178-184, 1998.

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 47, n.6, p. 999-1003, 2004. DOI: 10.1590/S1516-89132004000600020.

DEVERYSHETTY, J.; PHALE, P.S. Biodegradation of phenanthrene by *Alcaligenes* sp. strain PPH: Partial purification and characterization of 1-hydroxy-2-naphthoic acid hydroxylase. **FEMS Microbiology Letters**, v. 311, n.1, p. 93–101, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02079.x.

DHOUIB, A. *et al.* Autochthonous fungal strains with high ligninolytic activities from Tunisian biotopes. **African Journal of Microbiology Research**, v. 4, n. 5, p. 431-436, 2005 DOI: 10.5897/AJB2005.000-3079.

DIEZ, M.C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v.10, n. 3, p. 244–267, 2010. DOI: 10.4067/S0718-95162010000100004.

DORES, E.F.G.P.C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. Contaminação do ambiente aquático por pesticidas. Estudo de caso: águas usadas para consumo humano em Primavera do Leste, Mato Grosso - análise preliminar. **Química Nova**, v.24, n.1, p.27-36, 2001. DOI: 10.1590/S0100-40422001000100007.

DUBEIKOVSKY, A. N. *et al.* Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescens* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 9, p. 1277–1281, 1993. DOI: 10.1016/0038-0717(93)90225-Z.

DUKE, S. O. Protoporphyrinogen oxidase inhibiting herbicides. **Weed Science**, v. 39, n. 3, p. 465-473, 1991.

DURAND, S. *et al.* First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, p. 222–228, 2006. DOI:10.1111/j.1472-765X.2006.01923.x.

DYSON, J.S. *et al.* Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, n. 2, p. 613-618, 2002. DOI: 10.2134/jeq2002.0613.

EVENSON, R.E.; GOLLIN, D. Assessing the impact of the green revolution, 1960 to 2000. **Science**, v. 300, n. 5620, p.758–762. 2003. DOI: 10.1073/pnas.0912953109.

EXTOXNET. 1996. Diuron. Disponível em: <<http://ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/diuron.htm>>. Acesso em: 15 dez. 2014.

FAN, J. *et al.* Isolation, identification and characterization of a glyphosate-degrading bacterium, *Bacillus cereus* CB4, from soil. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 58, n. 4, p. 263-271, 2012. DOI: 10.2323/jgam.58.263

FAOSTAT. Food and Agriculture Organization of the United Nations Statistics Division. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?pageID=567#ancor>>. Acesso em: 09 jan. 2015. Obs.: clicar em "Countries by commodity"; em "Selected item", selecionar "Sugar cane"; aguardar atualização do gráfico e de valores da tabela.

FENG, Z. Z. *et al.* Microbial degradation of fomesafen by a newly isolated strain *Pseudomonas zeshuui* BY-1 and the biochemical degradation pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 29, p. 7104-7110, 2012. DOI: 10.1021/jf3011307

FERMAM, R. K. S. **Os requisitos ambientais no comércio internacional**: ferramentas de acesso a mercados para o setor de defensivos agrícolas. 2009. 240f. Tese (Doutorado em Ciências em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Escola de Química. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

FERREIRA L. P.; SALGADO, C. L. Bactérias. In: BERGAMIN Fº, A.; KIMATI, H. H. **Manual de Fitopatologia**. 3. ed., São Paulo: Agronômica Ceres. 1995. v. 1, p.97-131.

FIELD, J. *et al.* Diuron occurrence and distribution in soil and surface and ground water associated with grass seed production. **Journal of Environmental Quality**, v. 32, n. 1, p. 171-179, 2003. DOI: 10.2134/jeq2003.0171.

FILIZOLA, H.F. *et al.* Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaiara. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, n.5, p.659-667, 2002. DOI: 10.1590/S0100-204X2002000500011.

FINLEY, S.D.; BROADBELT, L.J.; HATZIMANIKATIS, V. *In silico* feasibility of novel biodegradation pathways for 1,2,4-trichlorobenzene. **BMC System Biology**, v. 4, n. 7, p. 4-14. 2010. DOI:10.1186/1752-0509-4-7 FMC.

FREITAS, T. Vendas de defensivos fecham 2013 perto de US\$ 11 bilhões-novo recorde. Disponível em: <<http://www1.folha.uol.com.br/colunas/vaivem/2014/01/1404831-vendas-de-defensivos-fecham-2013-perto-de-us-11-bilhoes-novo-recorde.shtml>> . De 30 de janeiro de 2014. Acesso em: 08 jun. 2014.

GAO, B. *et al.* Isolation and characterization of an *Alcaligenes* sp. strain DG-5 capable of degrading DDTs under aerobic conditions. **Journal of Environmental Science and Health part B.**, v. 46, n.3, p. 257-63, 2011. DOI: 10.1080/03601234.2011.540534.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5,n. 6, p. 497-525. 2005. DOI: 10.1002/elsc.200520098.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. **Chemosphere**, v. 56, n. 11, p. 1021-1032, 2004. DOI: 56(11):1021-32.

GORDON, S.A.; WEBER, R.P. Colorimetric estimation of indole-acetic acid. **Plant Physiology**, v.26, n.3, p.192-197, 1951. DOI: 10.1104/pp.26.1.192.

GREY, T. L. *et al.* Behavior of sulfentrazone in ionic exchange resins eletrophoresis gels, and cation-saturated soils. **Weed Science**, v. 48, p. 239-247, 2000. DOI: 10.1614/0043-1745(2000)048[0239:BOSIIE]2.0.CO;2.

GRÜTZMACHER, D. D. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.12, n.6, p.632–637, 2008. DOI: 10.1590/S1415-43662008000600010.

GYANESHWAR, P. *et al.* Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. **Plant and Soil**, v. 245, n 1, p. 83-93, 2002. DOI: 10.1023/A:1020663916259

HATZIOS, K. K. **Herbicide handbook**. supplement to seventh edition. Lawrence: Weed Science Society of America, 1998, 104p. ISBN: 9780911733181.

HE, Z.L.; BIAN, W; ZHU, J. Screening and identification of microorganisms capable of utilizing phosphate adsorbed by goethite. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, v. 33, n.5-6, p. 647-663, 2002. DOI: 10.1081/CSS-120003057.

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diuron**: produção de enzimas lignolíticas e degradação dos compostos. 2009. 110 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2009.

HERNANDEZ, D. D.; ALVES, P. L. C. A.; MARTINS, J. V. F. Influência do resíduo de colheita de cana-de-açúcar sem queima sobre a eficiência do imazapic e imazapic + pendimethalin. **Planta Daninha**, v. 19, n. 3, p. 419-426, 2001. DOI: 10.1590/S0100-83582001000300015.

HESS, D.; WARREN, F. **The herbicide handbook of the weed science society of America**. 8 Edition. P. 159-16, 2002. ISBN: 1-891276-33-6.

HONGSAWAT, P.; VANGNAI, A.S. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. **Journal of Hazardous Materials**, v 186, n.2-3, p. 1300–1307, 2011. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2010.12.002.

HOPKINS, W. G. **Introduction to plant physiology**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, Inc., 2000, 512p. ISBN: 0-471-19281-3.

IRANZO, M. *et al.* The use of microorganisms in environmental remediation. **Annals of Microbiology**, v. 51, p. 135-143, 2001. ISSN: 1869-2044.

JANG, H. D; CHEN, K. S. Production and characterization of thermostable Cellulases from *Streptomyces* Transformant T3-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 263–268, 2003. DOI: 10.1023/A:1023641806194.

JOHNSEN, K. *et al.* Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, n.6, p. 443–453. 2001. DOI: 10.1007/s003740100351.

JONES, J.G.; EDINGTON, M.A. An ecologic survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. **Journal of Genetic Microbiology**, v.52, p.381-390, 1968. . DOI: 10.1099/00221287-52-3-381.

