

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DE  
TEBUCONAZOLE POR ISOLADOS MICROBIANOS DE SOLOS  
CONTAMINADOS E DE AMBIENTES AMAZÔNICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NICOLE TEIXEIRA SEHNEM

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL  
MARÇO - 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DE  
TEBUCONAZOLE POR ISOLADOS MICROBIANOS DE SOLOS  
CONTAMINADOS E DE AMBIENTES AMAZÔNICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

NICOLE TEIXEIRA SEHNEM

(Bióloga – Universidade de Caxias do Sul)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia  
Agrícola e do Ambiente como requisito para a obtenção do Grau de Mestre em  
Microbiologia Agrícola e do Ambiente

PORTO ALEGRE, RS, BRASIL  
MARÇO – 2009

Catálogo na Publicação  
UFRGS/ICBS/Biblioteca Setorial

S456a Sehnem, Nicole Teixeira

Avaliação da capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes Amazônicos / Nicole Teixeira Sehnem. – 2009.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente. Porto Alegre, BR-RS, 2009.

Orientação: Prof. Marco Antônio Záchia Ayub

1. Tebuconazole 2. Fungicidas 3. Biodegradação 4. Microbiologia do solo 5. Microbiologia ambiental I. Ayub, Marco Antônio Záchia, orient. II. Título.

CDU 579.64(043)

## **AGRADECIMENTOS**

Ao CNPq, Capes, Pró-reitoria de Pós Graduação e Pró-reitoria de Pesquisa pelo auxílio financeiro.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos pela disponibilização de infra-estrutura.

À COTRIROSA pela disponibilização de material de coleta.

Ao Centro de Combustíveis e Central Analítica, pela disponibilidade do uso do cromatógrafo.

Ao meu orientador, Prof. Marco Antônio Záchia Ayub, pela acolhida e pela excelente orientação.

À minha co-orientadora, Priscila Brasil de Souza Cruz, pelo acompanhamento integral na execução desse trabalho e pela excelente orientação.

À professora Maria do Carmo Ruaro Peralba, pela disponibilização dos cromatógrafos e auxílio indispensável nas análises cromatográficas.

Às acadêmicas Ana Carolina Melo e Renata Criveletto.

A todos os colegas do Bioteclab, pela amizade e companhia.

Ao professor Aldo José Pinheiro Dillon, meu orientador no período de graduação, por despertar em mim a paixão pela pesquisa.

### **Em especial:**

À acadêmica de Biologia Janira Prichula, pelo apoio indispensável durante todo o período do mestrado.

À amiga Graziela Brush Brinques, pelo grande auxílio na fase analítica, e também nas correções da dissertação.

Às amigas Adriana, Fabiana, Ana Paula e Taís.

A pessoas muito especiais, meu irmão Jéferson, meu pai Hélio, minha prima Scheila, e Dinahel, pelo incentivo, compreensão e apoio.

Ao meu namorado, Cesar, pelo amor, carinho, compreensão e paciência.

À minha mãe, Marilene, por ter sido minha melhor amiga, minha maior incentivadora, e grande exemplo de luta, força e coragem.

# **Avaliação da capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes Amazônicos.<sup>1</sup>**

**Autor:** Nicole Teixeira Sehnem

**Orientador:** Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

## **RESUMO**

A utilização de fungicidas na agricultura para controle de pragas pode causar grandes impactos ambientais e as suas ações podem alterar quantitativa e qualitativamente a microbiota de solos expostos. O tebuconazole é um fungicida sistêmico do grupo dos triazóis que inibe o passo de desmetilação do carbono 14 do 24-metilenodihidrolanosterol, na biossíntese do ergosterol. Atualmente, as lavouras recebem repetidas aplicações deste em uma mesma cultura, propiciando o aparecimento de espécies resistentes à sua ação. Através do isolamento dos microrganismos encontrados em solos contaminados pode-se encontrar espécies resistentes e capazes de degradar este xenobiótico. O objetivo desse trabalho foi isolar, selecionar e avaliar a capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes Amazônicos. Os microrganismos foram isolados a partir de técnicas de isolamento utilizando diferentes soluções. As bactérias isoladas foram submetidas a experimentos de seleção e biodegradação realizados em biorreatores e tolerância em agitador horizontal. Os fungos isolados foram submetidos a esta mesma avaliação, porém em cultivos estáticos. Os fungos isolados mostraram ser resistentes a 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole, no entanto não foram capazes de degradá-lo. As bactérias selecionadas que apresentaram capacidade de degradar até 51% deste fungicida e tolerância de até 1 g.L<sup>-1</sup> foram identificadas como *Enterobacter sakazakii* e *Serratia marcescens*. Estas cepas apresentaram características interessantes para uma potencial utilização destas em remediação ambiental. Também foram testadas várias cepas de fungos recentemente isoladas dos ambientes Amazônicos, mas os mesmos não demonstraram qualquer tipo de resistência ou capacidade biodegradadora deste fungicida.

1. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (89 p.). Março, 2009.

# Evaluation of Tebuconazole degradation by microbial isolates from contaminated soil and from Amazon environments

**Author:** Nicole Teixeira Sehnem

**Supervisor:** Prof. Dr. Marco Antônio Záchia Ayub

## ABSTRACT

The use of fungicides in agriculture for the control of diseases can cause great environmental impacts and their actions can quantitatively and qualitatively modify microbial systems of exposed soils. Tebuconazole is a systemic fungicide of the group of the triazol that inhibits the sterol C-14  $\alpha$ -demethylation of 24-methylenedihydrolanosterol, a precursor of the cell membrane component ergosterol in fungi. Currently, crops receive repeated applications of these chemicals, inducing the appearance of resistant strains of bacteria and fungi. Through the isolation of microorganisms found in these soils, resistant species can be found that could be capable of degrading these xenobiotics. Thus, the objective of this work was to isolate microorganisms from contaminated soil and to evaluate the biodegradation of tebuconazole by them, as well as to test some recently isolated fungi strains from Amazon environment for this same purpose. Microorganisms were isolated by different methods of sampling soil. Screening of bacteria was performed on bioreactors, while tolerance to tebuconazole assays were performed on shaker. Screening of fungi was performed in static cultures. Some fungi were capable of growing in concentrations of 100 mg.L<sup>-1</sup> of tebuconazole, but proved unable to degrade this xenobiotic. Screening of bacteria resulted in some isolated capable of degrading up to 51% of the initial concentration of tebuconazole and were capable to tolerate up to 1 g.L<sup>-1</sup>. These strains were identified by biochemical standard procedures as being *Enterobacter sakazakii* and *Serratia marcescens* species. These bacteria present some important characteristics for potential use on environmental bioremediation. Microorganisms isolated from Amazon did not show any resistances or biodegradation capabilities towards tebuconazole.

1. Master of Science Dissertation in Agricultural and Environmental Microbiology, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (89 p.). March, 2009.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	iii
ABSTRACT .....	iv
LISTA DE FIGURAS .....	vii
LISTA DE TABELAS .....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
LISTA DE ABREVIATURAS .....	x
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. Defensivos agrícolas e mercado comercial .....	3
2.2. Impacto ambiental e biodegradação de pesticidas .....	4
2.3. Fungicidas do grupo dos triazóis .....	7
2.3.1. Tebuconazole .....	8
2.4. Impactos ambientais causados pelo tebuconazole .....	9
2.5. Degradação do tebuconazole .....	10
2.6. Resistência a inibidores da desmetilação .....	11
2.7. Biodegradação do tebuconazole .....	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	15
3.1. Coleta de solo para isolamento de microrganismos e análise físico-química ..	15
3.2. Tebuconazole .....	16
3.3. Meios de cultivo .....	16
3.4. Dispersão e extração de microrganismos do solo .....	17
3.5. Isolamento dos microrganismos extraídos do solo .....	18
3.6. Caracterização das cepas microbianas .....	18
3.7. Manutenção das cepas microbianas .....	19
3.8. Avaliação da resistência e capacidade degradadora de tebuconazole por fungos .....	19
3.9. Seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso .....	21
3.10. Identificação de microrganismos a partir de testes bioquímicos manuais ....	22
3.11. Identificação de microrganismos a partir de testes bioquímicos semi- automatizados .....	25
3.12. Biodegradação do tebuconazole a partir das bactérias selecionadas .....	26

3.13.	Avaliação da degradação de tebuconazole por fatores abióticos .....	27
3.14.	Avaliação da adsorção de tebuconazole às células estudadas .....	27
3.15.	Otimização das condições de cultivo para biodegradação de tebuconazole	28
3.16.	Determinação da tolerância do consórcio bacteriano a diferentes concentrações de tebuconazole .....	29
3.17.	Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
4.1.	Avaliação da eficiência dos métodos de extração de microrganismos do solo. .....	33
4.2.	Isolamento de cepas microbianas .....	35
4.3.	Caracterização dos microrganismos extraídos do solo .....	37
4.4.	Avaliação da resistência e capacidade degradadora de tebuconazole por fungos .....	38
4.5.	Análises cromatográficas .....	43
4.6.	Seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole .....	47
4.7.	Identificação de microrganismos selecionados .....	57
4.8.	Biodegradação do tebuconazole a partir das bactérias selecionadas .....	60
4.9.	Avaliação da adsorção das células inativadas ao tebuconazole .....	67
4.10.	Determinação da tolerância do consórcio bacteriano a diferentes concentrações de tebuconazole .....	68
4.11.	Avaliação de diferentes condições de cultivo para biodegradação de tebuconazole .....	69
5.	CONCLUSÕES .....	76
6.	PERSPECTIVAS .....	78
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	79
	APÊNDICE 1 .....	86
	APÊNDICE 2 .....	87



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do tebuconazole. ....	8
Figura 2. Cromatograma da solução padrão do tebuconazole puro e comercial com concentração de 50 mg.L <sup>-1</sup> . ....	44
Figura 3. Curva padrão de soluções de Tebuconazole comercial com concentrações entre 10 mg.L <sup>-1</sup> e 50 mg.L <sup>-1</sup> . ....	45
Figura 4. Cromatograma do meio de cultura controle contendo Tebuconazole comercial na concentração de 50 mg.L <sup>-1</sup> . ....	46
Figura 5. Análise cromatográfica de uma amostra de cultivo de microrganismos contendo Tebuconazole comercial na concentração de 50 mg.L <sup>-1</sup> . ....	47
Figura 6. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 1-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	49
Figura 7. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 1-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	50
Figura 8. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	51
Figura 9. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	52
Figura 10. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-3 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	53
Figura 11. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	54
Figura 12. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	55
Figura 13. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-3 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. ....	56

Figura 14. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 2-2.....	61
Figura 15. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 2-3.....	63
Figura 16. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 3-2.....	64
Figura 17. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em consórcio bacteriano contendo 11 isolados provenientes de solos contaminados. ....	66
Figura 18. Perfil do consumo de glicose do consórcio bacteriano composto pelas cepas TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04, proveniente do Grupo 2-2, em meio LB modificado com diferentes concentrações de tebuconazole. ....	69
Figura 19. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo 1 g.L <sup>-1</sup> de glicose a 30°C do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. ....	71
Figura 20. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo 10 g.L <sup>-1</sup> de glicose a 30°C do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. ....	72
Figura 21. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo 1 g.L <sup>-1</sup> de glicose a 37°C do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. ....	73
Figura 22. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo 10 g.L <sup>-1</sup> de glicose a 37°C do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. ....	74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Histórico de aplicação dos pesticidas nas lavouras de soja das propriedades visitadas, onde as amostras de solos foram coletadas. ....	15
Tabela 2. Descrição das atividades metabólicas bacterianas avaliada em cada meio de cultivo. ....	24
Tabela 3. Quantidade de unidades formadoras de colônias por grama de solo, obtidas após os diferentes tratamentos aplicados para extração dos microrganismos do solo. ....	34
Tabela 4. Avaliação da variedade de isolados obtidos a partir das técnicas de extração de microrganismos do solo das 3 diferentes propriedades. ....	36
Tabela 5. Frequência da morfologia celular das cepas isoladas ao microscópio ótico utilizando a coloração de Gram. ....	38
Tabela 6. Crescimento de isolados fúngicos isolados de solos contaminados (mm.dia <sup>-1</sup> ) em meio sólido com (AMNT) e sem presença (AMN) de tebuconazole, e procedência do tipo de solo. ....	40
Tabela 7. Crescimento de isolados fúngicos provenientes da floresta Amazônica (mm.dia <sup>-1</sup> ) em meio sólido com (AMNT) e sem presença (AMN) de tebuconazole. ....	41
Tabela 8. Cepas isoladas a partir de experimentos de biodegradação. ....	57
Tabela 9. Resultado de 18 testes bioquímicos manuais aplicados a onze diferentes isolados provenientes de seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole em cultura líquida. ....	58
Tabela 10. Identificação em nível de espécie de isolados bacterianos provenientes de solos contaminados com Tebuconazole. ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABD	Meio ágar batata dextrose
AEM	Meio ágar extrato de malte
ALB	Meio Luria-Bertani adicionado de ágar
AMN	Meio Merlin-Norkrans adicionado de ágar
AMNT	Meio Merlin-Norkrans adicionado de ágar e tebuconazole
AN	Meio ágar nutriente
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
DBO <sub>5</sub>	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DNS	Ácido dinitrosalicílico
DO	Densidade ótica
LB	Meio Luria-Bertani
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MM	Meio mineral
MMT	Meio mineral adicionado de tebuconazole
MN	Meio Merlin-Norkrans
MNT	Meio Merlin-Norkrans adicionado de tebuconazole
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultravioleta
<i>g</i>	Aceleração da gravidade

## 1. INTRODUÇÃO

A produção, comercialização e o uso mundial de pesticidas aumentam a cada ano. Embora mudanças surjam conforme as necessidades do mercado, como as culturas transgênicas, o uso de pesticidas é destacado porque a maioria destas inovações não impede a proliferação de ervas daninhas, fungos e outras fitopatologias no campo. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, considerando-se o uso agrícola, doméstico e em campanhas de saúde pública.

Grandes quantidades de defensivos agrícolas são utilizadas, especialmente em lavouras de soja, arroz, milho e trigo. Dentre estes pesticidas, o tebuconazole (1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3- (1H-1,2,4-triazol-1-il-metil)-pentano-3-ol)), um fungicida sistêmico do grupo químico do triazol, é um xenobiótico bastante utilizado nos sistemas agrícolas no controle de fungos que atacam as lavouras de cebola, batata, cevada, feijão, maçã, uva e mais recentemente, em lavouras de soja, especialmente após o início da utilização de soja geneticamente modificada e resistente ao glifosato, mais suscetível ao ataque de fungos. Os fungicidas do grupo triazol inibem o passo de desmetilação do carbono 14 do 24-metilenodihidrolanosterol na biossíntese de

ergosterol e são utilizados em muitas culturas para controle de doenças causadas por fungos.

Nas indústrias produtoras de tebuconazole, o efluente gerado apresenta alta toxicidade aos organismos aquáticos, impedindo que o mesmo seja degradado em estações de tratamento de efluentes, surgindo, a partir desse problema, a necessidade de encontrar alternativas para a biodegradação desse fungicida. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos relacionando o efeito das aplicações do tebuconazole em alimentos e sua biodegradação no solo, no entanto, não há bibliografias que cite as suas degradações em água. O presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes Amazônicos. Os objetivos específicos foram isolar microrganismos de solos expostos ao triazóis, selecionar os competentes para degradação de tebuconazole e identificá-los em nível de espécie, avaliar a tolerância desses ao xenobiótico e definir quais as condições de cultivo favoráveis para degradação. Outro objetivo foi avaliar isolados fúngicos provenientes da Floresta Amazônica em degradar tebuconazole.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Defensivos agrícolas e mercado comercial**

A produção, comercialização e o uso mundial de pesticidas crescem a cada ano. O Brasil é um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo e segundo os dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG) houve aumento de 31 % da venda de pesticidas no período de janeiro a outubro entre os anos de 2007 e 2008. Nos primeiros 10 meses de 2008, o valor comercializado de pesticidas foi cerca de 10,25 bilhões de reais. A comercialização de fungicidas correspondeu neste período a 30 % do mercado de defensivos agrícolas o que correspondeu a 2,2 bilhões de reais. O crescimento neste período para esse subgrupo foi de 26 % (SINDAG, 2009).

Os agrotóxicos são definidos de acordo com a Lei Federal nº 7082 de 11 de julho de 1989 (Artigo 2º, Inciso I), como produtos e agentes dos processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também 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 substâncias e

produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (Brasil, 1998).

Os pesticidas podem ser classificados quanto à sua ação, a princípio ativo e persistência. Quanto à ação, podem ser divididos em herbicidas, inseticidas, fungicidas, bactericidas, nematicidas, rodenticidas, moluscicidas, entre outros. As classes de pesticidas mais conhecidas são os organoclorados, organofosforados, carbamatos, dicarbamatos, triazinas, hidrocarbonetos clorados, triazóis, piretróides. Dentre estes, destacam-se os fungicidas do grupo dos triazóis.

## **2.2. Impacto ambiental e biodegradação de pesticidas**

O impacto dos pesticidas sobre o meio ambiente é um assunto polêmico e amplamente debatido por toda a sociedade e comunidade científica. Seus impactos sobre a microbiota do solo e os processos biológicos são dificilmente determinados com precisão, devido à natureza, heterogeneidade, dinâmica e respostas adaptativas da comunidade microbiana. Os efeitos negativos dos pesticidas devem ser avaliados por indicadores específicos, como a taxa de mineralização, nitrificação e atividade enzimática, considerando sua magnitude, duração e persistência (FORTES NETO et al., 2007).

Quando aplicados nos solos, fungicidas do grupo dos triazóis causam alterações na microbiota, prejudicando a ciclagem de nutrientes. Em um estudo recente foi avaliado o impacto que aplicações de placrobutazol em



solos, com histórico de 3 anos de aplicação do pesticida e sem histórico de aplicação, causavam sobre as atividades metabólicas dos microrganismos indígenas. Em ambos os solos, foi observado que este fungicida alterou negativamente a respiração microbiana e a degradação de celulose. (GONÇALVES, et al., 2009). Munier-Lamy & Borde (2000) avaliaram se o triazol flutriafol influenciava na atividade celulolítica dos microrganismos oriundos de um solo sem histórico de aplicação desse xenobiótico e observaram que ocorreram mudanças na microflora do solo que resultaram na diminuição da população de fungos saprofíticos, e por consequência, na diminuição da atividade celulolítica, que é um fator importante para a ciclagem de nutrientes do solo.

Quando os pesticidas são inseridos no solo para manejo na agricultura, vários processos físicos e químicos determinam o comportamento de seus resíduos no ambiente, refletindo na persistência do composto. Características do solo como temperatura, umidade, composição de matéria orgânica, profundidade, aeração, pH, adsorção/dessorção e composição de minerais; as características químicas do xenobiótico e presença de outros pesticidas são fundamentais para determinação do grau de persistência (SILVA & FAY, 1997). O comportamento de alguns pesticidas pode ser alterado de acordo com o ambiente em que estão inseridos, como ocorre em fontes aquíferas localizadas sob o solo usado para cultivo, que são mais susceptíveis à contaminação, devido a altas concentrações de pesticidas aplicados (DAMS, 2006). Segundo Kamrin (2000) a maioria dos fungicidas do grupo dos triazóis é mais estável em água do que em solo, e este fenômeno pode ser observado

quando em águas superficiais foram encontrados resíduos dos fungicidas triadimefon e flusidasole, após 28 semanas e dois anos de monitoramento, respectivamente. Já em solos que sofreram aplicação de fungicidas triazólicos apenas 19% da concentração inicial de tebuconazole foi detectada após 71 dias de estudo (POTTER et al., 2005).

