



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Tássia Chiachio Egea

Estudo do potencial de degradação do herbicida diuron e seus
metabólitos por bactérias isoladas de solo de canavial

São José do Rio Preto
2014

Tássia Chiachio Egea

Estudo do potencial de degradação do herbicida diuron e seus
metabólitos por bactérias isoladas de solo de canavial

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes

São José do Rio Preto
2014

Egea, Tássia Chiachio.

Estudo do potencial de degradação do herbicida diuron e seus metabólitos por bactérias isoladas de solo de canavial / Tássia Chiachio Egea. – São José do Rio Preto, 2014

119 f. : il., tabs.

Orientador: Eleni Gomes

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia industrial. 2. Herbicidas - Biodegradação. 3. Diuron. 4. Bactérias. 5. Microorganismos do solo. 6. Células imobilizadas. I. Gomes, Eleni. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 663.1

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Tássia Chiachio Egea

Estudo do potencial de degradação do herbicida diuron e seus metabólitos por bactérias
isoladas de solo de canavial

Tese apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutor em Microbiologia,
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia, do Instituto de Biociências,
Letras e Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”,
Campus de São José do Rio Preto.

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Eleni Gomes
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a Maricy Raquel Lindenbah Bonfá
UFGD – Dourados

Prof. Dr. Dávila de Souza Zampieri
USP – Piracicaba

Prof. Dr. Mauricio Boscolo
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Marcelo de Freitas Lima
UNESP – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
12 de dezembro de 2014

Agradecimentos

Agradeço imensamente a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho, em especial:

À Professora Eleni Gomes, pela orientação, dedicação e paciência em me ensinar e escutar durante os sete anos que trabalhamos juntas.

Ao Professor John Parsons por aceitar a co-orientação deste trabalho e por proporcionar uma das melhores experiências da minha vida em estudar e desenvolver este projeto na Universidade de Amsterdã.

Aos colaboradores da Açucareira Virgolino de Oliveira pela permissão e auxílio na coleta das amostras de solo para o desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro;

Aos queridos amigos de bancada Bruna, Angélica, Fernando e Erik, meus sinceros agradecimentos pela amizade, carinho, ajuda nas horas de sufoco, bate-papo nos cafés da tarde, e principalmente a paciência em aguentar minhas crises em épocas de relatório.

Aos colegas de laboratório, Diego, Josiane, Pedro, Gisele, Ariane, Priscila, Sidney, Débora, Janaína, Rafaela, Bruna Lima, Cecília, Christiane, Guillermo, Tatiana, pela troca de experiências, e principalmente paciência com minha presença nas horas práticas de trabalho.

À querida técnica Dani, pelo auxílio nas análises finais deste trabalho.

Aos pesquisadores do laboratório ThoMSon, pelo auxílio nas análises cromatográficas.

Aos queridos professores Maurício Boscolo e Eduardo Alves de Almeida pela atenção dedicada às minhas dúvidas analíticas.

Ao Professor André Rodrigues por partilhar de sua sabedoria, pela parceria nos trabalhos e pelo auxílio em minha primeira publicação.

À minha querida Família, que sempre me apoiou e acreditou em minha carreira acadêmica.

Ao meu querido companheiro Vinicius, por todo carinho e companheirismo durante esse último ano de doutorado.

RESUMO

Bioprospectar microrganismos a partir de ambiente impactado por xenobiótico e expô-los a um contaminante alvo, sob condições controladas, proporciona um estudo detalhado da capacidade microbiana local em se adaptar, sobreviver e remediar o ambiente. A proposta do presente trabalho foi isolar bactérias com potencial em degradar o herbicida diuron de solo com histórico de cinco anos de aplicação desse herbicida, sendo o meio de isolamento composto por glicose (controle) e diuron (meio indutor), separadamente, como fonte de carbono. Foram isoladas 400 bactérias, sendo 68% gram-positivas e 32% gram-negativas. A maioria dos isolados mostrou potencial em degradar entre 10 a 30% do herbicida em cinco dias de cultivo em meio líquido, entretanto bactérias dos gêneros *Stenotrophomonas* e *Bacillus* foram capazes de degradar 87% e 68%, respectivamente. Variações no meio de cultivo mostraram a importância da presença de fonte de carbono mais facilmente assimilável para o desenvolvimento da habilidade bacteriana em degradar o diuron. Células bacterianas imobilizadas em alginato-Ca não apresentaram aumento relevante na taxa de degradação de diuron. Entretanto, técnicas de microcosmos (solo) mostraram-se eficientes no aumento do potencial de degradação do herbicida. Condições de consórcio microbiano na presença de bactérias e fungos foram os ensaios que apresentaram as maiores porcentagens de degradação do herbicida diuron, tanto no cultivo de células em meio líquido, imobilizadas e microcosmo. A degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas permitiu o estudo da via de degradação da molécula original no ambiente, destacando a formação dos metabólitos DCPMU, DCPU, 3,4-DCA, 3,4-CAC, 4-CA, 4-CAC e Anilina. O conjunto de dados obtidos neste trabalho sugere fortemente que as bactérias presentes em solos impactados com diuron possuem o potencial em degradar o herbicida, entretanto sua completa mineralização é proporcionada pela ação em conjunto da população microbiana local.

Palavras-chave: Bactéria, Diuron, Biodegradação, Consórcio microbiano, Imobilização celular, Microcosmo.

Abstract

*Bioprospection of microorganisms from impacted environment by xenobiotic and expose them to a target contaminant, under controlled conditions, provides a detailed study of the local microbial ability to adapt, survive and remediate the environment. The purpose of this study was to isolate bacteria with potential to degrade the diuron herbicide from soil with a diuron historical application of five years. The isolation media were composed by glucose (control) and diuron (inductor means) separately as a carbon source. A number of 400 bacteria were isolated, and they were classified as 68% gram-positive and 32% gram-negative. Most isolates showed potential to degrade diuron from 10 to 30%, into five days of cultivation in liquid medium, however bacteria of the genera *Stenotrophomonas* and *Bacillus* were able to degrade 87% and 68%, respectively. Variations in the culture medium showed the importance of the presence of a carbon source easily assimilated to improve the bacteria development and ability to degrade diuron. Bacterial cells immobilized in Ca-alginate showed no significant increase in the rate of diuron degradation. However, microcosms techniques (soil) were effective in increasing the herbicidal degradation potential. Microbial consortium conditions in the presence of bacteria and fungi presented the highest herbicide diuron degradation percentages in liquid cultivation, cell immobilized and microcosm. The degradation of the herbicide diuron by bacteria allowed the degradation pathway of the parent molecule in the environment, highlighting the formation of metabolites DCPMU, DCPU, 3,4-DCA, 3,4-CAC, 4-CA, 4-CAC and aniline. The results obtained from this study strongly suggests that the bacteria present in soil impacted with diuron have the potential to degrade the herbicide, however completely mineralization is provided by the action of local microbial population.*

Keywords: *Bacteria, Diuron, Biodegradation, Microbial consortium, immobilization cells, Microcosm.*

Lista de Abreviaturas

1,2-DCB – diclorobenzeno
3,4-DCC – diclorocatecol
3,4-CAC – 3,4 dicloroacetanilida
4-CA – 4-cloroanilina
4-CAC – 4-cloroacetanilida
ACT - acetiltransferase
3,4-DCA – 3,4 dicloroanilina
DCCR – Delineamento Composto Central Rotacional
DCPMDU – 3,4-diclorofenil-3-metilideneureia,
DCPMU – 3,4-diclorofenil-3-metilureia
DCPU – 3,4-diclorofenilureia
EFS – Extração em Fase Sólida
GN – Bactérias Gram-negativas
GP – Bactérias Gram-positivas
PB – Plackett & Burman
PFC – Planejamento Fatorial Completo

Lista de Figuras

Figura 1: Fluxograma de atividades desenvolvidas no presente trabalho.	2
Figura 2: Fórmula estrutural do diuron.	7
Figura 3: Mecanismo inicial de biotransformação do herbicida diuron.	11
Figura 4: Biodegradação da molécula de 3,4-DCA pela formação dos metabólitos 1,2 DCB e diclorocatecol.	12
Figura 5: Grupo acetila ou etanoíla.	12
Figura 6: Formação do metabólito 3,4-CAC pela acetilação de 3,4-DCA.	13
Figura 7: Biodegradação da molécula de 3,4-DCA pela formação dos metabólitos 4-amino-2-clorofenol e 4-CA.	15
Figura 8: Vias de degradação microbiana da molécula de 3,4-DCA.	17
Figura 9: Área de amostragem de solo para isolamento das bactérias. A: Solo do canavial após corte da cana; B: Solo do canavial após correção e aplicação de herbicidas.	25
Figura 10: Fluxograma dos ensaios baseados no delineamento experimental.	30
Figura 11: Células bacterianas imobilizadas em esferas de alginato-Ca.	32
Figura 12: Placas de Petri contendo 20g de solo enriquecido com 50 mg.L ⁻¹ de diuron para testes de microcosmo.	33
Figura 13: Codificação das bactérias isoladas.	38
Figura 14: Crescimento das colônias bacterianas, em meio sólido, em diluições de 10 ⁻⁴ e 10 ⁻⁶	39
Figura 15: Bactérias TG selecionadas.	43
Figura 16: Bactérias TD selecionadas.	44
Figura 17: A. Superfície de resposta e B. gráfico de Pareto do efeito da glicose e do volume de inóculo na degradação de diuron.	49
Figura 18: Avaliação do crescimento das bactérias TG na presença de glicose e/ou diuron por 26 horas:	50
Figura 19: Avaliação do crescimento das bactérias TD na presença de glicose e/ou diuron por 26 horas:	51
Figura 20: Comparação da taxa de degradação de 50 mg.L ⁻¹ de diuron utilizando células bacterianas livres e imobilizadas em alginato-Ca.	53
Figura 21: Cromatograma, em HPLC, do cultivo de células imobilizadas da bactéria <i>P. aeruginosa</i> TD2.3 na presença de diuron.	54
Figura 22: Cromatograma, em HPLC, do cultivo de células imobilizadas da bactéria <i>B. cereus</i> TD4.31 na presença de diuron.	55
Figura 23: Avaliação da degradação de diuron em solo estéril (após autoclavagem) e não-estéril.	56
Figura 24: Avaliação do teor de umidade na degradação de diuron em solo não-estéril.	57
Figura 25: Tempo de retenção dos sinais cromatográficos, em HPLC, dos padrões analíticos de diuron e seus primeiros metabólitos.	59
Figura 26: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pela bactéria <i>S. acidaminiphila</i> TD4.7.	59
Figura 27: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pelo consórcio CBF (<i>S. acidaminiphila</i> TD4.7; <i>B. cereus</i> TD4.31; <i>C. elegans</i> B06; <i>A. brasiliensis</i> G08).	60
Figura 28: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pelo fungo <i>C. elegans</i> B06.	60
Figura 29: Tempo de retenção dos sinais cromatográficos, em HPLC, referente aos padrões analíticos de diuron, DCPMU, DCPU e 3,4-DCA na concentração de 8 mg.L ⁻¹	63
Figura 30: Sinais cromatográficos do diuron e metabólitos, em HPLC, gerados pela bactéria <i>A. faecalis</i> TG4.48 após cinco dias de cultivo na presença de diuron.	63
Figura 31: Obtenção dos espectros de massas, em LC-MS, dos metabólitos encontrados em análise de HPLC.	64
Figura 32: Confirmação do metabólito DCPMU, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria <i>B. cereus</i> TD4.31.	65

Figura 33: Confirmação do metabólito DCPU, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria <i>M. luteus</i> TG3.30.....	65
Figura 34: Confirmação do metabólito 3,4-DCA, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria <i>O. intermedium</i> TG3.48.....	66
Figura 35: Degradação de diuron e perfil de produção e consumo dos primeiros metabólitos. A: <i>Enterobacter</i> sp. TG1.15; B: <i>Enterobacter</i> sp. TD1.46 em meio composto de sais contendo 50 mg.L ⁻¹ de diuron.....	67
Figura 36: Taxa de degradação do metabólito 3,4-DCA pelas bactérias selecionadas em cultivo de cinco dias.....	68
Figura 37: Cromatograma e espectro de massas do metabólito 3,4-dicloroacetanilida (3,4-CAC) obtidos por LC-MS.	70
Figura 38: Cromatograma e espectro de massas do metabólito 3,4-dicloroacetanilida (3,4-CAC) obtidos por GC-MS.....	71
Figura 39: Cromatograma e espectro de massas da molécula de 4-CA formada a partir da degradação de 3,4-DCA pela bactéria <i>M. luteus</i>	72
Figura 40: Porcentagem de degradação do metabólito 4-CA pelas bactérias selecionadas.	73
Figura 41: Cromatograma e espectro de massas do metabólito anilina a partir do cultivo em 4-CA.	74
Figura 42: Cromatograma e espectro de massas do metabólito 4-cloroacetanilida a partir do cultivo em 4-CA.....	74
Figura 43: Formação da molécula de 4-CA pela degradação de 4-CAC.	75
Figura 44: Proposta de mecanismo de degradação de diuron no ambiente, por bactérias isoladas de solo de canavial.	76

Lista de tabelas

Tabela 1: Fatores que afetam diretamente o processo de biodegradação.....	5
Tabela 2: Características físico-químicas do herbicida diuron.....	8
Tabela 3: Descrição dos tipos de descloração microbiana.	14
Tabela 4: Possíveis metabólitos a partir da biodegradação do herbicida diuron.....	18
Tabela 5: Cronograma e descrição do período de amostragens.	26
Tabela 6: Descrição das fontes de carbono e aditivos presentes nos meios de isolamento.....	26
Tabela 7: Bactérias selecionadas para avaliação da degradação de diuron utilizando ferramentas estatísticas.	29
Tabela 8: Concentração das variáveis independentes para o planejamento experimental de Placket-Burmann.....	30
Tabela 9: Níveis das variáveis independentes para o planejamento PFC e DCCR.....	31
Tabela 10: Microrganismos selecionados para ensaios de microcosmo.	33
Tabela 11: Detecção analítica dos metabólitos da biodegradação do herbicida Diuron.	35
Tabela 12: Codificação dos isolados.....	39
Tabela 13: Comparação entre as cepas isoladas de acordo com a fase da cultura da cana-de-açúcar.	40
Tabela 14: Comparação entre as cepas isoladas em meios contendo glicose e diuron.	41
Tabela 15: Descrição da porcentagem de bactérias isoladas com potencial em degradar diuron.	42
Tabela 16: Identificação molecular, características macroscópicas e taxa de degradação de diuron das bactérias TG selecionadas.	43
Tabela 17: : Identificação molecular, características macroscópicas e taxa de degradação de diuron das bactérias TD selecionadas.	44
Tabela 18: Melhores condições de experimento para o planejamento PB.....	47
Tabela 19: Melhores condições de experimento para o planejamento PFC/DCCR.....	48
Tabela 20: Comparação da degradação entre os planejamentos estatísticos estudados.	52
Tabela 21: Variação da concentração, em mg.L ⁻¹ , dos primeiros metabólitos da degradação de diuron por células imobilizadas em alginato-Ca.	54

Tabela 22: Variação da concentração, em mg.L^{-1} , dos primeiros metabólitos da degradação de diuron em sistema de microcosmo, em solo não-estéril.....	58
Tabela 23: Quantidade, em mg.L^{-1} , de diuron biotransformado por bactérias isoladas de solo de canavial, em diversas técnicas de cultivo.....	61
Tabela 24: Variação das concentrações dos metabólitos do diuron pelas 370 cepas após cinco dias de cultivos. As cepas foram agrupadas de acordo com o meio no qual foram isoladas.	62
Tabela 25: Bactérias selecionadas para cultivo na presença de 3,4-DCA.....	68
Tabela 26: Distribuição potencial de degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas em meio controle.....	93
Tabela 27: Distribuição potencial de degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas em meio indutor.	93

Sumário

Introdução.....	1
1. Revisão de Literatura.....	3
1.1. Biodegradação de compostos xenobióticos: Técnicas, Fatores e Agentes.....	3
1.2. Herbicida diuron	7
1.3. Via de degradação microbiana do herbicida diuron	9
1.4. Influência do meio de cultivo no isolamento de bactérias por métodos dependentes de cultivo	18
1.5. Técnicas de imobilização, microcosmo e consórcio microbiano na degradação de xenobióticos.....	20
2. Objetivos	24
3. Materiais e Métodos	25
3.1. Amostragem de solo e isolamento de bactérias.....	25
3.2. Identificação bacteriana por técnica molecular	27
3.3. Triagem das bactérias degradadoras de diuron por cultivo submerso....	28
3.4. Otimização do meio de cultivo para avaliação da degradação do diuron pelas cepas bacterianas	29
3.5. Imobilização das células bacterianas em alginato de cálcio.....	31
3.6. Biodegradação do diuron por sistemas de microcosmo	32
3.6.1. Avaliação da degradação de diuron em sistema de microcosmo em solo estéril e solo não-estéril	34
3.6.2. Avaliação do teor de umidade na degradação de diuron em solo não-estéril	34
3.7. Métodos analíticos.....	35
3.7.1. Padrões analíticos	35
3.7.2. Preparo de amostras por extração em fase sólida (EFS)	35
3.7.3. HPLC	36
3.7.4. LC-MS	36

3.7.5. GC-MS	37
3.8. Cultivo submerso das bactérias em 3,4-DCA, 4-CA e 4-CAC para o estudo da via de biodegradação do diuron.....	37
4. Resultados e Discussão	38
4.1. Codificação e caracterização Gram das bactérias isoladas.....	38
4.2. Identificação e avaliação da degradação de diuron pelas bactérias isoladas	41
4.3. Avaliação de fatores nutricionais e ambientais na degradação do diuron pelas cepas selecionadas utilizando planejamento experimental	46
4.4. Avaliação da degradação de diuron pelas bactérias imobilizadas em alginato de cálcio e por microcosmo.....	53
4.5. Proposta de via de degradação de diuron por bactérias isoladas de solo de canavial	62
5. Considerações finais.....	78
6. Conclusões.....	78
Referências	80
Apêndice A	93
Apêndice B	94
Apêndice C	100
Anexo A – Laudo da análise do solo de amostragem utilizado no isolamento das bactérias e experimentos de microcosmo.	106

Introdução

Embora os herbicidas não sejam especificamente projetados para alterar os microrganismos do solo, tais compostos apresentam capacidade de causar efeitos diretos ou indiretos em atividades e estruturas da comunidade microbiana. De um modo geral, os microrganismos mostram uma relação dose-resposta à exposição de xenobióticos, sendo essa resposta dependente do tipo de formulação do composto (formulação comercial ou puro), concentração e tempo de exposição (CROUZET et al., 2010).

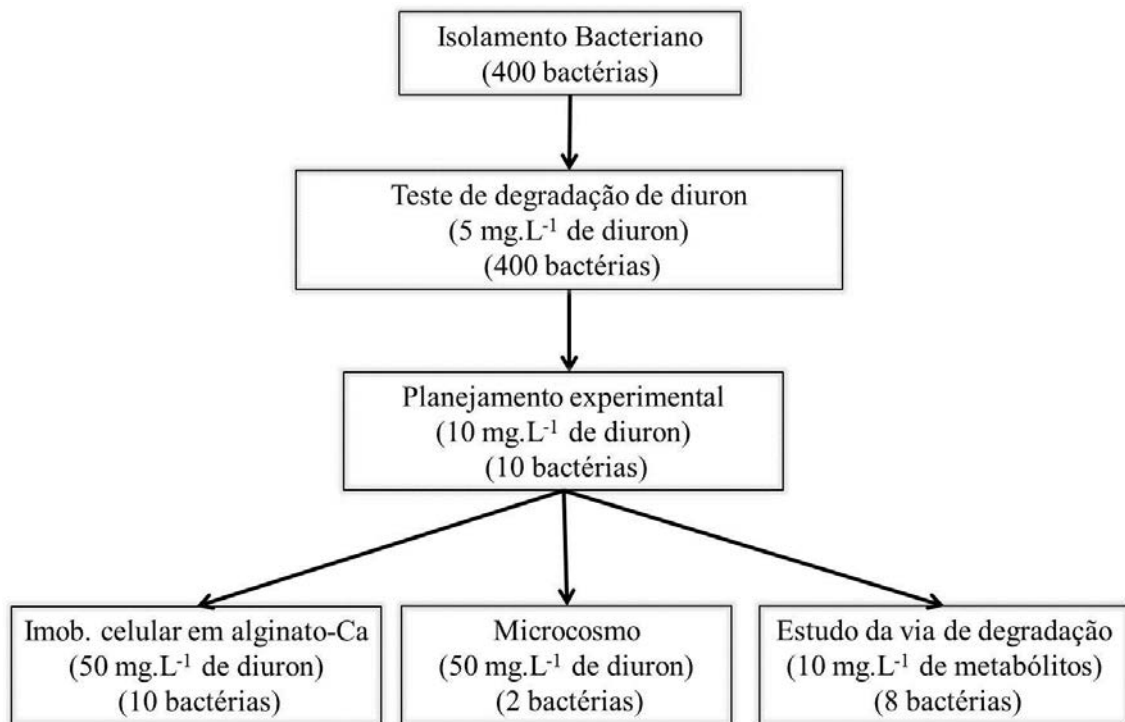
O herbicida diuron é conhecido como um xenobiótico capaz de gerar impactos negativos sobre a viabilidade e abundância bacteriana, alterando a capacidade das bactérias em mineralizar matéria orgânica e realizar nitrificação (TADONLÉKÉ et al., 2009). Por outro lado, sua presença pode proporcionar o desenvolvimento e a seleção de microrganismos tolerantes, tornando-os aptos a sobreviver e/ou degradar compostos tóxicos presentes no meio.

Embora os microrganismos possam responder positivamente à presença do diuron, este, quando presente em ambientes aquáticos, causa efeitos crônicos em peixes e invertebrados (NEBEKER, SCHUYTEMA, 1998), sendo um dos maiores responsáveis pelos impactos ambientais causados por pesticidas. Devido a sua persistência e mobilidade moderada, o diuron tem sido encontrado em diversos ecossistemas, tornando-se um dos pesticidas mais encontrados em águas superficiais e subterrâneas (IFEN, 2002).

Apesar de relatada sua persistência no ambiente e toxicidade a diversos tipos de organismos, o diuron apresenta-se, ainda, como um dos herbicidas mais utilizados na agricultura (RODRIGUES, ALMEIDA, 2005). Sendo assim, o presente trabalho dedica-se a estudar e compreender a interferência do diuron na comunidade bacteriana de solo impactado pelo mesmo, bem como analisar metodologias de degradação utilizadas pelos microrganismos, a fim reduzir a concentração desse xenobiótico em solos e águas contaminados.

Este estudo foi iniciado pelo isolamento de bactérias de solo na presença de dois meios de cultura distintos, os quais proporcionaram o isolamento de 400 cepas bacterianas, sendo a maioria classificadas como gram-positivas. Os seguintes procedimentos realizados neste trabalho estão descritos conforme fluxograma presente na figura 1.

Figura 1: Fluxograma de atividades desenvolvidas no presente trabalho.



1. Revisão de Literatura

1.1. Biodegradação de compostos xenobióticos: Técnicas, Fatores e Agentes.

Todo composto orgânico sintetizado quimicamente é potencialmente biodegradável, mesmo aqueles considerados altamente recalcitrantes. Em princípio, não existe composto orgânico de persistência infinita e, de acordo com o mesmo princípio, sempre haverá uma classe de microrganismos que apresenta o potencial metabólico, enzimático ou genético em degradar todo tipo de molécula (BATISSON et al., 2007). Entretanto, deve-se reconhecer que os microrganismos podem levar certo tempo para adquirir a capacidade em degradar novos produtos químicos introduzidos no ambiente pela tecnologia moderna.