- JURTSHUK JR., P.; LIU, J.K. Cytochrome oxidase analyses of *Bacillus* strains: existence of oxidase-positive species. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v.33, n. 4, p.387-891. DOI: 10.1099/00207713-33-4-887.
- KABLER, K.; WILLIAMSON, K. Aqueous hydrolysis of sulfentrazone. FMC internal report. 1991.
- KHAN, A. A. *et al.* Phosphorus Solubilizing Bacteria: Occurrence, Mechanisms and their Role in Crop Production. **Journal of Agricultural and Biology Science**, v. 1, n. 1, 48-58, 2009. DOI: 10.5923/j.re.20120201.10.
- KISHORE, G. M. & BARRY, G. F. 1992. International patent WO92/00377
- KIVISAAR, M.; CHAKRABARTY, A.M. PARSEK, M.R. Differential DNA bending introduced by the *Pseudomonas putida* LysR-type regulator, CatR, at the plasmid-borne *pheBA* and chromosomal *catBC* promoters. **Molecular Microbiology**, v. 15, n. 5, 819-829, 1995. DOI: 10.1111/j.1365-2958.1995.tb02352.x.
- KLINGMAN, G. C.; ASHTON, F. M.; NOORDHOFF, L. J. Weed science: principles and practices. 2. ed. New York: J. Wiley, 1982. 449 p. ISBN: 0-471-49171-3.
- KONG, L. *et al.* Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Alcaligenes faecalis* JBW4. **Journal of Environmental Sciences**, v. 25, n. 11, p. 2257–2264, 2013. DOI:10.1016/S1001-0742(12)60288-5.
- KONSTANTINOOU, I. K.; HELA, D. G.; ALBANIS, T. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. **Environmental Pollution**, v. 141, n. 03, p. 555-570, 2006. DOI: 10.1016/j.envpol.2005.07.024.
- KORNDÖRFER, G. H.; MELO, S. P. Fontes de fósforo (fluido ou sólida) na produtividade agrícola e industrial da cana-de-açúcar. **Ciência e Agrotecnologia**, v.33, n. 1, p.92-97, 2009. DOI: 10.1590/S1413-70542009000100013.
- LAEMMLI, C.M. *et al.* Characterization of a second *tfd* gene cluster for chlorophenol and chlorocatechol metabolism on plasmid pJP4 in *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4). **Journal of Bacteriology**, v. 182, n15, p. 4165-4172, 2000. DOI: 10.1128/JB.182.15.4165-4172.2000.
- LANZA, L.M.; MONTEIRO, A.C.; MALHEIROS, E.B. População de *Metarhizium anisopliae* em diferentes tipos e graus de compactação do solo. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1757-1762, 2004. DOI: 10.1590/S0103-84782004000600014.
- LEGRINI, O., OLIVEROS, E., BRAUN A.M. Photochemical processes for water treatment. **Chemical Reviews**, v. 93, n. 2, p. 671-698, 1993. DOI: 10.1021/cr00018a003.
- LEHTONEN, M. Status report on sugar cane agrochemicals management. Agrochemicals in the sugarcane industries: health and environmental challenges and solutions. [Goebel F.R (coordination)] Ethanol & Sugar Impact Analysis (ESIA) and Agricultural Research for Development (CIRAD). 2009. Disponível em: <[http://www.sucree-thique.org/IMG/pdf/agrochemicals\\_1\\_-2.pdf](http://www.sucree-thique.org/IMG/pdf/agrochemicals_1_-2.pdf)>. Acesso em: 12 dez. 2014

LEWIS, J. A., PAPAIVIZAS, G. C.; HORA, T. S. Effect of some herbicides on microbial activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 10, n. 2, p. 137-141, 1978. DOI: 10.1016/0038-0717(78)90084-6.

LI, Y. F. *et al.* Gridded usage inventories of technical hexachlorocyclohexane and Lindane for China with 1/60 latitude by 1/4" longitude resolution. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.41, n.3, p. 261-266, 2001.ISSN

LIANG, B. *et al.* Biodegradation of fomesafen by strain *Lysinibacillus* sp. ZB-1 isolated from soil. **Chemosphere**, v. 77, n. 11, p. 1614–1619, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2009.09.033.

LIN, C. H. *et al.* Determination of isoxaflutole (Balance) and its metabolites in water using solid phase extraction followed by high-performance liquid chromatography with ultraviolet or mass spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 21, p. 5816-5824, 2002. DOI: 10.1021/jf025622d.

LIN, M.; PING, S.Z.; YOU, S.B. Effect of inoculation with *Alcaligenes faecalis* on excretion of protons by rice roots and microecology of the rice rhizosphere. **Acta Phytobiologica Sinica**, v.18, p. 233–238, 1992.

LIU, M.C. *et al.* Toxicity of different industrial effluents in Taiwan: a comparison of the sensitivity of *Daphnia similis* and Microtox. **Environmental Toxicology**, v. 17, n.2, p. 93–97, 2002. ISSN: 1522-7278.

LOPES-ASSAD, M. L.; ALMEIDA, J. Agricultura e sustentabilidade: contexto, desafios e cenários. **Ciência e Ambiente**, v.29, n.1, p.1-17, 2004. ISSN: 2179-9962.

LORENZI, H.J.; BRUNELLI NETO, V.; OLIVEIRA, J.E. DE. Estudo do efeito do herbicida oxyfluorfen, aplicado em pré-emergência, sobre o crescimento e produtividade da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) cv. SP 71-6163. **STAB**, v.12, p.25-26, 1994. ISSN: 20739990.

LOWRY, O.H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n.1, 265-75, 1951. DOI: 10.1074/jbc.270.46.27489.

LUCY, M.; REED, E. & GLICK, B.R. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. **Antonie Leeuwenhoek**, v.86, p.1-25, 2004.

LUSCOMBE, B. M.; PALLETT, K.E. Isoxaflutole for weed control in maize. **Pesticide Outlook**, v.7,n. 6, p. 29-32, 1996. ISSN: 0956-1250.

MAHADEVAIAH, M. S. *et al.* Simple spectrophotometric determination of phosphate in sugarcane juices, water and detergent samples. **E-Journal of Chemistry**, v.4, n.4, p.467-473, 2007. DOI: 10.1155/2007/576560.

MAIA, J.L.T.; RIBEIRO, M.R. Propriedades de um *argissolo* amarelo fragipânico de Alagoas sob cultivo contínuo da cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 39, n. 1, p. 79-87, 2004. DOI: 10.1590/S0100-204X2004000100012.

MALATO, S., BLANCO, J., VIDAL, A., RICHTER, C., Photocatalysis with solar energy at a pilot-plant scale: An overview. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 37, n.1, p. 1-15, 2002. DOI:10.1016/S0926-3373(01)00315-0.

MALATO, S. *et al.* Photocatalytic treatment of water-soluble pesticides by photo-fenton and TiO<sub>2</sub> using solar energy. **Catalysis Today**, v. 76, n.2-4, p. 209–220, 2002. DOI: 10.1016/S0920-5861(02)00220-1.

MALGHANI, S. *et al.* Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n.4, p.893-900, 2009. DOI: 10.1590/S1517-83822009000400021.

MARDAD, I.; SERRANO, A.; SOUKRI, A. Solubilization of inorganic phosphate and production of organic acids by bacteria isolated from a moroccan mineral phosphate deposit. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.8, p. 626-635, 2013. . DOI: 10.1016/0038-0717(92)90199-8.

MARIN, F.; NASSIF, D.S. P. Mudanças climáticas e a cana-de-açúcar no Brasil: Fisiologia, conjuntura e cenário futuro. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.17, n.2, p. 232-239. 2013. DOI: 10.1590/S1415-43662013000200015.

MARTINEZ, C. O. Biotransformação do herbicida sulfentrazone em solos brasileiros. 2006. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade de Campinas, Campinas, SP, 2006.

MASAI, E. *et al.* Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of beta-aryl ether. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 6, p. 1768-1775, 2003. DOI: 10.1128/JB.185.6.1768-1775.2003.

MASSENSINI, A. M. Solubilização de fosfatos mediada por microrganismos do solo de plantio de eucalipto. 2007. 95 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007.

MASSENSINI, A. M. *et al.* Activity of phosphate solubilizing bacterial isolates in the presence of commercial glyphosate. **Planta Daninha**, v. 26, n. 4, p. 323-331, 2008. DOI: 10.1590/S0100-83582008000400013.

MASTEN, S.J.; DAVIES, S.H.R. The use of ozonation to degrade organic contaminants in wastewaters. **Environmental Science & Technology**, v. 28, n. 4, 180A-185A, 1994. ISSN: 0013-936X.

MEHNAZ, S., LAZAROVITS, G. Inoculation eVects of *Pseudomonas putida*, *Gluconacetobacter azotocaptans*, and *Azospirillum lipoferum* on corn plant growth under greenhouse conditions. **Microb Ecol.** v.51, p. 326–335, 2006. DOI: 10.1007/s00248-006-9039-7

MIRITI, P. *et al.* Isolation and characterization of Linuron degrading bacteria from soils under horticultural production in Kenya. **Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation**, v. 2, n. 5, p. 220-227, 2014. DOI:10.12691/ijebb-2-5-2.