A transformação ou degradação dos pesticidas no solo ocorrem em função de várias reações bióticas e abióticas que compreendem: reações primárias (oxidação, redução, hidrólise) e secundárias (conjugações e reações com constituintes do solo). O pesticida ideal é aquele que ao ser aplicado cumpra seu objetivo e seja degradado rapidamente a compostos secundários ou mineralizado formando CO<sub>2</sub>, água, produtos orgânicos e inorgânicos mais simples. Uma ampla faixa de microrganismos é capaz de utilizar pesticidas como substratos para crescimento, promovendo sua decomposição no solo. Outro tipo de transformação, chamada co-metabolismo, ocorre com alterações na molécula sem que esta seja utilizada como fonte de energia pelos microrganismos, que não têm suas populações aumentadas, os quais utilizam uma segunda fonte de energia para crescimento. Geralmente ocorre degradação incompleta da molécula com produção de metabólitos, por reações como hidrólise, substituição ou oxidação. Esses metabólitos podem ser degradados por outros microrganismos ou se acumulam no ambiente. A desativação de um determinado produto tóxico no solo pode consistir de uma simples reação, que causa a sua desintoxicação, a uma seqüência de transformações, envolvendo mecanismos diversos, que promovem sua degradação ou mineralização completa (FORTES NETO et al., 2007).

### 2.3. Fungicidas do grupo dos triazóis

Os fungicidas do grupo químico dos triazóis são comumente utilizados para o controle de fungos fitopatogênicos (ROBBERTSE et al., 2001), reguladores de crescimento em vegetais (SILVA et al., 2003), e também como preservantes de madeira (OBANDA et al., 2008). Uma grande variedade de fungicidas desse grupo químico é utilizada atualmente, como triadimenol, miclobutanil, propiconazole, epoxiconazole, penconazole, flusidasole, fenebuconazole, hexaconazole, tetraconazole e tebuconazole.

Os fungicidas do grupo triazol inibem o passo de desmetilação do carbono 14 do 24-metilenodihidrolanosterol, que é precursor do ergosterol, importante componente da membrana celular fúngica (MA et al., 2006; GARLAND et al., 2004; ROBBERTSE et al., 2001). Esse passo importante é mediado pelas enzimas citocromo P-450 esterol 14 $\alpha$ -desmetilase (P-450<sub>14DM</sub>) (DELYE et al., 1997; AKALLAL et al., 1998) e citocromo P-450 lanosterol desmetilase (PEREA et al., 2001). Esses compostos também são conhecidos como inibidores da desmetilação e foram introduzidos para manejo de doenças de plantas em torno de 1970 (MA et al., 2006).

Esses fungicidas são mais utilizados em culturas de banana, batata, cebola, cevada, feijão, maçã, soja, tomate e trigo. Além de serem utilizados como único fungicida durante o período de crescimento das culturas, também são aplicados em combinação com fungicidas de outros grupos químicos, para aumentar a eficiência dos tratamentos (FULLERTON et al., 1995).

### 2.3.1. Tebuconazole

O tebuconazole (RS)-1-p-clorofenil-4,4-dimetil-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ilmetil) pentan-3-ol (Figura 1) é um fungicida de ação sistêmica do grupo químico triazol, possuindo peso molecular de 307 (CALZA et al., 2002), é recomendado para o controle de doenças fúngicas. É um composto estável, resistente à hidrólise na faixa de pH de 4 a 9, e é compatível com o uso de inseticidas (OBANDA et al., 2008).

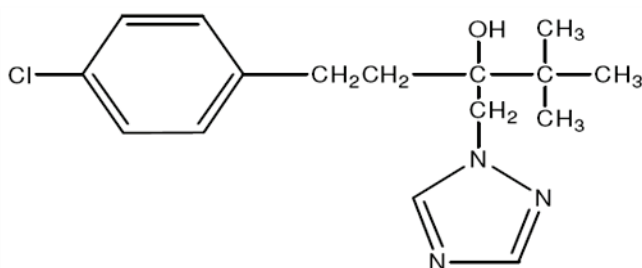


Figura 1. Estrutura molecular do tebuconazole. Fonte: Obanda, 2008.

O tebuconazole inibe 100% do crescimento micelial de *Beauveria bassiana*, fitopatógeno para videiras, na concentração de 0,42 mg.mL<sup>-1</sup>. A alta toxicidade de tebuconazole a esse fungo pode ser atribuída à alta potência desse fungicida e também ao seu amplo espectro de ação (MOURÃO et al. 2003). Em outro estudo, o tebuconazole aplicado na concentração indicada para campo (75 mL para cada 100 L de água), inibiu completamente o crescimento de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Verticillium lecanii*, sendo considerado muito tóxico para estes fungos estudados (LOUREIRO et al. 2002).

#### **2.4. Impactos ambientais causados pelo tebuconazole**

O uso de pesticidas pode causar impactos diretos e indiretos; locais, regionais e/ou globais; imediatos, de médio ou longo prazo; temporários, cíclicos ou permanentes; reversíveis ou irreversíveis. Em áreas agrícolas, os impactos podem ainda ser de fonte difusa, causados pela contaminação proveniente da aplicação regular, ou pontual, quando ocorre descarga (acidental ou não) durante o transporte e manuseio dos pesticidas. Os impactos podem ocorrer nos meios: físico-químico (abiótico), biótico e socioeconômico, portanto a avaliação de impactos ambientais deve contemplar, sempre que possível, os aspectos ecológicos, sociais e econômicos mantendo estreita relação com o conceito de sustentabilidade agrícola (SPADOTTO, 2002).

Os impactos, na dimensão ecológica, podem ser classificados segundo o compartimento afetado: água, solo, planta e atmosfera. Os impactos provocados pelo uso do tebuconazole podem ainda ser intrínsecos e extrínsecos. Como exemplo de impacto intrínseco negativo de pesticidas, pode ser citado o problema dos resíduos de tebuconazole no solo e em culturas no qual ele é aplicado. Garland et al. (2004) observaram que o óleo essencial de *Boronia megastigma*, utilizado na indústria de alimentos e de cosméticos, apresentou resíduo de tebuconazole 250 vezes mais concentrado que a quantidade de resíduo encontrada na flor. Quanto ao impacto extrínseco, pode ser citado como exemplo, a contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelo carreamento através da chuva e adsorção do tebuconazole pelas partículas de sedimentos presentes no meio aquático. Hussar et al. (2004)

verificaram que concentrações de  $3,88 \text{ mg.L}^{-1}$  de tebuconazole causam 100% de mortalidade em alevinos de *Piaractus mesopotamicus* em dois dias de exposição ao xenobiótico. Com essa mesma concentração, observa-se mortalidade de 80% de juvenis com 80 horas de exposição ao tebuconazole. Em alevinos de *Tilapia rendalli*, essa concentração causou mortalidade de 40% de alevinos em 6 dias de exposição, não causando mortalidade em juvenis. Para essa espécie, a mortalidade de 100% ocorreu quando expostos à concentração de  $7,75 \text{ mg.L}^{-1}$ . Sancho et al. (2009) observaram que a exposição de *Daphnia magna* ao tebuconazole pelo período de 48 horas na concentração de  $40,1 \text{ mg.L}^{-1}$  influencia na alimentação deste microcrustáceo e também nas funções metabólicas, resultando em alterações de componentes bioquímicos como a composição de lipídios e proteínas. Em estudos aplicados em ratos, foi observado que tebuconazole, quando aplicado em concentrações de até  $60 \text{ mg.kg.dia}^{-1}$ , desde o início da vida desse mamífero, causa danos no hipocampo cerebral, prejudicando assim o desenvolvimento do aprendizado (MOSER et al., 2001). Resultado semelhante foi obtido por Tully et al. (2006), também em ratos, submetidos a fluconazole, miclobutanil, propiconazole e triadimefon, que influenciaram na atuação da enzima citocromo P450, afetando a expressão de genes que estão envolvidos no metabolismo de hormônios.

## **2.5. Degradação do tebuconazole**

Os mecanismos e a velocidade de degradação de uma substância variam de acordo com o ambiente. Se um pesticida é aplicado no solo, a degradação por microrganismos presentes neste solo é um fator importante,

mas se a mesma substância é liberada diretamente em um corpo d'água, a hidrólise torna-se a via mais importante. Condições climáticas, incluindo pH, composição do solo e luz solar, podem contribuir para a degradação de um xenobiótico (BOXALL et al. 2004).

Atualmente, existem poucos estudos a respeito da degradação do tebuconazole, publicados em revistas científicas. A degradação fotoquímica deste xenobiótico presente em efluentes aquosos, através do processo foto-Fenton (UV/Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em reatores, foi eficaz (TEIXEIRA et al. 2005). Esta metodologia reduziu a demanda química de oxigênio em 89% após 180 minutos e carbono orgânico dissolvido em 86% após 60 minutos de reação. Ocorreu também o aumento de níveis de DBO<sub>5</sub>, o que indica a possibilidade de um passo preliminar para tratamentos biológicos convencionais para o tebuconazole.

## **2.6. Resistência a inibidores da desmetilação**

A inserção do tebuconazole ao meio ambiente causa como consequência a seleção natural de organismos resistentes a esse xenobiótico. Os mecanismos de resistência a inibidores da desmetilação são conhecidos em algumas espécies de fungos, porém não há relatos desses em bactérias, já que as mesmas não possuem ergosterol em sua membrana celular. Contudo, também não foram encontradas referências que avaliaram outros possíveis mecanismos de resistência que poderiam existir em procariotos.

Hatvani et al. (2006) relataram que, em linhagens de *Trichoderma harzianum* e *T. atroviride*, o tebuconazole apresentou forte efeito inibitório, com concentração inibitória mínima de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em um período de crescimento de 3 a 5 dias. Em linhagens do gênero *Trichoderma*, a fusão de protoplastos é eficiente para melhoramento de resistência ao tebuconazole.

Já Akallal et al. (1998) obtiveram mutantes resistentes ao tebuconazole com técnica de mutagênese por radiação ultravioleta e posterior seleção em meio de cultivo contendo tebuconazole a  $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$  em *Nectria haematococca*. Três genes de resistência ao tebuconazole foram claramente identificados em *N. haematococca*, denominados Teb 1, Teb 2 e Teb 3.

Robbertse et al. (2001) avaliaram a resistência de *Rhynchosporium secalis* ao tebuconazole em culturas de cevada. Em isolados que foram expostos ao tebuconazole por um ano, foi observada uma concentração mínima inibitória (CMI) em torno de  $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em culturas tratadas com tebuconazole por seis anos consecutivos, os isolados apresentaram CMI de 3,72 e  $4,96 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , em duas diferentes áreas. No isolado que nunca foi exposto ao xenobiótico, a CMI foi de  $0,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Em *Candida albicans*, são realizados muitos estudos para avaliar os mecanismos de resistência aos triazóis. Alguns mecanismos moleculares já foram observados em cepas resistentes (HOF, 2001), como alterações na membrana plasmática para diminuição da entrada do fungicida na célula; modificação e degradação do composto após a entrada na célula; alterações na produção de enzimas que atuam na biossíntese de ergosterol e alterações



nos transportadores de moléculas (WHITE et al., 1998). Perea et al. (2001) avaliaram os mecanismos moleculares responsáveis pela resistência a triazóis em *Candida albicans*. Os autores verificaram que a resistência de *C. albicans* é resultado da combinação de diferentes mecanismos como a superexpressão de transportadores ABC que são codificados pelos genes CDR e mutações no gene ERG11 que codifica a P-450 lanosterol 14  $\alpha$ -desmetilase.

Délye et al. (1997) estudaram a resistência do fungo *Uncinula necator* a triadimenol. De 91 isolados, 19 resistentes foram selecionados para investigar a mutação no gene P-450<sub>14DM</sub>. Foi observado que 16 isolados apresentaram uma mutação no gene codificador da enzima P-450<sub>14DM</sub>, que correspondia à substituição de um resíduo de tirosina por um resíduo de fenilalanina na posição 136.

O fungo fitopatogênico *Blumeriella jaapi*, maior causador de doenças foliares em cultura de cerejas, possui resistência ao fembuconazole. A superexpressão do gene CYP51 aumentou a resistência de *B. jaapi* 12 vezes em comparação com cepas sensíveis (MA et al., 2006).

## **2.7. Biodegradação do tebuconazole**

Embora o tebuconazole seja um fungicida muito utilizado na agricultura, pouco se sabe sobre a capacidade de microrganismos transformá-lo em outras moléculas ou de mineralizá-lo. Obanda et al. (2008), realizaram um estudo que, conforme pesquisas bibliográficas, é o único trabalho publicado em revistas científicas sobre a biodegradação deste fungicida até o presente

momento. Os autores utilizaram para os estudos de biodegradação uma cepa de *Trichoderma harzianum*, que foi isolada a partir de madeiras tratadas com tebuconazole para conservação. Esse isolado que era resistente ao xenobiótico também foi capaz de degradar 68% de tebuconazole (concentração inicial de 20 mg.L<sup>-1</sup>) após 21 dias de cultivo submerso realizado em incubadora com agitação na temperatura de 25°C. A degradação do tebuconazole foi iniciada aos 6 dias de cultivo e apresentou maior taxa de degradação entre 9 e 12 dias. É importante ressaltar que *T. harzianum* apresentou capacidade de degradar tebuconazole em meio de cultura suplementado com 10 g.L<sup>-1</sup> de glicose, sugerindo que esse fungo possa utilizar o mecanismo de co-metabolismo para a degradação do xenobiótico.

Em sua tese de doutorado, Obanda (2008) realizou, além de ensaios de biodegradação de tebuconazole por *T. harzianum*, estudos de biodegradação por uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*, também isolada de madeira conservada com esse fungicida. *P. fluorescens* apresentou degradação de tebuconazole a partir de 6 dias de cultivo, chegando à degradação de 70% do pesticida (concentração inicial de 20 mg.mL<sup>-1</sup>) em 21 dias, com crescimento a 30°C em meio Luria-Bertani.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Coleta de solo para isolamento de microrganismos e análise físico-química

As amostras de solo foram coletadas no município de Santa Rosa (Rio Grande do Sul) em lavouras de três propriedades particulares diferentes, que cultivavam soja. Nestas, utilizavam-se como herbicida o glifosato e como fungicidas, tebuconazole e Ópera® (pyraclostrobin + epoxiconazole).

A Tabela 1 apresenta o histórico de aplicações dos pesticidas utilizados nas lavouras onde as amostras de solo foram coletadas. Atualmente alguns produtores utilizam dois fungicidas concomitantemente, como pode ser observado na propriedade 3. Nesta propriedade, o Ópera® foi aplicado juntamente ao tebuconazole.

Tabela 1. Histórico de aplicação dos pesticidas nas lavouras de soja das propriedades visitadas, onde as amostras de solos foram coletadas.

Solo	Histórico de aplicação	Tempo de aplicação (ano)	Aplicações	Quantidade aplicada (mL.ha <sup>-1</sup> )
1	Glifosato	6	Fev 2007	2000
	Ópera	2	Jan 06/07 e Fev 07	200
2	Glifosato	4	Fev 2007	2000
	Tebuconazole	5	Fev 2006 e 2007	500
3	Glifosato	9	Dez 2006	3000
	Ópera	5	Jan 2006 e 2007	500
	Tebuconazole	5	Março 2007	500

Optou-se por coletar o solo superficial com 10 cm de profundidade e próximo às raízes da soja uma vez que neste tipo de cultura é difícil identificar solo de linha e entrelinha. Uma quantidade de 30 g de cada tipo de solo, coletadas de diferentes pontos de cada área, foram coletadas com colheres estéreis e colocadas em sacos de polipropileno estéreis (15 cm X 20 cm). Estes sacos foram devidamente identificados e acondicionados em uma caixa isopor com gelo, para manter as amostras em baixa temperatura, por um período de 12 horas. Posteriormente, estas amostras foram guardadas em geladeira (ELSAS & SMALLA, 1997).

### **3.2. Tebuconazole**

Foram utilizados em todos os experimentos Tebuconazole Padrão, contendo 99% de pureza, e o composto comercial Orius 250 EC, que caracteriza-se por uma formulação líquida que contém 250 g.L<sup>-1</sup> de tebuconazole. As duas formulações foram gentilmente cedidas pela Milenia Agrociências S/A. As características do composto estão descritas no Apêndice 1.

### **3.3. Meios de cultivo**

A composição de todos meios de cultivo utilizados neste trabalho está descrita no Apêndice 2.

### 3.4. Dispersão e extração de microrganismos do solo

Foram utilizadas várias técnicas para promover a dispersão e extração dos microrganismos do solo, com o objetivo de recuperar uma maior variedade de espécies. Realizaram-se seis técnicas diferentes, combinando a utilização de equipamentos como agitador horizontal (Nova Técnica) e homogeneizador de amostras (Stomacher 400 – Seward) com três soluções de extração, água destilada estéril, água peptonada ( $\text{g.L}^{-1}$ : peptona, 10; NaCl, 5) e tampão fosfato de sódio 50 mM pH 7. Às soluções de extração foram adicionados 10 g de solo.

- a. agitador horizontal X com água destilada estéril,
- b. agitador horizontal X água peptonada,
- c. agitador horizontal X tampão fosfato de sódio,
- d. homogeneizador de amostras X água destilada estéril,
- e. homogeneizador de amostras X água peptonada,
- f. homogeneizador de amostras X tampão fosfato de sódio.

O tempo de extração variou de acordo com o equipamento utilizado. No agitador horizontal as amostras foram agitadas por 60 min a 30 °C e 120 rotações por minuto (rpm), enquanto que no homogeneizador de amostras as amostras permaneceram por 10 min na velocidade média (aparelho sem controle de temperatura – temperatura ambiente 30 °C  $\pm$  2).

A fim de propiciar também o isolamento de fungos filamentosos não esporulantes encontrados no solo, placas de Petri contendo meio Ágar Extrato

de Malte (AEM) com adição de antibiótico (penicilina  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ ) foram levadas a campo, e nestas foram realizadas sementeiras com pequena alíquota de solo diretamente na superfície do meio (MELO & AZEVEDO, 1997).

### **3.5. Isolamento dos microrganismos extraídos do solo**

O isolamento dos microrganismos foi realizado utilizando-se a técnica da diluição seriada a partir do sobrenadante obtido após a aplicação das técnicas de extração. Em placas de Petri contendo meio AEM e AN foram semeados  $100 \mu\text{L}$  de sobrenadante (em triplicata) e após 48 horas de incubação a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , o número de colônias crescido em cada placa foi contabilizado. Colônias morfológicamente diferentes encontradas em uma mesma placa foram repicadas para placas com meio AEM e AN.

Os fungos que cresceram nas placas a partir das diluições provenientes das extrações e das sementeiras de solo foram isolados em meio ABD. Para evitar o crescimento de bactérias contaminantes, foi adicionado ao meio de cultura o antibiótico cloranfenicol na concentração de  $0,2 \text{ g.L}^{-1}$ .

### **3.6. Caracterização das cepas microbianas**

As bactérias isoladas a partir de cada solo foram discriminadas de acordo com as características morfológicas, como forma, elevação, borda, superfície, pigmentação, brilho, transparência, coloração e consistência da colônia. Também foram caracterizadas de acordo com as observações provenientes de visualização microscópica proveniente de coloração de Gram,

na qual foram utilizados como reativos violeta de metila, lugol e safranina. As observações foram realizadas em microscópio óptico com aumento da imagem em 1000 vezes.

### **3.7. Manutenção das cepas microbianas**

A manutenção das cepas bacterianas foi realizada sistematicamente, sendo essas repicadas ao menos uma vez a cada 60 dias, acompanhadas de controle por microscopia ótica para garantir a pureza das culturas. Adicionalmente, as culturas foram cultivadas em meio líquido Luria Bertani (LB) modificado por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Essa cultura também foi estocada em glicerol na proporção de 80% de cultura e 20% de glicerol. A suspensão foi homogeneizada em agitador de tubos e acondicionada a -18°C. As cepas fúngicas foram cultivadas em meio BDA pelo período de 7 dias e discos contendo micélio foram mantidos em água destilada estéril na temperatura de 4°C.

### **3.8. Avaliação da resistência e capacidade degradadora de tebuconazole por fungos**

Os ensaios de avaliação da resistência e capacidade de degradação de tebuconazole, por fungos, foram realizados através de experimentos com 42 cepas fúngicas isoladas a partir da extração dos solos expostos a tebuconazole, e também com 24 cepas de fungos isolados da Floresta

Amazônica, cedidos gentilmente pela Universidade Estadual do Amazonas. Todos os fungos foram inoculados em placas de Petri contendo meio ABD.