Compostos organoclorados são considerados de elevada recalcitrância no ambiente e bactérias com potencial em obter energia a partir do consumo desses compostos têm sido encontradas ao longo das últimas duas décadas, a partir de locais contaminados. A presença desses microrganismos sugere que a natureza apresentou condições de adaptação, a longo prazo, e evolução de sistemas enzimáticos específicos para compostos clorados (LOFFLER, et al., 2003). Os microrganismos, quando em contato com uma nova molécula em seu ambiente, podem obter novos genes catabólicos necessários para a degradação do referido composto a partir de outros microrganismos através de eventos conjugacionais ou transformacionais (CHAUDHRY, CHAPALAMADUGU, 1991; REINEKE, 1986; PLAZA et al., 2001).

Embora os microrganismos possam adaptar-se e remover substâncias tóxicas do ambiente, a grande variedade de xenobióticos utilizados atualmente pode interromper o equilíbrio do ecossistema. Contudo, considerando a diversidade microbiana e catabólica existente no solo, diferentes microrganismos respondem de forma distinta aos pesticidas, sendo necessário o estudo dos mesmos quanto suas habilidades em responder positivamente à degradação do xenobiótico no meio em que se encontram.

Quando os microrganismos locais respondem de maneira positiva ao xenobiótico e atuam de maneira a consumi-lo, a biodegradação acontece (GIANFREDA et al., 2006). Microrganismos, ou ainda organismos de ordem mais elevada como as plantas (fitorremediação) e animais, podem reduzir o potencial de toxicidade de contaminantes químicos por meio da transformação, degradação, e imobilização destes compostos no

meio ambiente (VALLERO, 2010). Esta tecnologia utiliza o desenvolvimento de microrganismos específicos ou consórcios microbianos nos sítios contaminados para realizar atividades de descontaminação (KUMAR et al., 2011) e seu sucesso depende de uma abordagem interdisciplinar que envolve microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química (BOOPATHY, 2000).

Devido à biodegradação apresentada pelos microrganismos no ambiente, tal processo tem recebido uma atenção considerável no desenvolvimento de uma tecnologia eficiente, limpa e barata para o tratamento de águas residuais (LOKESHWARI, JOSHI, 2009). A principal vantagem da biorremediação é o seu custo reduzido em comparação com as técnicas convencionais, tais como a incineração. Além disso, a biorremediação é muitas vezes uma solução permanente, fornecendo transformação completa do poluente, em vez de um método de recuperação de resíduos que transfere a partir de uma fase para outra (DHANKHAR, GURIYAN, 2011).

Em processos de biorremediação, os microrganismos usam os contaminantes como nutriente ou fonte de energia. A estrutura molecular e a concentração dos contaminantes afetam fortemente a viabilidade da biorremediação, o tipo de transformação microbiana, e se o composto irá servir como um substrato primário, secundário ou cometabólico (BOOPATHY, 2000).

Os organismos podem, enzimaticamente, atacar numerosos produtos químicos orgânicos e quebrá-los em espécies químicas menos tóxicas. Dependendo do composto de interesse e as espécies que fazem o ataque, os compostos resultantes, no final do processo, podem variar substancialmente. Os produtos de biodegradação completa, isto é, mineralização, são o dióxido de carbono e a água. Em qualquer processo mais curto, a mineralização irá produzir compostos que são geralmente mais simples que o composto original, como anéis clivados e remoção de halogêneos, com características físicas e químicas diferentes (HAPEMAN-SOMICH, 1991).

Durante o processo de biodegradação, a taxa de transformação da molécula é largamente controlada pela velocidade de fornecimento de nutrientes e de oxigênio aos organismos (Tabela 1), o que torna difícil, exportar diretamente os resultados de laboratório para o ambiente. Dependendo das circunstâncias, os testes de rastreio, tais como contagem microbiológica, avaliação de enzimas e testes de respiração podem ser usados para determinar se as condições existentes são favoráveis para o crescimento microbiano e fornecer a confirmação de que a população microbiana é metabolicamente

ativa. Assim, estudos de viabilidade são essenciais e podem ter um enorme impacto sobre o custo do processo de remediação (BALBA et al., 1998).

Tabela 1: Fatores que afetam diretamente o processo de biodegradação.

Fatores	Descrição
pH	Ambientes ácidos favorecem o desenvolvimento dos fungos e neutros favorecem as bactérias. O pH do ambiente pode ser corrigido por calagem (acréscimo de calcário).
Temperatura	A temperatura afeta o metabolismo e a taxa de crescimento dos microrganismos. Na maioria dos casos, o tratamento é feito em condições mesofílicas (20 - 40°C), porém há casos de tratamentos em condições termofílicas e psicrófilas.
H₂O	A disponibilidade de água no solo é um importante fator que influencia a remediação por bactérias. Microrganismos, geralmente, necessitam de uma atividade de água (a_w) de 0.9-1.0 para crescer e metabolizar.
Nutriente	Estudos mostram a necessidade da presença de compostos como nitrogênio e fósforo na otimização da biorremediação.
Oxigênio	A aplicação de oxigênio no local de remediação aumenta a taxa de crescimento e metabolismo dos microrganismos. Muitas vezes prefere-se aplicar H ₂ O ₂ no lugar de O ₂ , pois o peróxido mostra-se sete vezes mais solúvel em água que o oxigênio e a sua decomposição catalisada por enzimas tem rendimentos no solo de 0,5 mol de O ₂ por mol de peróxido de hidrogênio introduzido na zona contaminada.

Fonte: COLLERAN, 1997.

Todos os ambientes contêm microrganismos, entretanto nem todos apresentam capacidade em degradar o contaminante alvo. Caso haja número insuficiente de microrganismos ativos no local, técnicas de adição de cultura poderão ser aplicadas (KING et al., 1998). Caso o ambiente apresente organismos metabolicamente ativos contra o xenobiótico, entretanto em baixa atividade, uma adequação das propriedades físico-químicas do meio pode ser suficiente para estimular a atividade microbiana e acelerar o processo de transformação natural do composto. Este processo é conhecido como bioestimulação e é uma das técnicas de biorremediação mais utilizadas (HEAD, 1998).

A compreensão das condições ambientais auxilia e prepara o local para a resolução do problema. Uma das distinções primárias entre os ambientes impactados como solos superficiais, zona vadosa ou águas subterrâneas é o conteúdo de matéria orgânica (MO). Solos superficiais, que recebem regularmente entradas de material orgânico a partir de plantas, possuem um conteúdo maior de MO, a qual serve como depósito de carvão e de energia, bem como uma fonte de outros macronutrientes como nitrogênio, enxofre e fósforo. O alto teor de MO é tipicamente associada a altas

contagens de microrganismos e uma grande diversidade de populações microbianas. Solos de subsuperfície, sedimentos e águas subterrâneas têm baixos níveis de matéria orgânica, sendo o número da população e diversidade microbiana mais baixa do que solos superficiais (BOOPATHY, 2000). Em geral, a adição de matéria orgânica aumenta a adsorção de pesticidas e diminui sua mobilidade no perfil do solo. Além disso, a adição de adubo orgânico ao solo resulta normalmente em um aumento na atividade microbiológica, aumentando a biodegradação de pesticidas em ambientes poluído (WORRALL et al., 2001). Os solos de baixa permeabilidade, tais como argilas, são difíceis de tratar, uma vez que os líquidos (água, solutos e nutrientes) são difíceis de ser bombeados através desses sistemas. Normalmente, a biorremediação funciona melhor em solos que são relativamente arenosos, permitindo mobilidade e maior probabilidade de contato entre o microrganismo e o contaminante (BALBA et al., 1998).

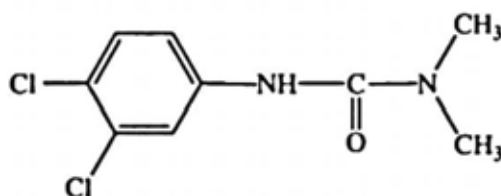
Beolchini et al. (2010) investigaram os efeitos de um fornecimento contínuo de nutrientes inorgânico e alterações de areia sobre a cinética de crescimento microbiano e a biorremediação de sedimentos portuários contaminados por hidrocarbonetos alifáticos e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Os autores observaram que os nutrientes inorgânicos estimularam o crescimento microbiano e aumentaram a biodegradação dos hidrocarbonetos de baixo e alto peso molecular, enquanto que a alteração de areia aumentou apenas a remoção de compostos de alto peso molecular. A adição simultânea de nutrientes inorgânicos e areia proporcionaram uma maior biodegradação. Esses resultados não representam uma regra geral e específica para remediação de locais contaminados com hidrocarbonetos, entretanto, o manejo usado neste trabalho pode ser uma ferramenta de apoio relevante ao projetar estratégias de biorremediação em locais semelhantes ao tratado.

Mesmo que a chance de sucesso na degradação seja baixa, é válido usar a biorremediação sempre que possível. Uma abordagem de biorremediação pode não ser adequada para todos os locais, mas quando é certa, é bastante vantajosa econômica e ambientalmente, somente sendo descartada caso o processo demore mais de dois meses e apresentar custo elevado (KING et al, 1998).

1.2. Herbicida diuron

Diuron, de nome científico 3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia e fórmula $C_9H_{10}Cl_2N_2O$ (Figura 2), é um herbicida utilizado no controle de plantas daninhas, sendo aplicado em várias culturas como cacau, batata, alho, cebola, cana-de-açúcar, algodão, abacaxi, seringueira, café, chá, entre outros (MUSUMECI et al., 1995). Pertence à família química das fenilamidas, subclasse das fenilureias, e à classe toxicológica III (medianamente tóxico), sendo facilmente absorvido através do sistema radicular das plantas e menos prontamente através das folhas e caules (GIACOMAZZI, COCHET, 2004; MONCADA, 2005).

Figura 2: Fórmula estrutural do diuron.



Diuron é um dos herbicidas que atua como inibidor do fotossistema II e sua atividade afeta plantas, algas e cianobactérias, inibindo o transporte de elétrons nas membranas fotossintéticas, competindo com a plastoquinona (QB) pelo sítio de ligação à proteína D1 do fotossistema II. Dessa maneira, o herbicida interrompe o fluxo normal dos elétrons que permite a geração do potencial de membrana e o armazenamento de energia química pelas células (BRUSSLAN, HASELKORN, 1989). A toxicidade do diuron em organismos não-alvos se dá pela semelhança entre os sítios de inibição da proteína D1 do fotossistema II e do complexo bc1 presente na cadeia respiratória dos eucariotos (RAGO, COLSON, 1988).

Além de ser largamente utilizado na agricultura, o diuron é utilizado no controle de plantas em áreas urbanas e também como um produto anti-fotossintetizante em tintas para evitar o acúmulo de organismos marinhos nos cascos de barcos. Este herbicida é muitas vezes aplicado em combinação com outros herbicidas, como bromacil, tidiazuron, glifosato e principalmente, o hexazinona, formando o herbicida comercial Velpar-K[®].

O relatório da agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) apresenta o diuron como uma molécula bastante estável à hidrólise e fotólise, sendo sua

degradação um processo principalmente microbiológico. Possui moderada tendência de adsorção, e como outras fenilureias, apresenta baixa solubilidade em água (Tabela 2) e maior lixiviação em solos com baixo teor de matéria orgânica (TIXIER et al., 2000; GIACOMAZZI & COCHET, 2004).

Tabela 2: Características físico-químicas do herbicida diuron.

Características	
Cor	Branca
Odor	Nenhum
Estado físico	Sólido
Ponto de fusão	158°C
Coeficiente de partição (log Kow)	2.68
Coeficiente de partição de Carbono Orgânico (Koc)	499,00
Pressão de vapor	2×10^{-7} mmHg a 30°C
Solubilidade em água	42 mg/L a 25° C

Fonte: Reregistration Eligibility Decision (RED) for Diuron, 2003.

Devido a sua persistência e mobilidade moderada, o diuron tem sido encontrado em ambas as águas de superfície e subterrâneas. Na França, o diuron foi observado em 38% das águas superficiais, com concentrações que variaram de 0,05 a 20,3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (IFEN, 2002), caracterizando-o como o quinto pesticida mais abundante nas águas superficiais e o sétimo nas águas subterrâneas neste país. Em águas costeiras como portos e marinas, no Reino Unido, as concentrações de diuron atingiram cerca de 6,7 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (THOMAS et al., 2001), e em ambientes aquáticos japoneses, incluindo lagos, 86% das amostras analisadas apresentaram concentração de diuron por volta de 3 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (OKAMURA et al., 2003).

O uso de diuron no controle de plantas daninhas ao longo de ferrovias foi restringido na Suécia em 1994 e na Alemanha em 1996, devido aos elevados níveis em águas subterrâneas (APVMA, 2011). O Comité Consultivo do Reino Unido sobre Pesticidas avaliou o uso de diuron como um produto anti-vegetativo e tomou a decisão de revogar o uso desse herbicida em todas as embarcações, devido à detecção de níveis significativos de diuron em águas e sedimentos ao longo do estuário e locais costeiros do Reino Unido, bem como locais de água doce (ACP 2002).

O herbicida diuron apresenta diferentes níveis de toxicidade para os diversos tipos de organismos. O relatório US- EPA concluiu que o diuron é praticamente não tóxico ou levemente tóxico para aves e mamíferos, moderadamente tóxico para a maioria dos animais aquáticos (peixes e invertebrados aquáticos), mas altamente tóxico

para trutas e plantas terrestres e aquáticas. Cardone et al. (2008) observaram que lagartos machos da espécie *Podarcis sicula* apresentaram toxicidade reprodutiva quando expostos ao diuron. Ricart et al. (2009), por sua vez, observaram que a presença de diuron afetou a atividade de biofilme autotrófico, diminuindo sua eficiência fotossintética, e reduziu a abundância bacteriana após uma semana de exposição ao herbicida.

Apesar de sua persistência no solo (meia-vida de dissipação de 90 a 180 dias) e toxicidade a diversos tipos de organismos, este herbicida apresenta-se, ainda, como um dos mais amplamente utilizados na agricultura (RODRIGUES, ALMEIDA, 2005), sendo um dos maiores responsáveis pelos impactos ambientais causados por pesticidas. Assim, diversos estudos dedicam-se a estudar e compreender seu comportamento no ambiente, bem como encontrar metodologias de degradação, a fim reduzir sua concentração em solos e águas contaminados com compostos aromáticos halogenados (HAGGBLOM, 1992).

1.3. Via de degradação microbiana do herbicida diuron

Compostos aromáticos clorados, como é o caso do diuron, são importantes poluentes ambientais por serem tóxicos e, na sua maioria, resistentes à degradação, acumulando-se no sedimento e na biota. Estudos revelam a capacidade de microrganismos de solo e aquáticos em transformar hidrocarbonetos aromáticos clorados tais como clorotolueno, clorobenzenos, clorobenzoatos, clorofenóis, cloroacetamida, 4-clorofenilacetato, clorofenoxyacetatos, entre outros (CHAUDHRY, CHAPALAMADUGU, 1991; HAGGBLOM 1992, HAGGBLOM, BOSSERT, 2003,)

Apesar da maioria dos estudos abordarem a degradação microbiana de pesticidas pelas bactérias (SIMONSEN et al. 2006; SORENSEN et al. 2008), os fungos também apresentam papel importante no processo de biotransformação (Harms et al. 2011). Diversos fungos são conhecidos por produzirem enzimas capazes de degradar herbicidas aromáticos. De acordo com Vroumsia et al. (1996), fungos dos gêneros *Cunninghamella* e *Penicillium* apresentaram elevado potencial na degradação do herbicida. Outros gêneros como *Aspergillus*, *Beauveria* e *Mortierella* também são citados na literatura com habilidade em degradar diuron (TIXIER et al., 2000; TIXIER et al., 2001; BADAWI et al., 2009; ELLEGAARD-JENSEN et al., 2013). Para

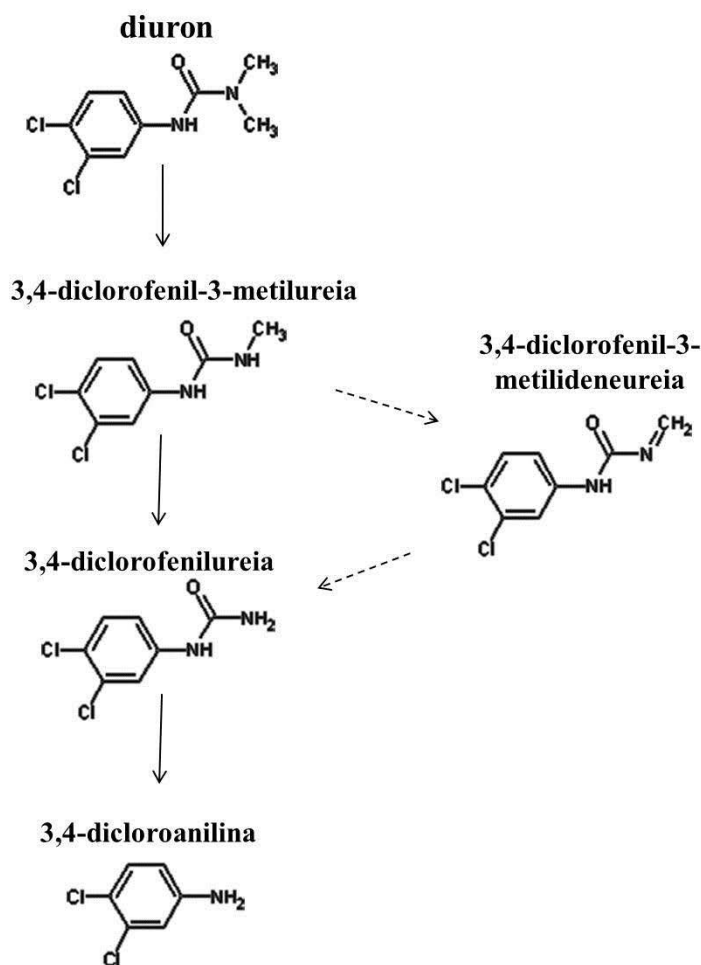
determinadas bactérias degradadoras de pesticidas tem sido demonstrado que elas são capazes de utilizar o composto como um fonte de carbono e nitrogênio (El-Deeb et al., 2000), como também a degradação pode estar relacionada a processos de desintoxicação cometabólica.

Rotas metabólicas diversas foram descritas para a biodegradação do herbicida diuron dos quais mostram diferentes vias para diferentes microrganismos. Tais vias mostram quanto os microrganismos são desafiados a desenvolver novos caminhos através da alteração da sua própria informação genética preexistente para a adaptação e sobrevivência à impactos gerados por moléculas xenobióticas (REINEKE, 1986). A cinética de degradação pode ser afetada por vários fatores, tais como mudanças nas propriedades físicas do ambiente, gestão e manejo do solo, e biodisponibilidade de um composto, podendo esta ser reduzida devido à complexação ou adsorção da molécula nas partículas sólidas do solo, comprometendo a capacidade dos microrganismos em degradar um composto.

Diversos microrganismos são descritos como capazes de metabolizar parcialmente o diuron (ROQUE, MELO, 2000), entretanto a maioria dos estudos aponta a transformação do diuron em compostos possivelmente mais tóxicos (GIACOMAZZI, COCHET, 2004). De acordo com a literatura, a degradação de diuron é iniciada com a remoção dos grupos N-metil formando 3,4-diclorofenil-metilureia (DCPMU) e 3,4-diclorofenilureia (DCPU) (DALTON et al., 1966; GIACOMAZZI, COCHET, 2004; SHARMA et al., 2010; HONGSAWAT, VANGNAI, 2011; FENOLL et al., 2012). Mais recentemente, Ellegaard-Jensen et al. (2013) propuseram a formação de DCPMDU (3,4-diclorofenil-3-metildeneureia), um intermediário entre os metabólitos DCPMU e DCPU. Os metabólitos da desmetilação (Figura 3), apesar de apresentarem estrutura química parecida com o diuron, não possuem efeitos herbicidas (APVMA, 2011).

A decomposição é seguida pela remoção do grupo ureia, o que resulta na formação de 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), um dos principais metabólitos da degradação do diuron, o qual apresenta toxicidade maior em alguns organismos, como *Vibrio fischeri*, quando comparado ao diuron (TIXIER et al., 2002).

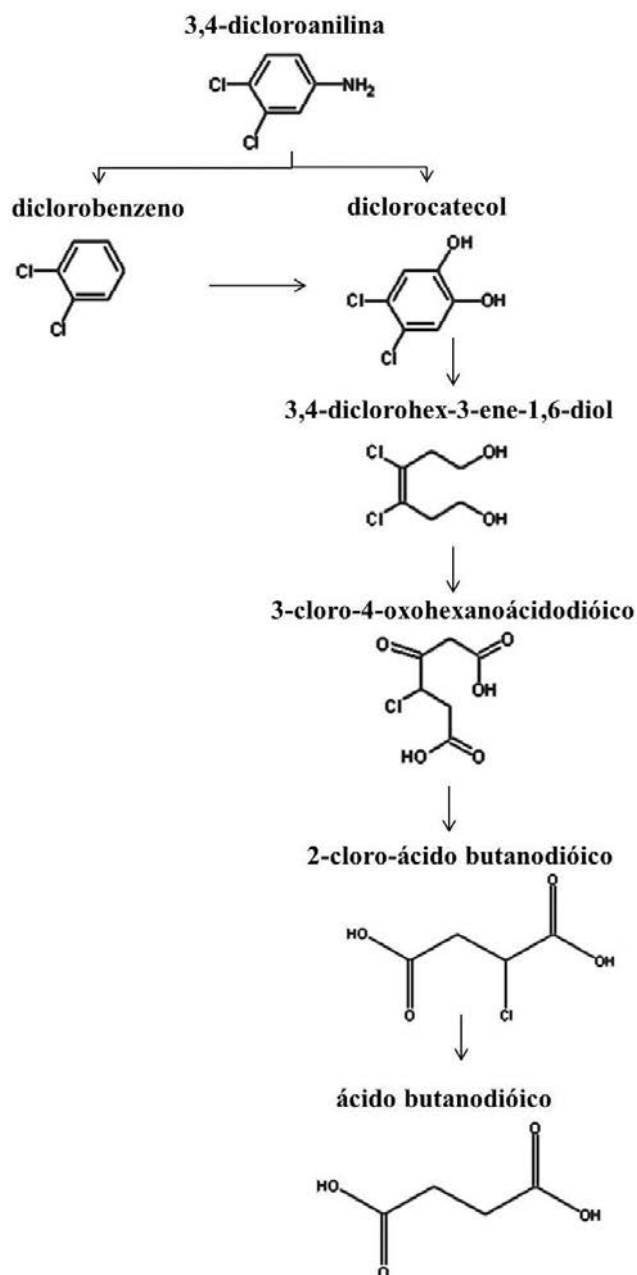
Figura 3: Mecanismo inicial de biotransformação do herbicida diuron.



Fonte: Giacomazzi & Cochet, 2004; Tixier et al, 2001; Ellegaard-Jensen et al, 2013.