MITRA, S.; BHOWMILK, P. C.; XING, B. Sorption and desorption of the diketone nitrile metabolite of isoxaflutole in soils. **Environmental Pollution**, v. 108, p. 183-190, 2000. DOI: 10.1016/S0269-7491(99)00192-X.

\_\_\_\_\_, S.; \_\_\_\_\_, P. C.; \_\_\_\_\_, B. Sorption of isoxaflutole by five different soils varying in physical and chemical properties. **Pesticide Science**, v. 55, n.9, p. 935-942, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9063(199909)55:9<935::AID-PS33>3.0.CO;2-S.

MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A. Controle Químico: os fungicidas e o meio ambiente. In: MIZUBUTI, E. S. G.; MAFFIA, L. A.(Ed.). **Introdução a Fitopatologia**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006, p. 146-147.

MLIKI, A, ZIMMERMANN, W. Purification and characterization of an intracellular peroxidase from *Streptomyces cyaneus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, n.3, p 916–919, 1992. DOI: 10.1111/j.1432-1033.1996.00192.x.

MOCHI, D.A.; MONTEIRO, A.C; BARBOSA, J.C. Action of pesticides to *Metarhizium anisopliae* in soil. **Neotropical Entomology**, v. 34, n.6, p. 961-971, 2005. DOI: 10.1590/S1519-566X2005000600013.

MONCADA, A. Environmental fate of diuron. California Department of Pesticide Regulation Web Site. Environmental Monitoring Branch. 2004. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/empm/pubs/fatememo/diuron.pdf>>. Acessado em: 08 jun. 2014.

MONKIEDJE, A.; SPITELLER, M.; BESTER, K. Degradation of racemic and enantiopure metalaxyl in tropical and temperate soils. **Environmental Science and Technology**, v.37, n. 4, p. 707-712, 2003. DOI: 10.1021/es020123e.

MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do Solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.

MUSSY, M.H. *et al.* Identification of microorganisms resistant to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-d) in soil from Rondônia, Brazil. **Interciência**, v. 38, n. 5, p. 353-357, 2013. ISSN: 0378-1844.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo, In: TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P.(org.). **Microbiologia do solo**, Campinas: Sociedade Brasileira do Solo, 1992, p.341-360.

NAGY, I. *et al.* single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (*s*-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n.5. p. 2056–2060, 1995. ISSN: 1098-5336.

NANDIHALLI, U.B.; DUKE, S.O. The porphyrin pathway as a herbicide target site. **American Chemical Society Symposium Series**, v. 524, p. 62–78, 1993. DOI: 10.1021/bk-1993-0524.ch005.

NAUTIYAL, C.S. An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. **FEMS Microbiology Letters**, v.170, n.1, 265-270, 1999. DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00555-2.

NEDER, R. N. Microbiologia manual de laboratório. São Paulo, Livraria Nobel S.A, 1992, 138p.

NELSON, E. A.; PENNER, D. Sensitivity of selected crops to isoxaflutole in soil and irrigation water. **Weed Technology**, v. 19, n.3, p. 659-663, 2005. DOI: 10.1614/WT-04-203R.1.

NEVES, M.F.; TROMBIN, V.G. (org.). A dimensão do setor Sucroenergético: mapeamento e quantificação da safra 2013/14. Ribeirão Preto: Markestrat, Fundace, FEA-RP/USP 2014.

NONGKHLAW, F.M.; JOSHI, S.R. Epiphytic and endophytic bacteria that promote growth of ethnomedicinal plants in the subtropical forests of Meghalaya, India. **Rev Biol Trop.** , v.62, n.4, p.1295-308, 2014. DOI: 10.15517/rbt.v62i4.12138

NOVAIS, R. F.; SMYTH, T. T. Fósforo em solo e planta em condições tropicais. **Informações Agronômicas**, n. 87, p 399, 1999. ISSN: 1806-6690.

OAKLEY, A. Glutathione transferases: a structural perspective. **Drug Metabolism Review**, v. 43, n. 2, p. 138-51, 2011. DOI: 10.3109/03602532.2011.558093.

ODUKKATHIL, G.; VASUDEVAN, N. Enhanced biodegradation of endosulfan and its major metabolite endosulfate by a biosurfactant producing bacterium. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 48, n. 6, 462–469, 2013. DOI: 10.1080/03601234.2013.761873.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. **Weed Technol.**, v. 14, n. 1, p. 100-105, 2000. DOI: 10.1614/0890-037X(2000)014[0100:SDIATS]2.0.CO;2.

OLCHANHESKI, L. R. *et al.* Mechanisms of tolerance and high degradation capacity of the herbicide mesotrione by *Escherichia coli* strain DH5- $\alpha$ . **Plos One**, v. 12, n. 9, p. 99960. 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0099960.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L. *et al.* Pesticide Biodegradation: mechanisms, genetics and strategies to enhance the process, biodegradation - Life of Science, Dr. Rolando Chamy (Ed.), ISBN: 978-953-51-1154-2, InTech, doi: 10.5772/56098. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/pesticide-biodegradation-mechanisms-genetics-and-strategies-to-enhance-the-process>.

\_\_\_\_\_, M.L. *et al.* Pesticides in the Environment: Impacts and its Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment, Pesticides - Formulations, Effects, Fate, Margarita Stoytcheva (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/13534. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-formulations-effects-fate/pesticides-in-the-environment-impacts-and-itsbiodegradation-as-a-strategy-for-residues-treatment> >. 2011.

PALLUD, C. *et al.* Modification of spatial distribution of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid degrader microhabitats during growth in soil columns. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p.2709–2716, 2004. DOI: 10.1128/AEM.70.5.2709-2716.2004.

PANIGRAHI, R. Global crop protection (pesticides) market – segmented by type, application area and geography. Trends And Forecasts (2014-2020). Sustainability, Regulation & Competition. Mordor Intelligence, Hyderabad, India, 2 Jun. 2014. Disponível em: [https://www.academia.edu/7239154/GLOBAL\\_CROP\\_PROTECTION](https://www.academia.edu/7239154/GLOBAL_CROP_PROTECTION)>. PESTICIDES\_MARKET\_SEGMENTED\_BY\_TYPE\_APPLICATION\_AREA\_AREA\_AND\_GEOGRAPHY. Acessado em: 08 jun. 2014.

- PARK, J.H. *et al.* Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 6, p. 3288–3298, 2003. DOI: 10.1128/AEM.69.6.3288-3298.2003.
- PARKINSON, A. *et al.* Human biotransformation, in: *biotransformation and Metabolite Elucidation of Xenobiotics* (Nassar AF, ed.), **John Wiley & Sons, Hoboken, NJ**, 1-78, 2010.
- PARSEK, M.R.; McFALL, S. M.; CHAKRABARTY, A.M. Microbial degradation of toxic environment pollution: ecological and evolutionary consideration. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 35, n 1-3, p.175–188, 1995. DOI: 10.1016/0964-8305(95)00032-Z.
- PATTEN, C.L.; GLICK, B.R. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 3, p.:207-220, 1996. DOI: 10.1002/9781118297674.ch29.
- PAUL, D. *et al.* Accessing microbial diversity for bioremediation and environmental restoration. **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 135–142, 1995. DOI: 10.1016/j.tibtech.2005.01.001.
- PERESTELO, F. *et al.* Bioalteration of Kraft Pine Lignin by *Bacillus rnegaterium* Isolated from Compost Piles. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v.68, n. 2, p. 151-153, 1989. ISSN2249-9598.
- PIERZYNSKI, G.M.; SIMS, J. T.; VANCE, G. F. *Soils and environmental quality* Boca Raton: **Lewis Pub.** 1994. 313p.
- PIRES, F. R. *et al.* Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, v.21, n.2, p.335-341, 2003. DOI: 10.1590/S0100-83582003000200020.
- POLUBESOVA, T. *et al.* Sulfentrazone adsorbed on micelle–montmorillonite complexes for slow release in soil. **Journal of Agriculture Food and Chemistry**, v.51, n. 11, p. 3410–3414, 2003. DOI: 10.1371/journal.pone.0059060.
- PORTO, A.M. *et al.* Biodegradation of pesticides, In: **Pesticides in modern world-pesticides use and management**. STOYTCHIEVA, M. (ed.), Chapter 20, 2011. DOI: 10.5772/950.
- POZO, C. *et al.* Effects of the herbicide alachlor on soil microbial activities. **Ecotoxicology**, v. 3, n.1, p. 4-10, 1994. DOI: 10.1007/BF00121384.
- RAMAKRISHNAN, B. *et al.* Mixtures of Environmental Pollutants: Effects on Microorganisms and Their Activities in Soils Reviews of Environmental and **Contamination Toxicology**, v. 211, p. 63-120, 2011. DOI: 10.1007/978-1-4419-8011-33.
- RASKO, D.A. *et al.* Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v.29, p.303–329, 2005. DOI: 10.1016/j.femsre.2004.12.005 q.
- RAYMOND, J. *et al.* A review of structure-based biodegradation estimation methods. **Journal of Hazardous Material**, v. 84, n.2-2, p. 189–215, 2001. ISSN: 03043894.
- REDDY, K. N.; LOCKE, M. A. Sulfentrazone sorption, desorption, and mineralization in soils from two tillage systems. **Weed Science**, v.46, n.4, p.494-500, 1998.