Os cultivos foram realizados em placas de Petri contendo meio sintético Merlin-Norkrans adicionado de tebuconazole (AMNT). Os cultivos controle foram realizados nas mesmas condições, sem a adição de tebuconazole ao meio Merlin-Norkrans (AMN) (TOMASINI et al., 2001). Discos de ágar (8 mm de diâmetro) retirados das extremidades de culturas crescidas em meio ABD foram utilizados como inóculo. As culturas foram incubadas a 30 °C por 30 dias, sendo que as medições do diâmetro das culturas foram realizadas a cada 3 dias. Todos os testes foram realizados em triplicata. Para definir os microrganismos com maior resistência utilizou-se um critério de seleção, no qual o crescimento dos microrganismos em meio AMN (controle) seria no máximo 20 vezes mais rápido do que o obtido pelos microrganismos inoculados em meio AMNT. A razão do crescimento (mm/dia) em meio AMN dividido pelo crescimento em meio AMNT foi denominada taxa de crescimento.

Os fungos que apresentaram crescimento em meio AMNT foram submetidos a teste líquido. Placas de Petri contendo 15 mL de meio MNT foram inoculadas com discos de ágar (6 mm de diâmetro) de culturas das cepas fúngicas selecionadas, de acordo com Tomasini et al. (2001). As culturas foram incubadas a 30 °C por 30 dias, e a cada 10 dias, amostras foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante foi congelado para posterior análise cromatográfica. Também foi realizado o teste controle, nas mesmas condições, sem inóculo. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.



Além de teste realizado em meio MNT com os isolados que apresentaram crescimento em meio AMNT, foi realizado o teste Bavendamm (NOBLES, 1948) para avaliar se esses fungos produziam as enzimas fenoloxidasas. Quando o fungo produtor de fenoloxidasas é cultivado na presença de ácido tânico, existe a formação de um halo no meio de coloração mais escura com relação ao controle sem inóculo. Este experimento foi conduzido em meio AEM suplementado com ácido tânico na concentração de 5 g.L<sup>-1</sup>, por 7 dias a 30°C. Foram utilizadas, como controles positivos, duas cepas de fungos produtores de peroxidases das espécies *Phlebia tremellosa* e *Ceriporiopsis subvermispora*.

### **3.9. Seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso**

As bactérias isoladas a partir da extração de cada solo foram agrupadas de acordo com as similaridades morfológicas. As bactérias isoladas pertencentes a um determinado solo foram divididas em dois ou três grupos perfazendo o total de 8 grupos de microrganismos, e foram nomeados da seguinte maneira:

- a) grupos provenientes do solo 1: grupo 1-1, grupo 1-2;
- b) grupos provenientes do solo 2: grupo 2-1, grupo 2-2 e grupo 2-3;
- c) grupos provenientes do solo 3: grupo 3-1, grupo 3-2 e grupo 3-3.

A seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole foi realizada em biorreatores (Biostat B Braun) de cultivo submerso com capacidade para 2

L, contendo 1,8 L de meio mineral (MM) (BRADLEY et al., 1997), 800 µL de tebuconazole (concentração final de 0,1 g.L<sup>-1</sup>), e 200 mL de inóculo. O inóculo foi preparado a partir das cepas bacterianas isoladas de cada grupo, sendo que cada grupo foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio LB modificado e foram incubadas por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Para promover maior pressão seletiva sobre os microrganismos, no sexto dia de cultivo, 1 L de meio mineral (MM) concentrado duas vezes e 800 µL de tebuconazole foram adicionados ao sistema, para completar o volume de 2 L. O cultivo foi realizado por um período de nove dias e alíquotas de 12 mL foram coletadas a cada 24 horas, sendo que 10 mL foram centrifugados por 15 min, a 4°C e 2500g. O volume restante (2 mL) foi utilizado para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC) através da utilização da técnica de diluição seriada. As diluições que variavam entre 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup> foram inoculadas (100 µL) em placas de Petri contendo meio AMNT. Após 48 horas, as colônias que apresentaram crescimento foram contabilizadas para estimativa de UFC. Os microrganismos resistentes foram isolados através da técnica de esgotamento a partir de colônias que apresentaram crescimento após o sexto dia de cultivo, no qual foi adicionado mais 0,1 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole, com intuito de aumentar a pressão seletiva.

### **3.10. Identificação de microrganismos a partir de testes bioquímicos manuais**

Para identificação dos isolados em nível de gênero, os provenientes do grupo 2-2, 2-3 e 3-2 foram submetidos a diferentes testes bioquímicos para

avaliar o perfil de produção de enzimas e a capacidade destes metabolizarem diferentes compostos orgânicos. Todos os testes foram realizados a partir de uma pequena quantidade de células, provenientes de um cultivo em meio sólido LB modificado, por 24 horas. A condição de incubação foi semelhante para a maioria dos testes bioquímicos, utilizando-se a temperatura de 30°C por 24 horas, somente no teste de crescimento a temperatura foi alterada para 42°C. Nos testes realizados em meio líquido, a cultura foi inoculada com alça de platina; nos semi-sólidos, o inóculo foi realizado em picada (profundidade do meio de cultura), enquanto que na cultura sólida, os meios foram inoculados sobre a superfície. Foram utilizados microrganismos como controle positivo e negativo. As espécies utilizadas como controle positivo foram *Pseudomonas aeruginosa* (OF glicose, motilidade, gelatinase, crescimento a 42 °C e arginina), *Burkholderia cepacia* (lisina), *Morganella morgani* (urease, ornitina e indol), *Klebsiella pneumoniae* (citrato e malonato) e *Serratia* sp. (DNAse). Como controle negativo, foram utilizadas as espécies *Achromobacter denitrificans* (OF glicose), *Acinetobacter* sp. (motilidade), *Pseudomonas putida* (gelatinase), *Pseudomonas fluorescens* (crescimento a 42 °C), *Burkholderia cepacia* (arginina), *Pseudomonas aeruginosa* (lisina), *Klebsiella pneumoniae* (ornitina e indol), *Morganella morgani* (citrato e malonato) e *Escherichia coli* (urease e DNAse).

Meios de cultura específicos demonstram a presença de atividades metabólicas específicas das cepas cultivadas. A Tabela 2 apresenta as características de cada meio de cultura ou substrato utilizado nos testes bioquímicos.

Tabela 2. Descrição das atividades metabólicas bacterianas avaliada em cada meio de cultivo.

<b>Meio de Cultivo</b>	<b>Atividade metabólica</b>
Caldo nutriente	crescimento das culturas (42°C)
Caldo nitrato	capacidade de reduzir nitrato
Meio caldo uréia	capacidade de produzir urease
Meio caldo malonato	utilização de malonato
Meio SIM	produção de H <sub>2</sub> S
Meio MIO	motilidade, produção de indol e ornitina descarboxilase
Ágar MacConkey	confirmar a característica de Gram e uso de lactose como fonte de carbono
Meio para DNase	enzima DNase
Meio Descarboxilase Base Moeller	utilização de lisina e arginina
Meio TSI	fermentação de glicose, lactose e sacarose
Meio ágar citrato de Simmon	utilização de citrato
Tiras contendo N'N'N'N-tetrametil-1,4-dicloretofenildiamônio	Produção de oxidase
Caldo gelatina	produção de gelatinase

Para teste de produção da enzima oxidase, foi utilizado como substrato N'N'N'N-tetrametil-1,4-dicloretofenildiamônio.

Para avaliação da capacidade de reduzir nitrato, após o período de cultivo em caldo nitrato, foram adicionadas 3 gotas de duas soluções para visualização da produção de cor. A solução A, que é composta por 1g de ácido sulfanílico e 125 mL de ácido acético é adicionada anteriormente, e logo após, foi adicionada a solução B, que é composta por 0,5 g de  $\alpha$ -naftol e 100mL de ácido acético. Ao final, nas amostras em que não houve produção de cor, foi adicionada uma pequena quantidade de pó de zinco.

Para avaliar a produção da enzima gelatinase, após o período de cultivo em caldo gelatina, a leitura do teste foi feita através da observação da consistência do meio.

### **3.11. Identificação de microrganismos a partir de testes bioquímicos semi-automatizados**

A identificação automatizada é um sistema padronizado para a identificação automática de bactérias. Para identificação dos isolados em nível de espécie foi utilizada a galeria ID 32 GN, que contém 32 poços de inóculo com diferentes substratos para assimilação que são (mg.poço<sup>-1</sup>): L-ramnose, 0,68; N-acetil-glicosamina, 0,68; D-ribose, 0,70; Inositol, 0,70; D-sacarose, 0,66; D-maltose, 0,70; ácido itacônico, 0,23; ácido subérico, 0,35; malonato de sódio, 1,20; acetato de sódio, 0,55; ácido láctico, 0,32; L-alanina, 0,68; 5-ceto-gluconato de potássio, 0,90; glicogênio, 0,64; ácido 3-hidroxibenzóico, 0,23; L-serina, 0,80; D-manitol, 0,68; D-glicose, 0,78; salicina, 0,52; D-melibiose, 0,66; L-fucose, 0,64; D-sorbitol, 0,68; L-arabinose, 0,70; ácido propiônico, 0,29; ácido cáprico, 0,11; ácido valérico, 0,25; citrato de trisódio, 0,57; L-histidina, 0,80; 2-ceto-gluconato de potássio, 0,98; ácido 3-hidroxibutírico, 0,30; ácido 4-hidroxibenzóico, 0,23; L-prolina, 0,52.

Cada cepa a ser identificada foi retirada de uma cultura após 24 horas de cultivo em meio Ágar MacConkey e foi inoculada em 2 mL de solução salina. A concentração celular dessa suspensão foi de 0,5 na escala de McFarland (leitura realizada em densitômetro DENSIMAT - bioMérieux). Posteriormente, um volume de 0,2 mL dessa suspensão foi inoculado em 7 mL de meio líquido, contendo em g.L<sup>-1</sup>: sulfato de amônio, 2; fosfato monossódico, 6,24; cloreto de potássio, 1,5; gelose, 1,5; solução de vitaminas, 10,5; solução de oligo-elementos, 10. Imediatamente após o preparo, volumes de 0,135 mL da suspensão final foram inoculados nas galerias e incubados a 30°C por 24

horas. Ao final do período, as amostras foram analisadas no aparelho mini API (bioMérieux), que é acoplado a uma base de dados de bactérias gram negativas.

### **3.12. Biodegradação do tebuconazole a partir das bactérias selecionadas**

A biodegradação do tebuconazole foi avaliada utilizando as bactérias selecionadas a partir dos cultivos submersos realizados em biorreatores. Consórcios de cepas bacterianas (agrupadas de acordo com o solo de origem) e um cultivo com todos os indivíduos agrupados (independentemente do solo de onde estes microrganismos haviam sido isolados) foram avaliados quanto a sua capacidade degradativa. Cada isolado foi inoculado em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio LB modificado e incubado por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Após esse período, foi avaliada a densidade ótica (DO) através da absorbância em 600 nm. O inóculo foi padronizado com DO igual a 1. A cultura foi inoculada com 200 mL de inóculo levando meio LB em biorreator com capacidade para 2 L, contendo como meio de cultivo 1,8 L meio mineral (MM) adicionado 0,1 g.L<sup>-1</sup> de tebuconazole comercial. O volume final do cultivo foi de 2L. Alíquotas de 12 mL de cultivo foram coletadas uma vez por dia, durante o período de nove dias, sendo que 10 mL desta amostra foram centrifugados por 15 min, a 4°C e 2500g, e o sobrenadante foi coletado e congelado para análise cromatográfica e medição de pH. O volume restante foi utilizado para determinação de unidades formadoras de colônia (UFC) por diluição seriada. As diluições, que variavam entre 10<sup>-4</sup> a 10<sup>-8</sup>, foram inoculadas

em placas de Petri contendo meio AMNT. Após 24 horas, as colônias foram contadas para estimativa de UFC.

### **3.13.Avaliação da degradação de tebuconazole por fatores abióticos**

Para avaliar se fatores abióticos como exposições à luz e evaporação influenciavam na biodegradação, foi conduzido um experimento em biorreator de 2L, nas mesmas condições de cultivo utilizadas no item 3.7., porém sem adição de inóculo. A coleta de amostras também foi realizada conforme o procedimento apresentado no item 3.7., no entanto, como não houve inóculo apenas foi avaliada a presença de contaminantes no meio de cultivo, através de plaqueamento de 100 µL de meio de cultura do biorreator em meio AMNT. Estas placas foram observadas por até 72 horas para confirmação da esterilidade do meio.

### **3.14.Avaliação da adsorção de tebuconazole às células estudadas**

A avaliação da adsorção de tebuconazole foi realizada através de um ensaio no qual foram utilizadas células mortas do consórcio bacteriano. O pré-inóculo consistiu do cultivo de cada cepa bacteriana, pertencente ao consórcio, isoladamente em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 200 mL de meio LB modificado, incubado por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Após esse período, foi lida a absorbância em espectrofotômetro a 600 nm da densidade ótica (DO). O inóculo foi padronizado de modo que todos os isolados do

consórcio fossem inoculados na mesma proporção de células com DO igual a 1. Após a padronização, as células foram autoclavadas a 121°C por 15 min para inativação das atividades metabólicas. Aos frascos Erlenmeyer de 1 L (duplicata), contendo 180 mL de meio MM, foram inoculados 20 mL do consórcio bacteriano inativado. Estes frascos permaneceram incubados em agitador horizontal por 9 dias a 30°C e 120 rpm. Alíquotas de 12 mL foram coletadas de cada frasco de cultivo, sendo que destas, 10 mL foram centrifugados por 15 min (4°C, 2500g), e o sobrenadante recolhido foi congelado para posterior análise cromatográfica. O volume restante (2 mL) foi utilizado para avaliação da presença de contaminantes no meio de cultivo, através do inóculo deste em meio AMNT pelo período de 72 h. As amostras foram coletadas nos tempos 0, 3, 6 e 9 dias de cultivo.

### **3.15.Otimização das condições de cultivo para biodegradação de tebuconazole**

O consórcio bacteriano que provocou a maior diminuição da concentração de tebuconazole, presente no meio de cultura, foi selecionado para um ensaio de otimização das condições de cultivo. Este ensaio avaliou a extensão da biodegradação frente a diferentes concentrações de glicose (1 e 10 g.L<sup>-1</sup>) e temperatura (30 e 37°C). As diferentes cepas pertencentes ao consórcio bacteriano selecionado, foram inoculadas isoladamente em frascos Erlenmeyer de 1 L, contendo 200 mL de meio LB modificado e incubados por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Assim como nos experimentos anteriores, realizados em biorreator, após a incubação, padronizou-se a carga de inóculo



utilizando a DO igual 1 (absorbância lida em espectrofotômetro a 600 nm) para que cada isolado do consórcio fosse inoculado com a mesma concentração celular ( $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Em biorreatores com capacidade para 2 L, 200 mL de inóculo já padronizado foram inoculados a 1,8 L de meio mineral (MM), perfazendo o volume final do cultivo de 2 L. Amostras foram coletadas uma vez por dia, durante nove dias. Estas amostras de 12 mL do meio de cultivo eram fracionadas em duas alíquotas, uma de 10 mL que foi centrifugada por 15 min, a 4°C e 2500g, da qual o sobrenadante foi coletado e congelado para análise cromatográfica e medição de pH. A segunda alíquota foi utilizada para determinação de UFC por diluição seriada. As diluições que variavam entre  $10^{-4}$  a  $10^{-8}$  foram inoculadas em placas de Petri contendo meio AMNT e após 24 horas, as colônias foram contabilizadas.

### **3.16.Determinação da tolerância do consórcio bacteriano a diferentes concentrações de tebuconazole**

Com o objetivo de avaliar a capacidade das cepas bacterianas, presentes nos consórcios, resistirem a diferentes concentrações de tebuconazole, foi conduzido um cultivo em frascos Erlenmeyer contendo meios com até 1g.L<sup>-1</sup> deste fungicida, em agitador horizontal.

O tebuconazole comercial quando diluído em soluções aquosas, em concentrações maiores que 40 mg.L<sup>-1</sup>, provoca uma turbidez no meio. Sendo assim, faz-se impossível determinar o crescimento celular por medidas espectrofotométricas. Desta forma, para avaliar se a presença de tebuconazole

alterava o metabolismo de assimilação do substrato do consórcio microbiano, foi selecionado como parâmetro de avaliação, o consumo de glicose. Para a realização deste experimento, as bactérias pertencentes ao consórcio foram cultivadas isoladamente em frascos Erlenmeyer de 125 mL, contendo 25 mL de meio LB modificado por 12 horas a 30°C e 120 rpm. Após esse período, foi avaliada a densidade ótica (DO) em espectrofotômetro a 600 nm. O pré-inóculo foi padronizado, DO com absorbância igual a 1, para que todos os isolados do consórcio estivessem presentes no inóculo na mesma proporção celular. Uma alíquota de 3 mL de inóculo foi adicionada a frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 27 mL de meio LB modificado, com concentrações de tebuconazole de 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1 g.L<sup>-1</sup>. Estes cultivos foram conduzidos em agitador horizontal por 48 horas a 30°C e 120 rpm, em triplicata. Amostras de 2 mL foram coletadas as 0, 24 e 48 horas de cultivo. Para determinar a sobrevivência das células às diferentes concentrações de tebuconazole, uma fração de 20 µL, de cada amostra coletada, foi plaqueada em meio sólido ALB modificado e estas ficaram incubadas em estufa por 24 h a 30°C. Após a centrifugação (15 min, 4°C e 2500g) do volume restante, o sobrenadante foi recuperado e congelado para análise de glicose residual no meio de cultura, que foi determinada pelo método do ácido dinitrosalicílico (DNS) (CHAPLIN, 1986). Esse método consiste na coloração das extremidades redutoras de glicose. A solução é composta por (g.L<sup>-1</sup>): tartarato do sódio e potássio, 300; ácido dinitrosalicílico, 1 e NaOH, 16. Para realização da coloração, 100 µL de amostra foram adicionados a 1 mL da solução de reação,

que permaneceu por 5 min a 100°C em banho-maria. Após resfriamento, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 540 nm.

### **3.17. Análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Para realização das análises cromatográficas, as amostras provenientes dos cultivos em biorreatores e cultivos líquidos de fungos, foram centrifugadas por 15 min, a 4°C e 2500g, e novamente centrifugadas por 15 min, a 4°C e 21460g. Após esta seqüência de centrifugações, as amostras foram filtradas em membrana de éster de celulose com poro de 0,2 µm. Para determinação do tempo de retenção do composto, foi realizada a avaliação cromatográfica com tebuconazole puro. A curva padrão, para determinação da linearidade do composto, foi construída com tebuconazole comercial com concentrações que variaram de 10 a 100 mg.L<sup>-1</sup>.

O decréscimo da concentração de tebuconazole nas amostras provenientes da seleção de bactérias capazes de degradar este fungicida, foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de ultravioleta (CLAE/UV). Para estas análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, composto por um desgaseificador DGU-2A, bomba LC-10AD, detector UV visível SPD-10A e módulo de comunicações CBM-10A. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (60:40) em condições isocráticas (RODRÍGUEZ-CUESTA, et al., 2005), previamente desgaseificada utilizando-se gás hélio. O fluxo de fase móvel utilizado foi 1 mL.min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda utilizado no para detecção de tebuconazole foi 227 nm (HU et al.,

2007). Utilizou-se a coluna Supelcosil LC18 (250 X 4,6 mm, poro 5  $\mu$ m) e o volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu$ L.