A partir da formação da molécula de 3,4-DCA, a degradação pode seguir por diferentes rotas, dependendo da via metabólica disponíveis nos microrganismos, formando diferentes metabólitos. Giacomazzi e Cochet (2004), observaram a degradação da molécula de 3,4-DCA em diclorocatecol, sem passar pela formação do diclorobenzeno, fato observado por Sharma et al. (2010) que discutem a via metabólica da biodegradação de diclorobenzeno pela formação de um intermediário comum, o diclorocatecol, e, em seguida, o anel de benzeno é quebrado. Entretanto, ambos os autores concordam na formação posterior dos produtos 3,4-diclorohex-3-ene-1,6-diol (3,4-DCHD) e ácido 3-cloro-4-oxohexanedióico (3-COHDA) (Figura 4).

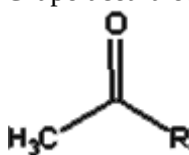
Figura 4: Biodegradação da molécula de 3,4-DCA pela formação dos metabólitos 1,2 DCB e diclorocatecol.



Fonte: Sharma et al., 2010; Giacomazzi e Cochet, 2004

A molécula de 3,4-DCA também pode ser biotransformada por reação de acetilação, na qual ocorre a incorporação de um grupo acetila à molécula (Figura 5).

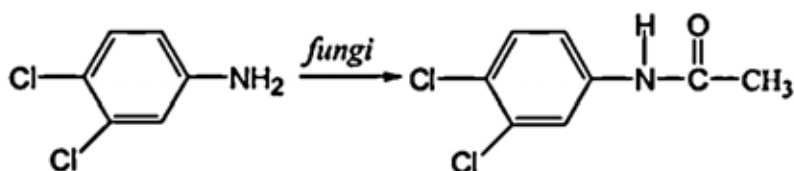
Figura 5: Grupo acetila ou etanoíla.



Quimicamente, aminas e hidroxilas podem ser acetiladas por vários reagentes, entre eles o anidrido acético, cloreto de acetila ou ácido acético glacial, entretanto enzimas denominadas acetiltransferases (ACT) também acetilam grupos NH_2 (TRABULSI et al., 2004) e são principalmente encontradas em bactérias, como *Bacillus cereus* e *Pseudomonas* spp., que apresentam resistência a antibióticos aminoglicosídeos (ANDRADE, 2002; TAKENAKA et al., 2006; MULYONO et al., 2007). Tais bactérias naturalmente não apresentam resistência a antibióticos, porém, bactérias anaeróbicas obrigatórias, como a *Listeria monocytogenes*, são naturalmente resistentes aos aminoglicosídeos e por apresentarem esse gene de resistência, elas podem transferi-lo para estirpes não-resistentes através de plasmídeos nas interações bacterianas no ambiente (TRABULSI et al., 2004).

Apesar do processo de acetilação ser mais comumente descrito entre as bactérias, Tixier et al. (2002) e Ellegaard-Jensen et al. (2014) observaram o potencial dos fungos *Aspergillus niger*, *Beauveria bassiana*, *Cunninghamella elegans* e *Mortierella isabelina* em acetilar a molécula de 3,4-DCA em 3,4-dicloroacetanilida (3,4-CAC) (Figura 6).

Figura 6: Formação do metabólito 3,4-CAC pela acetilação de 3,4-DCA.



Fonte: Tixier et al., 2002

Dentre as rotas de biotransformação de 3,4-DCA mais discutidas na literatura, encontram-se o mecanismo de desalogenação, podendo esta ocorrer em condições aeróbicas e anaeróbicas. A remoção do substituinte de halogênio é um passo fundamental na degradação de compostos aromáticos clorados, pois sua degradação é dificultada proporcionalmente pela quantidade de halogênios presentes na molécula, os quais dificultam o acesso de enzimas às interações moleculares (BATISSON et al., 2007). Outros fatores como temperatura, pH, fonte de carbono suplementares, presença

ou ausência de H₂ ou de outros doadores de elétrons e concorrentes receptores de elétrons também podem afetar a taxa de descloração (WIEGEL, WU, 2000).

Os microrganismos têm desenvolvido diferentes estratégias para remover o substituinte de cloro e se beneficiar dos compostos clorados. As bactérias beneficiam-se de compostos aromáticos e alifáticos clorados usando os compostos como fonte de carbono e energia na presença de um aceptor de elétrons apropriado (como o oxigênio). Diversas bactérias, incluindo os gêneros *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Micrococcus* e *Arthrobacter* removem o átomo de cloro, durante seu desenvolvimento, em um ataque enzimático antes da clivagem do anel aromático. Essas bactérias possuem genes que codificam as desclorinases, que geram produtos com o anel aromático desalogenado, o qual segue para outras vias de degradação.

O substituinte de cloro pode ser removido do anel aromático oxigenicamente, pelo ataque de dioxigenases, resultando em clorohidrodióis, os quais são instáveis e espontaneamente eliminados a HCl, formando o correspondente catecol (HAGGBLOM, 1992). Processos de descloração também podem ocorrer por métodos hidrolíticos ou redutivos, sendo este último decorrente do aproveitamento de compostos clorados como aceptores de elétrons terminais para a oxidação do substrato (doadores de elétrons) (LOFFLER et al., 2003) (Tabela 3). O mecanismo de degradação aeróbica de compostos clorados, para algumas espécies, pode envolver todas as reações de descloração (oxigenolítica, redutiva e hidrolítica) antecedente a quebra do anel (LOFFLER et al., 2003).

Tabela 3: Descrição dos tipos de descloração microbiana.

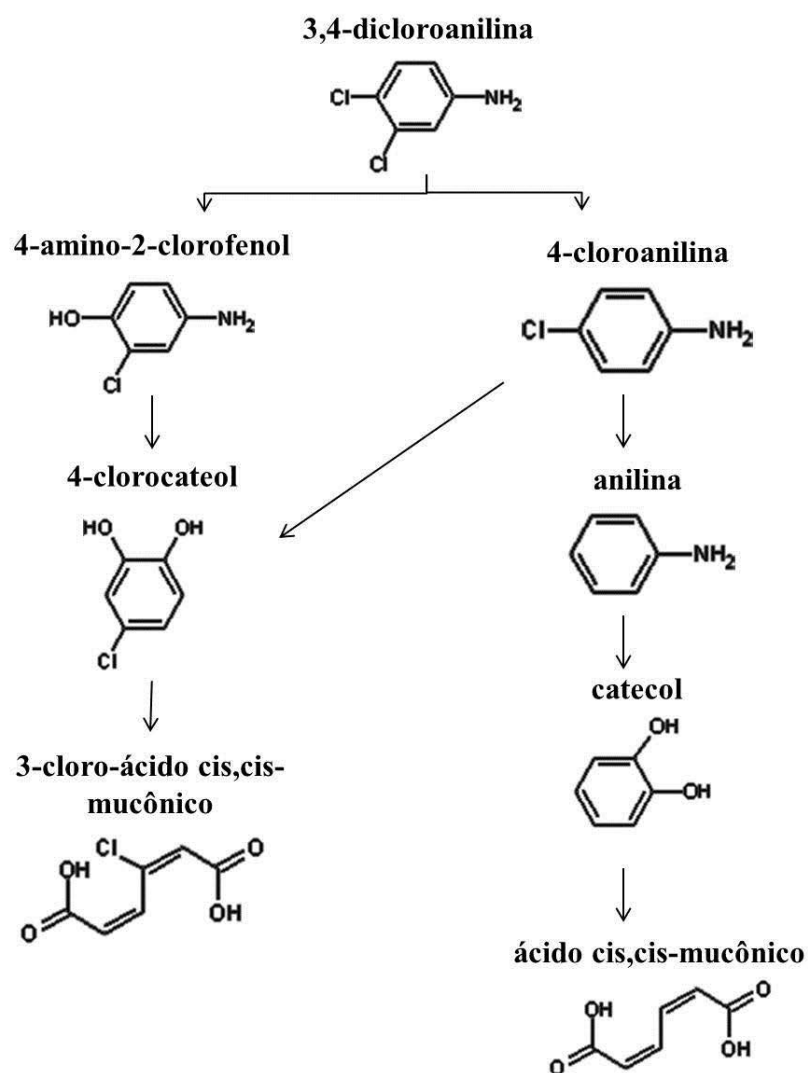
Tipo de descloração	Ambiente	Mecanismo de ação	Enzimas envolvidas	Gêneros bacterianos
Oxigenolítica	Aeróbico	Substituição do átomo de cloro por uma hidroxila derivada da molécula de O ₂	Mono e dioxigenase	<i>Burkholderia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Alcaligenes</i>
Hidrolítica	Aeróbico e anaeróbico	Substituição do átomo de cloro por uma hidroxila derivada da molécula de H ₂ O.	Hidrolases	<i>Xanthobacter</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Mycobacterium</i>
Redutiva	Aeróbico e anaeróbico	Substituição do átomo de cloro por um hidrogênio.	Desclorinases	<i>Desulfomonile</i> <i>Desulfitobacterium</i>

Fonte: LOFFLER et al., 2003.

Diversas bactérias desalogenantes como *Desulfitobacterium hafniense*, *Desulfitobacterium chlororespirans* e *Desulfitobacterium dehalogenans* foram descritas com habilidade de desclorar o composto 2,3,5-tricloro-4-metoxifenol a 3,5- dicloro-4-metoxifenol (MILLIKEN et al., 2004). Suzuki, (1983) demonstraram que a bactéria *Mycobacterium* sp. pode desclorar, por hidrólise, a molécula de pentaclorofenol em tetraclorohidroquinona.

Hongsawat e Vangnai (2011) observaram a degradação do 3,4-DCA pela formação de 4-cloroanilina (4-CA), que por sua vez segue por duas vias de degradação, sendo a primeira pela formação de anilina seguida de catecol e a segunda pela formação de 4-amino-2-clorofenol (Figura 7).

Figura 7: Biodegradação da molécula de 3,4-DCA pela formação dos metabólitos 4-amino-2-clorofenol e 4-CA.

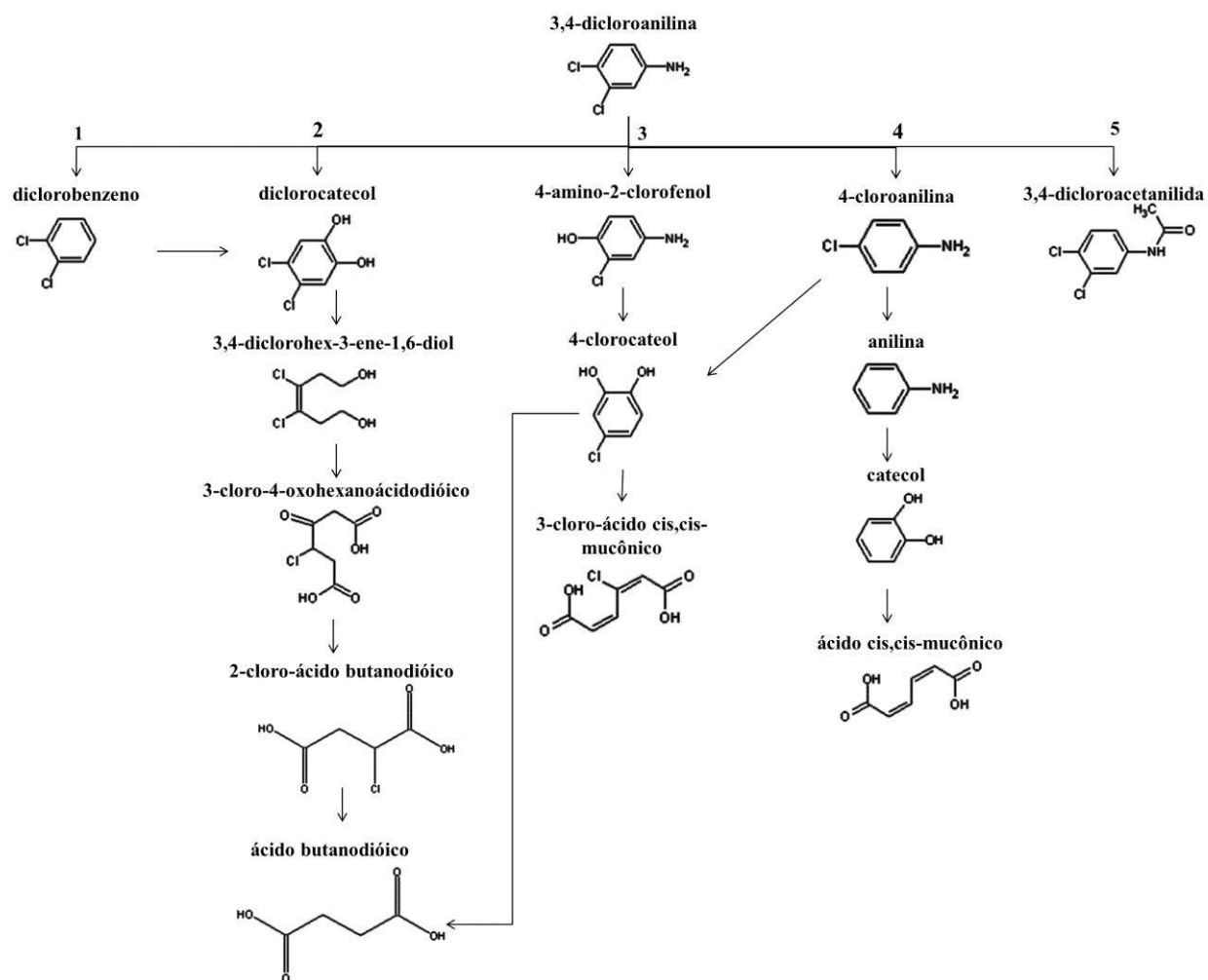


As cloroanilinas (CAs) são um grupo de aminas aromáticas cloradas originadas da biotransformação de herbicidas, sendo especialmente 4-cloroanilina (4-CA) e 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), das quais têm sido onipresentes e acumuladas no ambiente, incluindo solos agrícolas e águas residuais e industriais (RADIANTINGTYAS et al., 2003; HONGSAWAT, VANGNAI, 2011). Uma vez que a resistência de biodegradação microbiana e toxicidade de cloroanilinas dependem principalmente do número e a posição dos átomos de cloro no anel aromático, existem mais relatos de bactérias com capacidade de degradar anilina do que as monocloroanilinas (MCA) ou dicloroanilinas (3,4-DCA). A molécula de anilina, por sua vez, se faz presente como metabólito da degradação de 3,4-DCA e por ser considerada altamente tóxica, facilmente absorvida pela pele, e potencialmente mortal por ingestão ou inalação, (EMTIAZI et al., 2001) muitos pesquisadores têm dado atenção ao seu destino no meio ambiente (DEJONGHE et al., 2002; ZHANG et al., 2008).

Assim como a anilina, a molécula de catecol também é um composto intermediário de muitas reações de biotransformação no ambiente. Organismos eucarióticos produzem catecóis de anel único devido à ação de monooxigenases, e procariotos introduzem a molécula de oxigênio inteiro através de uma reação de dioxigenase formando primeiro um *cis*-diol. Em ambos os organismos, procariotos e eucariotos, o anel aromático do catecol é aberto por reação de dioxigenase por *orto* ou *para* clivagem. Dioxigenases e monooxigenases são duas das principais enzimas utilizadas por organismos aeróbios durante a transformação e mineralização de xenobióticos (BOOPATHY, 2000).

Observada a vasta possibilidade de vias metabólicas apresentada pelos microrganismos no ambiente, a figura 8 e a tabela 4 apresentam um resumo das vias de transformação de 3,4-DCA e os metabólitos esperados na degradação do herbicida diuron citadas nesta revisão.

Figura 8: Vias de degradação microbiana da molécula de 3,4-DCA



Fonte: 1: Sharma et al., 2010; 2: Giacomazzi e Cochet, 2004; 3: Giacomazzi e Cochet, 2004; 4: Hongswat e Vangnai, 2011; 5: Tixier et al., 2002; Ellegaard-Jensen et al., 2014.

Tabela 4: Possíveis metabólitos a partir da biodegradação do herbicida diuron.

Código	Nome IUPAC
DCPMU	3-(3,4-diclorofenil)-1-metiluréia
DCPMDU	(1-(3,4-dichlorophenyl)-3-methylideneurea)
DCPU	3,4-diclorofenil-uréia
3,4-DCA	3,4-dicloroanilina
4-CA	4-cloroanilina
—	anilina
DCB	1,2-diclorobenzeno
DCC	diclorocatecol
—	4-clorocatecol
—	catecol
DCHD	3,4-diclorohex-3-ene-1,6-diol
COHDA	3-cloro-4-oxohexanoácidodióico
3,4-DAC	3,4-dicloroacetanilida
4-CAC	4-cloroacetanilida
—	3,3'-4,4'-tetracloroazoxibenzeno
—	3-cloro- <i>cis-cis</i> -ácido-mucônico
	<i>cis-cis</i> ácido mucônico

Fonte: Giacomazzi & Cochet, 2004; Sharma et al., 2010; Hongsawat & Vangnai, 2011.

1.4. Influência do meio de cultivo no isolamento de bactérias por métodos dependentes de cultivo

Diversos microrganismos apresentam a capacidade de consumir moléculas complexas nos mais diversificados ambientes, apresentando fundamental importância na descontaminação de locais impactados (STASINAKIS et al., 2009; VALLERO, 2010). Técnicas moleculares modernas, ao longo das últimas décadas, têm permitido avaliar a diversidade microbiana sem a necessidade de cultivá-la, revelando um enorme reservatório de microrganismos inexplorados (ELLIS, et al., 2003). Tais técnicas, quando em combinação com metodologias de cultura-dependentes, podem ser muito úteis na monitoração da diversidade microbiana e da sucessão das comunidades ao longo do tempo, principalmente após interferências antropogênicas (TAKAKU et al., 2006).

No entanto, apesar do rápido monitoramento da diversidade por cultura-independente, a maioria das técnicas de identificação e as que possuem o melhor poder discriminatório são dependentes da cultura, permitindo identificações microbianas em

nível de espécie, em contraste com os outros procedimentos que raramente produzem identificações abaixo de gênero (VAZ-MOREIRA et al., 2011).

Por métodos de cultura-dependente, os microrganismos podem ser isolados do ambiente utilizando diversos meios de cultura, sendo eles seletivos ou não, contendo diferentes composições nutricionais que incluem mistura de sais quimicamente definida e fonte de carbono de fácil assimilação, bem como polipéptidos, aminoácidos e vitaminas (VIEIRA, NAHAS, 2005). Tradicionalmente, os microrganismos com potencial em degradar pesticidas são isolados utilizando meios seletivos, por métodos de culturas de enriquecimento (KARPOUZAS et al., 2000), onde o xenobiótico em estudo é acrescentado ao meio de cultivo para ambientar o microrganismo e estimular seu desenvolvimento na presença do composto.

Chanika, et al. (2011) isolaram, por métodos de enriquecimento, as bactérias *Pseudomonas putida* e *Acinetobacter rhizosphaerae* capazes de degradar rapidamente o organofosfato fenamifos (FEN), utilizando-o como fonte de carbono e nitrogênio. Batisson et al. (2009) isolaram bactérias de solo agrícola utilizando técnicas de enriquecimento, tendo o herbicida mesotriona como única fonte de carbono. Após isolamento, as bactérias responderam positivamente na degradação do herbicida, destacando as bactérias do gênero *Bacillus*, com habilidade de degradar 300 mg.L⁻¹, em 50h de cultivo.

Raymond e Bartha (1975) isolaram bactérias a partir de águas poluídas com petróleo, das quais foram submetidas a crescimento em naftaleno, 2-metilnaftaleno e 2-etilnaftaleno como únicas fontes de carbono. Tais autores observaram que das seis estirpes bacterianas isoladas a partir da água poluída, todas cresceram em naftaleno, 2-metilnaftaleno e 2-etilnaftaleno como únicas fontes de carbono, e três dos seis organismos foram capazes de metabolizar fenantreno e antraceno. Apenas uma estirpe, a qual cresceu em naftaleno, foi capaz de metabolizar outros compostos poliaromáticos, incluindo acenaftileno, bifenilo, fluoreno e tetralina. Batisson et al. (2007) isolaram bactérias a partir de enriquecimento com herbicida diuron e observaram que as bactérias *Pseudomonas* sp. e a *Stenotrophomonas* sp, ambas bastonetes gram-negativo, apresentaram melhor desempenho na degradação do herbicida.

Apesar da técnica de enriquecimento ser eficiente no isolamento de microrganismos com habilidade em degradar xenobiótico, esta sozinha não permite estudar o impacto gerado pelo composto sobre a comunidade microbiana total, pois a presença de xenobióticos pode causar alterações na atividade e diversidade microbiana

(ZABALOY et al., 2008). O uso de meios não-seletivos pode proporcionar o isolamento de uma variedade maior de microrganismos, que quando comparada com os isolados em meio seletivo, pode possibilitar o estudo da capacidade da microbiota local em se adaptar e desenvolver na presença do composto em questão.

Poucos trabalhos apresentam meios de isolamento sem enriquecimento. Castillo et al. (2011) isolaram bactérias degradantes de endosulfan de cinco plantações de café na Colômbia, historicamente expostos ao inseticida. Na fase de isolamento não foi utilizado o inseticida como meio seletivo, contudo, a estirpe *Azotobacter* sp. isolada foi posteriormente tratada com 10 mg.L⁻¹ de endosulfan, a qual respondeu positivamente ao meio, sendo capaz de crescer em cultura líquida e degradar o inseticida.

Para este trabalho, optou-se por não realizar o enriquecimento do meio de isolamento, pois, no caso do solo de canavial, a aplicação de diuron é feita tanto com o princípio ativo do diuron separadamente e em combinação com o princípio ativo de outros herbicidas. A aplicação é realizada, no mínimo, uma vez ao ano, proporcionando um enriquecimento do xenobiótico no ambiente. Considerando uma área de plantio com idade produtiva de cinco anos, tem-se uma aplicação em média de 8 a 16 kg/ha de diuron ou 11,6 a 31,1 kg/ha de diuron combinado com outros herbicidas (Blanco, 2003). Sabe-se que a toda a quantidade de herbicida aplicada na lavoura não chega ao solo, sendo parte dissipada pelo vento, retida nas folhas da cultura da cana ou até mesmo fotodegradada. Entretanto, a fração que encontra o solo contribui para o enriquecimento do agrotóxico, possibilitando o isolamento de microrganismos tolerantes e com potencial em degradar o composto.

1.5. Técnicas de imobilização, microcosmo e consórcio microbiano na degradação de xenobióticos

Um grande número de microrganismos capazes de degradar compostos xenobióticos foi isolado nos últimos anos sugerindo que os microrganismos estão desenvolvendo capacidade na degradação de xenobióticos recalcitrantes sob uma pressão seletiva da poluição no meio ambiente. Dentre os microrganismos, as bactérias são descritas na literatura como os melhores degradadores de xenobióticos presentes no ambiente, entretanto os fungos podem revelar-se valiosos degradadores de estruturas

moleculares, que não são de outra forma facilmente transportada em células bacterianas ou metabolizada pelas mesmas (BOUWER, ZEHNDER, 1993).

De modo geral, os microrganismos isoladamente apresentam capacidade em biotransformar parcialmente as moléculas de xenobiótico, não atingindo a mineralização completa do composto. Por esse motivo, a combinação de microrganismos por estratégias de consórcios microbianos pode fornecer todas as capacidades metabólicas para a mineralização completa de um contaminante orgânico (DÍAZ, 2004).