REGITANO, J.B.; KOSKINEN, W.C.; SADOWSKY, M.J. Influence of soil aging on sorption and bioavailability of simazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.4, p.1373-1379, 2006. DOI: 10.1021/jf052343s.

RIBAS, P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RIBEIRO, M. L. *et al.* Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, n. 3, v. 30, p. 688-694, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000300031.

RYCKEBOER, J.; MERGAERT, J.; VAES, K.; KLAMMER, S.; DE CLERCQ, D.; COOSEMANS, J.; INSAM, H.; SWINGS, J. A survey of bacteria and fungi occurring during composting and self-heating processes. *Ann Microbiol* 53: 349–410, 2003. DOI: 10.1007/bf03175343 4.

RIGOTTO, R.M.; VASCONCELOS, D.P.; ROCHA, M.M. Pesticide use in Brazil and problems for public health. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n 7, p 1-3, 2014. DOI: 10.1590/0102-311XPE020714.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Herbicides Guide**, 5. edition, Londrina, 2005, 592p.

RODRÍGUEZ, H.; FRAGA, R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. **Biotechnology Advances**, vol. 17, no. 4-5, pp. 319–339, 1999. DOI:10.14719/pst.2014.1.2.25.

RODRIGUEZ, H.*et al.* Gluconic acid production and phosphate solubilization by the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* spp. **Naturwissenschaften**, v. 91, p. 552–555, 2004. DOI:10.1007/s00114-004-0566-0.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, p. 723-728, 2000. DOI: 10.1590/S0103-90162000000400020.

ROSA, A.V. **Agricultura e meio ambiente**. São Paulo: Ed. Atual, 1998. p.10-17, 52-63.

ROSSETTO, R; DIAS, F. L. F.; VITTI, A. C. Problemas nutricionais dos solos nas novas fronteiras canavieiras. **Revista Idea News**, v.8, p.78-90, 2008. DOI: 10.1590/S1415-43662011000500002.

SAGLIO, P.; TRIJASSE, S. Behavioral responses to atrazine and diuron in goldfish. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 35, p.484–491, 1998. DOI: 10.1007/s002449900406.

SALVESTRINI, S.; DI CERBO, P.; CAPASSO, S. Kinetics of the chemical degradation of diuron. **Chemosphere**, v. 48, n.1, 69-73, 2002. DOI: 10.1016/S0045-6535(02)00043-7.

SANTOS, J. B. *et al.* Microbial activity in soil after herbicide application under no-tillage and conventional planting systems. **Planta Daninha**, v.23 n .4, p. 683 – 691, 2005. DOI: 10.1590/S0100-83582005000400017

SANTOS, D. H. **Adubação da cana-de-açúcar com torta de filtro enriquecida com fosfato solúvel**. 2009. 35 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, SP. 2009.

SANTOS, V. R. *et al.* Crescimento e produtividade agrícola de cana-de-açúcar em diferentes fontes de fósforo. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.13, n.4, p.389-396, 2009. DOI: 10.1590/S1415-43662009000400004.

SARAVANAN, V. S.; MADHAIYAN, M.; THANGARAJU, M. Solubilization of zinc compounds by the diazotrophic, plant growth promoting bacterium *Gluconacetobacter diazotrophicus*. **Chemosphere**, v. 66. p. 1794-1798, 2007. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2006.07.067.

SATOLO, L. F.; BACCHI, M. R. P. Dinâmica econômica das flutuações na produção de cana-de-açúcar. **Economia Aplicada**. v.13, n.3, p. 377-397, 2009. DOI: 10.1590/S1413-80502009000300002 .

SCALLA, R. *et al.* Recent advances in the mode of action of diphenyl ether and related herbicides. **Zeitschrift Naturforschung**, v. 45, n. 5, p. 503-511, 1990. DOI: 10.1515/znc-1990-0535.

SCHALLMEY, M.; SINGH, A.; WARD, O.P. Developments in the use of *Bacillus* species for Industrial Production. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 1-17, 2004. ISSN: 0008-4166.

SCHOCKEN, M.J. Soil photolysis of sulfentrazone. FMC internal report. 1994.

SCHUYTEMA, G. S., NEBEKER, A. V. Comparative toxicity of diuron survival and growth of pacific treefrog, bullfrog, red-legged frog, and africa clawed frog embryos and tadpoles. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.34, n.4, p.370-376, 2004. DOI: 10.1007/s002449900332.

SCHREIBER, F. *et al.* Plantas indicadoras de clomazone na fase vapor. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, 2013. DOI: 10.1590/S0103-84782013001000014.

SETTE, L.D.; OLIVEIRA, V.M.; MANFIO, G.P. Isolation and characterization ofalachlor-degrading actinomycetes from soil. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 87, n. 2, p. 81-89, 2005. DOI: 10.1007/s10482-004-1129-2.

SHAKOORI, A.R.; MAKHDOOM, M.; HAQ, R.U. Hexavalent Chromium reduction by a dichromate-resistant gram-positive bacterium isolated from effluents of tanneries. **Applied and Microbiology Biotechnology**, v. 53, n. 3, p. 348–351, 2000. DOI: 10.1007/s002530050033.

SHANKAR, T.; MARIAPPAN, V.; ISAIARASU, L. Screening cellulolytic bacteria from the mid-gut of the popular composting earthworm, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg). **World Journal of Zoology**, v.6, p 142-148, 2011. DOI: 10.7324/JAPS. 2014.40416.

SHETTY, P.K.; MURUGAN, M.; SREEJA, K.G. Crop protection stewardship in India: wanted or unwanted. **Current Science**, v.95, n. 4, p. 457–464, 2008. DOI: 10.5402/2012/247072.

SILVA, C. H. P. M.; NEUFELD, P. M. **Bacteriologia e micologia para laboratório clínico**. Rio de Janeiro: Editora Revinter, 2006, 497 p.

SILVA, C.M.M.; FAY, E.F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: Embrapa- Informações Tecnológicas, 2004, 400 p.

SILVA, D.R.O. *et al.* Monitoramento de agrotóxicos em águas superficiais de regiões orizícolas no sul do Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.9, 2009. ISSN: 0103-8478.

SILVA, E.R.L. *et al.* Techniques for *in vitro* evaluation of the herbicidal effect on *Bacillus thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* (*Btk*). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n 1, 59-67, 2008.

SILVA FILHO, G. N.; VIDOR, C. Solubilização de fosfatos por microrganismos na presença de fontes de carbono. **Rev. Bras. Ciên. Solo**, v.24, n. 2, p. 311-329, 2000. DOI: 10.1590/S0100-06832000000200008

SILVA, J. F. **Isolamento e caracterização de estirpes bacterianas associadas à cana-de-açúcar com características para a promoção de crescimento vegetal**. 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro -UENF. Rio de Janeiro, 2010.

SILVA, J. M. *et al.* Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.10, n.4, p. 891-903. 2005, DOI: 10.1590/S1413-81232005000400013

SILVA, N. **Testes Bioquímicos para Identificação de Bactérias em Alimentos**. Campinas. Instituto de Tecnologia de Alimentos; Laboratório de Microbiologia de Alimentos. Informes Técnicos, n.1, 87 p, 1996.

SIMS, G.K. Bioavailability in Biodegradation and Function of Herbicides. **Journal of Bioremediation and Biodegradation**, v. 5, n. 2, p. 144-145. 2014. DOI: 10.4172/2155-6199.1000e144.

SIMS, G.K. *et al.* Role of sorption and degradation in the herbicidal function of isoxaflutole. **Pest Management Science**, v. 65, n.7, p. 805-810, 2009. DOI: 10.1002/ps.1758.