As amostras provenientes da otimização das condições de cultivo para biodegradação, avaliação da degradação de tebuconazole por fatores abióticos e avaliação da adsorção de tebuconazole a células bacterianas, foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência utilizando detector de arranjo de diodos (CLAE/DAD). Para as análises, foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu, composto por um degaseificador DGU-20As, bomba LC-20AT, detector UV visível SPD-M20A e módulo de comunicações CBM-20A. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (70:30) em condições isocráticas. O fluxo de fase móvel utilizado foi 1 mL.min<sup>-1</sup> e o comprimento de onda utilizado no para detecção de tebuconazole foi 195 nm. Utilizou-se a coluna Supelcosil LC18 (250 X 4,6 mm, poro 5  $\mu$ m) e o volume de injeção utilizado foi de 20  $\mu$ L.

## **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **4.1. Avaliação da eficiência dos métodos de extração de microrganismos do solo.**

A recuperação de uma grande quantidade e diversidade de microrganismos do solo só é possível com a aplicação de uma técnica eficiente, capaz de dissociar as células microbianas das partículas de solo. Normalmente a recuperação total da microbiota é inviável porque os microrganismos estão distribuídos de forma heterogênea e há interações adsorptivas entre as células e as partículas de solo. Portanto faz-se necessária a utilização de procedimentos eficientes de dispersão dos microrganismos do solo. Foram encontradas na literatura muitas técnicas para extração de microrganismos do solo, porém, não há uma padronização nas metodologias aplicadas para este fim. Melo & Azevedo (1997) utilizaram soluções de extração como solução salina ou tampão Tris sob agitação em agitador horizontal ou em ultrassom. Já Josephson et al. (2000) relatam a utilização de soluções de extração com Tween 80 ou soluções utilizando pirofosfato de sódio procedendo a extração sob agitação mecânica ou manual ou com ultrassom. Elsas & Smalla (1997) citam, para recuperação microbiana, o uso de stomacher, ultrassom e shaker em combinação com soluções contendo

detergentes como deoxicolato de sódio para aumentar a dispersão dos microrganismos presentes no solo.

Com o objetivo de recuperar uma maior variedade de microrganismos, realizaram-se seis técnicas diferentes de extração de microrganismos, combinando a utilização de um agitador horizontal ou homogeneizador de amostras com três soluções de extração. Na Tabela 3 pode-se observar a quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC), presentes nos diferentes solos, obtidas após a aplicação de cada técnica de extração de microrganismos.

Tabela 3. Quantidade de unidades formadoras de colônias por grama de solo, obtidas após os diferentes tratamentos aplicados para extração dos microrganismos do solo.

Solo	Meio	STOMACHER			SHAKER		
		Água	Água pep	Tampão P/Na	Água	Água pep	Tampão P/Na
1	AN	$1,53 \times 10^6$	$1,60 \times 10^6$	$1,23 \times 10^7$	$2,60 \times 10^5$	$4,60 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$
	AEM	$4,86 \times 10^6$	$2,80 \times 10^6$	$6,20 \times 10^6$	$5,76 \times 10^6$	$9,33 \times 10^6$	$3,40 \times 10^6$
2	AN	$4,30 \times 10^6$	$2,30 \times 10^5$	$2,60 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$	$1,17 \times 10^7$	$3,40 \times 10^6$
	AEM	$3,60 \times 10^5$	$6,00 \times 10^5$	$4,30 \times 10^5$	$6,03 \times 10^6$	$4,20 \times 10^6$	$3,06 \times 10^6$
3	AN	$3,00 \times 10^6$	$1,90 \times 10^6$	$9,60 \times 10^7$	$3,53 \times 10^6$	$1,13 \times 10^6$	$6,30 \times 10^5$
	AEM	$1,73 \times 10^6$	$7,33 \times 10^5$	$3,00 \times 10^7$	$9,30 \times 10^5$	$1,80 \times 10^6$	$1,73 \times 10^6$

AN =ágar nutriente  
AEM = ágar extrato de malte

Água pep = água peptonada  
Tampão P/Na = Tampão fosfato de sódio

Comparando a quantidade de unidades formadoras de colônias obtidas após os tratamentos, não é possível determinar se há diferença entre os tratamentos pois os valores obtidos possuem diferença de apenas uma casa exponencial, embora, na maioria das análises, a técnica que combinou a utilização de homogeneizador de amostras e tampão fosfato de sódio mostrou-se mais eficiente na recuperação dos microrganismos associados ao solo. Elsas & Smalla (1997) também obtiveram uma excelente recuperação de

microrganismos do solo quando utilizaram o tampão fosfato de sódio em um homogeneizador de amostras.

No isolamento de fungos a partir dos solos coletados, comparando-se a técnica de semeadura sólida com a de extração líquida, pode-se observar que a extração líquida permitiu recuperar maior número de isolados em todos os solos (solo 1: 14 isolados, solo 2: 4 isolados, e solo 3: 9 isolados).

#### **4.2. Isolamento de cepas microbianas**

Devido ao grande número de isolados obtidos fez-se necessária uma seleção das colônias obtidas na extração de microrganismos. Ogram & Feng (1997) sugerem duas formas de selecionar colônias para posterior caracterização. Se o pesquisador está interessado no número de diferentes espécies presentes na microbiota, as colônias que morfologicamente diferem entre si devem ser selecionadas. No entanto, se o interesse está direcionado à diversidade das espécies, as colônias devem ser isoladas aleatoriamente. Como o objetivo do trabalho foi avaliar a capacidade de biodegradação de tebuconazole das diferentes espécies de microrganismos isolados do solo amostrado, foram selecionadas as espécies que eram diferentes entre si.

A partir de colônias isoladas das placas de cultivo obtidas com a diluição seriada e semeadura de solo em meio sólido, foram selecionadas 498 cepas de bactérias e fungos (Tabela 4). O solo 1 apresentou a maior diversidade microbiana seguido pelo solo 3 e solo 2, respectivamente. A

extração líquida foi responsável pela recuperação da maior quantidade e variedade de microrganismos.

Tabela 4. Avaliação da variedade de isolados obtidos a partir das técnicas de extração de microrganismos do solo das 3 diferentes propriedades.

B= número de bactérias isoladas; F= número de fungos isolados.

	Tratamento	Shaker		Stomacher		Total Líquida		Semeadura de solo		Total
		F	B	F	B	F	B	F	B	
Solo 1	Água	0	22	2	31					
	Água peptonada	3	31	2	20	14	153	5	29	201
	Tampão fosfato	6	27	0	22					
Solo 2	Água	2	33	1	17					
	Água peptonada	1	21	0	12	4	116	3	20	143
	Tampão fosfato	0	22	0	11					
Solo 3	Água	1	31	1	23					
	Água peptonada	2	21	0	15	9	123	5	17	154
	Tampão fosfato	5	18	0	15					

O número de isolados a partir de cada solo pode ser relacionado com dados do histórico de aplicação e concentração de fungicida utilizado em cada propriedade (Tabela 1). O solo 1 sofreu aplicação em menor quantidade ( $200 \text{ mL} \cdot \text{ha}^{-1}$ ) e por um período de 2 anos, apresentando maior variabilidade e maior número de microrganismos isolados. O solo 2 sofreu aplicação de tebuconazole por 5 anos e em maior concentração ( $500 \text{ mL} \cdot \text{ha}^{-1}$ ), assim como o solo 3. No entanto o solo 3 apesar de receber uma maior quantidade de fungicida (tebuconazole e Ópera) recebia também a adição de grandes quantidades de matéria orgânica o que provavelmente justifica a presença de um maior número de microrganismos em comparação com o solo 2. Cyro et al. (2006) avaliaram a biomassa de fungos em solos expostos ao tebuconazole ao longo de 28 dias em três diferentes concentrações, e observaram que o



número de fungos aumentou ao longo do experimento na maior concentração testada ( $270 \text{ mg.Kg}^{-1}$  de solo), sugerindo que os microrganismos adquirem resistência ao fungicida quando é realizada pressão de seleção.

Ao longo do trabalho de manutenção das culturas, 32 cepas não se adaptaram às condições de cultivo utilizadas em laboratório, restando 466 isolados para serem utilizados nos estudos posteriores.

#### **4.3. Caracterização dos microrganismos extraídos do solo**

Todas as cepas foram repicadas para placas com o objetivo de fazer uma identificação morfológicas destas células. Muitas destas colônias que inicialmente pareciam puras, no entanto, estavam contaminadas e foram sucessivamente esgotadas ou diluídas a fim de se obter as colônias puras, que posteriormente foram acondicionadas em tubos de ensaio com meio de cultura AEM. Todo este procedimento foi acompanhado por microscopia ótica para certificação de que a colônia era a mesma isolada originalmente.

A identificação celular das cepas isoladas foi realizada para que durante os estudos de biodegradação não ocorressem perdas das cepas através da repicagem de eventuais contaminantes. Para isso foram feitas identificações microscópicas da morfologia celular das cepas isoladas ao microscópio ótico utilizando a coloração de Gram (Tabela 5).

Tabela 5. Frequência da morfologia celular das cepas isoladas ao microscópio ótico utilizando a coloração de Gram.

<b>Microrganismos</b>	<b>Total</b>	<b>Gram +</b>	<b>Gram -</b>
Bastonete	60,0	23,7	76,3
Cocos	21,5	1,8	98,2
Estreptobacilo	6,7	65,7	34,3
Cocobacilos	2,9	0,0	100,0
Filamentosos	0,8	50,0	50,0
Estafilococos	0,6	0,0	100,0
Espiroqueta	0,2	0,0	100,0
Estreptococos	0,2	100,0	0,0
Fungos	7,1	-	-

Dentre todos os microrganismos isolados 93% eram bactérias e 7% fungos filamentosos. A maioria das cepas de bactérias isoladas tem forma de bastonete e são gram negativas. Segundo Maier & Pepper (2000) as bactérias são os microrganismos que predominam no solo, seguidas dos actinomicetos e fungos, respectivamente. Geetha & Fulekar (2008), em estudos de biodegradação de diferentes pesticidas de organismos provenientes de solo, encontraram predominância de bactérias de diferentes gêneros como *Pseudomonas*, *Serratia* e *Bacillus*, seguidos de actinomicetos, e finalmente fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

#### **4.4. Avaliação da resistência e capacidade degradadora de tebuconazole por fungos**

A utilização excessiva de xenobióticos em lavouras tem como conseqüência a seleção natural de microrganismos resistentes causada pela pressão seletiva (MELO & AZEVEDO, 1997). Em solos contaminados com tebuconazole existe uma maior possibilidade de encontrar microrganismos

resistentes e estas espécies podem ser potenciais biodegradadoras deste xenobiótico. Alguns autores relatam a ocorrência de espécies fúngicas resistentes a diferentes concentrações de tebuconazole no solo.

A concentração de tebuconazole utilizada em todos os experimentos foi de  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  devido à alta toxicidade que este fungicida causa em fungos de diversas espécies, como descrito por Mourão et al. (2003), que reportaram que a concentração de  $420 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de tebuconazole foi suficiente para inibir totalmente o crescimento micelial de *Beauveria bassiana*; e por Loureiro et al. (2002), que observaram que tebuconazole aplicado na concentração indicada para campo ( $150 \mu\text{g}.\text{L}^{-1}$ ), inibiu completamente o crescimento de *B. bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Paecilomyces fumosoroseus* e *Verticillium lecanii*.

A avaliação da resistência à toxicidade ao tebuconazole das cepas extraídas e isoladas a partir dos solos contaminados com fungicidas do grupo dos triazóis foi testada em cultivo sólido. Após 30 dias de cultivo, dos 40 fungos isolados, somente 11 apresentaram capacidade de crescer em meio de cultura contendo  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  de tebuconazole, sendo que o perfil de crescimento dos isolados foi muito lento se comparado com o meio sem fungicida (controle). Resultados semelhantes foram obtidos por Hatvani et al. (2006), que relataram que em linhagens de *Trichoderma harzianum* e *T. atroviride*, o tebuconazole causou inibição no crescimento em concentrações superiores a  $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  em um período de crescimento entre 3 a 5 dias.

Dentre os 11 isolados que foram resistentes ao tebuconazole apenas 4 cepas (549, 157, 92 e F2) apresentaram uma melhor taxa de crescimento (razão do crescimento ( $\text{mm}.\text{dia}^{-1}$ ) em meio AMN dividido pelo

crescimento em meio AMNT). As cepas com maior taxa de crescimento foram isoladas a partir dos solos com histórico de maior tempo de aplicação e maior concentração do fungicida, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6. Crescimento de isolados fúngicos isolados de solos contaminados ( $\text{mm.dia}^{-1}$ ) em meio sólido com (AMNT) e sem presença (AMN) de tebuconazole, e procedência do tipo de solo.

ISOLADO	SOLO	AMN	AMNT	TAXA
549	SOLO 2	12,6	1,2	10,1
157	SOLO 3	12,8	1,1	11,1
92	SOLO 2	26,6	1,3	19,8
F2	SOLO 1	9,6	0,4	19,8
554	SOLO 3	15,3	0,6	24,1
545	SOLO 1	28,8	1,1	26,9
531	SOLO 2	16,0	0,4	33,9
644	SOLO 3	37,5	1,1	34,8
546	SOLO 1	13,1	0,3	36,0
552	SOLO 3	15,7	0,3	46,1
547	SOLO 2	32,0	0,6	52,8

Embora a partir do solo 1 tenha sido obtido o maior número de microrganismos isolados, somente o isolado F2 apresentou uma taxa de crescimento com razão AMN/AMNT menor que 20 vezes. Estes dados são coerentes com os apresentados por Robbertse et al. (2001), que avaliaram a resistência de *Rhynchosporium secalis* ao tebuconazole em culturas de cevada. Neste estudo os isolados expostos ao tebuconazole por seis anos, um ano e nunca expostos tiveram o crescimento inibido a partir da concentração de  $4,96 \mu\text{g.ml}^{-1}$ ,  $3 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e  $0,4 \mu\text{g.ml}^{-1}$ , respectivamente, mostrando que a aplicação sucessiva e por longos períodos faz com que algumas espécies sejam resistentes à pressão seletiva. Alguns autores como Silva & Melo (1997) afirmam que gêneros como *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* são

normalmente encontrados em solos tratados com benomil, e que *Gliocadium*, *Penicillium* e *Trichoderma* predominam em solos tratados com diferentes fungicidas. Todas as cepas fúngicas que cresceram em meio sólido contendo tebuconazole foram submetidas a teste em meio MNT. Somente os isolados 546 e 549 apresentaram crescimento em 30 dias de cultivo, porém não foi observada atividade de biodegradação com relação ao controle nas análises cromatográficas.

A partir dos 24 isolados fúngicos provenientes da Floresta Amazônica que foram submetidos ao mesmo teste de resistência, somente 11 foram resistentes à concentração de  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de tebuconazole, apresentando variadas taxas de crescimento, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Crescimento de isolados fúngicos provenientes da floresta Amazônica ( $\text{mm}\cdot\text{dia}^{-1}$ ) em meio sólido com (AMNT) e sem presença (AMN) de tebuconazole.

ISOLADO	AMN	AMNT	TAXA
UEA_125	21,5	2,7	7,8
UEA_102	8,3	0,7	11,3
UEA_017	33,0	2,8	11,7
UEA_115	31,6	2,5	12,6
UEA_118	11,0	0,8	13,4
UEA_094	17,7	1,1	14,8
UEA_090	34,3	1,9	17,8
UEA_119	31,6	0,9	32,7
UEA_127	29,1	0,8	35,3
UEA_120	22,8	0,6	36,9
UEA_126	30,6	0,7	39,9

A capacidade de resistência de isolados fúngicos Amazônicos ao tebuconazole indica que, mesmo os fungos que nunca sofreram exposição ao tebuconazole podem apresentar resistência a esse pesticida. Dados

semelhantes são reportados por Diamantopoulou et al. (2006) em estudos com uma linhagem comercial de *Agaricus bisporus* que não apresentava histórico de exposição ao tebuconazole, mostrando que esse fungo não teve seu crescimento afetado pelo tebuconazole na concentração de 0,1 mg.L<sup>-1</sup>. Porém, este pesticida causou deformidades no corpo de frutificação e diminuiu o rendimento da produção de biomassa, por consequência, na rentabilidade do produto quando esse xenobiótico é aplicado.

De acordo com muitos trabalhos em degradação de compostos xenobióticos como corantes (CIULLINI et al., 2008) e pesticidas (OKEKE et al., 1997), os organismos predominantemente capazes de realizarem a degradação desses compostos são os fungos, que possuem a característica de produzir enzimas como as fenoloxidasas. Essas enzimas, que normalmente são responsáveis pela degradação da lignina, presente em vegetais, não possuem especificidade pelo substrato, visto que a lignina é uma macromolécula que não possui uma estrutura repetitiva, apresentando portanto uma grande variedade de ligações químicas (AZADPOUR et al., 1997). Isso permite que os fungos equipados com este sistema enzimático possam degradar uma grande variedade de compostos aromáticos (MOUGIN et al., 1994). Porém, a avaliação da produção de enzimas fenoloxidativas, realizada através do ensaio de crescimento em meio contendo ácido tânico, com todas as cepas fúngicas estudadas, revelou que nenhuma destas produz essas enzimas. Este fato corrobora o resultado obtido neste experimento de avaliação de resistência e capacidade degradadora sugerindo que as cepas fúngicas avaliadas são resistentes ao tebuconazole, mas não são capazes de degradá-

lo nas condições avaliadas, embora essas tenham sido isoladas a partir de madeiras em estado de decomposição.

#### **4.5. Análises cromatográficas**

A quantificação de tebuconazole é realizada através de métodos cromatográficos variados como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), entre outras. A grande maioria dos trabalhos publicados atualmente tem como objetivo avaliar as concentrações residuais deste composto em amostras ambientais. Nestes casos se faz necessária a preparação das amostras com o objetivo de concentrar a pequena quantidade de tebuconazole encontrado nas mesmas. Esses métodos são demorados, caros e normalmente há uma perda entre 40 a 50% de amostra durante a preparação. Nos experimentos realizados neste trabalho foram utilizadas concentrações entre 100 mg.L<sup>-1</sup> e 1000 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole, quantidades consideravelmente maiores do que as encontradas na literatura, que citam entre 4 a 10 mg.L<sup>-1</sup> (RODRÍGUEZ-CUESTA et al., 2005). Com base em metodologias utilizadas para a caracterização de águas residuárias que continham uma composição variada de pesticidas, foi realizada então uma adaptação das técnicas propostas por HU et al. (2007) e Rodríguez-Cuesta (2005) para que esta pudesse ser aplicada à quantificação de tebuconazole por CLAE acoplado a um detector de ultravioleta, utilizando a coluna cromatográfica C18. Inicialmente foram realizados alguns testes com diferentes composições da fase móvel e de fluxo, injetando apenas padrões para o aperfeiçoamento da técnica. A Figura 2 apresenta o cromatograma obtido após

a injeção de amostras de solução padrão do tebuconazole puro e comercial na concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ , no qual é possível visualizar que o pico aparece com excelente resolução.

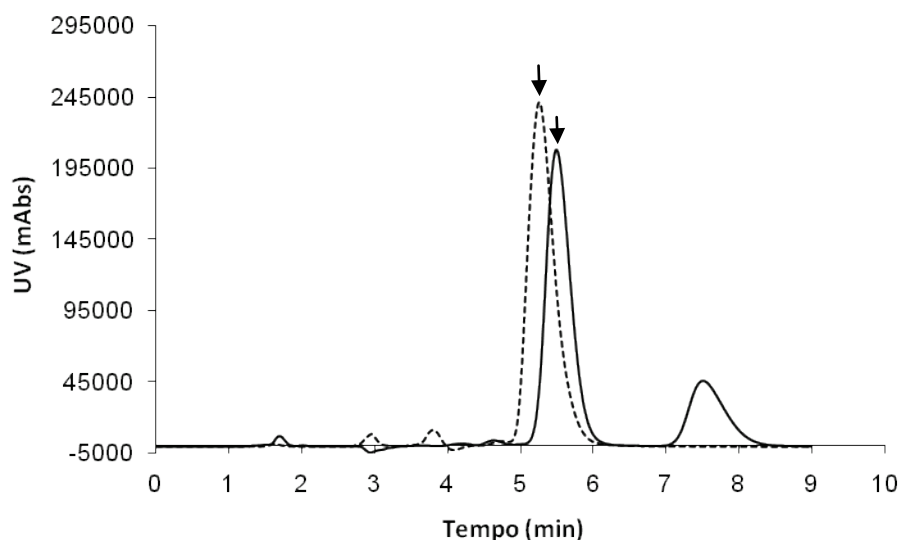


Figura 2. Cromatograma da solução padrão do tebuconazole puro e comercial com concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Tempo de retenção dos padrões de tebuconazole 5,5 minutos. (—) Tebuconazole comercial; (- -) Tebuconazole puro.