Os microrganismos presentes no ambiente podem utilizar compostos xenobióticos como fonte de carbono e energia, introduzindo-os em seu metabolismo. Entretanto, processos de cometabolização também são observados, onde certos microrganismos se encarregam do ataque inicial aos constituintes da molécula do xenobiótico, produzindo compostos intermediários que podem ser, subsequentemente, assimilados por outras espécies microbianas como fonte de carbono e nutrientes (BENNETT et al., 2007; MIKESKOVÁ et al., 2012). Além disso, o efeito sinérgico na degradação de compostos recalcitrantes pode ser explicado pelo fato das hifas fúngicas funcionarem como vetores de transporte para as bactérias, permitindo que elas atravessem poros ou lacunas de ar no solo e, assim, ter acesso aos contaminantes que antes eram inacessíveis (KOHLMEIER et al., 2005; WARMINK e VAN ELSAS, 2009).

Diversos estudos relatam a eficiência da combinação de microrganismos em processos de biorremediação. Zhang et al., (2013) estudaram a degradação de paracetamol por consórcio de bactérias e observaram que a degradação poderia ser realizada pelos isolados individuais, mas é estimulada por uma interação sinérgica do consórcio das três bactérias, sugerindo uma possível interação complementar entre os isolados.

Sorensen et al., (2008) estudaram o consórcio entre *A. globiformis* D47 e *Variovorax* sp. SRS16 quanto sua capacidade em degradar e mineralizar linuron e diuron em concentrações ecologicamente relevantes em meios líquidos e no solo. Em conclusão, a co-cultura pareceu ser altamente eficiente na mineralização dos compostos em questão, sugerindo que esta pode ser ideal para descontaminar solos e águas afetados por estes herbicidas, bem como o seu metabólito comum, 3,4-DCA.

Breugelmans et al. (2007) observaram que culturas mistas degradam linuron mais rapidamente do que as estirpes individuais e Herrera-González et al. (2012) utilizaram um consórcio de 9 bactérias (*Acidovorax* sp., *Luteibacter*, *Xanthomonas* sp.,

Flavobacterium sp., *Variovorax* sp., *Acinetobacter*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., e *Kocuria* sp.) para degradar propanil e 3,4-DCA. Diversos trabalhos relatam estirpes com capacidade para mineralizar 3,4-DCA sem exibir a capacidade de degradar diuron em 3,4-DCA (TIXIER et al., 2000; DEJONGHE et al., 2002; BAZOT et al., 2007). Desse modo, faz-se necessária uma combinação entre os microrganismos para realizar a degradação do herbicida.

A combinação de microrganismos pode ser comprometida pela interferência de uma espécie sobre a outra e tal interferência pode ser minimizada quando as células encontram-se imobilizadas em matrizes como polímeros, biofilme, agregados do solo, sedimentos, etc. Bazot et al. (2007) observaram o aumento da degradação de diuron na combinação de *Arthrobacter* sp. N4 e *Delftia acidovorans* W34, quando uma ou ambas foram imobilizadas em aglinato-Ca. A imobilização de células microbianas representa um método eficiente de preservação celular, pois garante a estabilidade física e química das células, impedindo a contaminação por outros microrganismos (KANMANI et al, 2011, *apud* TRABELSI et al, 2014). Fragoeiro e Magan (2008) cultivaram os fungos *Trametes versicolor* e *Phanerochaete chrysosporium* em lascas de madeira e, ao aplicá-los em sistemas de microcosmos, observaram que o cultivo dos fungos não somente aumentou a degradação de pesticidas no solo, como também aumentou a atividade de enzimas extracelulares, como celulase e lacase, e a atividade respiratória.

Como descrito anteriormente, células microbianas também podem ser adicionadas e imobilizadas em agregados do solo e sedimentos, reproduzindo um ambiente de microcosmo ou micronichos. Técnicas de microcosmos que apresentam a adição de microrganismos isolados e pré-estudados na degradação de um composto específico são largamente aplicados e comumente descritos na literatura. Patel et al. (2013) avaliaram a adição de um consórcio bacteriano na degradação de fenantreno e observaram que a taxa de degradação aumentou de 61% para 94% em sedimentos bioaumentados com o consórcio. Esta técnica de adição de microrganismos, quando reproduzida no ambiente, deve ser acompanhada de estudos de impacto ambiental na comunidade microbiana indígena (CRUZ et al., 2014).

Metodologias de laboratório têm sido cada vez mais utilizadas para avaliar o potencial de bio degradação de pesticidas no solo como alternativa a estudos *in situ*, sendo este último, muitas vezes, dificultado pela alta variabilidade do clima, falta de reprodutibilidade e custos extremamente elevados. A abordagem técnica de microcosmo em laboratório apresenta as questões de variabilidade e reprodutibilidade ao mesmo

tempo, proporcionando um maior nível de precisão para prever os efeitos ambientais dos pesticidas sobre processos estruturais do solo (CARACCILO et al. 2012).

Apesar de alguns autores apontarem diversas falhas no sistema de microcosmo (TARRADELLAS et al., 1996), esta técnica apresenta-se como reprodutível e controlável que simulam a situação do campo, ou seja, os processos e interações de componentes, de determinada parte do ambiente. Processos que envolvem a dinâmica do solo como mineralização do nitrogênio, química do solo, transformações de nutrientes, decomposição da matéria orgânica e atividade biológica podem ser utilizadas como parâmetros em microcosmos (BURROWS, EDWARDS, 2002).

Parâmetros de mobilidade de pesticidas por lixiviação, absorção em flora ou fauna, degradação biótica e abiótica, e volatilização também são largamente estudados em processos de microcosmo. No caso do estudo de degradação por sistema de microcosmo, o contaminante é, geralmente, misturado ao solo a fim de permitir a exposição máxima do composto aos organismos presentes (MORGAN, KNACKER, 1994).

Embora o microcosmo possa ser realizado em sistemas aberto ou fechado, o mesmo estará sempre sujeito a pelo menos o controle de um fator ambiental, tais como temperatura, luz, umidade, fluxo de ar e da água (BURROWS, EDWARDS, 2002). O microcosmo pode ser elaborado em sistemas homogêneos de solo peneirado ou solos intactos extraídos do campo, podendo ser introduzido organismos exógenos, bem como apresentar somente os organismos endógenos. Este último é o tipo de microcosmo mais simples, não havendo a necessidade de isolar ou adicionar organismos ao processo. Tal técnica foi utilizada por Vercraene-Eairmal et al. (2010) que estudaram a capacidade de uma comunidade bacteriana de ecossistema aquático em degradar o herbicida diuron e transformar a molécula nos metabólitos DCPMU e DCPU.

Alguns critérios devem ser atendidos quando se utiliza um microcosmo de solo para que os resultados imitem adequadamente os efeitos do campo, como: o solo deve apresentar características químicas e biológicas semelhantes aos solos do campo; o solo deve ser recém-coletado para permitir a máxima diversidade de organismos endógenos; o microcosmo deve apresentar tamanho adequado para permitir que a unidade funcione como um ecossistema; e por último, os microcosmos laboratoriais devem avaliar os principais processos da dinâmica do solo que representam a função e a saúde de um ecossistema real. Tais critérios permitem que os dados recolhidos sejam utilizados na

previsão do comportamento global e os efeitos de um poluente no campo (Burrows, Edwards, 2002).

2. Objetivos

Geral

O objetivo geral deste trabalho foi estudar o potencial e o mecanismo de degradação do herbicida diuron por bactérias isoladas de solo de canavial com histórico de aplicação desse herbicida.

Específicos

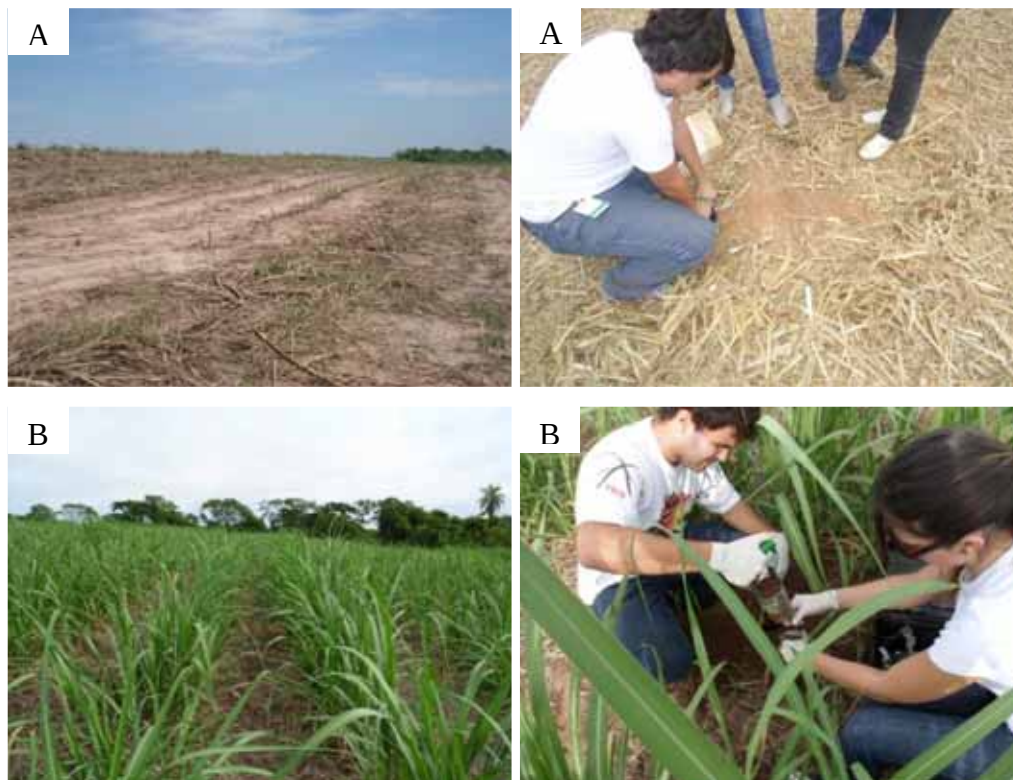
- * Avaliar influência da fonte de carbono do meio de cultivo na composição de bactérias GP e GN de solo de canavial;
- * estudar o potencial de degradação do diuron em cultivo em meio líquido pelas bactérias isoladas e identificar os metabólitos gerados;
- * estudar a degradação do diuron por técnica de imobilização celular e microcosmos, observar os metabólitos gerados e compará-los com aqueles obtidos em meio líquido;
- * estudar a degradação do diuron por consócio de cepas, identificar os metabólitos gerados e comparar com aqueles de cultura pura;
- * propor rota metabólica para a degradação do herbicida diuron.

3. Materiais e Métodos

3.1. Amostragem de solo e isolamento de bactérias

Amostras de solos foram coletadas em área de plantação de cana-de-açúcar, caracterizada como Latossolo Vermelho Distrófico, com histórico de aplicações intensivas do herbicida diuron nas formas de Velpar-K® (diuron e hexazinona) e Herburon® (diuron). Quatro coletas foram realizadas em uma propriedade de plantio da Usina Açucareira Virgolino de Oliveira S/A (Unidade José Bonifácio - Latitude 0610521 e Longitude 7657939), sendo duas realizadas após o corte da cana e duas após correção do solo e aplicação dos herbicidas (Figura 9). As características do solo estão apresentadas no Anexo A.

Figura 9: Área de amostragem de solo para isolamento das bactérias. A: Solo do canavial após corte da cana; B: Solo do canavial após correção e aplicação de herbicidas.



As amostras foram retiradas em 10 cm de profundidade, em três pontos pertencentes à mesma fileira do cultivo da cana-de-açúcar. A amostra final foi composta

pela mistura dos solos coletados nos três pontos. A descrição do período das amostragens encontra-se na tabela 5.

Tabela 5: Cronograma e descrição do período de amostragens.

Amostragem	Descrição do período de amostragem	Data
1^a	Duas semanas após o corte da cana (sem correção ou aplicação de herbicidas).	Junho/2011
2^a	Uma semana após correção e aplicação de herbicidas.	Setembro/2011
3^a	Duas semanas após corte da cana (sem correção ou aplicação de herbicidas)	Maio/2012
4^a	Uma semana após correção e aplicação de herbicidas.	Fevereiro/2013

O solo coletado para o isolamento das bactérias foi acondicionado em embalagens plásticas, previamente estéreis, no interior de caixa de isopor em temperatura ambiente (PEREIRA et al., 1996), sendo conduzido, no mesmo dia, ao laboratório para transferência e cultivo em meios minerais.

Em laboratório, as amostras de solo foram transferidas para gral estéril, trituradas com pistilo estéril (OLSEN, BAKKEN, 1987) e homogeneizadas. Alíquotas de 5g foram pré-cultivadas em frascos de erlenmeyers de 500 mL contendo 100 mL de meio mínimo de sais de Dellamatrice e Monteiro (2004), com modificações: 0,6% NaNO₃; 0,15% KH₂PO₄; 0,05% KCl; 0,05% MgSO₄·7H₂O; 10⁻⁴% FeSO₄; 10⁻⁴% ZnSO₄, pH 6,8.

Foram preparados 10 meios de cultivos diferentes, sendo cinco contendo 500 mg.L⁻¹ de glicose (meio controle) e cinco contendo 50 mg.L⁻¹ de diuron (meio indutor) como fonte de carbono. Também foram adicionados 0,2% de ampicilina (antibiótico de amplo espectro), 0,08% de cetoconazol (antifúngico) e 10 mg.L⁻¹ de 3,4-DCA (produto de degradação do diuron), conforme descrito na tabela 6. Optou-se por diversificar o meio de isolamento para possibilitar a coleta de cepas das mais diversificadas espécies.

Tabela 6: Descrição das fontes de carbono e aditivos presentes nos meios de isolamento.

	Meio Controle	Meio Indutor
1	Glicose	Diuron
2	Glicose + Ampicilina	Diuron + Ampicilina
3	Glicose + Ampicilina + Cetoconazol	Diuron + Ampicilina + Cetoconazol
4	Glicose + Cetoconazol	Diuron + Cetoconazol
5	Glicose + 3,4-DCA	Diuron + 3,4-DCA

Os frascos foram levados à agitação de 100 rpm, a 30 °C por 120 horas, sem haver qualquer outro enriquecimento das amostras após adição do solo ao meio líquido.

Neste trabalho optou-se por não realizar o enriquecimento das amostras ao longo da incubação com quantidades conhecidas de diuron por entender que o local de amostragem apresenta mais de cinco anos de aplicação de herbicida, sendo esse um enriquecimento suficiente para o surgimento de bactérias com habilidade em degradar o composto em questão.

Após 120 horas, realizaram-se diluições em série de 10^{-2} a 10^{-6} para o isolamento das colônias bacterianas. Foram selecionadas 10 colônias de cada meio de cultivo (descritos na tabela 6), nas diluições entre 10^{-4} e 10^{-6} , totalizando 100 colônias por coleta e 400 colônias ao final de todas as coletas. As cepas foram isoladas de diluições diferentes devido a não formação de 10 colônias nas diluições mais altas. Todas as cepas foram submetidas a teste de colocação de Gram, para caracterização das bactérias isoladas. O armazenamento das culturas puras foi realizado em criotubos contendo 2% de glicerol, acondicionados em freezer -80°C .

3.2. Identificação bacteriana por técnica molecular

A identificação das bactérias utilizando técnicas moleculares foi realizada a partir da extração do DNA genômico (protocolo de Turnbull^a et al. 2001) e amplificação e sequenciamento parcial de regiões do *operon* ribossomal rRNA 16S. Os *primers* utilizados foram 63F (5'-CAG GCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') e 1387R (5'-GGG CGG WGT GTA CAA GGG-3') para amplificar cerca de 1300 pares de base (MARCHESI et al., 1998), sendo W substituído por A ou T.

As bactérias foram cultivadas em meio líquido YT (extrato de levedura 10 g.L^{-1} ; Triptona 16 g.L^{-1} ; 5 g.L^{-1} NaCl, pH 7,0), por 16 horas, e um microlitro desta suspensão foi utilizado diretamente na mistura de reação de PCR de $48\text{ }\mu\text{L}$ contendo: $2\text{ }\mu\text{L}$ de cada primer (10 mM), $5\text{ }\mu\text{L}$ de tampão de PCR 10X, $3,0\text{ }\mu\text{L}$ de MgCl_2 (50 mM), $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de dNTP (50 mM), $0,2\text{ }\mu\text{L}$ de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e água ultrapura (Milli-Q, Millipore, EUA), esterilizada, para completar o volume final.

As amplificações foram realizadas utilizando termociclador PRIME G (Analítica). A temperatura de reação foi iniciada a 95°C , por 5 minutos. Trinta ciclos de amplificação foram realizados, cada uma consistindo de 95°C (1 min), 55°C (1 min) e 72°C (1,5 min). Um período adicional de 72°C durante 5 minutos foi incluído no final dos 30 ciclos. Para avaliar a presença de produtos de PCR em amostras, $4\text{ }\mu\text{L}$ de

cada mistura de reação foi sujeita a eletroforese em gel de agarose 1% ao lado de um marcador de peso molecular apropriado.

O produto de PCR (cerca de 50 ng.µL⁻¹) foi purificado utilizando *kit* de purificação GeneJET PCR Purification Kit (Fermentas, Thermo Scientific), segundo recomendação do fabricante, antes de serem submetidos ao sequenciamento (Genomic Engenharia Molecular - SP). O material foi preparado utilizando os primers do PCR e primers internos (cada 400 pb, oito no total) para garantir um melhor sequenciamento. A PCR para o sequenciamento dos fragmentos dos genes 16S rRNA foi feita usando-se o *kit* “Big Dye Terminator” versão 3.0 (Applied Biosystems). Cerca de 1,5 µl do produto da purificação foi adicionado a mistura de reação de sequenciamento contendo 3,5 µl de tampão (Big Dye Terminator 5x Sequencing Buffer), 1 µl de primer, 1 µl de Big Dye e H₂O para completar o volume de 10 µl. A temperatura de reação foi iniciada a 105 °C, por 10 segundos. Trinta e cinco ciclos foram realizados, cada um consistindo de 96 °C (15 s), 55 °C (15 s) e 60 °C (4 min). Um período adicional de 72 °C durante 5 minutos foi incluído no final dos 30 ciclos. Após a amplificação dos fragmentos, realizou-se a precipitação de acordo com as instruções do *kit* “Big Dye Terminator” versão 3.0.

As sequências geradas foram processadas para remoção das bases produzidas com baixa qualidade (índice de qualidade >20) com auxílio do pacote de programas Phred/Phrap/Consed em sistema operacional Linux. As sequências obtidas foram comparadas com as já existentes depositadas em bancos de dados, como o Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) e CBS (<http://www.cbs.knaw.nl/index.htm>).

3.3. Triagem das bactérias degradadoras de diuron por cultivo submerso

Para o estudo do potencial de degradação de diuron pelas bactérias, realizou-se o cultivo dos isolados, em erlenmeyers de 50 mL, contendo 10 mL do meio de sais composto por: 5 mg.L⁻¹ de diuron; 0,05% de glicose (para crescimento inicial das bactérias); 0,6% (NH₄)₂SO₄; 0,1% KH₂PO₄; 0,2% Na₂HPO₄; 0,05% NaCl; 0,05% surfactante Triton X-100, 1% elementos traços (g.L⁻¹: 0,025 KI; 0,025 LiCl; 0,05 MnSO₄; 0,5 H₃BO₃; 0,05 ZnSO₄; 0,05 CoCl₂; 0,025 (NH₄)₆Mo₇O₂₄; 0,05 CuSO₄; 0,01 FeSO₄) e 0,1% de complexo vitamínico (mg.L⁻¹: 2,0 biotina; 2,0 ácido fólico; 5,0

cloridrato de tiamina; 5,0 ácido nicotínico; 5,0 pantotenato de cálcio; 10,0 piridoxina; 5,0 ácido lipóico e 0,1 vitamina B12).

O pré-inóculo foi preparado por suspensão de células bacterianas obtidas no cultivo descrito, sem adição de diuron, em solução salina, com densidade óptica analisada em espectrofotômetro ($DO_{600} > 0,3$). Dessa suspensão, utilizou-se 0,5 mL para inocular 10 mL do meio acima descrito, os quais foram incubados a 30 °C, 100 rpm, por cinco dias. Antes da incubação, os erlenmeyers foram pesados para posterior correção do volume final, considerando que ocorreu uma evaporação média de 15% do volume após cinco dias de incubação. Transcorrido o tempo de cultivo, as amostras foram centrifugadas por 4 min, a 6000 x g. O sobrenadante foi utilizado para avaliar o potencial de degradação do herbicida diuron e a quantidade de diuron remanescente no meio de cultivo, após período de incubação, foi tomada como referência para cálculo da degradação do herbicida, sendo este descontado do valor do cultivo abiótico (controle).

3.4. Otimização do meio de cultivo para avaliação da degradação do diuron pelas cepas bacterianas

Foram selecionadas 10 cepas (Tabela 7), com potencial de degradação do diuron para os experimentos com planejamento estatístico Plackett & Burman (PB) Planejamento Fatorial Completo (PFC) e Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) (Figura 10). Devido ao uso de material biológico nos ensaios estatísticos, foi considerado o valor de R^2 de 85% (ELLEGAARD-JENSEN, 2013).

Tabela 7: Bactérias selecionadas para avaliação da degradação de diuron utilizando ferramentas estatísticas.

Código	Identificação
TG2.31	<i>Enterobacter</i> sp.
TG3.14	<i>Leucobacter</i> sp.
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TD2.18	<i>Achromobacter</i> sp.
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>

Utilizou-se, primeiramente, o planejamento Plackett & Burman (PB) por matrizes de elementos para 8 ensaios + 3 pontos centrais (Tabela 8) para seleção prévia das variáveis de maior interferência (RODRIGUES, IEMMA, 2009). Este planejamento foi utilizado para estudar a interferência da concentração de glicose, da adição de vitaminas e nitrogênio (NH_4SO_4) e do valor pH inicial do meio de cultivo sobre o potencial das bactérias de degradar o herbicida. A mistura de vitaminas foi composta de: (mg.L^{-1}): 2,0 biotina; 2,0 ácido fólico; 5,0 cloridrato de tiamina; 5,0 ácido nicotínico; 5,0 patotenato de cálcio; 10,0 piridoxina; 5,0 ácido lipóico e 0,1 vitamina B12. Os resultados foram analisados em um nível de confiança de 90% e significância de $\alpha \leq 0,1$.

Figura 10: Fluxograma dos ensaios baseados no delineamento experimental

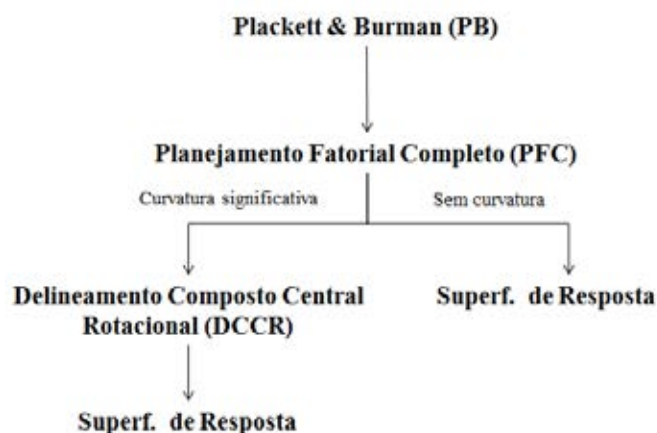


Tabela 8: Concentração das variáveis independentes para o planejamento experimental de Placket-Burmann.