SINGER, S.S.; SCHOCKEN, M.J. Aerobic soil metabolism of sulfentrazone. **FMC internal report**, 1991.

SINHA, S. *et al.* Microbial transformation of xenobiotics for environmental bioremediation. **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.22, 6016–6027, 2009. ISSN: 1684-5315.

SIQUEIRA, J. O.; ANDRADE, A. T.; FAQUIN, V. O papel dos microrganismos na disponibilização e aquisição de fósforo pelas plantas. In: YAMADA, T.; ABDALLA, S. R. S. (Eds.) **Fósforo na agricultura brasileira**. Piracicaba: ESALQ/USP, 2004. p. 117-156.

SOARES, W. L.; PORTO, M.F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciência e Saúde Coletiva**. v.12, n.1, p. 131-143, 2007. DOI: 10.1590/S1413-81232007000100016.

SØRENSEN, S.R.; ALBERS, C.N.; AAMAND, J. Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2332–2340, 2008. DOI: 10.1128/AEM.02687-07.

SOUZA, M.L. Utilização de microrganismos na Agricultura. **Biociência e Desenvolvimento**, 21, p. 28-31, 2001. ISSN: 1414-4522.

SPADOTTO, C.A. **Avaliação de riscos ambientais de agrotóxicos em condições brasileiras**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2006.

SPAEPEN, S.; VANDERLEYDEN, J.; REMANS, R. “Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 31, no. 4, p. 425–448, 2007.

STAMFORD, N. P. *et al.* Effect of sulphur inoculated with *Thiobacillus* on saline soils amendment and growth of cowpea and yam bean legumes. **Journal of Agricultural Science**, v. 139, p. 275-281, 2002. DOI: 10.1017/S0021859602002599.

STEENHOUDT, O., VANDERLEYDEN, J. *Azospirillum*, A Free-Living Nitrogen-Fixing Bacterium Closely Associated With Grasses: genetics, Biochemical and Ecological aspects. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24:487–506. 2000.

STEFFEN, G.P.K.; STEFFEN, R.B.; ANTONIOLLI, Z.I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. *Tecnológica*, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011. ISSN: 1517-8048.

SUENAGA, K.; SINGH, R.P.; WILLIAM, H.M. Tagging of slow rusting genes for leaf rust, *Lr34* and *Lr46*, using microsatellite markers in wheat. **Japan International Research Center for Agricultural Sciences**. vol 8–9, 2001.

SUSLOW, I.; SCHROTH, M. N.; ISAKA, M. Application of a rapid method for gram differentiation of plant pathogenic and saprophytic bacteria without staining. **Phytopathology**, vol .72, n.7, p. 917-918, 1982. DOI: 10.1094/Phyto-72-917.

SVIRIDOV, A.V. *et al.* Distribution of glyphosate and methylphosphonate catabolism systems in soil bacteria *Ochrobactrum anthropic* and *Achromobacter* sp. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, p. 787-796, 2011. DOI: 10.1007/s00253-011-3485-y.

TANG, X., ZHU, B., KATOU, H. A review of rapid transport of pesticides from sloping farmland to surface waters: Processes and mitigation strategies. *Journal of Environmental Science*, v. 24, n. 3, 351–361, 2012. DOI: 10.1016/S1001-0742(11)60753-5.

TAO, G., C. *et al.* Phosphate solubilizing and mineralizing abilities of bacteria isolated from soils. **Pedosphere**. v.18, n.4, p. 515-523, 2008. ISSN: 1002-0160.

TEALE, W. D. ; PAPONOV, I. A.; PALME, K. Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 7, n. 11, p. 847–859, 2006.

TESFAMICHAEL, A. A.; KALUARACHCHI, J. J. A methodology to assess the risk of an existing pesticide and potential future pesticide for regulatory decision - marking. **Environmental Science Policy**, v. 9, p. 275, 2006. DOI: 10.1016/j.envsci.2005.12.004.

TIXIER P. *et al.* Model evaluation of cover crops, application to eleven species for banana cropping systems. **European Journal of Agronomy**, v. 34, p. 53-61, 2011. DOI: /10.1016/j.eja.2010.10.00.

TOMITA, R. Y.; BEYRUTH, Z. Toxicologia de agrotóxicos em ambiente aquático. **Biológico**, v.64, n.2, p.135-142, 2002. ISSN: 1980 – 6221.

TOMITA, R.Y. *et al.* Toxicidade da mistura dos herbicidas atrazina e diuron sobre *Daphnia similis* (Crustacea, Cladocera). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.71(supl.), p.1-749, 2004.

TOMLIN, C. **Pesticide Manual**. 10. ed. Cambridge: British Crop Protection Council and The Royal Society of Chemistry, 1994. 1341 p.

TRAVKIN, V. *et al.* Degradation of 3,4-dichloro- and 3,4-difluoroaniline by *Pseudomonas fluorescens* 26-K. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 38, n. 2, p. 121-132, 2003. DOI: 10.1081/PFC-120018443.

UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação. Microrganismos degradadores do herbicida atrazina Biotecnologia. v.10, p.10-13, 1999.

USEPA. United States Environmental Protection Agency. Isoxaflutole PC code 123000. 29 jun 1995. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/chemicalsearch/chemical/foia/cleared-reviews/reviews/123000/123000-020.pdf>>. Acesso em: 23 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. United States Environmental Protection Agency. Sulfentrazone PC code 129081. 25 mar 1996. Disponível em: <[http://www.epa.gov/pesticides/chem\\_search/cleared\\_reviews/csr\\_PC-129081\\_25-Mar-96\\_055.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-129081_25-Mar-96_055.pdf)> . Acesso em: 23 mar. 2015.

\_\_\_\_\_. United States Environmental Protection Agency. Diuron PC code 035505. 27 ago. 2001. Disponível em: <[http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/cleared\\_reviews/csr\\_PC-035505\\_27-Aug-01\\_043.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/cleared_reviews/csr_PC-035505_27-Aug-01_043.pdf)>. Acesso em: 23 mar 2015.

\_\_\_\_\_. United States Environmental Protection Agency. Environmental Risk Assessment for the Reregistration of Diuron. 2013. Disponível em: <[http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/diuron\\_efed\\_chapter.pdf](http://www.epa.gov/espp/litstatus/effects/diuron_efed_chapter.pdf)>. Acesso em: 08 jun. 2014.

VAN EERD, L.L. *et al.* Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, p. 472-495, 2003. DOI: 10.1614/0043-1745(2003)051[0472:PMIPAM]2.0.CO;2.

VEIGA, M. M. *et al.* Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 22, n. 11, p. 2391-2399, 2006. DOI: dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2006001100013.

VELINI, E.D. *et al.* Avaliação dos efeitos de doses do herbicida clomazone, aplicado em pós-emergência inicial, sobre o crescimento e produtividade de soqueira de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum* cv. SP 71-1406). **STAB**, v.12, p.30-35, 1993. ISSN: 1873-2321.

VENDAN R. T., YU Y., LEE S., RHEE Y. Diversity of endophytic bacteria in ginseng and their potential for plant growth promotion. **Journal of Microbiology**, v.48, p. 559–565, 2010. DOI: 10.1007/s12275-010-0082-1.

VERMA, J.P.; JAISWAL, D.K.; SAGAR, R. Pesticide relevance and their microbial degradation: a-state-of-art. **Reviews of Environmental Science and Bio/Technology**, v.13, n.4, p. 429-466, 2014. DOI: 10.1007/s11157-014-9341-7.

VERMA, S. C.; LADHA, J. K.; TRIPATHI, A. K. Evaluation of plant growth promoting and colonization ability of endophytic diazotrophs from deep water rice. **Journal of Biotechnology**, v. 91, p. 127-141, 2001. DOI: 10.1016/S0168-1656(01)00333-9.

VERMELHO, A.B.; PEREIRA, A.F.P.; COELHO, R.R.R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Práticas em Microbiologia**. Rio de Janeiro: Publisher Koogan Guanabara, 2006. 239 p.

VESSEY, J. K. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. **Plant and Soil**, v. 255, n. 2, p. 571-586, 2003. DOI: 10.1023/A:1026037216893.

VISCHETTI, C, CASUCCI C, PERUCCI P. Relationship between changes of soil microbial biomass content and imazamox and benfluralin degradation. **Biology and Fertility of Soils**. v. 35, n. 1, p. 13-17, 2002. DOI: 10.1007/s00374-001-0433-5.

WEYENS, N. *et al.* Exploiting plant–microbe partnerships for improving biomass production and remediation. **Trends in Biotechnology**, v.27, n.10, 591–598, 2009. DOI: 10.1016/j.tibtech.2009.07.006.