Avaliando os diferentes cromatogramas obtidos após os testes padronizou-se que a melhor condição de quantificação do tebuconazole era obtida utilizando-se como fase móvel uma solução de acetonitrila e água ultrapura na proporção de 60% para 40%. Com esta fase móvel, a um fluxo de 1 mL por minuto, e comprimento de onda em 227 nm, o tempo de retenção do tebuconazole tanto da solução padrão do produto puro como do produto comercial, foi de 5,5 minutos e o tempo total de análise foi de 10 minutos.

A partir da determinação das condições de análise do tebuconazole, foi construída uma curva padrão para verificar quais os limites de detecção deste composto por esta técnica. Para isso, foi construída uma curva padrão



com soluções padrões preparadas com o produto comercial em concentrações que variaram de 10 mg.L<sup>-1</sup> a 100 mg.L<sup>-1</sup>, no entanto foi observado, como mostra a Figura 3, que a curva padrão mostrou-se linear entre as concentrações de 10 mg.L<sup>-1</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup>.

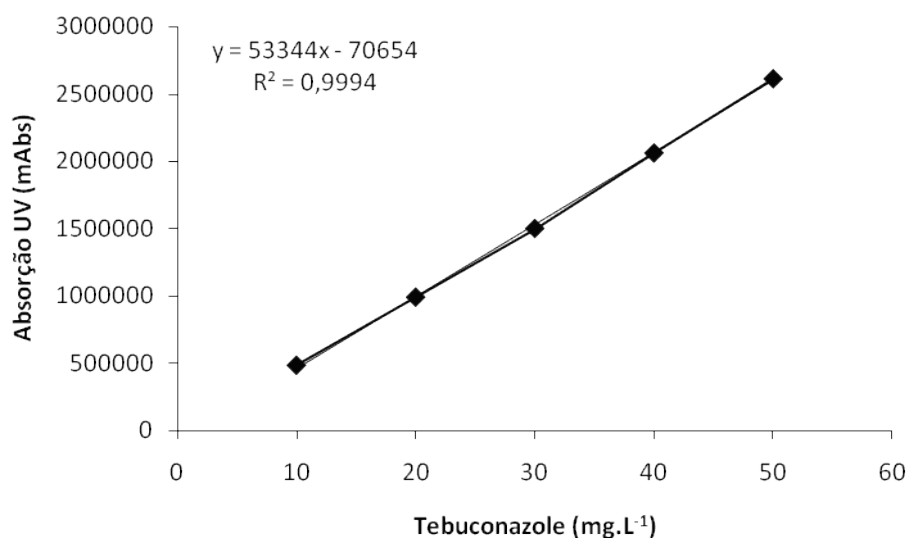


Figura 3. Curva padrão de soluções de Tebuconazole comercial com concentrações entre 10 mg.L<sup>-1</sup> e 50 mg.L<sup>-1</sup>.

Como as amostras analisadas para quantificar a biodegradação seriam provenientes de meios de cultivo, foi analisado o perfil cromatográfico dos meios de cultivo controle e teste, ambos contendo tebuconazole, para avaliar se os componentes do meio de cultura não promoveriam interferência através de sobreposição ao pico do fungicida analisado. Utilizando-se a mesma condição de análise verificou-se que um maior número de picos foi observado no meio de cultura controle, no entanto estes não interferiram na análise, pois foram detectados entre 2 e 3 minutos anteriormente ao tebuconazole (5,5 min) não influenciando na análise do xenobiótico.

A Figura 4 apresenta o cromatograma do meio de cultura controle com adição de tebuconazole, onde é possível constatar que os compostos presentes neste meio não se sobrepuseram ao pico de tebuconazole.

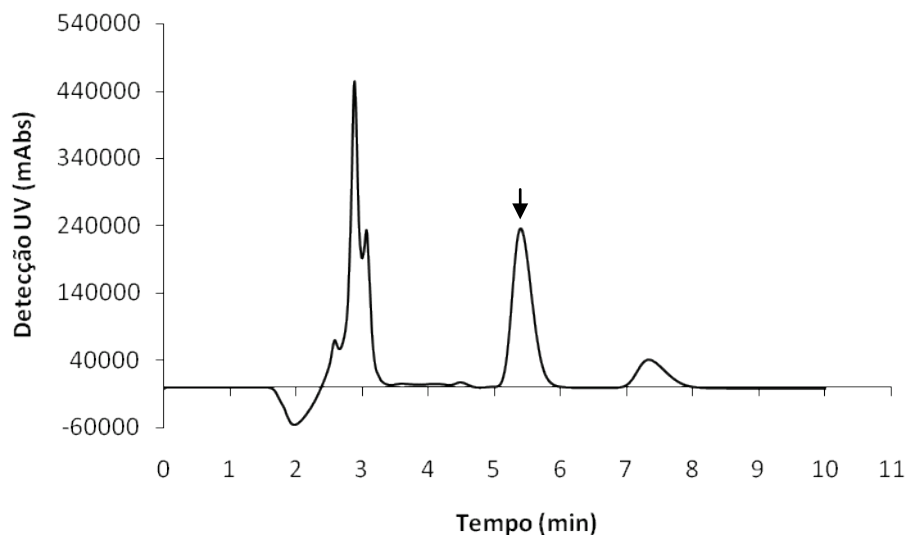


Figura 4. Cromatograma do meio de cultura controle contendo Tebuconazole comercial na concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ . Tempo de retenção de 5,5 minutos.

A fim de dirimir a dúvida sobre a possível interferência de compostos produzidos após o cultivo, provenientes da atividade metabólica dos microrganismos, injeções de amostras de experimentos de biodegradação também foram realizadas. Nas diversas amostras analisadas os compostos oriundos do meio de cultivo contendo tebuconazole comercial apresentaram picos entre 2 e 4 minutos, não promovendo interferência na absorção do tebuconazole (Figura 5).

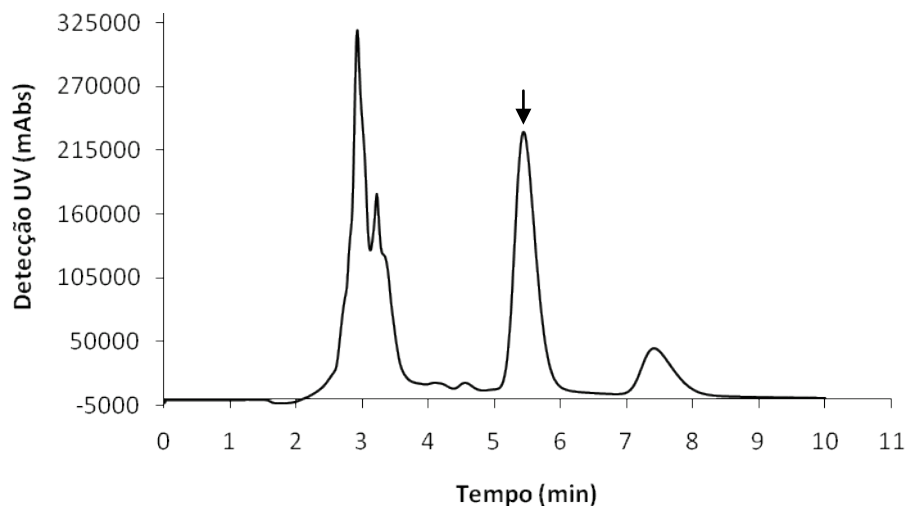


Figura 5. Análise cromatográfica de uma amostra de cultivo de microrganismos contendo Tebuconazole comercial na concentração de  $50 \text{ mg.L}^{-1}$ .

Quando os testes de análises cromatográficas foram realizados em CLAE/DAD, foi realizada uma varredura para observar se a detecção era maior em outro comprimento de onda, e foi observado que a 195 nm a absorção de tebuconazole era maior. Não havia interferentes na faixa de tempo de absorção do tebuconazole. Por esse motivo, o comprimento de onda foi modificado. A concentração de acetonitrila na fase móvel foi aumentada para que houvesse maior simetria no pico de tebuconazole. Os cromatogramas de absorção foram semelhantes aos observados a 227 nm.

#### 4.6. Seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole

A partir dos nove grupos de bactérias provenientes das técnicas de extração de microrganismos do solo e por semeadura direta em meio sólido, nomeados como descrito no item 3.7, foram realizados testes para avaliar a

capacidade dessas bactérias biodegradarem o tebuconazole em cultura líquida. A partir desses estudos foi possível observar o crescimento bacteriano por UFC e a concentração de tebuconazole no meio de cultura. Em todos os experimentos, foi realizada a análise de açúcar residual, e nas primeiras 24 horas de cultivo, todo o açúcar presente no meio de cultura já havia sido consumido. Um experimento controle realizado nas mesmas condições dos demais ensaios, porém, sem a adição de inóculo, demonstrou que a concentração de tebuconazole ao longo de 9 dias de cultivo apresentou variação insignificante, demonstrando que o composto não evaporou e não sofreu fotodegradação durante esse período.

O perfil do experimento de biodegradação das bactérias pertencentes ao grupo 1-1 está demonstrado na Figura 6. A concentração de tebuconazole manteve-se estável até o sexto dia de cultivo e aumentou após adição de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de tebuconazole ao meio. A concentração celular desse grupo ao longo de nove dias de cultivo aumentou de  $2,83 \times 10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$  no início do cultivo para  $4,37 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$  no terceiro dia, e para  $1,49 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$  ao sétimo dia de cultivo, quando mais glicose e nutrientes foram adicionados ao sistema. Isso demonstra que, apesar de apresentar crescimento, os microrganismos presentes não utilizaram tebuconazole como substrato, ou seja, não houve biodegradação.

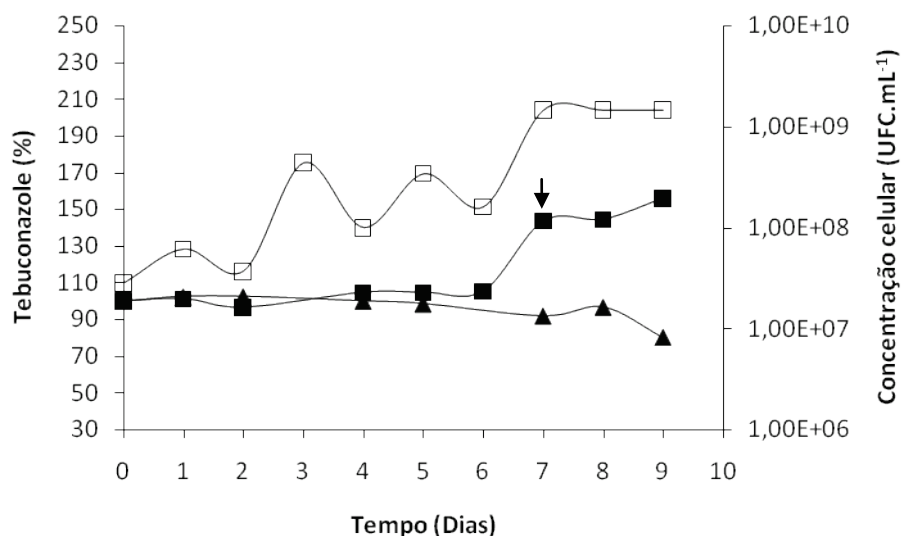


Figura 6. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 1-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

O comportamento do experimento de biodegradação do grupo 1-2, mostrado na Figura 7, foi semelhante ao encontrado no grupo 1-1. A concentração de tebuconazole também se manteve constante até o momento da suplementação com meio concentrado (sexto dia de cultivo). No entanto, a concentração celular inicial que era de  $1,37 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, caiu para  $3 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> aos seis dias de cultivo, e aumentou a partir do sétimo dia para  $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mantendo-se estável até o final do experimento, o que pode ser explicado pela a adição de glicose ao meio de cultura.

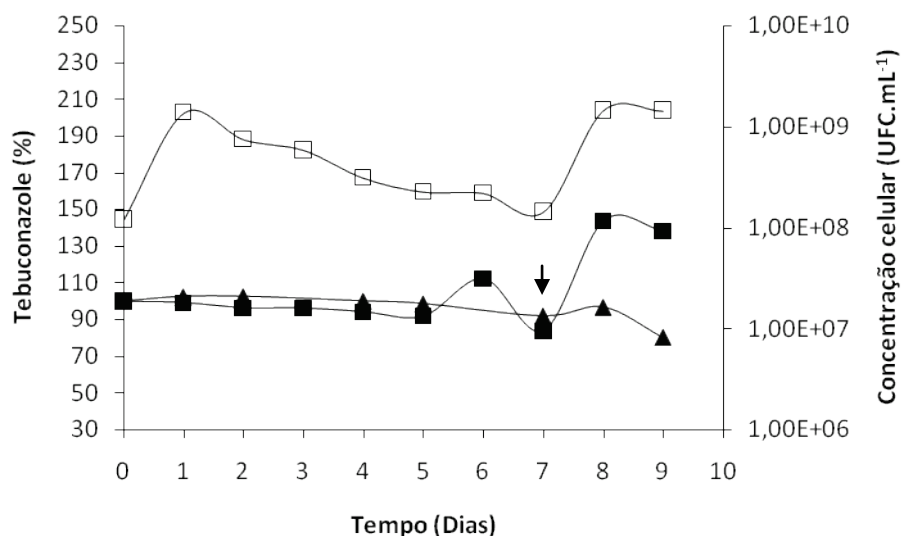


Figura 7. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 1-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismo; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

No experimento de biodegradação em que o desempenho das bactérias do grupo 2-1 foi avaliado, não houve diminuição da concentração de tebuconazole até o quinto dia de cultivo, onde foi detectada uma diminuição de 19% (Figura 8). A partir do sexto dia de cultivo, houve o aumento da concentração de tebuconazole no mesmo dia em que houve a adição de tebuconazole ao meio de cultivo. A concentração celular desse grupo iniciou em  $1,2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>, apresentando uma diminuição para  $7,2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> em quatro dias, mas voltando a aumentar para  $2,26 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> a partir do quinto dia de cultivo, chegando a  $7,5 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> após a adição de meio de cultura e mantendo-se estável até o final do experimento.

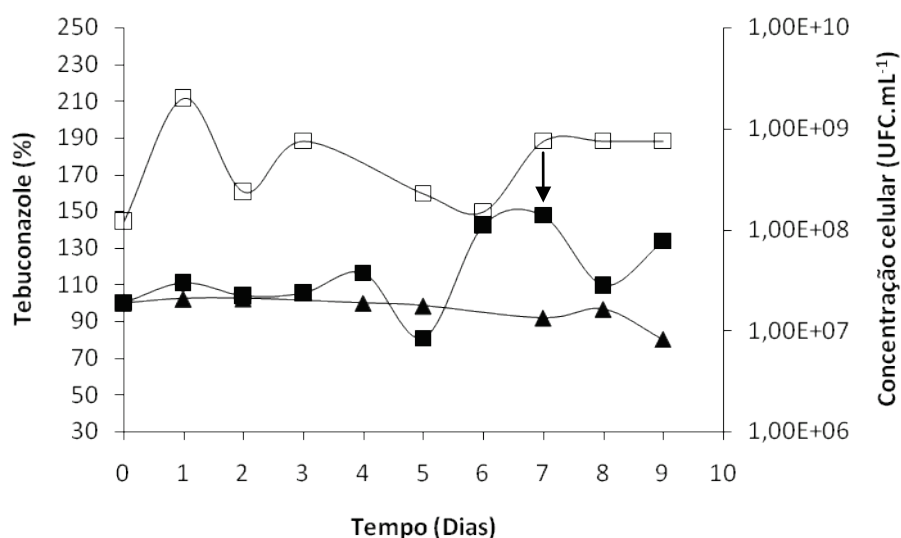


Figura 8. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

O grupo 2-2 apresentou uma biodegradação de 51% do tebuconazole, sendo observada diminuição do composto já no terceiro dia de cultivo (Figura 9) e ainda foi possível observar que após a adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole (6 dias de cultivo), houve o desaparecimento de 20% do composto, no final do cultivo. Nos primeiros três dias do cultivo a concentração celular variou de  $2,13 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> a  $1,48 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mantendo-se em torno de  $3 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> a partir do quarto dia de cultivo.

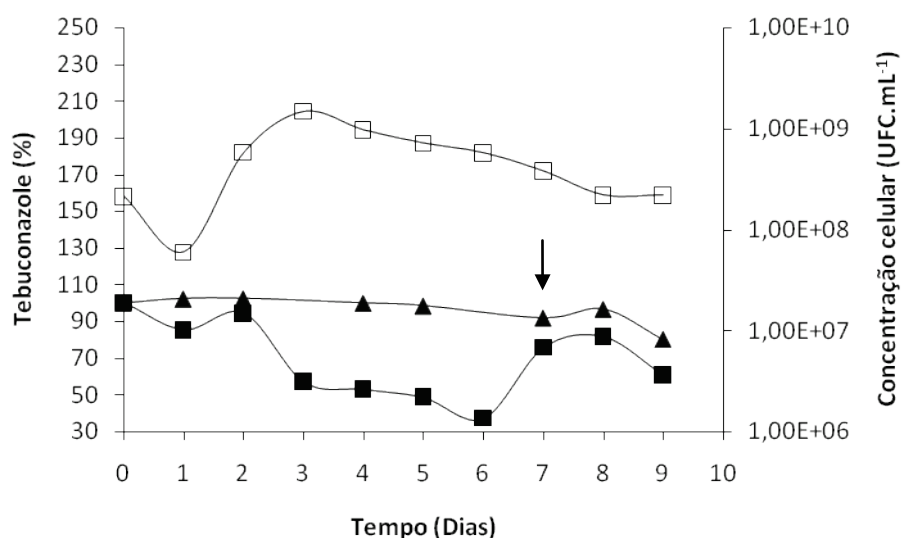


Figura 9. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

Os estudos realizados sobre o grupo 2-3 revelaram que, a partir do segundo dia de cultivo, foi possível observar a ocorrência de uma pequena diminuição do tebuconazole, que continua gradualmente até o quarto dia de cultivo, chegando à diminuição de 23%. A partir desse momento, é observada a concentração do xenobiótico. Após a adição tebuconazole, glicose e nutrientes, no sexto dia de cultivo, foi possível observar a diminuição de 30% de tebuconazole ao final do experimento de biodegradação. Nesse grupo, a concentração celular inicial foi de  $2,8 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> e esta diminuiu já nas primeiras 24 horas de cultivo para  $4,3 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, mantendo-se estável até o final do cultivo (Figura 10).