Exp.	Variáveis (%)			
	Glicose	Vitaminas	N*	pH
1	0,2% (1)	0,0%(-1)	0,19%(1)	6,5 (-1)
2	0,2% (1)	0,0%(-1)	0,06% (-1)	7,5 (1)
3	0,2% (1)	0,2% (1)	0,06% (-1)	7,5 (1)
4	0,0% (-1)	0,2% (1)	0,19%(1)	7,5 (1)
5	0,2% (1)	0,2% (1)	0,19%(1)	6,5 (-1)
6	0,0% (-1)	0,0%(-1)	0,19%(1)	7,5 (1)
7	0,0% (-1)	0,2% (1)	0,06% (-1)	6,5 (-1)
8	0,0% (-1)	0,0%(-1)	0,06% (-1)	6,5 (-1)
9	0,1% (0)	0,1% (0)	0,13% (0)	7,0 (0)
10	0,1% (0)	0,1% (0)	0,13% (0)	7,0 (0)
11	0,1% (0)	0,1% (0)	0,13% (0)	7,0 (0)

*(NH_4) $_2\text{SO}_4$ utilizado como fonte de nitrogênio.

Entre parênteses encontram-se os valores codificados do experimento

Um segundo planejamento foi realizado, variando-se a concentração de glicose, em níveis acima do utilizado no primeiro experimento, e a quantidade de inóculo em planejamento fatorial completo (PFC), seguido de DCCR (Tabela 9) para os ensaios cujos resultados apresentaram curvatura significativa no planejamento PFC.

A extração das amostras foi realizada como descrito no item 3.3, e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a quantidade de diuron remanescente no meio de cultivo. Os meios de cultivo nos quais foram observadas as maiores taxas de degradação do diuron, foram utilizados nas etapas posteriores do trabalho.

Tabela 9: Níveis das variáveis independentes para o planejamento PFC e DCCR.

Exp.	Variáveis	
	Glicose (%)	Inóculo (mL)
1	0,07(-1)	232 (-1)
2	0,43 (1)	232 (-1)
3	0,07 (-1)	868 (1)
4	0,43 (1)	868 (1)
5*	0,00 (-1,41)	550 (0)
6*	0,50 (1,41)	550 (0)
7*	0,25 (0)	100 (-1,41)
8*	0,25 (0)	1000 (1,41)
9	0,25(0)	550 (0)
10	0,25 (0)	550 (0)
11	0,25 (0)	550 (0)

* ensaios realizados somente para DCCR

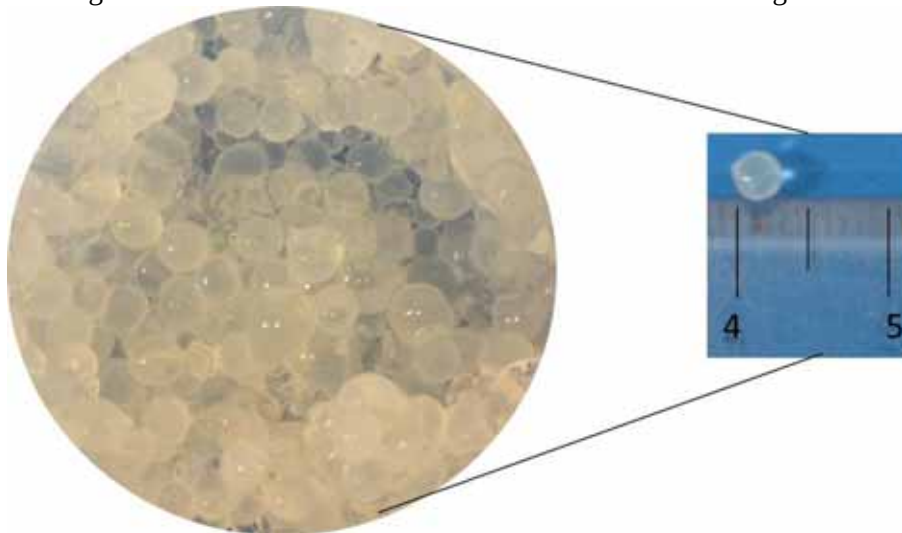
Entre parênteses encontram-se os valores codificados do experimento

3.5. Imobilização das células bacterianas em alginato de cálcio

As esferas de alginato-Ca foram preparadas segundo Betigeri e Neau (2002), utilizando 2,5% de alginato de sódio (Dinâmica – CAS 9005-38-3 - viscosidade não disponível) em tampão fosfato 0,05M, pH 7. Foram adicionados 2 mL de suspensão microbiana a 10 mL de solução de alginato de sódio. Essa suspensão foi gotejada, com o auxílio de ponteiros de 1 mL estéreis, em 50 mL de CaCl_2 0,05M. Depois de formadas as esferas (3,5mm de diâmetro – Figura 11), estas foram lavadas duas vezes com água destilada para a eliminação das células não imobilizadas e 2g das esferas foram

transferidas para meio de cultivo na presença de 50 mg.L^{-1} de diuron e incubada a 30°C por 120 h.

Figura 11: Células bacterianas imobilizadas em esferas de alginato-Ca.



A extração das amostras foi realizada como descrito no item 3.3, e o sobrenadante foi utilizado para avaliar a quantidade de diuron remanescente no meio de cultivo. As esferas de alginato-Ca não foram reutilizadas após término do cultivo.

3.6. Biodegradação do diuron por sistemas de microcosmo

A avaliação da degradação de diuron por bactérias em culturas únicas e por consórcios microbianos foi realizada em experimentos de microcosmo para avaliar a capacidade dos microrganismos de degradar o diuron na presença de solo. O solo utilizado no estudo de microcosmo foi o mesmo coletado para o isolamento das bactérias, o qual foi armazenado em temperatura de 4°C . Após tamizado a uma granulometria de 2 mm^2 , o solo foi avaliado para a verificação da presença de diuron residual. Todo experimento de microcosmo foi realizado em placas de Petri de 9 cm de diâmetro, contendo 20g de solo enriquecido com 50 mg.L^{-1} de diuron, como mostra a figura 12.

O solo presente nas placas apresentou profundidade de 0,5cm, sendo este experimento realizado para avaliar a degradação do herbicida nas camadas superficiais do solo no meio ambiente. Os microrganismos utilizados neste experimento estão listados na tabela 10. As bactérias foram inoculadas na concentração de 10^5 células por

grama de solo e cada fungo na concentração de 10^6 esporos. As placas foram incubadas a 30°C , por 10 dias.

Os fungos utilizados para este experimento foram o *Cunninghamella elegans* B06 e *Aspergillus brasiliensis* G08 da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Unesp – Campus S.J. Rio Preto, os quais também foram isolados em solo com histórico de aplicação do herbicida diuron.

Um controle foi realizado com solo enriquecido com 50 mg.L^{-1} de diuron e, após 48 horas do enriquecimento, o diuron foi extraído para determinação da taxa de herbicida adsorvido no solo. Esse valor foi considerado no momento do cálculo do diuron degradado.

Figura 12: Placas de Petri contendo 20g de solo enriquecido com 50 mg.L^{-1} de diuron para testes de microcosmo.



Tabela 10: Microrganismos selecionados para ensaios de microcosmo.

Microrganismo	Descrição
Bactérias	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> TD4.7; <i>Bacillus cereus</i> TD4.31
Fungos	<i>Cunninghamella elegans</i> B06; <i>Aspergillus brasiliensis</i> G08.
CBB	Cultivo das bactérias <i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i> TD4.7; <i>Bacillus cereus</i> TD4.31
CFF	Cultivo dos fungos <i>Cunninghamella elegans</i> B06; <i>Aspergillus brasiliensis</i> G08
CBF (pH 7)	Cultivo das bactérias e fungos descritos, em meio de cultivo otimizado para bactérias.
CBF (pH 5)	Cultivo das bactérias e fungos descritos, em meio de cultivo otimizado para fungos (otimização do meio não apresentada).

3.6.1. Avaliação da degradação de diuron em sistema de microcosmo em solo estéril e solo não-estéril

Primeiramente, foi realizado experimentos de microcosmo utilizando solo esterilizados e não-esterilizados , buscando-se comparar a taxa degradação de diuron dos microrganismos inoculados com a taxa de degradação dos mesmos na presença da microbiota nativa do solo.

A amostra de solo foi esterilizada por três vezes em autoclave, com duração de 1h a cada intervalo de 24h. Ambos os solos estéril e não estéril foram enriquecidos com uma solução de diuron (50 mg.L^{-1}) em metanol, resultando em concentração final de $0,05 \text{ mg diuron/g de solo}$ (ou $50 \text{ g diuron/kg solo}$). Após evaporação do metanol, o solo foi inoculado com 10 mL de solução salina (formulada com base nos dados do planejamento experimental) contendo os microrganismos selecionados para o experimento na concentração de 10^5 células bacterianas e 10^6 esporos fúngicos por grama de solo. As células e esporos foram contados e calculados utilizando câmara de Neubauer)

Após 10 dias de cultivo, os solos foram secos em estufa a 60°C , por 12 h. O material seco foi transferido para erlenmeyers de 125 mL contendo 20 mL de metanol. O frasco foi submetido a banho ultrassônico por 30 min e após a decantação do solo, o sobrenadante foi filtrado em membrana $0,22 \mu\text{m}$ e injetado em HPLC e LC/MS para análise do diuron remanescente e de seus metabólitos.

3.6.2. Avaliação do teor de umidade na degradação de diuron em solo não-estéril

Depois de observado os resultados do primeiro experimento de microcosmo, repetiu-se o experimento utilizando o solo não-estéril, variando-se o teor de umidade do solo. O solo foi preparado novamente pela adição de 50 mg.L^{-1} de solução de diuron em metanol ($0,05\text{mg diuron/g de solo}$) e após evaporação do solvente, foi inoculado com 10, 20 e 30 mL de solução salina contendo 10^5 células bacterianas e 10^6 células fúngicas por grama de solo. A extração das amostras foi realizada conforme descrito no item anterior.

3.7. Métodos analíticos

3.7.1. Padrões analíticos

De acordo com a literatura, a degradação da molécula de diuron pode gerar cerca de 16 metabólitos diferentes. Entretanto, para o presente trabalho foram selecionados 10 metabólitos a serem estudados na padronização da metodologia em cromatografia líquida de alta performance (HPLC), por cromatografia líquida e espectrometria de massas (LC/MS) e por cromatografia gasosa e espectrometria de massas (GC-MS). Os Padrões dos metabólitos foram adquiridos das empresas Sigma Aldrich, LGC Standards GmbH e Da Vinci Laboratory Solutions. Todos os dez metabólitos adquiridos foram submetidos à análise em HPLC e LC-MS e GC-MS (Tabela 11).

Tabela 11: Detecção analítica dos metabólitos da biodegradação do herbicida Diuron.

Código	Nome IUPAC	Detecção Analítica
DCPMU	3-(3,4-diclorofenil)-1-metiluréia	HPLC e LC-MS
DCPU	3-(3,4-diclorofenil)-uréia	HPLC e LC-MS
3,4-DCA	3,5-dicloroanilina	HPLC e LC-MS
4-CA	4-cloroanilina	HPLC e LC-MS
—	Anilina	HPLC, LC-MS e GC-MS
1,2DCB	1,2-diclorobenzeno	GC-MS
—	4-clorocatecol	HPLC, LC-MS e GC-MS
—	Catecol	GC-MS
4-CAC	4-cloroacetanilida	HPLC, LC-MS e GC-MS
—	benzeno	GC-MS

3.7.2. Preparo de amostras por extração em fase sólida (EFS)

A extração em fase sólida (EFS) foi realizada de acordo com Gatidou et al. (2005), com modificações, e o condicionamento dos cartuchos poliméricos (Oasis HLB, 60mg) foi realizado de acordo com procedimento pelo fabricante (Waters).

Um volume de 10 mL de amostra filtrada foi utilizado na extração. A separação dos compostos de interesse foi realizado off-line, utilizando-se cartuchos poliméricos montados em Manifold (SUPELCO -12 amostras) acoplado a bomba a vácuo (MARCONI). Os cartuchos foram condicionados por 3 mL de MeOH e 3 mL de água Milli-Q. As amostras percorreram o cartucho com um fluxo de aproximadamente 6 mL.min⁻¹. Com a finalidade de remover sais presentes na amostra, os cartuchos foram

lavados com 3 ml de água Milli-Q, em seguida, seco durante 1 minuto. Os compostos foram eluídos com 1 ml do solvente orgânico (MeOH, PA).

3.7.3. HPLC

A degradação do herbicida e o surgimento dos primeiro metabólitos foram avaliados em HPLC (Perkin Elmer Model Flexar). Antes de injetadas, as amostras foram filtradas em filtros em polietileno (PTFE) de 0,22 µm de poro, não estéril. As condições da análise em HPLC foram: 10 µL de injeção de amostra; Coluna Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (250mm x 4,6mm x 5µm – PN: 959990-902); eluição isocrática contendo fase móvel Água:Acetonitrila (40/60 v/v); Fluxo de 1,0 mL/min; detector UV ajustado em 240nm, forno a 40 °C e tempo de corrida de 9 min.

As curvas de calibração foram realizadas nas concentrações de 0,5 a 50 mg.L⁻¹ para o diuron e 0,05 a 10 mg.L⁻¹ para os metabólitos e o coeficiente de correlação foi de 0,999 para o compostos estudados. Tal coeficiente indicou que a metodologia desenvolvida neste trabalho teve um bom desempenho na quantificação do diuron e seus metabólitos.

3.7.4. LC-MS

Para a confirmação dos metabólitos encontrados em HPLC e para a identificação de novos metabólitos na via de degradação do diuron, as amostras foram injetadas e analisadas em espectrômetro de massa Agilen Technologies 1220 Infinity LC - 500 ion Trap LC-MS, nas seguintes condições: pressão do gás nebulizador, 35 psi; pressão do gás de secagem, de 10 psi; temperatura de secagem do gás, 350°C; tensão da agulha, 5000; e tensão do capilar, 35.

A fase móvel foi constituída de metanol (Solução A: 100% + 0,2% de ácido fórmico) e H₂O Mili-Q (Solução B: 100% + 0,2% de ácido fórmico). A coluna utilizada foi a PerkinElmer C18 (150 mm x 4,6 mm x 5 µm – Cat # N9303558) e o tempo de corrida 26 minutos (20 minutos de corrida e 6 minutos de equilíbrio do sistema). Os espectros de massas obtidos para cada metabólito de interesse estão apresentados no Apêndice C.

3.7.5. GC-MS

A cromatografia gasosa acoplada ao massas foi utilizada principalmente para a detecção de metabólitos não detectados por cromatografia líquida, como também para os metabólitos desconhecidos. Foi utilizado o cromatógrafo da marca Perkin Elmer modelo 680, acoplado a um detector de massas Perkin Elmer, modelo Clarus 600T, software turbo mass. A coluna cromatográfica utilizada foi a Elite 5-MS da Perkin Elmer (30 x 0.25mm, 1um), temperatura de forno ajustado para 40 °C (mantido por 4 minutos) acréscimo de 15 °C/min até 200 °C (mantido por 5 minutos), acréscimo de 20°C/min até 330 °C (mantido por 10 minutos), temperatura do injetor a 270 °C, temperatura da linha de transferência (transferliner) 280 °C, temperatura da fonte de ionização 280 °C, solvente delay (do espectrômetro de massas): 3,5 minutos.

Foi utilizado hélio como gás de arraste, 12 psi/min, modo de injeção splitless e o volume de amostras injetado foi de 1uL. As mostras foram analisadas no modo Scan (50 a 300 m/z) e modo SIR para o monitoramento do íon molecular e de seus fragmentos.

- primeiro canal: 3,50 – 5,00 minutos (benzeno);
- segundo canal: modo scan;
- terceiro canal: 5,01 – 11,00 minutos (anilina);
- quarto canal: 11,01 – 12,00 minutos (1,2-DCB);
- quinto canal: 12,01 – 14,00 minutos (catecol);
- sexto canal: 14, 01 – 16,00 minutos (4-clorocatecol);
- sétimo canal: 16,01 – 30,00 minutos (4-CAC)

3.8. Cultivo submerso das bactérias em 3,4-DCA, 4-CA e 4-CAC para o estudo da via de biodegradação do diuron

Das bactérias estudadas, oito foram selecionadas para cultivo submerso na presença dos metabólitos 3,4-DCA, 4-CA e 4-CAC, separadamente, para a identificação dos metabólitos produzidos. Foi utilizado o meio de cultivo otimizado após planejamento experimental, e as bactérias permaneceram em cultivo por 5 dias, a 30 °C e agitação de 100 rpm.

O preparo do experimento e a extração do material seguiram conforme descrito no item 3.3. Todos os extratos foram analisados em HPLC, LC-MS e GC-MS.

4. Resultados e Discussão

4.1. Codificação e caracterização Gram das bactérias isoladas

As amostras de solo coletadas foram suspensas nos 10 meios de isolamento descritos e após cinco dias de incubação, as alíquotas foram submetidas a diluição em série, plaqueadas e incubadas a 30 °C para observação e isolamento das colônias bacterianas. Em todos os 10 meios de isolamento utilizados, houve formação de mais de 10 colônias nas diluições de 10^{-4} , entretanto, os meios contendo ampicilina e 3,4-DCA, foram os que proporcionaram os menores números de unidades formadoras de colônias (UFC).

Nos meios contendo somente glicose e diuron, pode-se observar a formação de 65 e 57 UFC, respectivamente, na diluição de 10^{-6} , equivalendo a uma concentração média de $1,2 \times 10^8$ bactérias por grama de solo. Observou-se que o número de colônias formadas em meio contendo glicose e em meio contendo diuron foram próximas, embora tenha sido observada uma maior variedade de formas e cores das colônias no meio com glicose. Esse resultado indicou que a glicose permitiu maior variedade bacteriana enquanto que o diuron pode ter exercido efeito seletivo na microbiota.

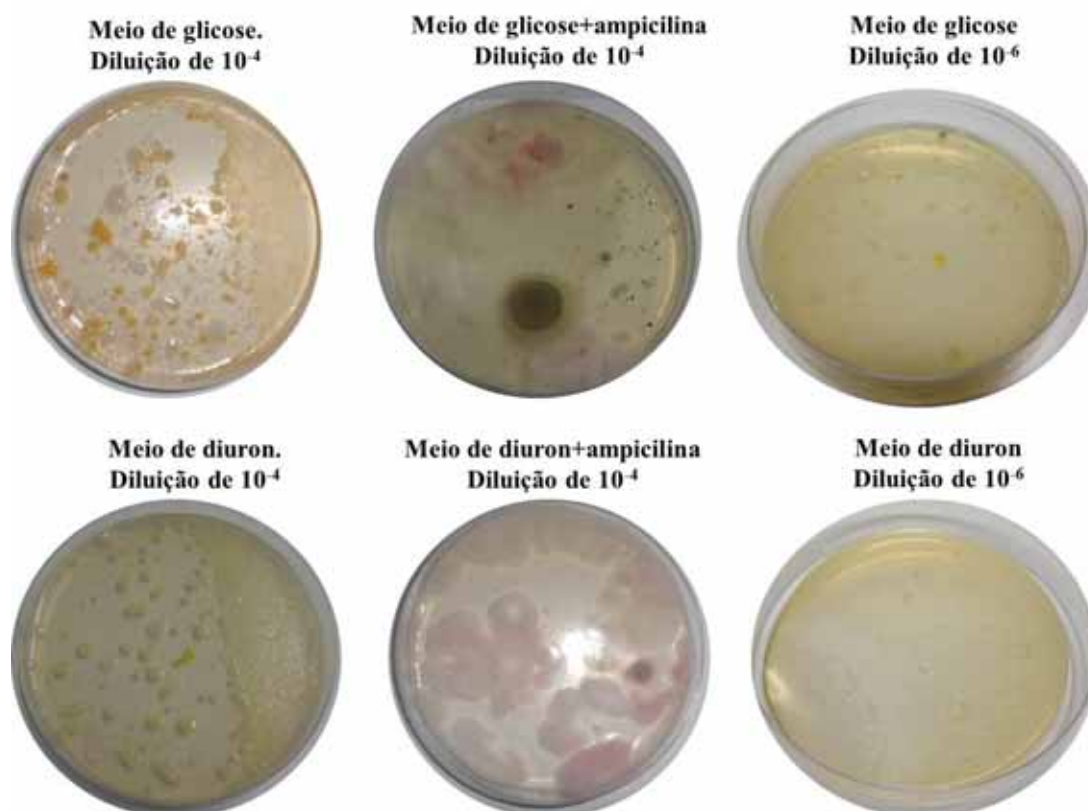
A codificação das bactérias foi realizada de acordo com o nome do coletor das amostras, a fonte de carbono do meio de isolamento, o número da coleta e o número da cepa (Figura 13).

Figura 13: Codificação das bactérias isoladas.



Exceto as placas contendo meio acrescido de cetoconazol, todos os outros meios apresentaram crescimento fúngico após quatro dias de incubação, principalmente as placas de meio contendo ampicilina (Figura 14), que apresentaram crescimento fúngico no terceiro dia de incubação.

Figura 14: Crescimento das colônias bacterianas, em meio sólido, em diluições de 10^{-4} e 10^{-6} .



O processo de cultivo microbiano proporcionou o isolamento de 400 cepas bacterianas, sendo 200 isoladas em meio com glicose e 200 em meio de diuron. A distribuição do código para os isolados encontra-se na Tabela 12.

Tabela 12: Codificação dos isolados.

Coleta	Isolados em glicose	Isolados em diuron
1	TG1.1 a TG1.50	TD1.1 a TD1.50
2	TG2.1 a TG2.50	TD2.1 a TD2.50
3	TG3.1 a TG3.50	TD3.1 a TD3.50
4	TG4.1 a TG4.50	TD4.1 a TD4.50

T= coletor; G= glicose; D=diuron; primeiro número= n.º da coleta, segundo n.º=espécime

Pelo método de isolamento de cultura-dependente, das 400 linhagens isoladas, observou-se que 68% foram Gram-positiva (GP) e 32% Gram-negativa (GN). Bactérias GN são conhecidas por apresentarem rápidas respostas a variações ambientais, aumentando sua concentração quando as fontes de carbono facilmente assimiláveis

estão disponíveis, ou diminuindo na presença de altas concentrações de pesticidas (YANG et al., 2000, Banks et al., 2014).

Devido à presença de uma parede celular relativamente espessa e capacidade para formar endosporos, as bactérias GP são consideradas tolerantes a estresse (HUANG et al., 2009). A capacidade de formação de esporos por bactérias GP apresenta-se entre os gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Sporosarcina*, *Sporolactobacillus*, *Sporohalobacter*, *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Desulfitobacterium*. Esporos do gênero *Bacillus* podem chegar até 10^6 /g de solo (HONG et al., 2009).

Entretanto, informações sobre a abundância das populações bacterianas em solos na literatura são bastante divergentes, sendo o tipo de solo e condições ambientais e antropogênicas fatores que interferem no tipo e na densidade da população microbiana local (ATLAS, BARTHA, 1993, WENDEROTH, REBER, 1999). Zhang et al. (2014) demonstraram que o tratamento com o fungicida fluopiram, mesmo na dose recomendada pelo fabricante, diminuiu a biomassa bacteriana (tanto para as bactérias GP como GN) e biomassa fúngica, em diversos períodos de incubação.

Wenderoth e Reber (1999) isolaram maiores porcentagens de bactérias GP em solo contaminado com metais pesados em baixa concentração, porém, o aumento na concentração de metal levou a um isolamento de maior número de bactérias GN, diminuindo a razão de GP/GN de 10 para 2 quando a concentração aumentou cerca de 7 vezes. Rousseaux et al. (2001), isolaram 26 bactérias de solos por métodos de enriquecimento na presença do herbicida atrazina e 22 (84%) eram GN e 4 (16%) GP.