WILLUT, J.M. *et al.* Formation and decline of major sulfentrazone photoproducts in buffered aqueous solutions by simulated sunlight. **Abstracts of American Chemistry Society**, 1997. ISSN: 0065-7727.

WIRÉN-LEHR S.; SCHEUNERT, I.; DORFLER, U. Mineralization of plant-incorporated residues of <sup>14</sup>C-isoproturon in arable soils originating from different farming systems. **Geoderma**, v. 105, n.3-4, p. 351-366, 2002. DOI: 10.1016/S0016-7061(01)00112-4.

WOOD, T.K. Molecular approaches in bioremediation. **Current Opinion of Biotechnology**, v. 19, n. 6, p.572–578, 2009. DOI: 10.1016/j.copbio.2008.10.003

WU, S.J. *et al.* A novel dichloromethane-degrading *Lysinibacillus sphaericus* strain wh22 and its degradative plasmid. **Applied Microbiology and Biotechnology**; v. 82, n. 4, p. 731–740, 2009. DOI: 10.1007/s00253-009-1873-3.

YADAV, K., SINGH, T. Effect of *Bacillus megatherium* on the solubilization of phosphatic fertilizers influencing yield and uptake by sugarcane. **Bharatiya Sugar**, v.15, p.15-23, 1990.

YAO, X.F. *et al.* Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megatherium* IMT21. **Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 721–726, 2011, DOI: 10.1099/mic.0.045393-0.

YOU M, LIU X. Biodegradation and Bioremediation of Pesticide Pollution. **Chinese Journal of Ecology**, v.1, p. 73-77, 2004. ISSN: ISSN: 10004890.

ZHOU, Y. et al. *Bacillus pallidus* sp. nov., isolated from forest soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 58, p.2850–2854, 2008. DOI: 10.1099/ijs.0.2008/000075-0.

## **Apêndice I – Colorações Diferenciais e Meios de Cultivo**

## **1. Aspectos morfológicos**

### **1.1. Coloração de Gram**

Indicada para classificar as bactérias conforme a composição de sua parede e provável revestimento externo em Gram positivos (não possuem envoltório lipopolissacarídico, pois retêm o corante cristal violeta utilizado, adquirindo a cor violeta-escuro por este não ser lavado por solvente orgânico), e em Gram negativos (possuem envoltório lipopolissacarídico que adsorve a maior parte do corante, sendo este posteriormente lavado por etanol). As bactérias Gram negativas adquirem cor roseada após nova coloração com safranina.

O procedimento foi realizado utilizando-se lâminas de vidro limpas e previamente desengorduradas. Nestas depositou-se uma gota de água destilada estéril e sobre a mesma, com o auxílio de uma alça de metal flambada, friccionou-se parte de uma colônia bacteriana coletada de meio sólido. Os esfregaços foram rapidamente flambados sobre a chama de bico de Bunsen e recobertos com uma solução de cristal de violeta (solução A: 4 g de cristal de violeta em 20 mL de etanol 95%; e solução B: 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL água destilada), durante 1 min. O excesso de corante sobre as lâminas foram esgotados, e sobre as mesmas depositou-se solução de lugol a 2% (LIMED<sup>®</sup>), visando aumentar a fixação do corante previamente utilizado nas células. Após 1 min, novamente esgotou-se o material e o esfregaço foi lavado com álcool (95%) até o total desprendimento de pigmentos. As lâminas foram lavadas em água corrente e cobertas com solução de safranina (0,5 g de safranina em 100 mL de álcool a 50 %), aguardando-se cerca de 30 s antes do esgotamento total da solução. Efetuou-se a secagem de cada lâmina, utilizando-se lenço de papel, e as células foram observadas com o auxílio do microscópio trinocular Coleman (magnitudes de 640 a 1600 X) (NEDER, 1992).

### **1.2. Confirmação da reação de Gram**

Parte de uma unidade formadora de colônia foi transferida com o auxílio de palito de madeira estéril para uma gota (cerca de 30  $\mu$ L) de uma solução de KOH a 3% (p/v), previamente depositada sobre lâmina de vidro asséptica e deslipidizada. Durante 15 s, homogenizou-se o material com o auxílio de um palito de madeira, observando-se a ocorrência da formação de um fio viscoso da emulsão de microrganismos, o que confirma aqueles que são Gram-negativos. Não ocorrendo a formação do fio viscoso, os mesmos são considerados Gram-positivos, conforme descrito por SUSLOW *et al.* (1982).

### **1.3. Coloração de endosporos**

Preparou-se esfregaços de células conforme descrito em 1.2, mas utilizou-se coloração diferente do método de Gram. Para tal, utilizou-se uma solução de verde malaquita (1 g de verde malaquita em 20 mL de água destilada), e fixou-se o mesmo por flambagem rápida sobre bico de Bunsen, até o desprendimento de vapores (sem que o material fervesse ou secasse). Após o resfriamento, a lâmina foi lavada com água corrente e tratada com solução de safranina durante 20-30 min. Decorrido este tempo, lavou-se e secou-se a lâmina, e o esfregaço foi examinado ao microscópio com objetiva de imersão. Os esporos, quando presentes, coraram-se de verde, sendo este um dos critérios adotados na identificação de bactérias esporulantes (NEDER, 1992).

### **1.4. Bactérias álcool-ácido resistentes**

Preparou-se esfregaços de células conforme descrito em 1.2, mas utilizou-se coloração diferente do método de Gram. Para tal, utilizou-se solução de fucsina de Ziehl concentrada [na proporção de 1:1, misturou-se as soluções A (3 g de fucsina básica a 10 mL de álcool 95°) e solução B (5 g de fenol fundido a 95 mL de água destilada)], e fixou-se o mesmo por flambagem rápida sobre bico de Bunsen, até o desprendimento de vapores (sem que o material fervesse ou secasse). O excesso de corante foi esgotado, e as lâminas novamente tratada com uma solução de álcool-ácido clorídrico a 1% (97 mL de álcool a 95% e 3 mL de ácido clorídrico), até o desprendimento total de pigmentos. Em seguida, lavou-se o material em água corrente e novamente submeteu-se cada esfregaço a coloração com solução de azul de metileno de Loeffler (Reagen). As células que permaneceram coradas após tratamento com a mistura álcool-ácido foram denominadas álcool-ácido resistentes, corando-se em vermelho, e as demais células coraram-se em azul (VERMELHO *et al.*, 2006).

## **2. Meios de cultivo de manutenção e diferenciais**

### **2.1. Meio ágar nutriente (AN)**

A 1 L de água destilada adicionou-se: 5,0 g de peptona; 3,0 g de extrato de carne; 1,0 g de NaCl e 15 g de ágar. Após esterilização (121°C, 1 atm, 20min) e resfriamento, o meio foi vertido em placas de Petri e tubos de ensaio para posterior utilização (NEDER, 1992).

### **2.2. Meio mínimo mineral Jones & Edington (J.E.) (líquido e sólido)**

A 1L de água destilada adicionou-se 0,5 g de  $K_2HPO_4$ ; 0,5 g de  $(NH_4)_2SO_4$ ; 0,5 g de

MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 10 mg de FeCl<sub>2</sub>.1H<sub>2</sub>O; 10 mg CaCl<sub>2</sub>; 0,1 g de MnCl<sub>2</sub>; 0,01 mg de ZnSO<sub>4</sub> e 15 g de Ágar (pH 6,5) (JONES & EDINGTON, 1968). Após esterilização (121°C, 1 atm, 20min) e resfriamento, diferentes volumes de solução estoque de um dos três herbicidas em acetona (25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg.mL<sup>-1</sup> de meio) foram filtradas (membrana 0,22 µm) e adicionadas. O Caldo J.E. foi preparado da mesma forma mas sem adição de ágar.

### **2.3. Meio “Três Glicídios e Ferro (T.S.I.) (Vetec, pH= 7,3 ± 0,2, a 25 °C).**

Dissolveu-se 59,4 g do meio desidratado em 1L de água destilada correspondendo a 3 g de extrato de carne; 3 g de extrato de levedura; 20 g de NaCl; 10 g de lactose; 10 g de sacarose; 1 g de dextrose; 0,2 g de FeSO<sub>4</sub>; 0,3 g de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 0,024 g de vermelho de fenol e 15 g de ágar para cada litro de água. O material foi aquecido sob agitação constante até dissolução completa, fervendo-se por 1 min. Após homogeneização, o meio foi autoclavado (121°C, 1atm, 20 min) e distribuído em tubos de ensaio esterilizados e resfriados (45-50°C). As inoculações dos isolados foram realizadas através de picada no fundo do tubo e estriamento da rampa, os tubos foram incubados (30 ± 1°C, no escuro) e observados após 6, 18, e 24 h de incubação. O objetivo de se utilizar este meio foi verificar a capacidade das bactérias em fermentar glicose, lactose e/ou sacarose através da produção de ácido, a presença ou não de gás e a produção de H<sub>2</sub>S durante seu crescimento (SILVA , 1996).