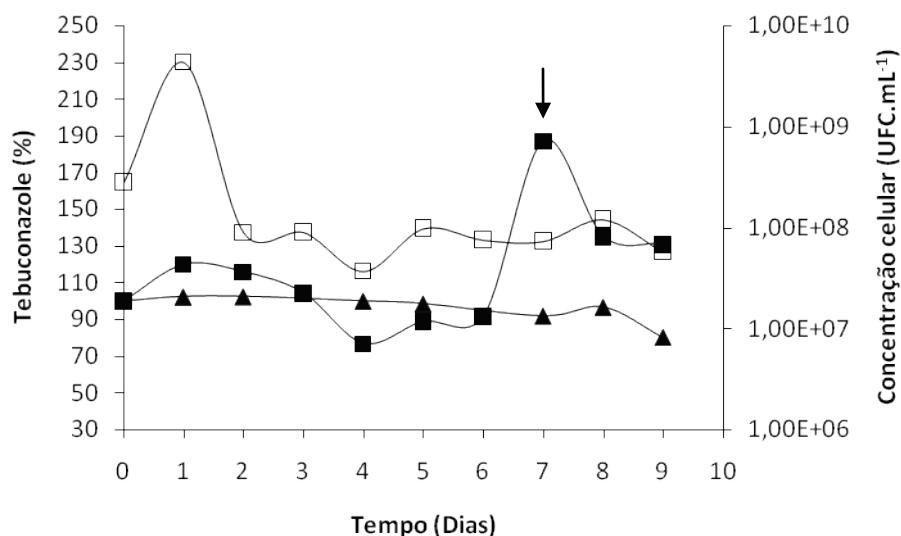


Figura 10. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 2-3 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

Os microrganismos presentes no grupo 3-1 (Figura 11) foram capazes de degradar 30% durante os primeiros 4 dias de cultivo, no entanto após esse período podemos observar que ocorreu o aumento da concentração de tebuconazole o que provavelmente está relacionado à evaporação do meio. A biomassa foi aumentando à medida que havia uma diminuição na concentração de tebuconazole e assim que a concentração deste xenobiótico aumentou a concentração celular diminuiu, refletindo um possível efeito tóxico.

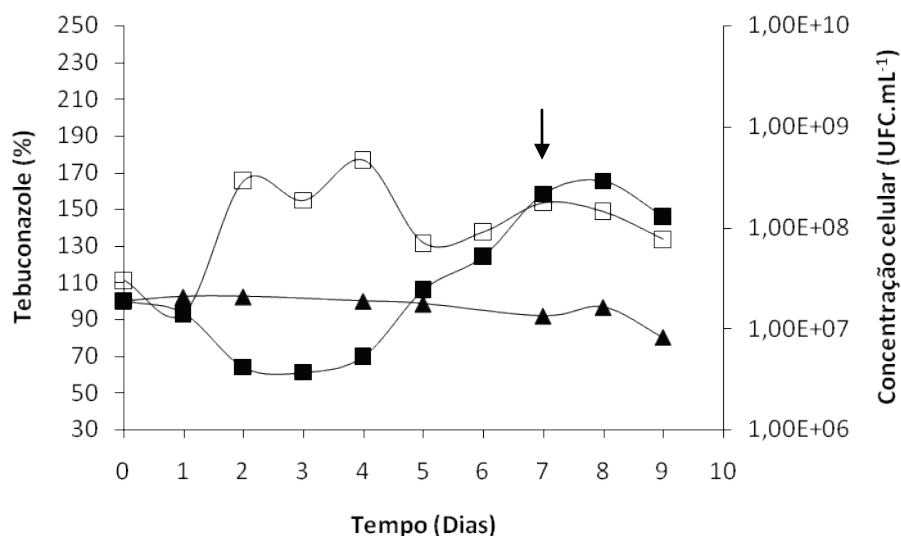


Figura 11. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-1 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

Os dados referentes aos microrganismos presentes no grupo 3-2 apresentaram uma diminuição gradual na concentração de tebuconazole, chegando a uma redução de 26% no quinto dia de cultivo. Também pode ser observada a diminuição de tebuconazole após a adição de xenobiótico e meio de cultivo, que chegou a 18% em dois dias. A concentração celular desse grupo manteve-se em torno e  $2 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> até o quinto dia de cultivo, apresentando um aumento em 6 dias. A concentração de células viáveis ao final do experimento ficou em  $9,3 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> (Figura 12).

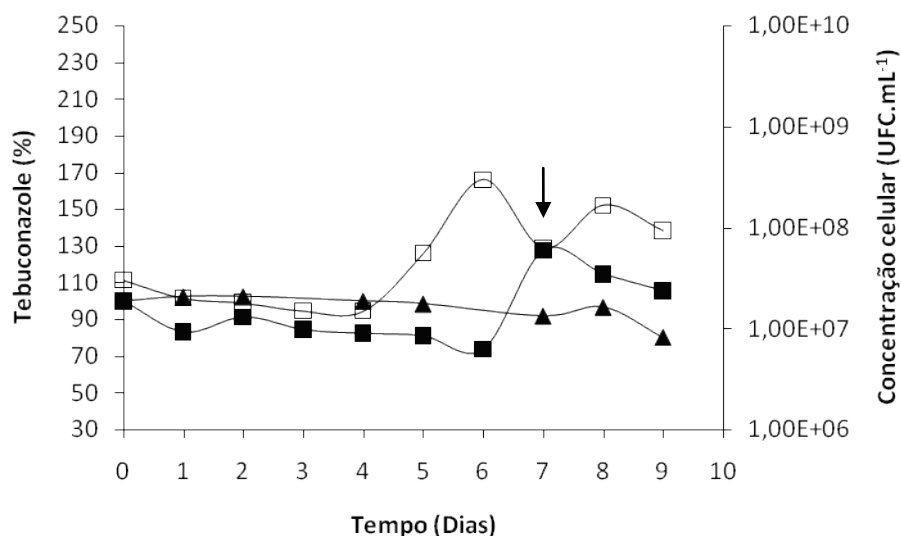


Figura 12. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-2 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

A Figura 13 demonstra o comportamento de biodegradação dos microrganismos do grupo 3-3, que provocaram o desaparecimento de 25% de tebuconazole nas primeiras 24 horas de cultivo. No entanto esta velocidade de biodegradação não foi mantida e em seguida foi detectado o aumento da concentração de tebuconazole. Além disso, a concentração celular, que iniciou em  $1,3 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>, somente diminuiu ao longo do cultivo, chegando a  $8,6 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup> ao final do experimento. Esses resultados sugerem que esse grupo de microrganismos não tolera a presença de concentrações de tebuconazole acima de 125 mg.L<sup>-1</sup> e que provavelmente este grupo tenha que ser avaliado em um experimento com maior concentração inicial de glicose para avaliar um possível co-metabolismo desse fungicida.

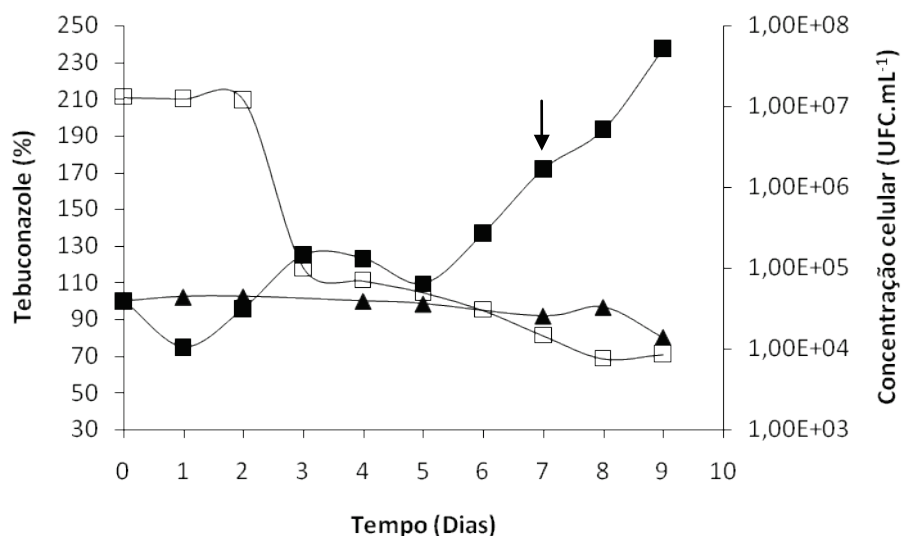


Figura 13. Perfil de crescimento das bactérias do grupo 3-3 e biodegradação de tebuconazole em biorreatores de cultivo submerso. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismo; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial. A seta indica o momento de adição de 100 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole.

Ao final dos testes, foram escolhidos três grupos de microrganismos para as próximas etapas do trabalho. Foram escolhidos os grupos 2-2, 2-3 e 3-2. Estes grupos, além de apresentarem degradação no início do cultivo, também foram capazes de degradar o tebuconazole após a adição do composto em 6 dias. Apesar de ser observada diminuição de tebuconazole, o grupo 2-1 não foi selecionado devido ao longo tempo que esse grupo de microrganismos utilizou para degradar o xenobiótico.

A partir dos testes de seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole, foram isoladas 11 cepas diferentes, que foram submetidas a

testes bioquímicos para identificação em nível de gênero e espécie. A Tabela 8 mostra a origem dos microrganismos isolados e selecionados.

Tabela 8. Cepas isoladas a partir de experimentos de biodegradação

<b>Grupo</b>	<b>Cepas isoladas</b>
2-2	TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04
2-3	TBZ 05, TBZ 06, TBZ 07, TBZ 08 e TBZ 09
3-2	TBZ 10 e TBZ 11

#### **4.7. Identificação de microrganismos selecionados**

Todas as cepas citadas no item acima foram submetidas a uma sequência de 18 testes bioquímicos manuais para a determinação de gênero e uma sequência de 32 testes semi-automatizados para determinação da espécie.

A Tabela 9 apresenta as capacidades de utilização de substratos e de produção de enzimas nos testes bioquímicos manuais.

Tabela 9. Resultado de 18 testes bioquímicos manuais aplicados a onze diferentes isolados provenientes de seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole em cultura líquida.

Amostra	TBZ 01	TBZ 02	TBZ 03	TBZ 04	TBZ 05	TBZ 06	TBZ 07	TBZ 08	TBZ 09	TBZ 10	TBZ 11
Fermentação glicose	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Redução nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fermentação lactose	+	-	+	-	+				+	-	-
Motilidade	+	+	+	+	+				+	+	+
Ornitina	+	+	+	+	+				+	+	+
Indol	-	-	-	-	-				-	-	-
Urease	-	-	-	-	-				-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+				+	+	+
Malonato	+	+	+	+	+				+	+	+
DNAse	-	+	-	+	-				-	+	+
H <sub>2</sub> S	-	-	-	-	-				-	-	-
OF glicose						O	O	O			
Oxidase						+	+	+			
Motilidade						+	+	+			
Gelatinase						+	-	+			
Crescimento 42 °C						-	-	-			
Arginina						+	+	+			
Lisina						-	-	-			
Gênero	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Serratia</i>	<i>Serratia</i>

A partir da definição de gênero, as cepas foram submetidas à análise em sistema semi-automatizado que foi utilizado para determinação em nível de espécie das cepas estudadas.

A Tabela 10 apresenta os resultados referentes à identificação obtidos a partir do programa mini-Api.

Tabela 10. Identificação em nível de espécie de isolados bacterianos provenientes de solos contaminados com Tebuconazole.

<b>CEPA</b>	<b>IDENTIFICAÇÃO</b>	<b>CONFIABILIDADE (%)</b>
<b>TBZ 01</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	94,1
<b>TBZ 02</b>	<i>Serratia marcescens</i>	86,6
<b>TBZ 03</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	92,5
<b>TBZ 04</b>	<i>Serratia marcescens</i>	85,3
<b>TBZ 05</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	94,1
<b>TBZ 06</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,9
<b>TBZ 07</b>	<i>Pseudomonas putida</i>	95,3
<b>TBZ 08</b>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99,9
<b>TBZ 09</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i>	93,2
<b>TBZ 10</b>	<i>Serratia marcescens</i>	85,35
<b>TBZ 11</b>	<i>Serratia marcescens</i>	85,35

Dentre as espécies identificadas temos gêneros que são reconhecidamente potenciais biodegradadores de xenobióticos como *Pseudomonas*, que é citada em diversos estudos relacionados à degradação de atrazina, paration, carbaril, 2,4-dinitrotolueno, tolueno, benzeno, xileno, diclorobenzeno, entre outros. Mandelbaum et al. (1995) reportaram a mineralização de 80% de atrazina em cultura líquida por *Pseudomonas* sp em 24 horas de cultivo. Em outro estudo com um isolado de *Pseudomonas* sp. proveniente de solo contaminado com carbaril, foi observada a completa transformação deste a 1-naftol em 40 horas de crescimento em cultura líquida (CHAPALAMADUGU & CHAUDHRY, 1991).

Já os gêneros *Serratia* e *Enterobacter* são menos referenciados nas pesquisas como degradadores de xenobióticos. Alguns autores utilizaram estes microrganismos em estudos de biodegradação. Lacayo-Romero et al. (2005) avaliaram a capacidade de biodegradação de *Enterobacter cloacae* sobre toxafeno, um pesticida de amplo espectro, e obtiveram como resultado a degradação de 40% do composto em 20 dias de cultivo. A biodegradação de 2,4-D foi estudada através de experimentos de cultivo submerso realizados com uma cepa isolada de solo identificado como *Serratia marcescens* (SILVA et al., 2007). Altos níveis de degradação de tributil fosfato também são relatados para um isolado proveniente de solo contaminado identificado como *Serratia odorifera* (BERNE et al., 2004).

#### **4.8. Biodegradação do tebuconazole a partir das bactérias selecionadas**

Foram realizados testes de biodegradação nas mesmas condições de cultivo para seleção de bactérias degradadoras de tebuconazole. Os grupos foram estudados separadamente, e também foi realizado um cultivo reunindo as 11 cepas pertencentes aos 3 grupos para avaliar a capacidade de degradação desse consórcio microbiano. O valor de pH para todos os experimentos descritos neste item durante todo o período de cultivo foi de  $7 \pm 0,5$ .

Nesse experimento de biodegradação, o consórcio bacteriano pertencente ao grupo 2-2, que é composto por *Enterobacter sakazakii* (TBZ 01



e TBZ 03) e *Serratia marcescens* (TBZ 02 e TBZ 04) foi capaz de diminuir 39% da concentração de tebuconazole inicial no meio de cultura. A diminuição do xenobiótico pôde ser observada a partir de 2 dias de cultivo. Se compararmos esses resultados com os obtidos na seleção de microrganismos do grupo, o perfil de degradação foi semelhante, já que a degradação de tebuconazole nos dois experimentos ocorreu até o sexto dia de cultivo. Porém, a degradação do composto no experimento de seleção foi maior (51%) quando comparada com o experimento de biodegradação das cepas selecionadas (39%) (Figura 14). Essa diminuição da degradação pode ter ocorrido devido à perda da capacidade dessas bactérias em degradar esse xenobiótico, embora todas as cepas selecionadas tenham sido mantidas sob pressão seletiva durante armazenamento e manutenção.

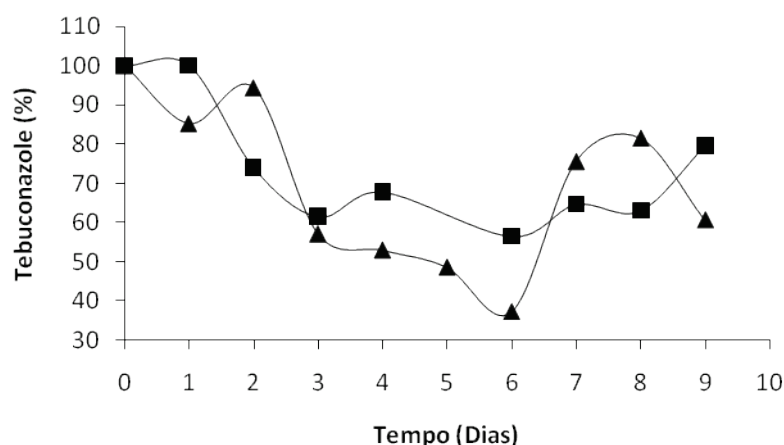


Figura 14. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 2-2. (▲) perfil da degradação de tebuconazole em seleção de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio utilizando as cepas TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04, selecionadas a partir de experimento de seleção de microrganismos. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Até o presente momento, não foram publicados resultados sobre a biodegradação de tebuconazole com bactérias. Os únicos resultados encontrados são provenientes de uma tese de doutorado de autoria de Obanda (2008), na qual foram realizados estudos de biodegradação do xenobiótico em questão com uma cepa de *Pseudomonas fluorescens*. Obanda (2008) avaliou a degradação de tebuconazole por *P. fluorescens* em meio LB contendo 20 mg.L<sup>-1</sup> do xenobiótico e observou que houve degradação de 10% e 70% de tebuconazole aos 6 e 21 dias de cultivo, respectivamente. Já este consórcio (grupo 2-2), composto por cepas de *E. sakazakii* e *S. marcescens*, apresentou melhor taxa de biodegradação chegando a reduzir a concentração de tebuconazole em 39% aos 6 dias de cultivo.

No experimento em que foram selecionadas três cepas do gênero *Pseudomonas* (TBZ 06, TBZ 07 e TBZ 08) e duas cepas do gênero *Enterobacter* (TBZ 05 e TBZ 09), a biodegradação foi observada apenas no período entre 4 e 6 dias de crescimento (18%). A Figura 15 demonstra a comparação dos experimentos de seleção de microrganismos e de biodegradação do consórcio microbiano composto por TBZ 05, TBZ 06, TBZ 07, TBZ 08 e TBZ 09. Nessa comparação, o consórcio bacteriano apresentou uma pequena redução na concentração de tebuconazole ao longo do período de cultivo.

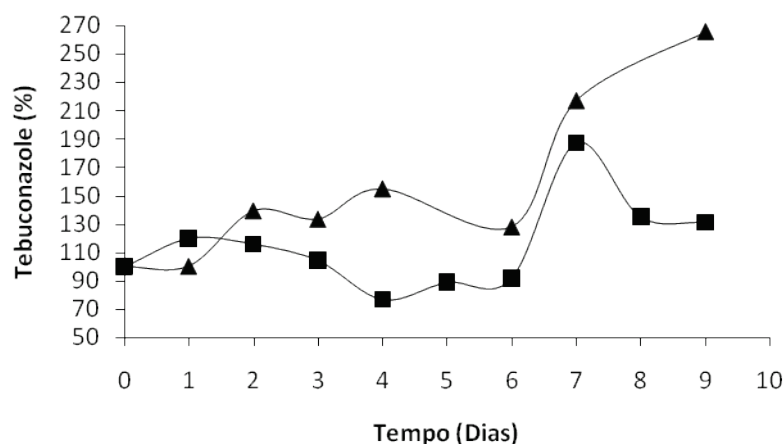


Figura 15. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 2-3. (▲) perfil da degradação de tebuconazole em seleção de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio utilizando as cepas TBZ 05, TBZ 06, TBZ 07, TBZ 08 e TBZ 09, selecionadas a partir de experimento de seleção de microrganismos. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Em experimento de biodegradação em cultura líquida (agitador horizontal), Obanda (2008) avaliou a capacidade degradadora de tebuconazole por *P. fluorescens* e observou que houve degradação de 10% aos 6 dias de cultivo. Quando comparamos os resultados obtidos, neste trabalho, pelo consórcio (grupo 2-3) que continha as cepas pertencentes ao gênero *P. fluorescens*, *P. putida* e *E. sakazakii* com os obtidos por Obanda (2008), pode-se concluir que este consórcio apresentou atividade de degradação superior aos reportados em sua tese. No mesmo período de cultivo (6 dias) o consórcio 2-3 apresentou uma redução na concentração de tebuconazole de 18% enquanto que nos experimentos realizados por esta pesquisadora a cepa de *P. fluorescens* foi capaz de reduzir 10% da concentração inicial de tebuconazole. É importante ressaltar que a concentração inicial de tebuconazole utilizada

nestes experimentos de biodegradação foi de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , cinco vezes maior que as utilizadas por Obanda.

Quando os dois isolados provenientes da seleção do grupo 3-2 pertencentes ao gênero *Serratia* (TBZ 10 e TBZ 11) foram incubados para degradação de tebuconazole, foi observada uma pequena biodegradação nas primeiras 24 horas de cultivo (8%). A partir daí, não foi observada degradação de tebuconazole até o final do cultivo (Figura 16).