Comparando-se o período de amostragem e o meio de cultivo no qual as bactérias foram isoladas (Tabelas 13 e 14) tem-se que a quantidade de GN diminuiu após aplicação do herbicida no solo (de 33% para 31%) e na presença de diuron no meio de isolamento (de 36% para 27%).

Tabela 13: Comparação entre as cepas isoladas de acordo com a fase da cultura da cana-de-açúcar.

	GP (%)	GN (%)
Bactérias isoladas em solo sem cobertura vegetal (pós corte)	67	33
Bactérias isoladas em solo após aplicação do herbicida na presença de cana-de- açúcar	69	31

Tabela 14: Comparação entre as cepas isoladas em meios contendo glicose e diuron.

	GP (%)	GN (%)
Bactérias isoladas em meio contendo glicose	64	36
Bactérias isoladas em meio contendo diuron	73	27

Os resultados presentes neste trabalho indicaram que as bactérias GP, por apresentarem a maior parcela populacional no solo amostrado, oferecem maior resistência ao impacto gerado pelo herbicida. Tal observação foi comprovada ao realizar o isolamento em meio indutor, onde a concentração de GP também aumentou, tendo o herbicida exercido uma pressão seletiva negativa sobre as GN, as quais apresentam ser mais sensíveis ao herbicida.

4.2. Identificação e avaliação da degradação de diuron pelas bactérias isoladas

Das 400 bactérias isoladas, 370 atingiram crescimento satisfatório ($OD_{600} \geq 0,3$) e foram submetidas a experimentos para avaliação da degradação de diuron. Embora dados de literatura mostrem que bactérias isoladas em meio indutor foram capazes de biotransformar o diuron em 24h, atingindo taxas de degradação de até 96% (BATISSON et al., 2007; SHARMA et al., 2010) optou-se por realizar as análises por período de cinco dias para garantir uma avaliação mais abrangente da degradação do herbicida por todos os isolados. Os níveis de degradação do diuron foram determinados pela quantificação do herbicida residual nos meios de cultivo, sendo a concentração inicial de 5 mg.L⁻¹.

Com base nos dados da tabela 15, pode-se observar que cerca de 41% das cepas isoladas em meio contendo glicose foram capazes de degradar o diuron (desde 1%), contra somente 27% das bactérias isoladas em diuron. Não foi observada diferença relevante na quantidade de bactérias com taxa de degradação maior que 20% entre os meios de isolamento. Entretanto, deve-se destacar que entre as bactérias isoladas em meio de glicose, o potencial de degradação não ultrapassou 35% (Tabela 16), enquanto que entre as isoladas em meio contendo diuron, houve degradação de até 84% (Tabela 17).

Tabela 15: Descrição da porcentagem de bactérias isoladas com potencial em degradar diuron.

	Meio controle	Meio indutor	Total de isolados
Bactérias isoladas	200 (50%)	200 (50%)	400 (100%)
Bactérias analisadas	181 (45,25%)	189 (47,25%)	370 (92,5%)
Bactérias com potencial em degradar desde 1% de diuron	163 (40,75%)	108 (27%)	271 (67,75%)
Bactérias com potencial em degradar mais de 20% de diuron	21 (5,25%)	24 (6%)	45 (11,25%)

A distribuição do potencial de degradação do diuron pelas 400 bactérias isoladas encontra-se descrita no Apêndice A. As bactérias que apresentaram maiores taxas de degradação do diuron foram analisadas macro e microscopicamente (Figuras 15 e 16) e submetidas à identificação molecular (Apêndice B), como ilustrado nas tabelas 16 e 17. O ágar presente no cultivo da cepa *Pseudomonas aeruginosa* TD2.3 foi pigmentado de verde quando este foi acrescido de 10 mg.L⁻¹ de diuron. Conforme descrito por Vasil (1986) *P. aeruginosa* é a uma bactéria que produz o pigmento pioverdina (pigmento fluorescente), responsável pela cor verde brilhante, entre outros pigmentos como piocianina, piorrubina e piomelanina. Neste trabalho, a bactéria *P. aeruginosa* apresentou taxa de degradação de 29%, sendo que outros trabalhos mostraram porcentagens de degradação de 60% para o gênero (BATISSON et al., 2007).

De acordo com a literatura, bactérias GN são melhores degradadoras de xenobióticos. Castillo et al. (2011) isolaram a bactéria GN *Azotobacter* sp. em solos de plantações de café tratados com endossulfan com grande potencial de degradar o inseticida. Rousseaux et al. (2001) isolaram bactérias degradadores do herbicida atrazina e observaram que bactérias GP não foram capazes de mineralizar completamente o anel de atrazina e sugeriram que a completa mineralização do composto deve ser feita por consórcios microbianos. Por outro lado, Kastner et al. (1994) demonstraram que bactérias GP possuem elevado potencial na degradação e mineralização de xenobióticos como hidrocarbonetos poliaromáticos (HPAs) no solo.

Tabela 16: Identificação molecular, características macroscópicas e taxa de degradação de diuron das bactérias TG selecionadas.

Código	Identificação molecular	Coloração Gram	Cor da colônia	Textura	Forma	mg.L ⁻¹ de diuron consumido *	% de degradação
TG2.31	<i>Enterobacter</i> sp.	GN	bege de centro marcado	pastosa	achatada	1,7	35
TG3.14	<i>Leucobacter</i> sp.	GP	amarelo escuro/fluorescência	pastosa	abaulada	0,5	11
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>	GP	amarelo claro/fosco	mucóide	abaulada	1,4	29
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	GN	bege escuro	mucóide	abaulada	1,6	33
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>	GN	bege claro	pastosa	achatada	1,7	35

* após cultivo de cinco dias.

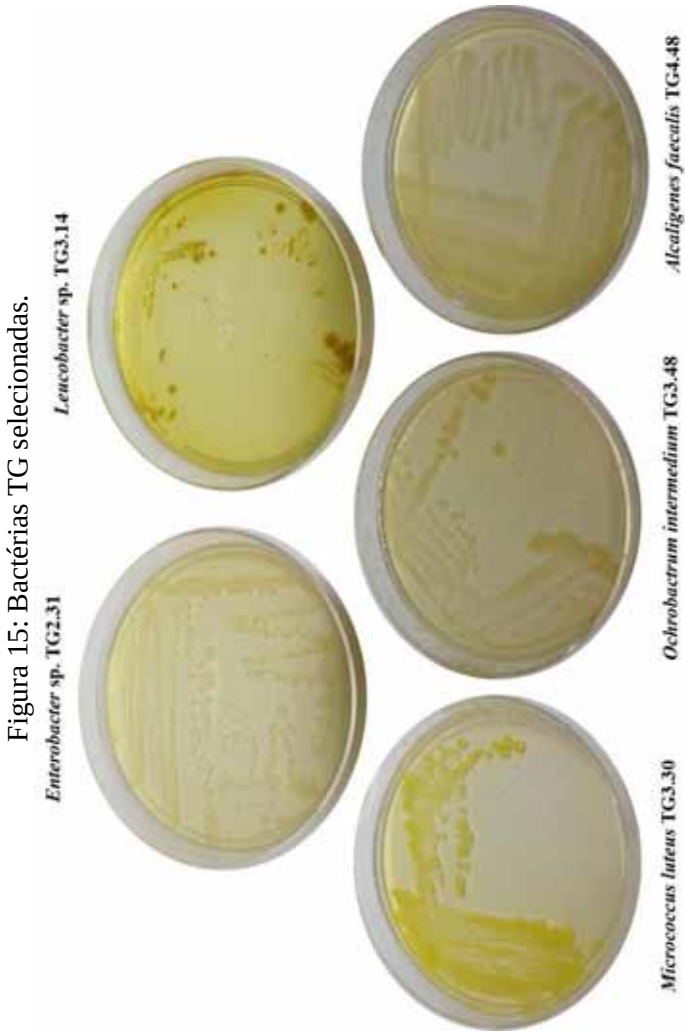


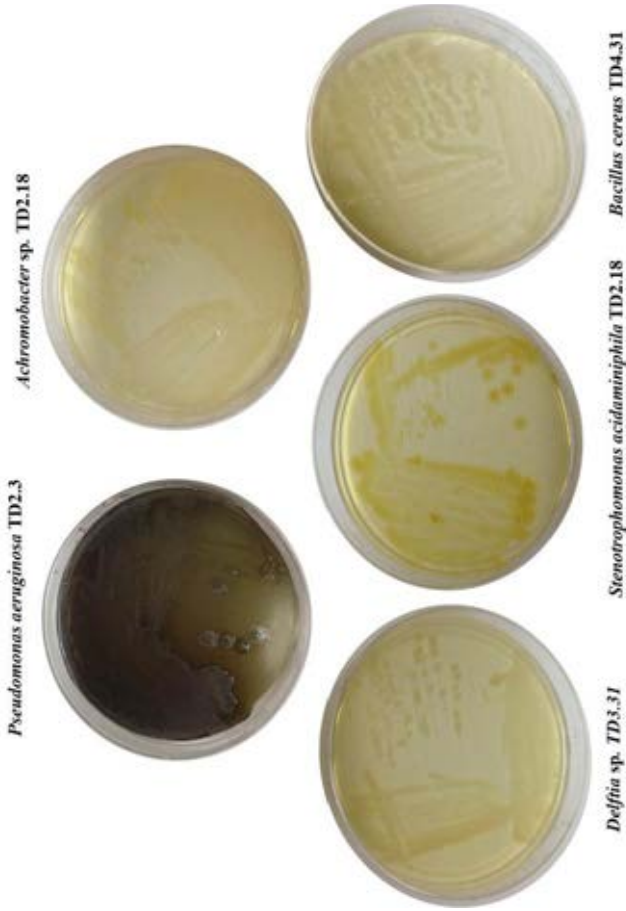
Tabela 17: Identificação molecular, características macroscópicas e taxa de degradação de diuron das bactérias TD selecionadas.

Código	Identificação Molecular	Coloração Gram	Cor da colônia	Textura	Forma	mg.L ⁻¹ de diuron consumido *	% de degradação
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GN	verde/fluorescência **	pastosa	achatada	1,4	29
TD2.18	<i>Achromobacter</i> sp.	GN	Bege	mucoide	abaulada	1,6	32
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.	GN	Bege	mucoide	abaulada	2,3	47
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	GN	amarelo escuro		centro abaulado e bordas achatadas	4,2	84
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>	GP	Branco	pastosa	achatada	3,4	68

* após cultivo de cinco dias.

** Coloração verde quando *P. aeruginosa* foi cultivada na presença de diuron. Coloração bege na ausência de diuron.

Figura 16: Bactérias TD selecionadas.



Neste trabalho foi possível observar que tanto as bactérias GP como GN apresentaram potencial em degradar o herbicida, entretanto houve maior destaque para as GN, em particular a cepa *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD4.7 a qual consumiu 4,2 de 5 mg.L⁻¹ de diuron em cinco dias, atingindo 84% de degradação. Batisson et al. (2007) também observaram taxas de degradação elevadas para a bactéria do mesmo gênero, com degradação de 13 mg.L⁻¹ (65%) de 20 mg.L⁻¹, do herbicida, em 24h. Bactérias do gênero *Stenotrophomonas* estão distribuídas em diversos ambientes como águas, solos e plantas (VAZQUEZ et al., 2005). Assih et al. (2002) isolaram *S. acidaminiphila* de lodo anaeróbio de tratamento de efluentes da indústria petroquímica, sendo a bactéria caracterizada como capaz de crescer e degradar hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. *S. acidaminiphila* também foi relatada como capaz de degradar uma variedade de compostos químicos, aromáticos e cloroaromáticos como acrilamida (LAKSHMIKANDAN et al., 2014) acetamiprida (TANG et al., 2012), HPAs (JUHASZ et al., 2000), microcistina (CHEN et al., 2010) e butaclor (DWIVEDI et al., 2010).

Outra bactéria de destaque neste trabalho foi a cepa *Bacillus cereus* TD4.31, a qual consumiu 3,4 de 5 mg.L⁻¹ de diuron em cinco dias (68% de degradação) em cultivo submerso. Yao et al. (2011) relatam a capacidade da bactéria do gênero *Bacillus* em mineralizar 50 mg.L⁻¹ de 3,4-dicloroanilina em 30 dias. Outros estudos destacam também a capacidade de espécies desse gênero em degradar benzeno em concentrações de até 150 mg.L⁻¹ (DOU et al., 2010), e fenol em concentrações de 2000 mg.L⁻¹ (BANERJEE, GHOSHAL, 2010) demonstrando que as cepas utilizaram os compostos aromáticos como fonte de C e energia. Espécies de *Bacillus* também são descritas como degradadoras de hidrocarbonetos alifáticos, produtoras de biossurfactantes (THAVASI et al, 2011; TULEVA et al, 2005), degradadoras do pesticida dimetil dissulfeto (DMDS) (LIANG et al., 2015) e com ação na remoção de Cd²⁺ de solo contaminado por biossorção (ARIVALAGAN et al., 2014).

As demais bactérias selecionadas para as próximas etapas do trabalho apresentaram capacidade de degradação entre 10 e 50%, sendo elas dos gêneros *Delftia*, *Leucobacter*, *Achromobacter*, *Ochrobactrum*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Alcaligenes*, *Enterobacter*. Bactéria do gênero *Micrococcus* também foi isolada por métodos de enriquecimento por Sharma et al. (2010) e apresentou a habilidade em degradar elevadas concentrações do herbicida diuron, em apenas 30 h. A cepa *Delftia* sp. TD3.31 foi a terceira melhor cepa na degradação do herbicida, sendo este gênero bastante citado

em trabalhos envolvendo biodegradação de xenobióticos com habilidade em biotransformar anilinas, cloroanilinas, linuron, diuron, entre outros (BAZOT et al, 2007; BENNDORF; BABEL, 2002; JUÁREZ-JIMÉNEZ et al, 2010; MÜLLER; BABEL, 2004; PATIL et al, 2006).

A cepa *Ochrobactrum intermedium* apresentou taxa de degradação de 33% após cinco dias de cultivo. Não foram encontrados relatos de degradação de diuron por esta bactéria, entretanto a mesma apresentou resultados satisfatórios na degradação de nicotina (YUAN et al., 2005) e tolerância a metais pesados como o chumbo (WARANUSANTIGUL et al, 2011).

A cepa *Alcaligenes faecalis* apresentou taxa de degradação de 35%, sendo descrita na literatura como capaz de degradar pesticidas organoclorados como o endossulfan (KONG et al., 2013). Essa bactéria é comumente encontrada como componente natural da microbiota de vários ambientes, como solo, água e em plantas de tratamento de esgoto (NAKANO et al., 2014).

Neste trabalho, a cepa identificada como *Achromobacter* sp. apresentou taxa de degradação de 35%, sendo este gênero já descrito na literatura na degradação de diuron como observado por Devers-Lamrani et al. (2014), em que avaliaram a viabilidade do uso de *Achromobacter* sp. SP1 em consórcio com *Arthrobacter* sp. BS2 com o objetivo de mineralizar o herbicida diuron. Há outros relatos na literatura sobre o emprego de *Achromobacter* sp. em biorremediação, como na biodegradação de sulfonamidas (REIS et al, 2014) e bifenil (HONG et al, 2009; STANBROUGH et al, 2013).

4.3. Avaliação de fatores nutricionais e ambientais na degradação do diuron pelas cepas selecionadas utilizando planejamento experimental

Nos ensaios para avaliação de fatores nutricionais sobre a degradação do diuron, foi utilizada concentração de 10 mg.L⁻¹ do herbicida.

Os ensaios de Plackett Burman (PB) mostraram que as concentração de glicose (0 a 0,2%) , de solução de vitaminas (0 a 0,1%) e de sulfato de amônio (0,06 a 0,13%) nos meios com pH inicial de 6,5; 7,0 ou 7,5 não influenciaram significativamente a degradação do diuron pelas cepas selecionadas (intervalo de $R^2 \leq 85\%$). Apesar da não significância estatística para este experimento, pode-se observar uma tendência clara do

efeito da adição de glicose ao meio. Entretanto, somente a bactéria *A. faecalis* TG4.48 apresentou maiores taxas de degradação na ausência de glicose e pH 6,5.

Com base nesse experimento, ficou estabelecido que 0,1% de solução de vitaminas e 0,13% de nitrogênio foram suficientes para o desenvolvimento das bactérias (Tabela 18).

Tabela 18: Melhores condições de experimento para o planejamento PB.

Código	Identificação	Glicose	Vitaminas	N*	pH	% degrad.
TG2.31	<i>Enterobacter</i> sp.	0,1%	0,1%	0,13%	7	9,3
TG3.14	<i>Leucobacter</i> sp.	0,1%	0,1%	0,13%	7	9,1
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>	0,2%	0,1%	0,13%	7	10,7
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0,2%	0,1%	0,13%	7	9,2
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0%	0%	0,06%	6,5	7,9
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,2%	0,1%	0,06%	7	9,0
TD2.18	<i>Achromobater</i> sp.	0,1%	0,1%	0,13%	7	10,2
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.	0,1%	0,1%	0,13%	7	11,7
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	0,1%	0,1%	0,13%	7	11,2
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>	0,1%	0,1%	0,13%	7	8,2

*(NH₄)₂SO₄ utilizado como fonte de nitrogênio.

Considerando o efeito da glicose no meio de cultivo, optou-se por realizar outra bateria de ensaios variando a concentração de glicose de zero a 0,5%, fixando a concentração de vitamina, nitrogênio e pH em 0,1%; 0,13% e 7,0, respectivamente, num planejamento fatorial completo (PFC) e delineamento composto central rotacional (DCCR).

O experimento realizado por planejamentos PFC revelou significância na concentração de glicose e volume de inóculo somente para a bactéria *Enterobacter* sp. TG2.31. Esse resultado revelaram que a capacidade de degradação de diuron por esta cepa depende da presença de glicose e acontece em maiores concentrações celulares.

O experimento realizado por planejamentos DCCR (Tabela 19) revelou significância para as bactérias *Alcaligenes faecalis* TG4.48; *Achromobater* sp. TD2.18 e *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD4.7. Para essas três cepas, a glicose apresentou-se como indutora da degradação do herbicida (Figura 17A), diferentemente do observado no planejamento PB para a cepa *Alcaligenes faecalis* TG4.48.

Tabela 19: Melhores condições de experimento para o planejamento PFC/DCCR.

Código	Identificação	Glicose	Inóculo (µL)	% degrad.	D.O. (600nm)
TG2.31	<i>Enterobacter</i> sp..	0,5%	550	10,1	0,221
TG3.14	<i>Leucobacter</i> sp.	0,25%	550	6,2	0,594
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>	0,5%	550	11,1	0,289
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0,5%	550	12,0	0,906
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,43%	868	13,3	0,357
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,5%	550	17,3	1,093
TD2.18	<i>Achromobacter</i> sp.	0,25%	1000	17,9	0,768
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.	0,42%	232	17,6	0,101
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	0,25%	550	21,3	0,532
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>	0,25%	550	27,2	0,683

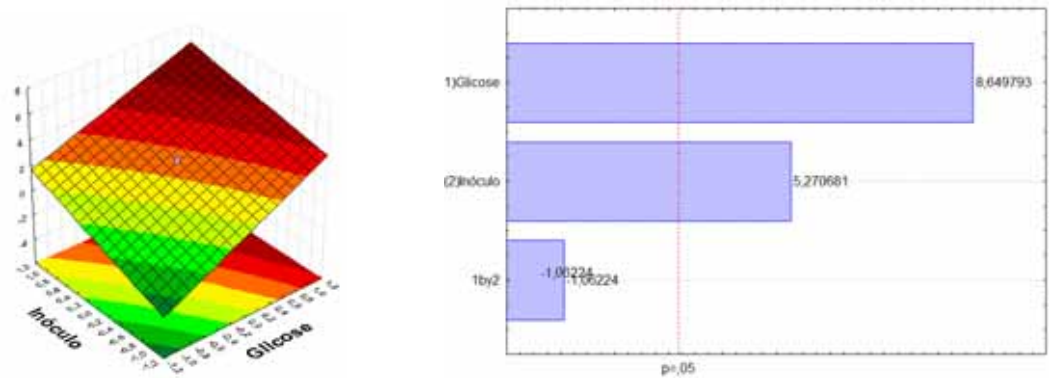
Quanto a variável inóculo, tem-se que a quantidade de células presentes no meio no início do cultivo interferiu significativamente na degradação do diuron, embora de forma diferente para cada cepa, como apresentado na figura 17A. O gráfico de Pareto (Figura 17B) revela que as variáveis glicose e volume de inóculo apresentam resultados significativos separadamente, entretanto a combinação de ambas resultou em aumento significativo da degradação do herbicida (significância $p=0,05$) para as bactérias em questão.

O crescimento celular também foi avaliado pela variação de absorbância, a 600 nm, no cultivo das cepas em meio contendo glicose (0,5%), diuron (5 mg.L⁻¹) e glicose+diuron. Exceto para a bactéria *Enterobacter* sp. TG2.31 que apresentou maior crescimento em meio contendo somente diuron como fonte de C, e a *Delftia* sp. TD3.31, a qual não apresentou diferença no crescimento entre os meios, todas as cepas selecionadas apresentaram maiores crescimentos na presença de glicose (Figuras 18 e 19).

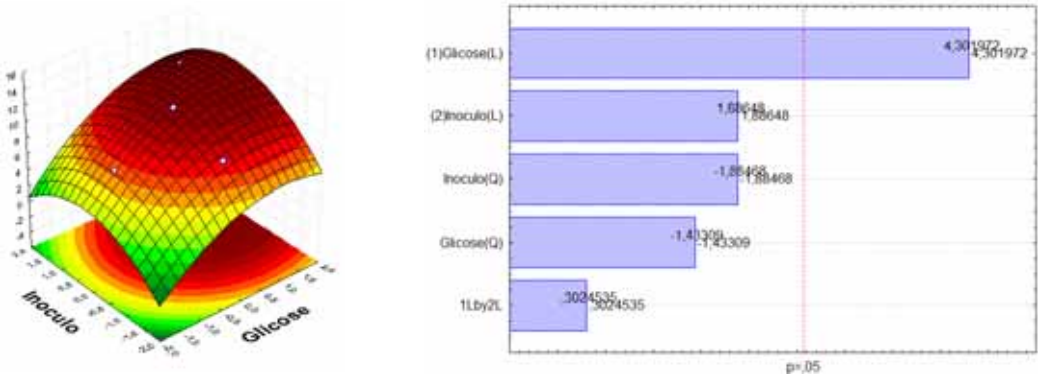
A tabela 20 apresenta as taxas de degradação de cada bactéria, nos dois planejamentos estatísticos.

Figura 17: A. Superfície de resposta e B. gráfico de Pareto do efeito da glicose e do volume de inóculo na degradação de diuron.