### **2.4. Ágar MacConkey (Himedia, pH 7,4 ± 0.2 a 25 °C)**

Adicionou-se do meio sintético 55,37 g em 1L de água destilada, correspondendo a: 20 g de peptona; 10 g de lactose; 5 g de sais biliares; 5 g de NaCl; 0,07 g de vermelho neutro e 15,3 g de ágar para 1 L de água. Após homogeneização, o meio foi esterilizado (120°C, 1 atm, 20 min) e posteriormente distribuído em placas de Petri. Após sua solidificação as culturas bacterianas jovens foram inoculadas e incubadas (30 ± 1 °C, escuro) durante 18-24 h. Avaliou-se o crescimento dos microrganismos, considerando-se fermentadores de lactose aqueles que se apresentaram como colônias de coloração rosa. As placas nas quais não houve crescimento ou ausência da cor rosa nas colônias foram reincubadas por mais 24 h, sendo consideradas negativas as que se mantiveram inalteradas.

### **2.5. Ágar Citrato de Simons (Difco, pH 6,8 ± 0,2 a 25 °C).**

Suspendeu-se 24,2 g do meio comercial desidratado em 1 L de água destilada , correspondendo a 0,2 g de MgSO<sub>4</sub>; 1 g de NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1 g de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 g de citrato de sódio;

5 g de NaCl; 13 g de ágar; 0,08 g de azul de bromotimol, por cada litro de água. O mesmo foi homogeneizado e aquecido até dissolução completa, distribuídos em tubos de ensaio e esterilizado (121 °C, 1atm, 20 min). Após solidificação de forma inclinada a superfície do meio foi inoculada em estrias, com o auxílio de uma alça de platina, sem tocar o fundo. Depois os tubos foram levados para incubadora ( $30 \pm 1$  °C, no escuro) durante 48 h. A utilização do citrato como fonte de energia gera grande quantidade de gás carbônico (CO<sub>2</sub>), que reage com o sódio (Na<sup>+</sup>) e a água do meio, produzindo compostos alcalinos como o carbonato de sódio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), elevando o pH do meio e causando a viragem do indicador para azul, o que é considerado resultado positivo para a prova de citrato (VERMELHO *et al.*, 2006).

## **2.6. SIM (Sulfito – Indol – Motilidade) (Difco - pH = 7,3 ± 0,2 a 25 °C)**

Suspendeu-se 30 g do meio comercial desidratado em 1 L de água destilada, correspondendo a 30 g de peptona; 3 g de extrato de carne; 0,2 g de ferro peptonado; 0,025 Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O e 3 de ágar por litro de água. Após autoclavagem (120 °C, 1 atm, 20 min), verteu-se o meio em tubos, que foram mantidos na posição vertical, resfriados, inoculados por picada única e central (alça de platina) e incubados ( $30 \pm 1$  °C, no escuro), por 24 h. O crescimento difuso das colônias (além da linha de inoculação), em direção às paredes do tubo de ensaio, indicou motilidade para o microrganismo.

Com relação à presença de indol, esta é revelada a partir da disposição de 200 - 300 µL do reagente de Kovacs para indol (5 g de p-dimetilbenzaldeído; 75 mL de álcool amílico; 25 mL de ácido clorídrico concentrado) no meio de cultura, e posterior agitação. O desenvolvimento de uma cor vermelho-violeta na superfície do meio indica resultado positivo, e a não alteração implica em resultado negativo. Quanto à produção de H<sub>2</sub>S, esta é revelada pelo escurecimento do meio de cultura pela deposição de sulfato difuso (SILVA & NEUFELD, 2006).

## **2.7. Meio para atividade de fenoloxidas**

Ao meio Ágar Nutriente previamente esterilizado (120 °C, 1 atm, 15 min) e resfriado para 45-50°C acrescentou-se 0,5% de ácido gálico e levou-se o material novamente para autoclave por mais 10 min. Após resfriamento (45 - 50 °C), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculado com culturas jovens (24 h), e incubados a  $30 \pm 1$  °C por 4 dias no escuro. O teste é considerado positivo para halos marrom escuros ao redor de colônias

(Reação de Bavendamm), conforme CONCEIÇÃO *et al.* (2005), sendo realizado em triplicata para cada microrganismo.

### **2.8. Meio para Atividade de Lignina-Peroxidase (Ligninase)**

Preparou-se o meio composto por: 2 g de glicose; 2 g de tartarato de amônio; 2 g de extrato de malte; 0.26 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0.26 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 0.5 g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.01 g de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 0.0066 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0.005 g de  $\text{FeSO}_4$ , 0.0005 g de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0.02 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.09 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0.07 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0.1 g de azul de metileno (cloreto 3,7-bis-dimetilaminofenazotônio) e 20 g de ágar para 1 L de água. O pH foi ajustado para 5.5, seguindo-se a esterelização em autoclave a 121 °C, 1 atm, por 20 min. Após resfriamento do meio (45 - 50 °C), o mesmo foi vertido em placas de Petri e posteriormente inoculados com culturas jovens (24 h de crescimento) e incubados a  $30 \pm 2$  °C por 10-30 dias no escuro. A detecção da atividade foi verificação pela descoloração do meio de cultivo ao redor da colônia. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (DHOUIB *et al.*, 2005).

### **2.9. Meio para Atividade Celulolítica**

Dissolveu-se 1 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 1 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 5 g de  $\text{MgSO}_4$ , 0,001 g de NaCl, 15 g ágar e 10 g de carboximetil-celulose em 1 L de água destilada. Após a homogeneização, o meio foi autoclavado (120 °C, 1 atm, 20 min.), vertido em placas de Petri, inoculado com culturas jovens (24 h) e incubado por 10 dias ( $30 \pm 1$  °C, no escuro). A atividade foi verificada pela presença de zonas alaranjadas ao redor da colônia após a aplicação da solução de vermelho Congo (0,1g em 100 mL de água destilada) colocado sob a superfície das placas por um período de 2 h. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (RYCKEBOER *et al.*, 2003).

### **2.10. Meio para Atividade Ureásica**

Utilizou-se o meio ágar uréia de Christensen composto por: 1 g de peptona; 1 g de dextrose; 5 g de NaCl; 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 20 g de uréia; 0,12 g de vermelho de fenol (6 mL de solução 0,2 %) para 1 L água destilada. O meio foi autoclavado, vertido e inoculado conforme item anterior. O crescimento foi observado após 6 e 24 h de incubação a  $30 \pm 1$  °C, no escuro. A mudança da coloração do meio de amarelo alaranjado para rosa escuro, indica

resultado positivo. Os tubos considerados negativos foram reincubados por 6 ou mais dias. O teste foi realizado em triplicata com todos os microrganismos (SILVA, 1996)

### **2.11. Meio NBRIP modificado (NAUTIYAL, 1999)**

O meio NBRIP (*National Botanical Research Institute Phosphate*), contendo (g.L<sup>-1</sup>): glicose (10,0); KCl, (0,2); MgCl<sub>2</sub>.6 H<sub>2</sub>O (5,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,25); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, (0,1), água destilada (850), com ágar (17) para o meio sólido, ou sem ágar (meio líquido), foi inicialmente esterilizado (120°C, 1 atm, 15 min). A esse volume de meio adicionou-se 50 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10% para meio com ágar e 1% para meio líquido) e 100 mL de CaCl<sub>2</sub> (10%) para a formação de precipitado insolúvel de fosfato de cálcio (CaHPO<sub>4</sub>). O mesmo foi utilizado para seleção de bactérias solubilizadoras de fosfatos. Portanto, no meio sólido a concentração de fosfato insolúvel foi de cerca de 5 mg.mL<sup>-1</sup> e no meio líquido esta foi de cerca de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>.