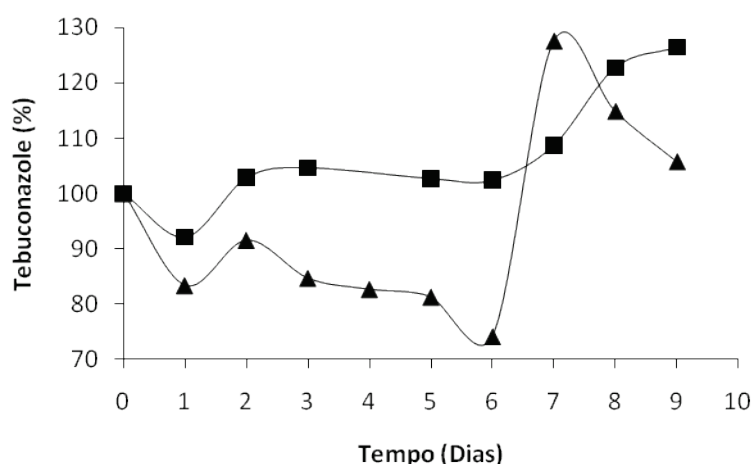


Figura 16. Comparação dos perfis de biodegradação do tebuconazole em cultura líquida por bactérias provenientes do Grupo 3-2. (▲) perfil da degradação de tebuconazole em seleção de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio utilizando as cepas TBZ 10 e TBZ 11, selecionadas a partir de experimento de seleção de microrganismos. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Como houve uma pequena redução na concentração de tebuconazole pelos isolados provenientes dos grupos 2-2 e 3-2, acredita-se que alguns desses isolados possa ter perdido a capacidade de degradá-lo, já que as condições de cultivo utilizadas eram as mesmas.

Embora o gênero *Pseudomonas* seja muito citado em estudos de biodegradação de diversos xenobióticos, para degradação de tebuconazole, o consórcio avaliado não se mostrou eficiente. Estudos de degradação de xenobióticos mostram que a capacidade de degradar esses compostos muitas vezes é atribuída a plasmídeos. Foi reportado que genes catabólicos, incluindo muitos envolvidos na degradação de compostos organoclorados também são expressos em plasmídeos (NEILSON, 1990). Serdar et al. (1982) demonstraram que, em *Pseudomonas diminuta*, a capacidade de hidrolisar o herbicida Paration foi perdida quando o plasmídeo que esta carregava foi eliminado. Estudos realizados com uma cepa de *Pseudomonas* sp. que apresentava instabilidade na degradação de atrazina mostraram que os genes responsáveis pela capacidade de degradação do composto estavam inseridos em um plasmídeo, e que este era perdido quando o microrganismo não estava sob pressão de seleção (SOUZA et al., 1998).

Quando todos os isolados foram cultivados em consórcio, a concentração de tebuconazole diminuiu apenas 16% durante os 9 dias de cultivo. Como a quantidade de inóculo é a mesma para todos os isolados em consórcio, e somente o grupo 2-2 apresentou degradação de tebuconazole, é possível que a quantidade de inóculo de células capazes de degradar o xenobiótico tenha sido muito baixa para apresentar maiores valores de degradação (Figura 17).

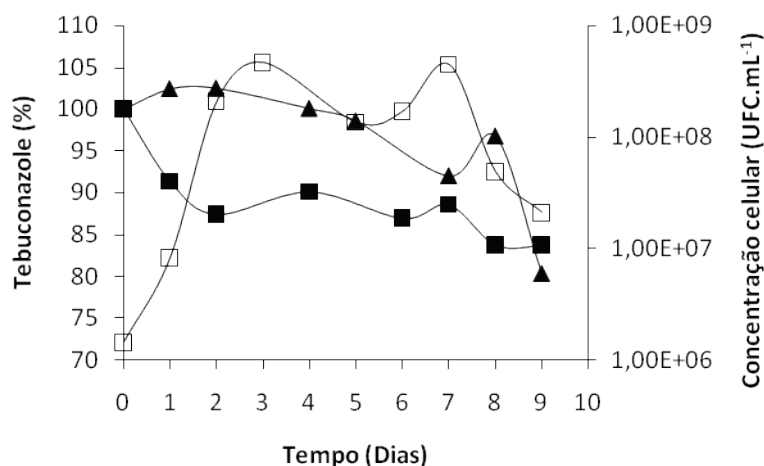


Figura 17. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em consórcio bacteriano contendo 11 isolados provenientes de solos contaminados. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Os microrganismos pertencentes ao grupo 2–2, que apresentaram melhores resultados de biodegradação, foram submetidos a experimentos referentes à tolerância a altas concentrações de tebuconazole e avaliação de crescimento, em diferentes temperaturas e concentrações de co-substrato (glicose), e biodegradação. Esses microrganismos, pertencentes aos gêneros *Serratia* e *Enterobacter* (família Enterobacteriaceae), são encontrados em uma grande diversidade de ambientes. Além de serem citados em estudos de biodegradação, produção de enzimas e de pigmentos, também são bastante referenciados como causadores de doenças em seres humanos. As bactérias pertencentes à espécie *Serratia marcescens* são encontradas em amostras ambientais e possuem uma ampla variedade de hospedeiros, atuando como fixadores de nitrogênio em vegetais (GYANESHWAR et al., 2001), patógenos de animais (CONNICK Jr et al., 2001) e patógenos de fungos fitopatogênicos

(SOMEYA et al., 2000). Nas últimas décadas têm sido identificadas como patógenos oportunistas em seres humanos (KURZ et al., 2003; GIRI et al., 2004). *Enterobacter sakazakii* é uma bactéria encontrada em diversos ambientes, como solo, água, alimentos e resíduos ambientais (GALPERIN, 2007; KIM & BEUCHAT, 2005). Também é causadora de infecções como meningite em neonatos e adultos imunodeprimidos (OH & KANG, 2004). Devido a essas características, para fins de ampliação de escala do processo da biodegradação em cultura líquida, estudos de patogenicidade devem ser realizados para avaliar a questão da biossegurança dessas cepas.

#### **4.9. Avaliação da adsorção das células inativadas ao tebuconazole**

O consórcio bacteriano selecionado para testes referentes à tolerância a altas concentrações de tebuconazole e avaliação de crescimento ainda foram submetidos a teste de adsorção das células ao tebuconazole. Não foi observada adsorção do xenobiótico às células do consórcio microbiano avaliado. Os dados indicam que os microrganismos que compõem o consórcio bacteriano são responsáveis pelo desaparecimento do tebuconazole durante o período de cultivo, já que esse não ocorre por evaporação, fotodegradação ou adsorção a células bacterianas inativadas.

#### **4.10.Determinação da tolerância do consórcio bacteriano a diferentes concentrações de tebuconazole**

Um grande problema para os estudos realizados com tebuconazole é a insolubilidade do composto puro e a turbidez que o produto comercial causa quando em contato com substâncias aquosas. Por isso, não é possível determinar crescimento celular por medidas espectrofotométricas. Devido a isso, para determinar se o tebuconazole era capaz de interferir nas atividades metabólicas do consórcio microbiano, o consumo de açúcar foi utilizado como parâmetro de metabolismo. Os isolados provenientes do grupo 2-2, que apresentou melhor perfil de biodegradação de tebuconazole, foram avaliados quanto à tolerância a diferentes concentrações de tebuconazole. Em todas as concentrações estudadas, que variaram de 100 mg.L<sup>-1</sup> a 1000 mg.L<sup>-1</sup>, não foram observadas diferenças no consumo de glicose com relação ao controle sem tebuconazole em até 48 horas de crescimento (Figura 18). Este fato indica que o consórcio bacteriano composto pelas espécies *Serratia marcescens* e *Enterobacter sakazakii* foi tolerante a concentrações iguais e inferiores a 1000 mg.L<sup>-1</sup> de tebuconazole, visto que o crescimento não foi afetado pelo xenobiótico.



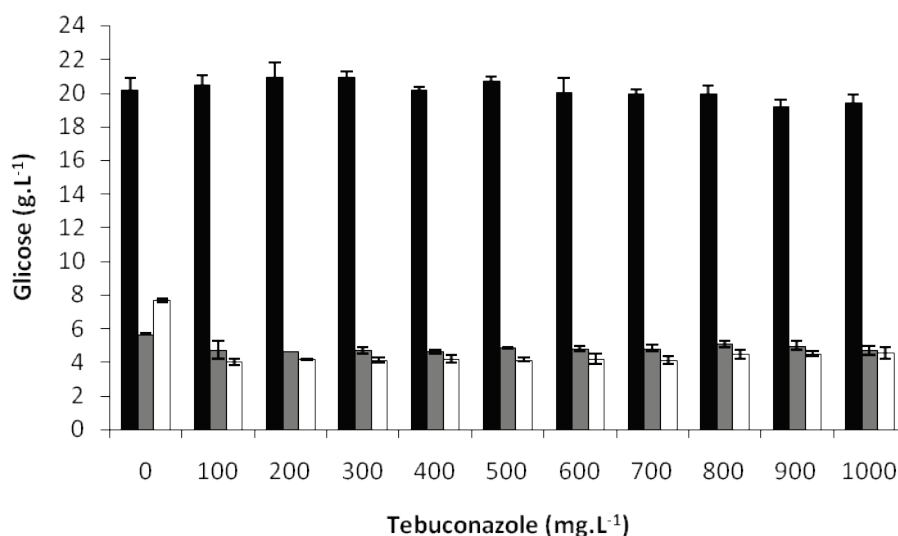


Figura 18. Perfil do consumo de glicose do consórcio bacteriano composto pelas cepas TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04, proveniente do Grupo 2-2, em meio LB modificado com diferentes concentrações de tebuconazole. Barras pretas, tempo zero; barras cinzas, 24 horas; barras brancas, 48 horas.

Poucos estudos relacionados à tolerância à Concentração Mínima Inibitória de fungicidas por bactérias foram encontrados na literatura. Em um estudo realizado para avaliar se havia possibilidade de utilizar concomitantemente um fungicida como tebuconazole e um bioinseticida, com a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, foi observado que o xenobiótico inibiu o crescimento deste microrganismo na concentração de 150 mg.L<sup>-1</sup> após 24 horas de cultivo (GASSEN et al., 2006).

#### 4.11. Avaliação de diferentes condições de cultivo para biodegradação de tebuconazole

Para avaliar se diferentes condições de cultivo influenciavam na degradação de tebuconazole pelo consórcio composto por 4 cepas

pertencentes às espécies *Enterobacter sakazakii* (TBZ 01 e TBZ 03) e *Serratia marcescens* (TBZ 02 e TBZ 04), foram definidos dois parâmetros de estudo. O primeiro parâmetro avaliado foi a concentração de glicose utilizada nos experimentos nas concentrações de  $1 \text{ g.L}^{-1}$  e  $10 \text{ g.L}^{-1}$ . O segundo parâmetro estudado foi a temperatura, já que todos os estudos anteriores tinham sido realizados a  $30^\circ\text{C}$  e esses isolados não haviam sido cultivados em outra condição, foi então avaliada a degradação de tebuconazole também a  $37^\circ\text{C}$ . Estudos variando o valor de pH não foram necessários pois este permaneceu estável ao longo de todo o cultivo, sem necessidade de correção, em todos os experimentos realizados anteriormente. Esses parâmetros foram combinados em 4 experimentos, com as seguintes condições:  $1 \text{ g.L}^{-1}$ – $37^\circ\text{C}$ ;  $10 \text{ g.L}^{-1}$ – $37^\circ\text{C}$ ;  $1 \text{ g.L}^{-1}$ – $30^\circ\text{C}$  e  $10 \text{ g.L}^{-1}$ – $30^\circ\text{C}$ . O período de incubação foi de 9 dias. A glicose foi totalmente consumida nas primeiras 24 horas de incubação em ambos os meios de cultivo ( $1 \text{ g.L}^{-1}$  e  $10 \text{ g.L}^{-1}$ ) (dados não reportados). A Figura 19 apresenta o perfil de crescimento e degradação de tebuconazole em meio de cultivo contendo  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ . Foi observado que houve degradação de 39% de tebuconazole.

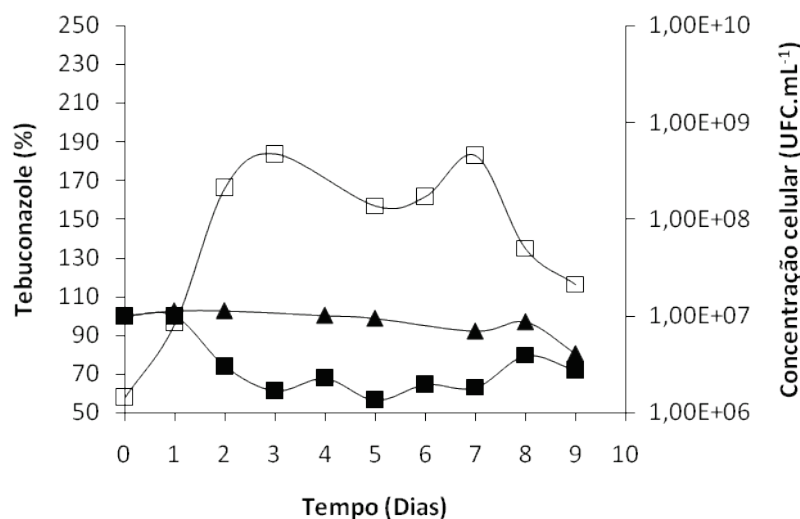


Figura 19. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose a  $30^\circ\text{C}$  do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Quando o consórcio bacteriano foi submetido a concentração de  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , não foi observada a biodegradação do tebuconazole (Figura 20). Embora a concentração celular tenha aumentado com relação ao cultivo com apenas  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose (máximo de  $4,5 \times 10^8 \text{ UFC.ml}^{-1}$  para  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose e máximo de  $1,68 \times 10^9$  para  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose), a alta concentração celular não parece ter relação com a degradação de tebuconazole. Os dados sugerem que é necessária a privação de fonte de carbono para que a degradação de tebuconazole seja favorecida.

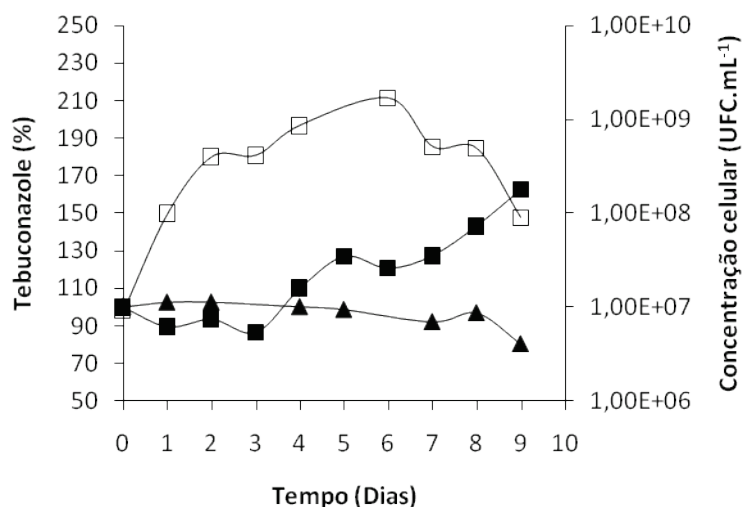


Figura 20. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose a  $30^\circ\text{C}$  do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Quanto à temperatura, pode-se afirmar que  $37^\circ\text{C}$  não favoreceu a degradação de tebuconazole, independentemente da concentração de glicose presente no meio. Não foi observada degradação nos tratamentos em que foi aplicada a temperatura de  $37^\circ\text{C}$  (Figuras 21 e 22).

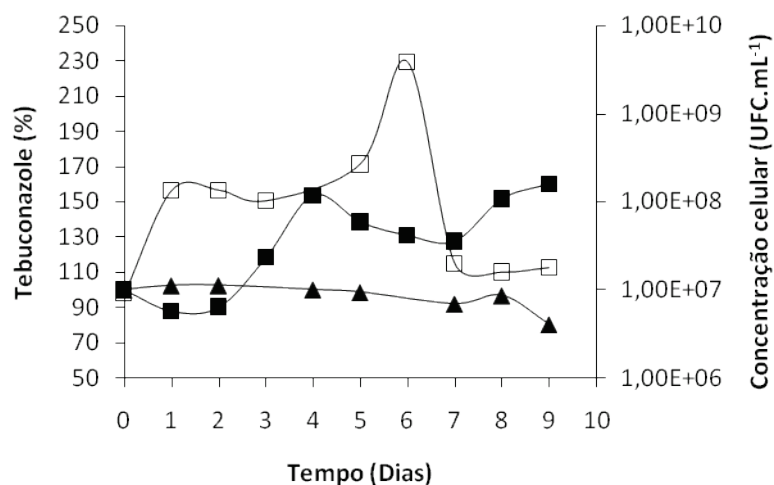


Figura 21. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose a  $37^\circ\text{C}$  do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Foi observada diferença na concentração celular entre os tratamentos submetidos à temperatura de  $37^\circ\text{C}$ . No cultivo em que a concentração de glicose foi de  $10 \text{ g.L}^{-1}$ , a concentração celular não passou de  $3,3 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ , enquanto que no tratamento com apenas  $1 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose, a concentração celular chegou a  $3,87 \times 10^9 \text{ UFC.mL}^{-1}$ . Os dados indicam que a temperatura mais adequada para crescimento e biodegradação de tebuconazole nas condições estudadas foi de  $30^\circ\text{C}$ .

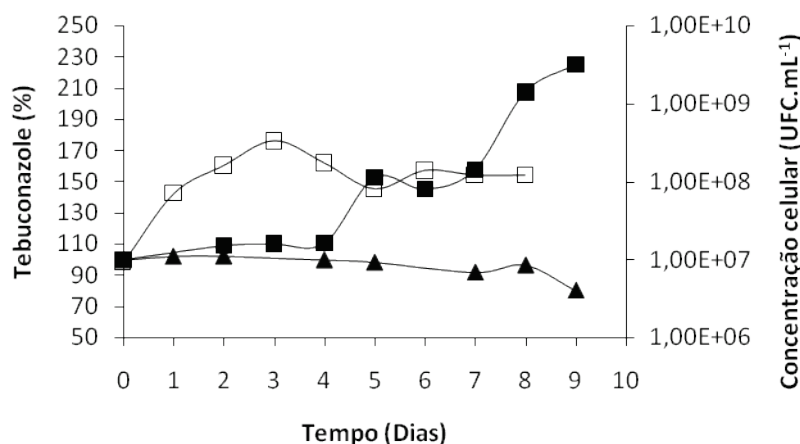


Figura 22. Perfil de crescimento e desaparecimento do tebuconazole em cultura líquida contendo  $10 \text{ g.L}^{-1}$  de glicose a  $37^\circ\text{C}$  do consórcio microbiano composto por TBZ 01, TBZ 02, TBZ 03 e TBZ 04. (▲) concentração de tebuconazole em meio de cultura controle, na ausência de microrganismos; (■) concentração de tebuconazole em meio de cultura na presença de microrganismos; (□) concentração celular. A porcentagem de tebuconazole refere-se à variação em relação à concentração inicial.

Alguns estudos relatam a relação de biodegradação de xenobióticos com a concentração celular bacteriana. Um estudo de biodegradação de metilparation em cultura líquida por um consórcio bacteriano que continha *Enterobacter sakazakii*, não foi observada relação entre o crescimento celular e a degradação do pesticida, já que o pico de crescimento do consórcio foi observado em 7 dias de crescimento, porém, as maiores porcentagens de degradação do xenobiótico foram observadas nos quatro primeiros dias de crescimento somente (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2001). Berne et al. (2004) observaram em um estudo de degradação de tributil fosfato por *Serratia odorifera* que, em cultura líquida, a biodegradação desse composto ocorreu durante o crescimento exponencial, quando o meio de cultivo continha 1 mM de glicose, sugerindo que a degradação de tributil fosfato por *Serratia odorifera* poderia ocorrer em uma via de co-metabolismo. Não foram encontrados na

literatura relatos que relacionem a temperatura de cultivo com a eficiência de degradação por xenobióticos.

## 5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir que é possível isolar microrganismos (bactérias e fungos) resistentes a tebuconazole a partir de solos contaminados com triazóis.

Fungos com histórico ou não de aplicação de tebuconazole podem apresentar resistência a esse fungicida. No entanto, a quantidade de fungos isolados a partir de solos contaminados com fungicidas do grupo dos triazóis é inversamente proporcional à concentração de pesticida aplicada. Embora cepas resistentes tenham sido isoladas, nenhuma foi capaz de degradar tebuconazole. Essa característica pode ser explicada pela ausência de fenoloxidasas em todas as cepas estudadas.