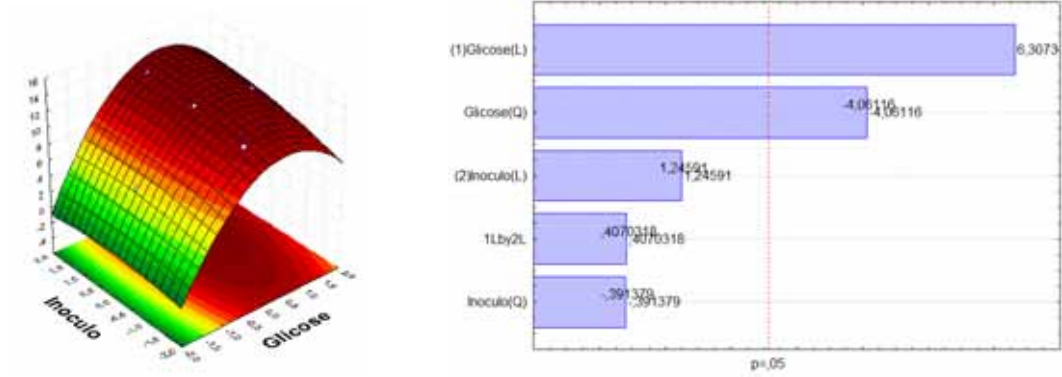
A. B.
TG2.31: PFC Fórmula: $y = 2,332323 + 2,397742g + 1,461045i - 0,294455gi$



TG4.48: DCCR Fórmula: $y = 11,63048 + 2,13649g - 0,84711g^2 + 0,93688i - 1,11405i^2 + 0,21243gi$



TD2.18: DCCR Fórmula: $y = 12,76379 + 2,57163g - 1,97082g^2 + 0,50798i - 0,18993i^2 + 0,23470gi$



TD4.7 DCCR Fórmula: $y = 13,84224 + 0,74084g - 3,18651g^2 + 0,15488i - 2,75102i^2 - 0,16248gi$

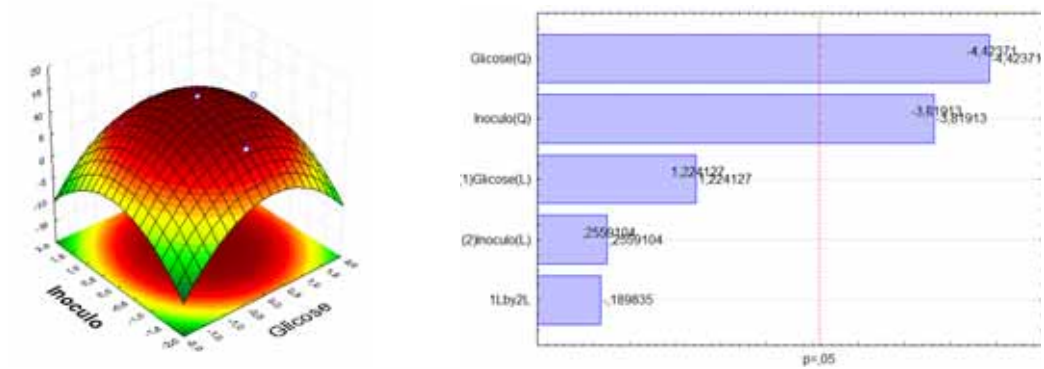


Figura 18: Avaliação do crescimento das bactérias TG na presença de glicose e/ou diuron por 26 horas:

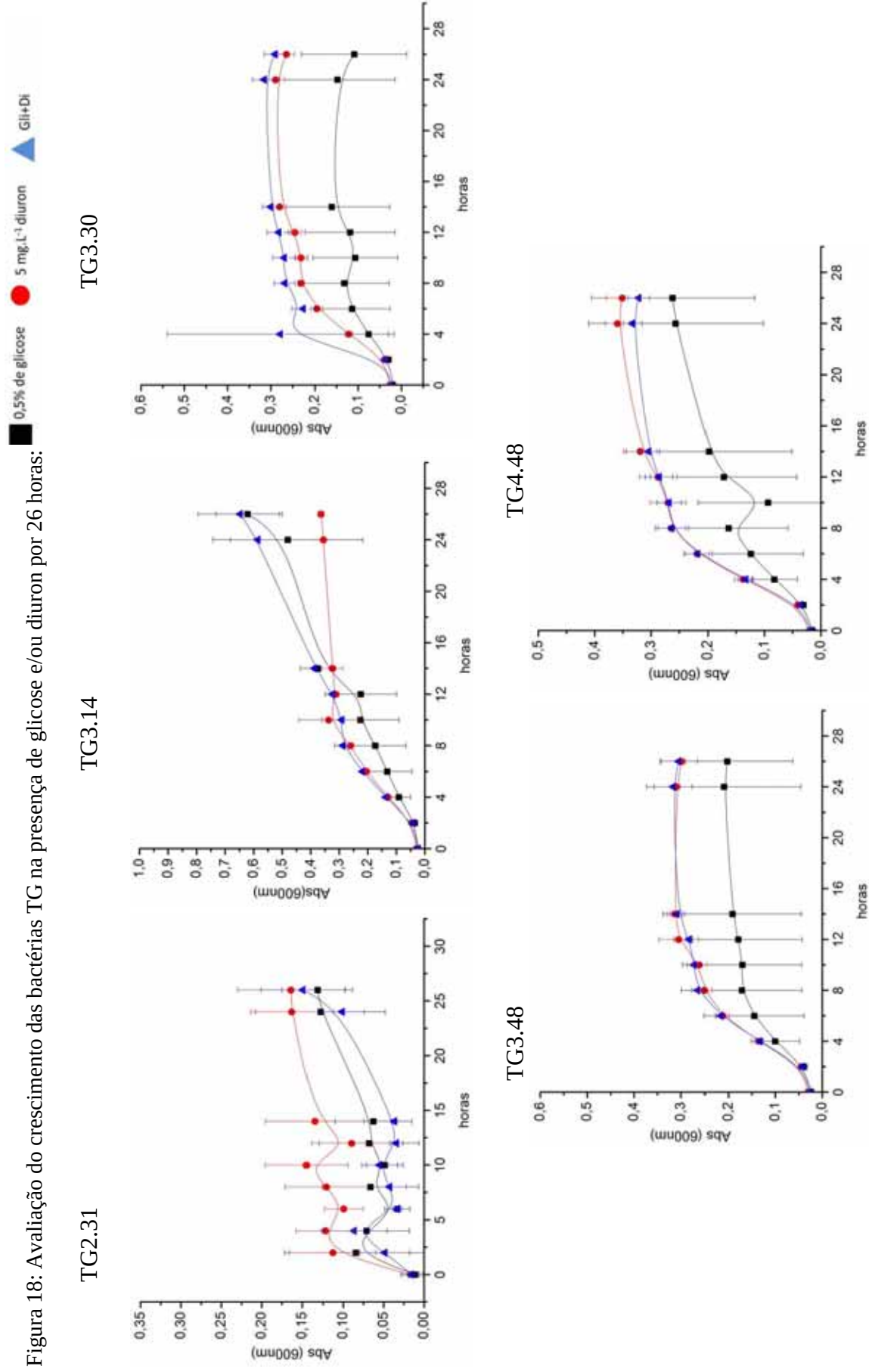


Figura 19: Avaliação do crescimento das bactérias TD na presença de glicose e/ou diuron por 26 horas:

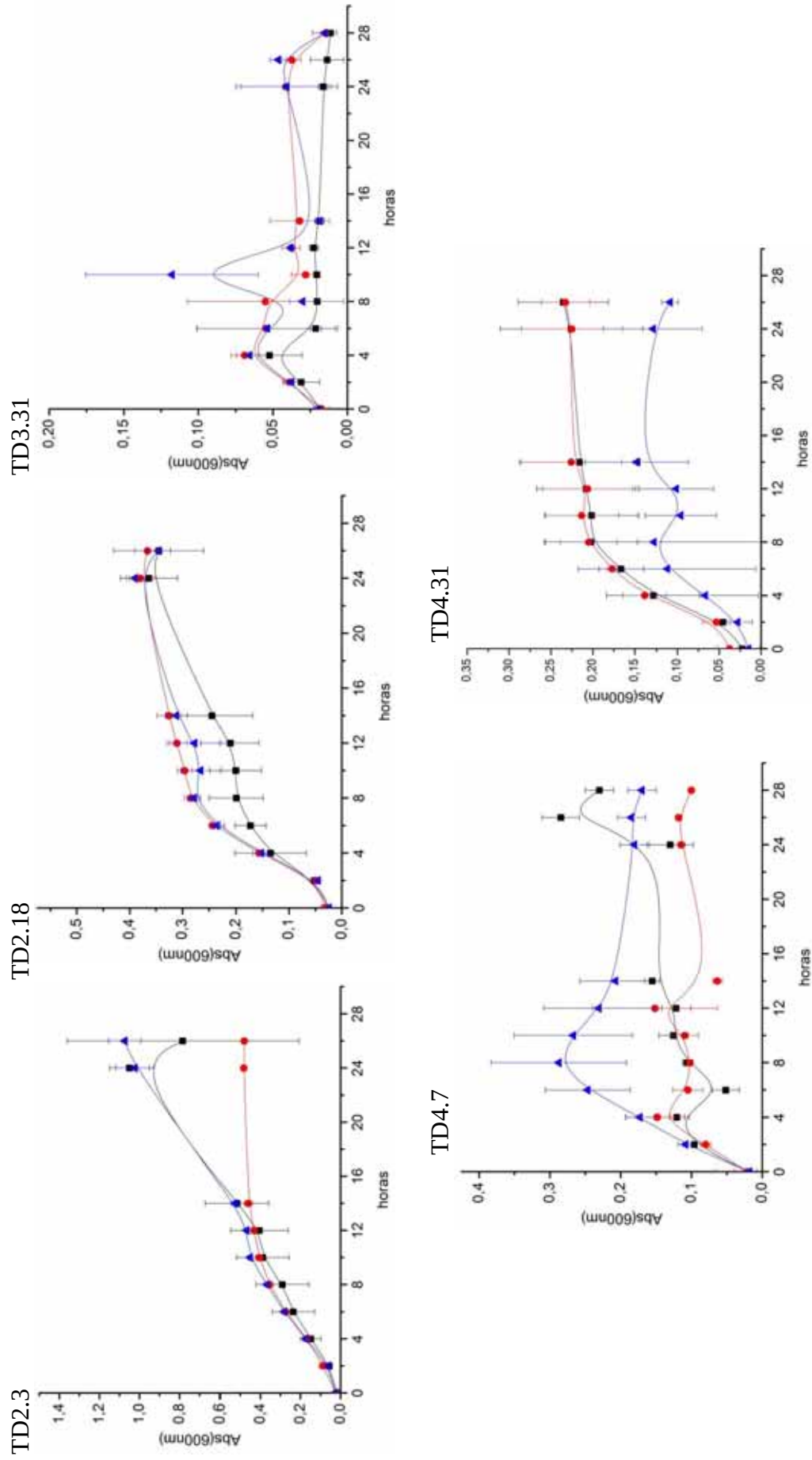


Tabela 20: Comparação da degradação entre os planejamentos estatísticos estudados.

Código	Identificação	mg.L ⁻¹ de diuron consumido no PB	mg.L ⁻¹ de diuron consumido no PFC/DCCR*
TG2.31	<i>Enterobacter</i> sp..	0,9 (9,3%)	1,1 (10,1%)
TG3.14	<i>Leucobacter</i> sp.	0,9 (9,1%)	0,6 (6,2%)
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>	1,0 (10,7%)	1,1 (11,1%)
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	0,9 (9,2%)	1,2 (12,0%)
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>	0,8 (7,9%)	1,3 (13,3%)*
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,9 (9,0%)	1,7 (17,3%)
TD2.18	<i>Achromobacter</i> sp.	1,0 (10,2%)	1,8 (17,9%)*
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.	1,2 (11,7%)	1,8 (17,6%)
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	1,1 (11,2%)	2,1 (21,3%)*
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>	0,8 (8,2%)	2,7 (27,2%)

Os resultados obtidos nesses experimentos revelaram que a presença de glicose no meio de cultura favorece o crescimento microbiano e a degradação do diuron, sugerindo que um sistema de cometabolismo pelas bactérias na degradação do diuron possa estar ocorrendo. Sharma et al. (2010) também observaram a degradação de diuron em meio contendo 0,5% de glicose e obtiveram 96% de degradação de diuron pela bactéria *Micrococcus* sp. PS-1. Ellegaard-Jensen et al. (2013) defendem que é improvável que o fungo *Mortierella* sp. LEJ701 utilize o diuron como fonte de C e/ou N, uma vez que o crescimento não foi estimulado pela adição do herbicida, mesmo com as mais baixas concentrações de glicose e NH₄Cl.

Dados divergentes foram encontrados por Roque e Melo (2000) que observaram o melhor crescimento da bactéria *Acinetobacter baumannii* em meio contendo diuron na presença de NH₄NO₃, porém a glicose não estimulou o crescimento, sugerindo uma atividade de repressão catabólica na presença dessa fonte de carbono.

Os resultados adquiridos pelos experimentos delineados por planejamentos estatísticos pode revelar que as bactérias selecionadas não atingiram a degradação observada no experimento de triagem. Apesar de a concentração do herbicida ter aumentado de 5 para 10 mg.L⁻¹, a quantidade (em mg.L⁻¹) consumida pela bactéria no mesmo período foi menor que a detectado nos testes anteriores. Foi descartada a possibilidade de toxicidade do diuron, pois o crescimento bacteriano na presença de diuron apresentou-se maior para a maioria das bactérias estudadas comparado com o crescimento na ausência do herbicida. A partir de tal resultado, supõe-se que as bactérias possam ter perdido o potencial de degradação devido aos sucessivos repiques

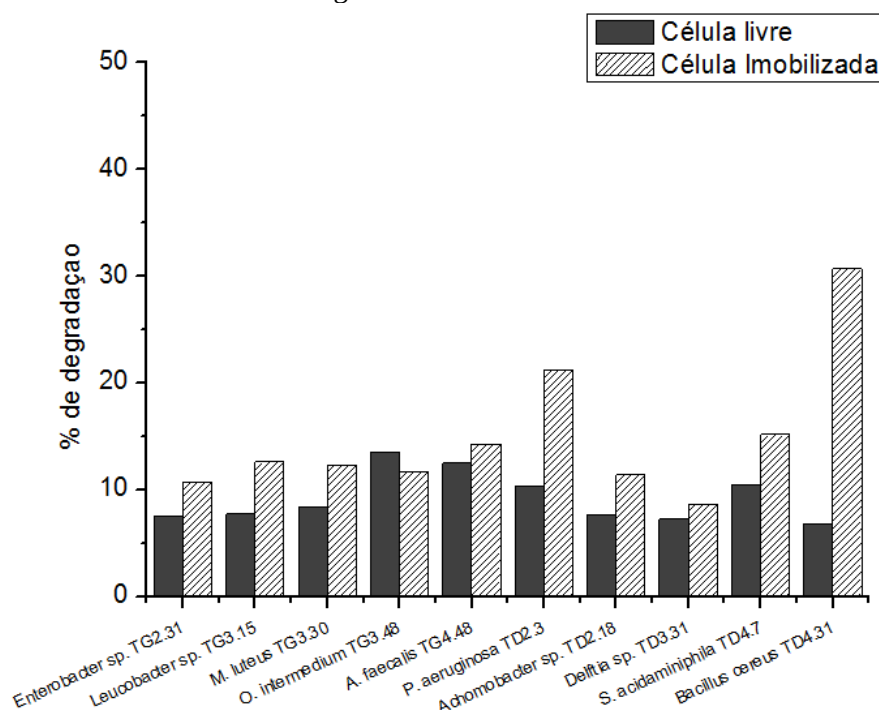
ou perda de plasmídeo correspondente à habilidade de degradação (TAM et al, 1987; CHAUDHRY, CHAPALAMADUGU, 1991; TURNBULL et al., 2001b).

4.4. Avaliação da degradação de diuron pelas bactérias imobilizadas em alginato de cálcio e por microcosmo

Os ensaios de degradação do diuron pelas 10 bactérias imobilizadas em alginato de cálcio foram realizados na concentração de 50 mg.L⁻¹ do herbicida.

A imobilização na matriz de alginato-Ca proporcionou um aumento na capacidade das bactérias em degradar diuron entre 2 e 24%, sendo este último pertencente a bactéria *B. cereus* TD4.31 (Figura 20). Esses dados corroboram com os de Banerjee e Ghoshal (2011), que observaram uma maior eficiência na degradação de fenol por células imobilizadas de *B. cereus* em relação às livres, indicando uma melhor tolerância das células imobilizadas em relação à toxicidade do fenol.

Figura 20: Comparação da taxa de degradação de 50 mg.L⁻¹ de diuron utilizando células bacterianas livres e imobilizadas em alginato-Ca.



A bactéria *O. intermedium* TG3.48 revelou a única cepa a qual teve sua capacidade de degradação diminuída na presença das esferas de alginato. De acordo com Bazot e Lebeau (2009), a vantagem do processo com biomassa imobilizada inclui,

na maioria dos casos, a melhoria da estabilidade da célula microbiana, permitindo a operação de um processo contínuo, evitando a necessidade de separação da biomassa do líquido de cultivo ou ainda, o reaproveitamento da biomassa em sistemas de batelada (MARTINS et al., 2013). Entretanto, estes autores também demonstraram que nem toda bactéria possui melhor desempenho na presença de matriz de alginato, observando que a melhor taxa de dissipação de diuron foi obtida por células livres de *Arthrobacter* sp. N4 co-cultivadas com células de *Delftia acidovorans* WDL34 imobilizadas.

O cultivo das células imobilizadas na presença de diuron apresentou variadas concentrações dos primeiros metabólitos a partir da degradação do herbicida (Tabela 21), entretanto as concentrações observadas foram menores quando comparadas com outros métodos de cultivo (conforme resultados nos próximos itens).

Tabela 21: Variação da concentração, em mg.L^{-1} , dos primeiros metabólitos da degradação de diuron por células imobilizadas em alginato-Ca.

	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
Mínimo observado	0,02	0,06	0,09
Máximo observado	0,08	0,10	0,13

A presença de um sinal cromatográfico no tempo de retenção de 4,15 min foi observada no cultivo das células imobilizadas das cepas *P. Aeruginosa* TD2.3 e *B. cereus* TD4.31 (Figuras 21 e 22). Até o presente momento, não foi possível a identificação deste metabólito.

Figura 21: Cromatograma, em HPLC, do cultivo de células imobilizadas da bactéria *P. aeruginosa* TD2.3 na presença de diuron.

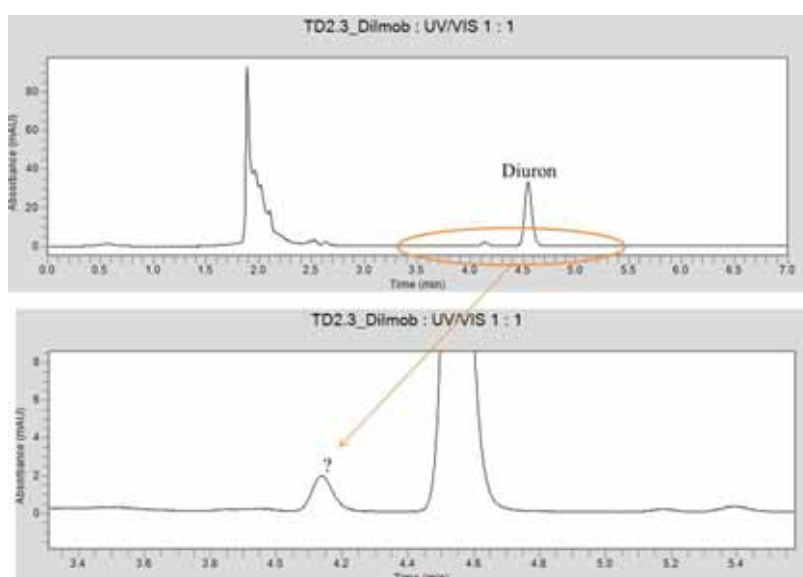
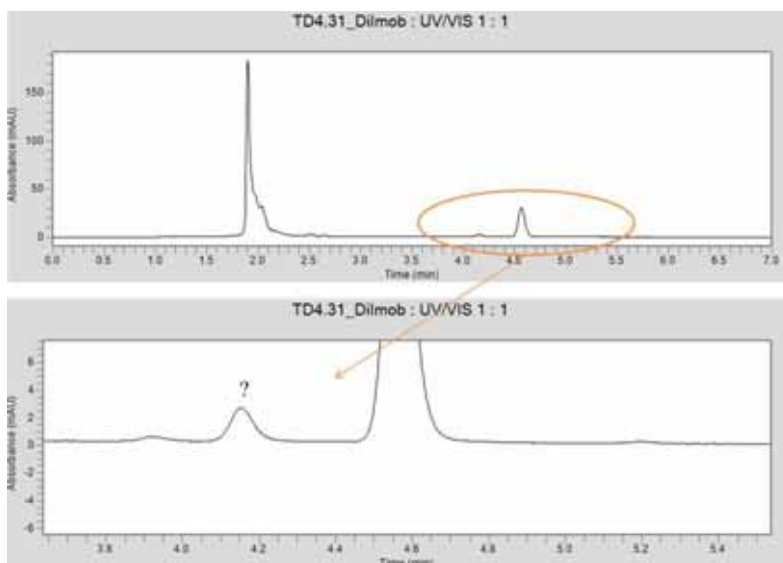


Figura 22: Cromatograma, em HPLC, do cultivo de células imobilizadas da bactéria *B. cereus* TD4.31 na presença de diuron.



Mesmo a imobilização tendo apresentado resultados positivos para a cepa *B. cereus* TD4.31, optou-se por utilizar células livres no experimento de degradação do herbicida diuron em sistemas de microcosmos para observar a interação dos microrganismos com as partículas do solo.

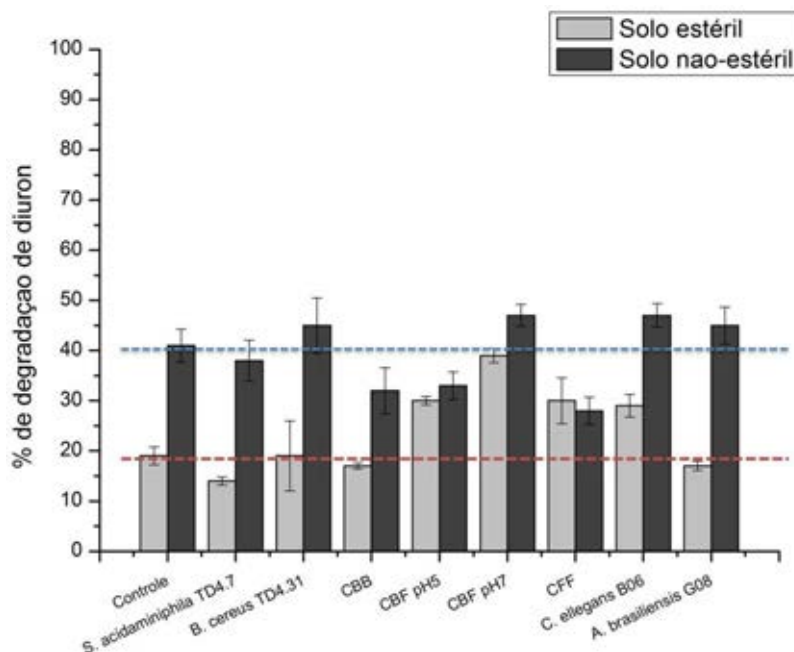
Os ensaios de otimização em microcosmo foram realizados na concentração de 50 mg.L⁻¹ do herbicida, utilizando as cepas *S. acidaminiphila* TD4.7 e *B. cereus* TD4.31, as quais apresentaram melhor desempenho na degradação do diuron, e dois fungos da coleção do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia Aplicada, Unesp – Campus S.J. Rio Preto. Os fungos selecionados para este experimento foram o *Cunninghamella elegans* B06 e *Aspergillus brasiliensis* G08, os quais também foram isolados em solo com histórico de aplicação do herbicida diuron.