## **3. Testes diferenciais *in vitro***

### **3.1. Prova da Catalase**

Sobre uma lâmina de vidro previamente asséptica e deslipidizada, e com o auxílio de palito de madeira estéril, depositou-se uma fração de uma colônia bacteriana jovem em AN (18-24 h). Sobre a colônia, adicionou-se 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%, recentemente preparado. O surgimento de bolhas decorrentes da liberação de oxigênio pela célula bacteriana indicou positividade para a produção de catalase (SILVA, 1996).

### **3.2. Prova da Oxidase em tiras de papel**

Com o auxílio de uma pinça flambada, depositou-se, em placa de Petri esterilizada, uma fita de papel de filtro embebida com uma solução aquosa de cloridrato de dimetil-p-fenileno diamino 1% (reagente de Kovacs). Em seguida, e com um palito de madeira estéril, coletou-se e depositou-se uma fração de uma colônia bacteriana jovem (24-36 h) em AN sobre tal fita. O aparecimento de coloração rósea, inicialmente, passando a vermelha intensa, 10 a 15 s depois, indicou reação positiva para oxidase. Se a mudança da cor ocorreu entre 15 e 60 s depois, a reação foi considerada negativa (FERREIRA & SALGADO, 1995).

## **Apêndice II**

**Resultados da caracterização morfo-bioquímica dos microrganismos isolados de solo com antigo histórico de cultivo de cana-de-açúcar**

**Quadro 1.** Aspectos morfo-bioquímicos dos microrganismos isolados em solo com longos anos de cultivo de cana-de-açúcar (NR = não realizado)

Microrganismo	Gram	Cor	Motilidade	Endosporos	Fenoloxidase	Ligninase	Urease	Celulase	Catalase	Oxidase	Citrato
AB SG2 SULF	+	Pigmentada	+	-	-	-	-	+	-	-	-
AB SG1 SULF	-	Incolor	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AB PR SULF	+	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	+	-	-
AB G1 SULF	+	Pigmentada	+	-	-	-	-	+	+	-	-
AB SG3 SULF	+	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	-	-	+
ACO SG3a SULF	+	Incolor	-	+	-	-	+	+	+	-	+
ACO PR2 SULF	+	Pigmentada	+	+	-	-	-	-	+	-	-
ACO PR1 SULF	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	+	-	+
ACO SG1a SULF	-	Incolor	-	-	-	-	-	+	-	-	-
APC PR SULF	+	Pigmentada	-	-	-	+	-	+	+	-	+
APC SG SULF	+	Pigmentada	-	-	-	+	-	+	+	-	-
APF SG SULF	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	-	-	-
APF PR1 SULF	-	Incolor	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB G1 ISOX	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AB PR2 ISOX	+	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	+	-	+
AB PR1 ISOX	+	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	-	-	-
APF SG3 ISOX	+	Pigmentada	+	+	+	-	+	+	+	-	+/-
APF SG1 ISOX	+	Pigmentada	+	-	-	+	+	+	-	-	+
APF PR2 ISOX	+	Pigmentada	-	+	-	-	-	-	-	-	+
APF SG4 ISOX	+	Pigmentada	+	+	-	-	+	+	-	-	-
APF G3 ISOX	+	Pigmentada	+	+	-	-	-	-	+	-	+
APF PR1 ISOX	+	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	-	-	-
APF G2 ISOX	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	+	-	-	-
APF G1 ISOX	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	+	-	-	-
ACO PR1 ISOX	+	Pigmentada	+	+	+	-	+	+	+	-	+

**Quadro 1.** *Continuação:* Aspectos morfo-bioquímicos dos microrganismos isolados....

Microrganismo	Gram	Cor	Motilidade	Endosporos	Fenoxidase	Ligninase	Urease	Celulase	Catalase	Oxidase	Citrato
ACO PR2a ISOX	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	-	-	-
ACO PR2 ISOX	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	+	-	+
ACO SG3 ISOX	-	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	-	-	+
ACO G2b ISOX	-	Incolor	+	-	-	+	-	+	-	-	-
ACO G2a ISOX	+	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	-	-	+
AB SG1a DIU	+	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	+
AB PR3a DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	+	-	+
AB SG2a DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB G1a DIU	+	Pigmentada	-	+	-	-	-	+	-	-	+
AB G2a DIU	-	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	-	-	+
APF PR1a DIU	+	Incolor	+	+	-	-	-	+	-	-	-
APF SG1a DIU	-	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	-	-	+
APF G2a Diu	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
APF G1a DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ACO G1a DIU	+	Pigmentada	+	+	+	+	-	+	+	-	+/-
ACO PR3a DIU	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
ACO SG3 DIU	+	Incolor	-	-	-	-	+	+	-	-	+
ACO G2 DIU	+	Pigmentada	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ACO PR1a DIU	+	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	+	-	-
ACO G1 DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	+	-	-
ACO PR2ab diu	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	-	+	-	-
ACO PR2 a DIU	+	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	-	-	-
ACO PR2	-	Pigmentada	-	-	-	-	-	+	-	-	+
ACO SG2 DIU	-	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	-	-	+
ACO PR1 DIU	-	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	+	-	+

NR = Não realizado

**Quadro 1. Continuação:** Aspectos morfo-bioquímicos dos microrganismos isolados....

Microrganismo	Gram	Cor	Motilidade	Endosporos	Fenoxidase	Ligninase	Urease	Celulase	Catalase	Oxidase	Citrato
APC PR1a DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	+	-	+
APC G1a DIU	-	Incolor	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	+
APC PR2a DIU	-	Incolor	+	-	NR	NR	NR	NR	-	-	+
APC SG1a DIU	-	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	+	-	-
APC G2a DIU	+	Pigmentada	-	-	-	+	+	+	+	-	-
CORY SG2	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	-	-
CORY SGA2	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	-	+
CORY G2	+	Pigmentada	+	+	NR	NR	NR	NR	-	+	+
CORY SGA3	-	Incolor	-	-	-	-	+	+	+	-	-
CORY PR1	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	+	+
CORY SGA1	+	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
CORY G1	+	Pigmentada	-	+	-	-	+	+	+	-	+
CORY SG1	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	-	-
CORY PRA1	-	Pigmentada	+	-	NR	NR	NR	NR	+	-	+
PAFLU G2	+	Pigmentada	+	-	-	-	-	+	+	-	-
PAFLU PR1	+	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
PAFLU G3	-	Pigmentada	+	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
PAFLU SG1	-	Incolor	+	-	NR	NR	NR	NR	+	+	-
PAFLU SGA3	+	Pigmentada	+	+	-	-	+	+	+	-	-
PAFLU PR2	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
PAFLU PRA1	-	Pigmentada	+	-	-	-	+	+	+	-	+
PAFLU PRA2	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
PAFLU SG4	-	Pigmentada	-	-	-	-	+	+	+	-	+
PAFLU SGA2	-	Incolor	-	-	-	-	+	-	+	-	+
PAFLU SG2	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	+

NR = Não realizado

**Quadro 1.** *Continuação:* Aspectos morfo-bioquímicos dos microrganismos isolados....

Microrganismo	Gram	Cor	Motilidade	Endosporos	Fenoxidase	Ligninase	Urease	Celulase	Catalase	Oxidase	Citrato
PAFLU SGA4	-	Incolor	-	-	-	-	+	+	+	-	-
PAPIO SGA1	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	+	-
PAPIO PR1	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	+	+	-
PAPIO SGA2	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	+	+	-
PAPIO PRA1	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
<b>PAPIO G2</b>	<b>-</b>	<b>Pigmentada</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+/-</b>
PAPIO PR2	-	Pigmentada	+	-	-	-	-	-	+	-	-
PAPIO SG2	-	Pigmentada	-	-	-	+	+	+	+	-	-
PAPIO PR2	-	Incolor	-	-	NR	NR	NR	NR	+	+	+
PAPIO G1	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
BDA PR2	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
BDA SG1	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	+	+	-
BDA SGA2	+	Incolor	-	+	NR	NR	NR	NR	+	-	-
BDA SG2	-	Pigmentada	+	-	NR	NR	NR	NR	+	+	-
BDA SGA1	+	Pigmentada	+	+	NR	NR	NR	NR	+	-	+
BDA G2	+	Pigmentada	+	+	NR	NR	NR	NR	+	-	-
BDA PR1	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	+	-	-
BDA G1	+	Incolor	-	+	NR	NR	NR	NR	+	-	+
ACO SG1 ISOX	-	Pigmentada	-	-	NR	NR	NR	NR	-	-	-
ACO PR2 ISOX	+	Pigmentada	-	+	NR	NR	NR	NR	-	-	-
ACO SG2 ISOX	-	Incolor	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NR = Não realizado