Consórcios bacterianos isolados a partir de solos contaminados com triazóis demonstraram a capacidade de degradar tebuconazole. O melhor perfil de degradação foi observado no consórcio bacteriano composto por 2 cepas da espécie *Enterobacter sakazakii* e por 2 cepas da espécie *Serratia marcescens*, com 39% de degradação do fungicida. Outros 7 isolados pertencentes a essas espécies e a *Pseudomonas fluorescens* e *P. putida* apresentaram atividade de biodegradação, porém essa característica foi perdida durante os estudos de biodegradação.



Entre os estudos realizados com diferentes condições de cultivo para degradação de tebuconazole, o cultivo em que o consórcio foi mantido a 30°C e 1 g.L<sup>-1</sup> de glicose foi o único que apresentou degradação, indicando que concentrações maiores deste açúcar não favorecem a biodegradação por *S. marcescens* e *E. sakazakii* em cultivo submerso, sugerindo que é necessária a privação de fonte de carbono para promover a degradação.

Concentrações de até 1 g.L<sup>-1</sup> de tebuconazole não influenciaram no metabolismo do consórcio bacteriano utilizado para degradação de tebuconazole no consórcio composto por *S. marcescens* e *E. sakazakii*, indicando que esse consórcio tolera altas concentrações de tebuconazole.

## 6. PERSPECTIVAS

Considerando o fato de que somente uma publicação a respeito da degradação de tebuconazole foi encontrada, e que este trabalho é o início de uma linha de pesquisa e que muitas questões não foram respondidas devido à indisponibilidade de tempo durante o período de mestrado, projetam-se realizar alguns trabalhos futuros. Estes consistem na otimização de condições de cultivo para a degradação de tebuconazole; o estudo da capacidade de biodegradação de tebuconazole em meio de cultivo utilizando somente tebuconazole como fonte de carbono; o estudo da biodegradação de tebuconazole em concentrações de até  $1 \text{ g.L}^{-1}$  deste xenobiótico; e a avaliação das rotas metabólicas utilizadas para a degradação do xenobiótico. Essas rotas, se elucidadas, poderiam propiciar os trabalhos de identificação das seqüências gênicas envolvidas na biodegradação e à clonagem molecular com vistas a possíveis aplicações de microrganismos potencializados em sistemas de recuperação ambiental (solos contaminados) ou em tratamentos de efluentes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKALLAL, R. et al. Inheritance and mechanisms of resistence to tebuconazole, a sterol C14-demethylation inhibitor, in *Necria haematococca*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Amsterdam. v. 60, p. 147-166. 1998.

AZADPOUR, A. et al. Use of lignin degrading fungi in bioremediation. **Remediation Journal**, Oxford.v. 7. p. 25-49. 1997.

BERNE, C. et al. Tributyl phosphate degradation by *Serratia odorifera*. **Biotechnology Letters**, Leiden. V. 26. p. 681-686. 2004.

BOXALL, A. B. A. et al. When synthetic chemicals degrade in the environment. **Environmental Science & Technology**, Washington. p. 368A – 375A. 2004.

BRADLEY, S. N. et al. Biodegradation of agricultural chemicals. In: HURST, C. J. ed. **Manual of Environmental Microbiology**, Oxford. p. 815. 1997.

Brasil. **Lei Federal 7.082, de 12 de julho de 1989**. Legislação Federal de agrotóxicos e afins. Disponível em <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=163>>. Acesso em 12 jan. 2009.

CALZA, P. High-performance liquid chromatographic/tandem mass spectrometric identification of the phototransformation products of tebuconazole on titanium dioxide. **Journal of Mass Spectrometry**, Oxford. v. 37. p. 566 – 576. 2002.

CHAPALAMAGUDU, S.; CHAUDHRY, G. R. Hydrolysis of carbaryl by a *Pseudomonas* sp. and construction of a microbial consortium that completely metabolizes carbaryl. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 57. p. 744-750. 1991.

CHAPLIN, M. F. Monosaccharides. In: Chaplin M.F.; Kennedy, J.F. (eds). **Carbohydrate Analysis**. IRL Press, Oxford. p. 1 - 3. 1986.

CIULLINI, I. et al. Fungal laccase, cellobiose dehydrogenase, and chemical mediators: Combined actions for the decolorization of different classes of textile dyes. **Bioresource Technology**, Amsterdam. v. 99. p. 7003-7010. 2008.

CONNIC JR, W. J. et al. Increased mortality of *Coptotermes formosanus* (Isoptera: Rhinotermitidae) exposed to eicosanoid biosynthesis inhibitors and *Serratia marcescens* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). **Environmental Entomology**, Lanham. v. 30. p. 449 – 455. 2001.

CYCONÍ, M. et al. Microbiological characteristics of a sandy loam soil exposed to tebuconazole and *k*-cyhalothrin under laboratory conditions. **Ecotoxicology**, Leiden. v. 15. p. 639 – 646. 2006.

DAMS, R. I. Pesticidas: usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, Joinville. v. 7. p. 37- 44. 2006.

DÉLYE, C. et al. A mutation in the 14 $\alpha$ -demethylase gene of *Uncinula necator* that correlates with resistance to a sterol biosynthesis inhibitor. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 63. p. 2966-2970. 1997.

DIAMANTOPOULOU, P. et al. Effect of famoxadone, tebuconazole and trifloxystrobin on *Agaricus bisporus* productivity and quality. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam. v. 109. p. 190 – 195. 2006.

ELSAS, J. D. & SMALLA, K. Methods for sampling soil microbes. In: HURST, C. J. ed. **Manual of Environmental Microbiology**, Oxford. p. 383-390. 1997.

FORTES NETO, P. Microbiota do solo como indicadora da poluição do solo e do ambiente. In: SILVEIRA, A. P. D.; FREITAS, S. S. **Microbiota do solo e qualidade ambiental**. Instituto Agrônômico. 312 p. 2007.

FULLERTON, R. A. et al. Use of demethylation inhibiting fungicides (DMIs) for the control of onion white rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in New Zealand. **New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science**. v. 23 p. 121-125, 1995.

GALPERIN, M. Y. Some bacteria degrade explosives, others prefer boiling methanol. **Environmental Microbiology**, Oxford. v. 9. p. 2905 – 2910. 2007.

GARLAND, S. M. et al. The dissipation of tebuconazole and propiconazole in boronia (*Boronia megastigma* Nees). **J. Agric. Food Chem**, Washington. v. 52. p. 6200-6204. 2004.

GASSEN, M. H. et al. Avaliação da compatibilidade de fungicidas e inseticidas com a bactéria entomopatogênica *Bacillus thuringiensis*, em laboratório. **19<sup>a</sup> RAIB. Anais.** São Paulo. 2006.

GEETHA, M; FULEKAR, M. H. Bioremediation of pesticides in surface soil treatment unit using microbial consortia. **African Journal of Environmental Science and Technology**, Washington. v. 2. p. 036-045. 2008.

GIRI, A. V. et al. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. **BMC Microbiology**, Leiden. v. 4. p. 4 – 11. 2004.

GONÇALVES, I. C. R. et al. Effect of paclobutrazol on microbial biomass, respiration and cellulose decomposition in soil. **European Journal of Soil Biology**, Amsterdam. inpress. 2009.

GYANESHWAR, P. et al. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. **Journal of Bacteriology**, Washington. v. 183. p. 2634 – 2645. 2001.

HATVANI, L. et al. Production of *Trichoderma* strains with pesticide-polyresistance by mutagenesis and protoplast fusion. **Antonie van Leeuwenhoek**, Leiden. v. 89, p. 387-393. 2006.

HOF, H. Critical Annotations to the Use of Azole Antifungals for Plant Protection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington. v. 45. p. 2987–2990. 2001

HU, M. et al. Selective solid-phase extraction of tebuconazole in biological and environmental samples using molecularly imprinted polymers. **Anal. Bioanal. Chem**, Leiden.v. 387. p. 1007-1016. 2007.

HUSSAR, G. J. et al. Ensaio para a determinação de dosagem tóxica do fungicida tebuconazole (Folicur 200 CE) sobre alevinos e juvenis de tilápia (*Tilapia rendalli*) e de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Eng. Ambient.** v. 1. p. 035-044. 2004.

JOSEPHSON, K. L. et al. Cultural methods. In: MAIER, R. M. et al. **Environmental Microbiology**. Elsevier. p. 213. 2000.

KAMRIN, M. A. Triazines and triazoles. In: **Pesticide profiles: toxicity, environmental impact, and fate**. Lewis Publishers. 2000.

KIM, H.; BEUCHAT, L. R. Survival and Growth of *Enterobacter sakazakii* on Fresh-Cut Fruits and Vegetables and in Unpasteurized Juices as Affected by Storage Temperature. **Journal of Food Protection**, Lawrence. v. 68. p. 2541 – 2552. 2005.

KURZ, C. L. et al. Virulence factors of the human opportunistic pathogen *Serratia marcescens* identified by in vivo screening. **The EMBO Journal**. v. 22. p. 1451 – 1460. 2003.

LACAYO-ROMERO, M. et al. A toxaphene-degrading bacterium related to *Enterobacter cloacae*, strain D1 isolated from aged contaminated soil in Nicaragua. **Systematic and Applied Microbiology**, Oxford. v. 28. p. 632-639. 2005.

LOUREIRO, E. S. et al. Efeito de produtos fitossanitários químicos utilizados em alface e crisântemo sobre fungos entomopatogênicos. **Neotropical Entomology**. v. 31. p. 263-269. 2002.

MA, Z. et al. Overexpression of the 14 $\alpha$ -demethylase target gene (*CYP51*) mediates fungicide resistance in *Blumeriella jaapii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 72. p. 2581–2585. 2006.

MAIER, R. M.; PEPPER, I. L. Terrestrial environments. In: MAIER, R. M. et al. **Environmental microbiology**. p. 61 – 89. 2000.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. Como isolar microrganismos degradadores de moléculas xenobióticas. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. Ed. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA, p. 167-183, 1997.

MANDELBAUM, R. T. et al. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 61. p. 1451-1457. 1995.

MOSER, V. C., et al. The effects of perinatal tebuconazole exposure on adult neurological, immunological, and reproductive function in rats. **Toxicological Sciences**. v. 62. p. 339 – 352. 2001.

MOUGIN, C. et al. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 60. p. 705-708. 1994.

MOUNIER-LAMY, C.; BORDE, O. Effect of a triazole fungicide on the cellulose decomposition by the soil microflora. **Chemosphere**. v. 41. p. 1029-1035. 2000.

MOURÃO, S. A. et al. Seletividade de Defensivos Agrícolas ao Fungo Entomopatogênico *Beauveria bassiana*. **Neotropical Entomology** v. 32. p. 103-106. 2003.

NEILSON, A. H. The biodegradation of halogenated organic compounds. **Journal of Applied Bacteriology**. v. 69. p. 445-470. 1990.

NOBLES, M. K. Studies in forest pathology; identification of cultures of wood-rotting fungi. **Canadian Journal**. v. 26. p. 281-432. 1948.

OBANDA, D. N. Resistance of *Trichoderma harzianum* to the biocide tebuconazol – Proposed biodegradation pathways. **Hulzforschung**, Berlin. v. 62. p. 613 – 619. 2008.

OBANDA, D. N. Biotransformation of organic wood preservatives by micro-organisms (Tese). **Louisiana State University**. 71 p. 2008.

OGRAM, A.; FENG, X. Methods for soil microbial community analysis. In: **Manual of Environmental Microbiology**. Hurst, C.J. ed. p. 422 – 430. 1997.

OH, S. W.; KANG, D. H. Fluorogenic Selective and Differential Medium for Isolation of *Enterobacter sakazakii*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 70. p. 5692 – 5694. 2004.

OKEKE, B. C. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Leiden. v. 48. p. 563-569. 1997.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. A. et al. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. v. 17. p. 147-155. 2001.

PEREA, S. et al. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington. v. 45. n. 10. p. 2676 – 2684. 2001.

POTTER, T. L. et al. Accelerated soil dissipation of tebuconazole following multiple applications on peanut. **J. Environ. Qual.** v. 34. p. 1205-1213. 2005.

ROBBERTSE, B. et al. DMI sensivity and cross-resistance patterns or *Rhynchosporium secalis* isolates from South Africa. **Crop Protection**, Amsterdam. v. 20. p. 97-102. 2001.

RODRÍGUEZ-CUESTA, M. J. et al. Development and validation of a method for determining pesticides in groundwater from complex overlapped HPLC signal and multivariate curve resolution. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, Amsterdam. v. 77. p. 251-260. 2005.

SANCHO, E. et al. Disturbances in energy metabolism of *Daphnia magna* after exposure to tebuconazole. **Chemosphere**. v. 74. p. 1171-1178. 2009.

SERDAR, C. M. et al. Plasmid involvement in parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 44. p. 246-249. 1982.

SILVA, T. M., et al. Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from brazilian contaminated soil. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 38. p. 522 – 525. 2007.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S. Biodegradação de fungicidas benzimidazóis. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. Ed. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA. p. 149, 1997.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. In: Melo, I. S. & Azevedo, J. L. Ed. **Microbiologia Ambiental**. Jaguariúna, EMBRAPA-CNPMA. p. 67-79, 1997.

SILVA, C. M. M. S. et al. Degradação do paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 38. p. 1223-1227. 2003.



SINDAG. **Mercado de defensivos: Câmara Temática de Insumos Agropecuários**. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/upload/Vendas\\_janeirooutubro.ppt](http://www.sindag.com.br/upload/Vendas_janeirooutubro.ppt)>. Acesso em 15 de fev. 2009.

SOMEYA, N. et al. Biological control of cyclamen soilborne diseases by *Serratia marcescens* strain B2. **Plant Disease**. v. 84. p. 334 - 340. 2000.

SOUZA, M. L. et al. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington. v. 64. p. 2323-2326. 1998.

SPADOTTO, C. A. Classificação do impacto ambiental. **Comitê do Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas**, 2002.

TEIXEIRA, A. C. S. C. et al. Photo-Fenton Remediation of Wastewaters containing agrochemicals. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v. 48. p. 207-218. 2005.

TOMASINI, A. et al. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Leiden. v. 17. p. 201-205. 2001.

TULLY, D. B. Gene expression profiling in liver and testis of rats to characterize the toxicity of triazole fungicides. **Toxicology and Applied Pharmacology**, Amsterdam. v. 215. n. 3. p. 260 – 273. 2006.

WHITE, T. C. et al. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington. v. 11. p. 382 – 402. 199

## APÊNDICE 1

### **Características físico-químicas do tebuconazole**

Fórmula:  $C_{16}H_{22}N_3OCl$

Peso molecular: 307,82

Estado físico: sólido

Forma: cristais

Cor: branco

Ponto de fusão: 102,4°C

Limites de explosividade: produto não explosível

Densidade a 26°C: 1,25

Solubilidade a 20°C: água, 0,036 g.L<sup>-1</sup>; n-hexano, 0,1 g.L<sup>-1</sup>; diclorometano, 200 g.L<sup>-1</sup>; isopropanol e tolueno, 50 – 100 g.L<sup>-1</sup>.

Estabilidade: estável à temperatura ambiente e ao ar.

Produtos perigosos de decomposição: a queima produz CO, CO<sub>2</sub>, óxidos nitrosos, cloretos e compostos orgânicos não identificáveis.

### **Características de Orius 250 EC**

Composição de princípio ativo: tebuconazole 250 g.l<sup>-1</sup>.

Composição de ingredientes inertes: não informado pelo fabricante.

Tipo de formulação: concentrado emulsionável.

## APÊNDICE 2

### Composição dos meios de cultivo utilizados no trabalho (g.L<sup>-1</sup>)

#### Meios de cultura sólidos e semi-sólidos:

**AEM** - Ágar extrato de malte: ágar, 20; extrato de malte, 20; extrato de levedura, 7.

**AN** - Ágar nutriente: ágar, 20; peptona de gelatina, 50; extrato de carne, 30; cloreto de sódio, 10.

**ABD** - Ágar batata dextrose: ágar, 20; caldo de batata dextrose; 24.

**AMN**- Merlin-Norkrans: ágar, 15; glicose, 5; extrato de malte, 2; extrato de levedura, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15; (NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>, 0,25.

**AMNT** - Merlin-Norkrans adicionado de tebuconazole: ágar, 15; glicose, 5; extrato de malte, 2; extrato de levedura, 1; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,15; (NH<sub>4</sub>)HPO<sub>4</sub>, 0,25; tebuconazole, 0,1.

**ALB** - Luria Bertani modificado: ágar, 20; glicose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5.

**SIM** (pH 7,3) - Sulfeto de hidrogênio, indol e motilidade: ágar, 3,5; peptona de caseína, 20; peptona de carne, 6,1; sulfato de ferro e amônio, 0,2; tiosulfato de sódio, 0,2.

**MIO** - Motilidade Indol Ornitina: ágar, 2; caseína enzimática hidrolisada, 10; digestão peptídica de tecido animal, 10; extrato de levedura, 3; hidrocloreto de L-ornitina, 5; dextrose, 1; bromocresol púrpura, 0,02.

**Ágar MacConkey** (pH 7,1) : peptona de caseína, 17; peptona de carne, 3; cloreto de sódio, 5; lactose, 10; mistura de sais biliares, 1,5; vermelho neutro, 0,03; cristal violeta, 0,001; ágar, 13,5;

**TSI** - Tríplice Açúcar Ferro: ágar, 15; digestão péptica de tecido animal, 20; glicose, 1; cloreto de sódio, 5; extrato de levedura, 3; extrato de carne, 3; tiosulfato de sódio penta hidratado, 0,3; lactose, 10; sulfato ferroso hepta hidratado, 0,2; vermelho de fenol, 0,024; sacarose, 10.

**DNase**: ágar, 15; hidrolisado de caseína, 15; proteína de soja digerida, 5; DNA, 2; NaCl, 5.

**Descarboxilase Base Moeller**: ágar, 15; digestão péptica de tecido animal, 5; extrato de levedura, 3; glicose, 1; bromocresol púrpura, 0,02; L-arginina, 5; ou L-lisina, 5;.

**Ágar citrato de Simmon** (pH 6,9): ágar, 15;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,2;  $NH_4H_2PO_4$ , 1;  $K_2HPO_4$ , 1;  $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , 2; NaCl, 5; Azul de bromotimol, 0,08.

#### **Meios de cultura líquidos:**

**LB** - Luria Bertani modificado: glicose, 20; peptona, 10; extrato de levedura, 5; NaCl, 5.

**MNT** - Merlin-Norkrans adicionado de tebuconazole: glicose, 5; extrato de malte, 2; extrato de levedura, 1;  $KH_2PO_4$ , 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0,15;  $(NH_4)HPO_4$ , 0,25.

**MNT** - Merlin-Norkrans adicionado de tebuconazole: glicose, 5; extrato de malte, 2; extrato de levedura, 1;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,5;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,15;  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$ , 0,25; tebuconazole, 0,1.

**MMT** - meio mineral (pH 7,0):  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , 4.2;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 2;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.2;  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.012;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0.003;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.003;  $\text{CoCl}$ , 0.001; glicose, 1; tebuconazole, 0,1.

**Caldo nutriente:** caldo nutriente, 8; glicose, 10.

**Caldo nitrato** (ph 7): extrato de carne, 3; peptona de carne, 5; nitrato de potássio, 1.

**Caldo uréia** (pH 6,8): extrato de levedura, 0,1; fosfato monopotássico, 9,1; fosfato dipotássico, 9,5; uréia, 20; vermelho de fenol, 0,01.

**Caldo malonato:** extrato de levedura, 1; glicose, 0,25; sulfato de amônia, 2; fosfato dipotássico, 0,6; fosfato monopotássico, 0,40; cloreto de Sódio, 2; malonato de sódio, 3; azul de bromotimol, 0,025.

**Caldo gelatina:** extrato de carne, 3; peptona, 5; gelatina, 120.