Nos ensaios para a padronização da metodologia de microcosmo observou-se que 20% do diuron aplicado ao solo não pode ser recuperado provavelmente por adsorção às partículas do solo. Desse modo, essa proporção do diuron foi considerada não biodisponível e descontada nos cálculos de porcentagem de degradação ao longo dos ensaios.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos de microcosmo utilizando solos estéril e não-estéril, pode-se observar que neste último houve maior degradação do herbicida diuron (Figura 23) porém, sem significância estatística (*Anova*, $p > 0,05$). A taxa de degradação da amostra de controle para o solo não-estéril foi interpretada como a degradação realizada pelos microrganismos já presentes no solo (controle).

A partir das amostras de solo estéril, tem-se que os cultivos na presença de fungos (separadamente ou em consórcio) apresentaram maiores taxas de degradação do herbicida diuron. Entretanto, amostras de solo não-estéril revelaram elevadas taxas de degradação tanto na presença de fungos como de bactérias.

Figura 23: Avaliação da degradação de diuron em solo estéril (após autoclavagem) e não-estéril.



Para este primeiro experimento de microcosmo, a bioaugmentação do solo com a bactéria *B. cereus* TD4.31 e consórcio microbiano CBF (pH 7) proporcionaram as maiores taxas de degradação do herbicida diuron. Por outro lado, a combinação entre as bactérias (CBB) e os fungos (CBF) selecionados, pode-se observar que o consórcio revelou um efeito negativo quando comparado com a ação dos microrganismos separadamente.

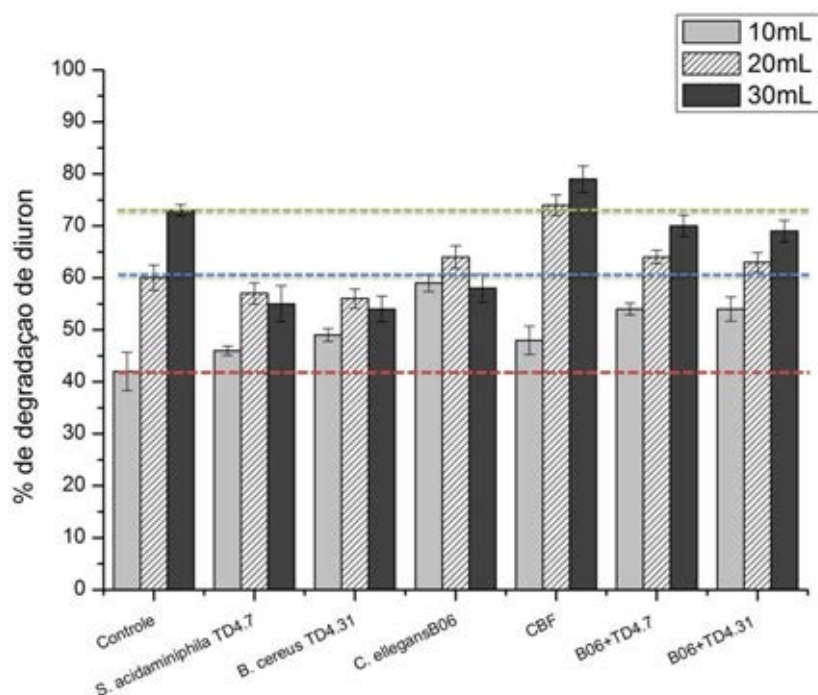
Alguns autores relatam a participação dos fungos na degradação de xenobiótico como importante, porém secundária à participação das bactérias. Segundo Nojiri e Tsuda (2005) a diversidade metabólica das bactérias permite a elas utilizar produtos químicos complexos como fonte de carbono e energia mais rapidamente que os fungos. Bouwer e Zehnder (1993) relatam que as bactérias são conhecidas como melhores degradadores de xenobióticos, entretanto fungos podem revelar-se valiosos degradadores de estruturas moleculares, que não são de outra forma facilmente transportada em células bacterianas ou metabolizada pelas mesmas.

Ensaio realizado com solo estéril pode-se observar que a amostra controle apresentou taxa de degradação de 20% (Figura 23). Alfonso-Hernandez et al. (1984) observaram que a quantidade de diuron degradado no ambiente através de processos não-biológicos no solo pode variar entre 55 a 70%, durante 3 semanas após a aplicação, sendo essa taxa aumentada para 80 a 85% quando ocorre a participação de microrganismos.

O segundo experimento de microcosmo foi realizado com solo não estéril, utilizando as melhores combinações do primeiro microcosmo, adicionando-se a combinação entre o melhor fungo com as duas bactérias selecionadas para o experimento, separadamente.

O microcosmo em solo não-estéril revelou que a taxa de degradação do herbicida diuron está relacionada com o teor de umidade do solo. Pela análise estatística, pode-se observar uma diferença significativa na porcentagem de degradação de diuron em relação ao teor de umidade (ANOVA, $p = 0,005$). Entretanto, novamente o experimento revelou a capacidade dos microrganismos já presentes no solo em degradar o herbicida, sendo a adição das bactérias e fungos não relevante para o aumento da degradação (Figura 24).

Figura 24: Avaliação do teor de umidade na degradação de diuron em solo não-estéril.



Safi et al., 2014 estudaram o potencial de cianobactérias em aumentar a taxa de degradação do diuron em solos contaminados e observaram que a degradação do diuron no solo aumentou na presença de cianobactérias quando adicionadas à água de irrigação, entretanto o aumento da concentração do microrganismo não aumentou proporcionalmente a biodegradação do herbicida. Bois et al., 2013 estudaram a eficiência de uma bacia de águas pluviais para reter as águas de escoamento de solo agrícola contaminado com herbicida glifosato, diuron e, o metabólito do diuron, 3,4-DCA. Esses autores mostraram que o aumento da concentração de microrganismo e a presença de planta não tiveram efeito significativo na redução do herbicida, sendo a presença de microrganismos nativos suficiente para degradar o herbicida em 5 semanas.

De acordo com os resultados, a adição inicial de 10 mL de solução salina proporcionou as menores taxas de degradação para todos os tipos de inóculo, comparado com os volumes de 20 e 30 mL. A baixa disponibilidade de água pode inibir a atividade microbiana, diminuindo o potencial da água intracelular, reduzindo a hidratação e atividade de enzimas (STARK, FIRESTONE, 1995).

A adição de 20 mL de solução salina apresentou ser a melhor condição para os inóculos contendo os microrganismos separadamente, podendo inferir que quantidades mais elevadas poderiam diminuir a taxa de oxigênio disponível para o desenvolvimento dos mesmos. A combinação dos microrganismos selecionados apresentou maiores taxas de degradação na maior umidade, revelando a necessidade de água no desenvolvimento de um volume maior de biomassa.

As amostras de microcosmo apresentaram variadas concentrações dos primeiros metabólitos a partir da degradação de diuron (Tabela 22), entretanto as maiores concentrações foram encontradas nas amostras de consórcio CBF.

Tabela 22: Variação da concentração, em mg.L^{-1} , dos primeiros metabólitos da degradação de diuron em sistema de microcosmo, em solo não-estéril.

	DCPMU	DCPU	3,4-DCA
Mínimo observado	0,44 (controle)	0,04 (controle)	0,05 (controle)
Máximo observado	1,68 (CBF 10mL)	0,26 (TD4.7 30mL)	0,12 (B06 30mL e TD4.7 10mL)

Devido ao uso de uma coluna analítica menor para a análise das amostras de microcosmo, em HPLC, os sinais cromatográficos apresentam-se com tempo de retenção distinto ao das análises de triagem, planejamento e imobilização. As condições

de análise em HPLC foram: 10 µL de injeção de amostra; Coluna PerkinElmer C18 (150 mm x 2,1 mm x 1,9 µm); eluição isocrática contendo fase móvel Água:Acetonitrila (50/50 v/v); Fluxo de 0,5 mL/min; detector UV ajustado a 240nm, forno a 40 °C e tempo de corrida de 12 min.

Os sinais cromatográficos adquirido para os padrões analíticos e a presença dos primeiros metabólitos encontram-se ilustrados nas figuras de 25 a 28.

Figura 25: Tempo de retenção dos sinais cromatográficos, em HPLC, dos padrões analíticos de diuron e seus primeiros metabólitos.

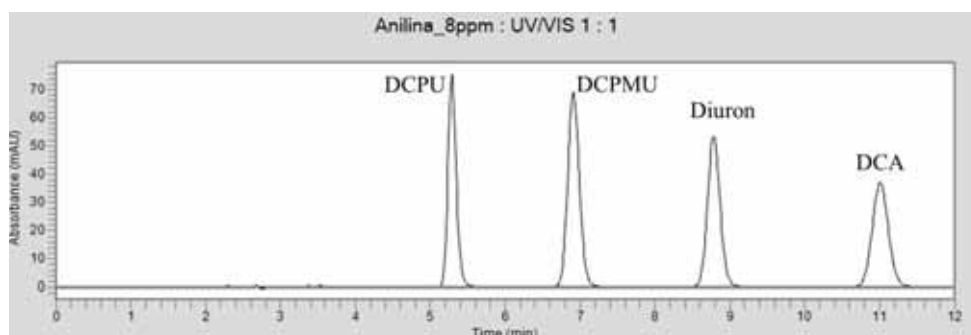
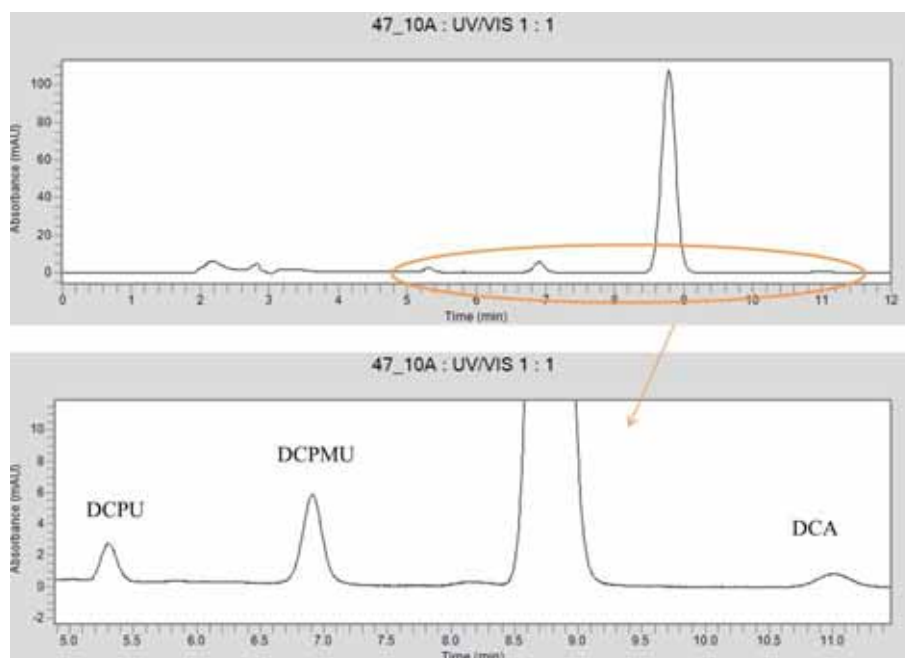


Figura 26: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pela bactéria *S. acidaminiphila* TD4.7



A presença de um sinal cromatográfico no tempo de retenção de 8,1 min foi observada em todos os tipos de cultivo nas amostras de microcosmo, sendo sua

intensidade mais elevada nas amostras em maior teor de umidade e na presença de fungo (Figuras 27 e 28). Até o presente momento, não foi possível a identificação deste metabólito, entretanto há indicação deste metabólito ser o mesmo encontrado no tempo de retenção de 4,15 min para as amostras de imobilização, visto que ambos se apresentam entre os sinais de diuron e do metabólito DCPMU.

Figura 27: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pelo consórcio CBF (*S. acidaminiphila* TD4.7; *B. cereus* TD4.31; *C. elegans* B06; *A. brasiliensis* G08).

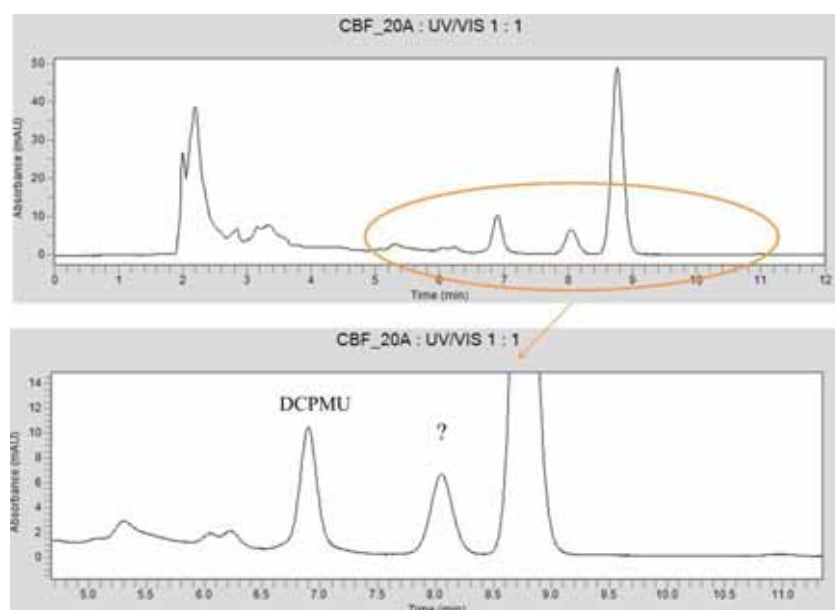
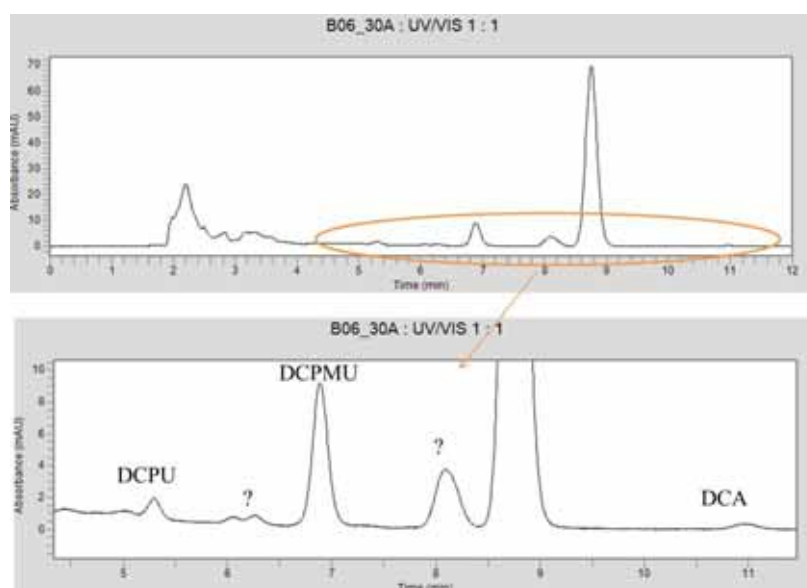


Figura 28: Sinais cromatográficos, em HPLC, da formação dos primeiros metabólitos do diuron em sistema de microcosmo bioaumentado pelo fungo *C. elegans* B06.



Ao analisar o comportamento das bactérias nos diversos tipos de cultivo (Tabela 23), pode-se observar que a concentração do herbicida interfere na taxa de degradação do mesmo, sendo que concentrações mais elevadas estimulam os microrganismos a utilizarem o composto, mesmo na presença de outras fontes de carbono.

Tabela 23: Quantidade, em mg.L^{-1} , de diuron biotransformado por bactérias isoladas de solo de canavial, em diversas técnicas de cultivo.

Bactéria	Triagem (5 mg.L^{-1} diuron em 5 dias)	Planejamento (10 mg.L^{-1} diuron em 5 dias)	Cultivo de células livres (50 mg.L^{-1} diuron em 5 dias)	Imobilização celular (50 mg.L^{-1} diuron em 5 dias)	Microcosmo solo estéril (50 mg.L^{-1} diuron em 20 dias)
<i>Enterobacter</i> sp. TG2.31	1,75	1,01	3,77	5,37	-
<i>Leucobacter</i> sp. TG3.15	0,55	0,62	3,87	6,3	-
<i>M. luteus</i> TG3.30	1,45	1,11	4,17	6,17	-
<i>O. intermedium</i> TG3.48	1,65	1,2	6,78	5,86	-
<i>A. faecalis</i> TG4.48	1,75	1,33	6,25	7,14	-
<i>P. aeruginosa</i> TD2.3	1,45	1,73	5,16	10,63	-
<i>Achromobacter</i> sp. TD2.18	1,6	1,79	3,85	5,70	-
<i>Delftia</i> sp. TD3.31	2,35	1,76	3,61	4,34	-
<i>S. acidaminiphila</i> TD4.7	4,2	2,13	5,26	7,58	7,0*
<i>Bacillus cereus</i> TD4.31	3,4	2,72	3,42	15,33	9,5*

* valores não subtraídos da degradação de diuron em solo controle.

4.5. Proposta de via de degradação de diuron por bactérias isoladas de solo de canavial

Como já descrito, a via de degradação do diuron inicia-se pela desmetilação do herbicida, produzindo primeiramente o metabólito DCPMU, seguido do DCPU e 3,4-DCA. Este processo pode estar associado a presença de enzimas desmetilases, as quais são reportadas como enzima associadas ao citocromo *P450*, observadas em bactérias do gênero *Pseudomonas*, e estão envolvida em degradação de diversos compostos tóxicos (CHAKRABORTY et al., 2005). Os metabólitos desmetilados foram observados em baixas concentrações nos meios de cultivo conforme mostrado nos cromatogramas (Tabela 24), entretanto a variação das concentrações ao longo dos cultivos sugere o consumo dos mesmos pelas bactérias.

Tabela 24: Variação das concentrações dos metabólitos do diuron pelas 370 cepas após cinco dias de cultivos. As cepas foram agrupadas de acordo com o meio no qual foram isoladas.

	DCPMU (mg.L⁻¹)	DCPU (mg.L⁻¹)	3,4-DCA (mg.L⁻¹)
Isolados em glicose (TG)	0,16 a 0,94	0,12 a 0,67	0,28 a 0,80
Isolados em diuron (TD)	0,16 a 0,20	0,13 a 0,53	0,36 a 0,42

Apesar das bactérias isoladas em meio contendo diuron apresentarem as maiores taxas de degradação do herbicida, observou-se maior quantidade de metabólitos nos isolados em meio de glicose, podendo propor que as bactérias TD teriam maior habilidade em degradar os metabólitos formados, dando sequência à degradação da molécula de diuron.

Alguns exemplos dos cromatogramas das amostras de diuron, formação dos primeiros metabólitos e sua confirmação em espectrômetro de massas estão ilustradas nas figuras de 29 a 34.

Figura 29: Tempo de retenção dos sinais cromatográficos, em HPLC, referente aos padrões analíticos de diuron, DCPMU, DCPU e 3,4-DCA na concentração de 8 mg.L^{-1} .

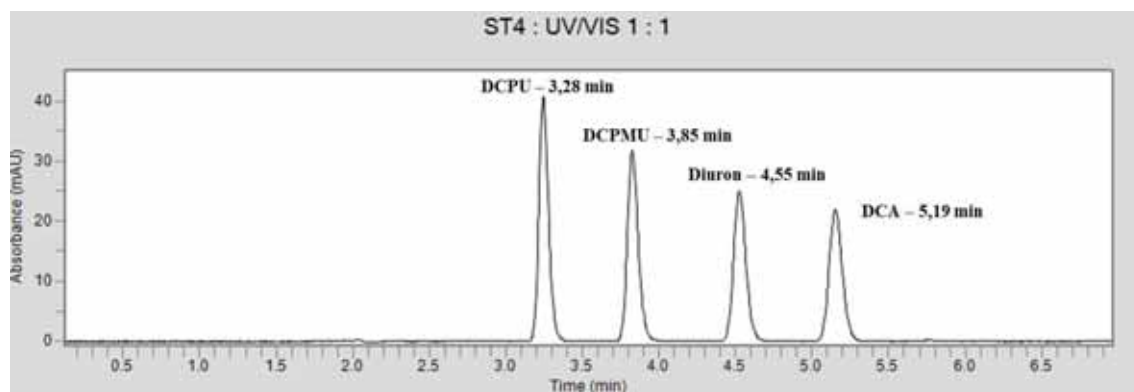


Figura 30: Sinais cromatográficos do diuron e metabólitos, em HPLC, gerados pela bactéria *A. faecalis* TG4.48 após cinco dias de cultivo na presença de diuron.

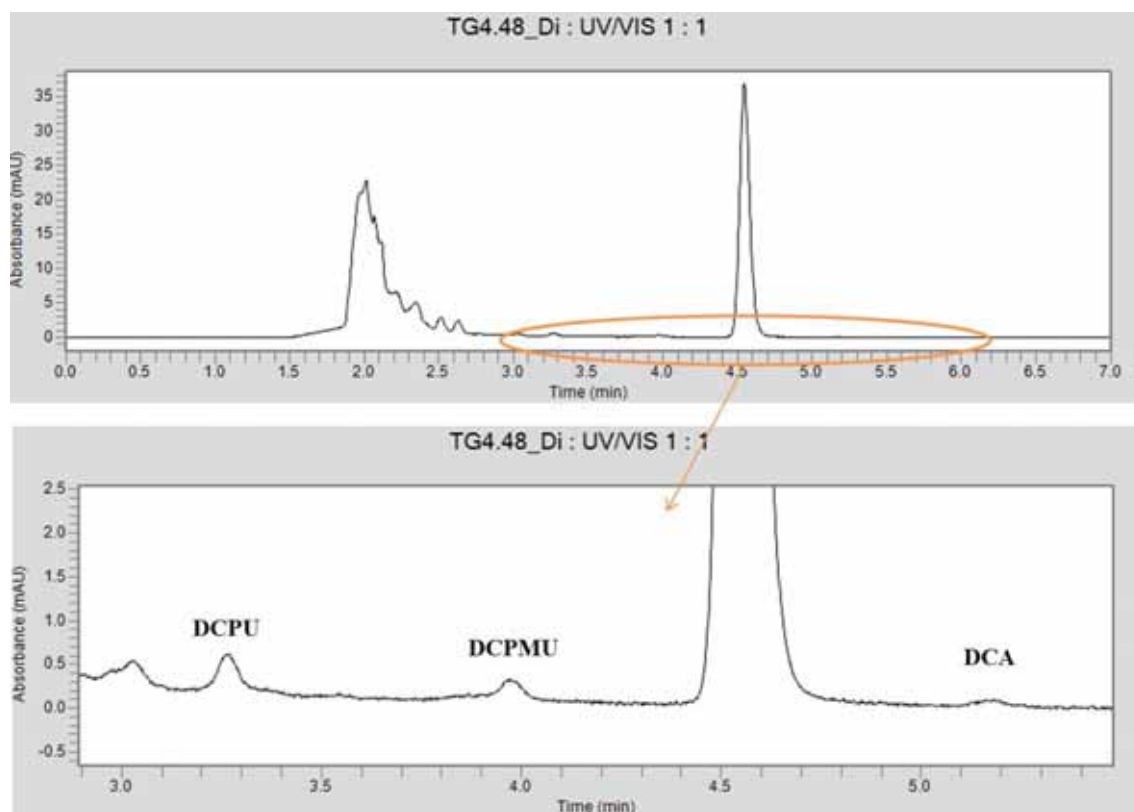


Figura 32: Confirmação do metabólito DCPMU, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria *B. cereus* TD4.31.

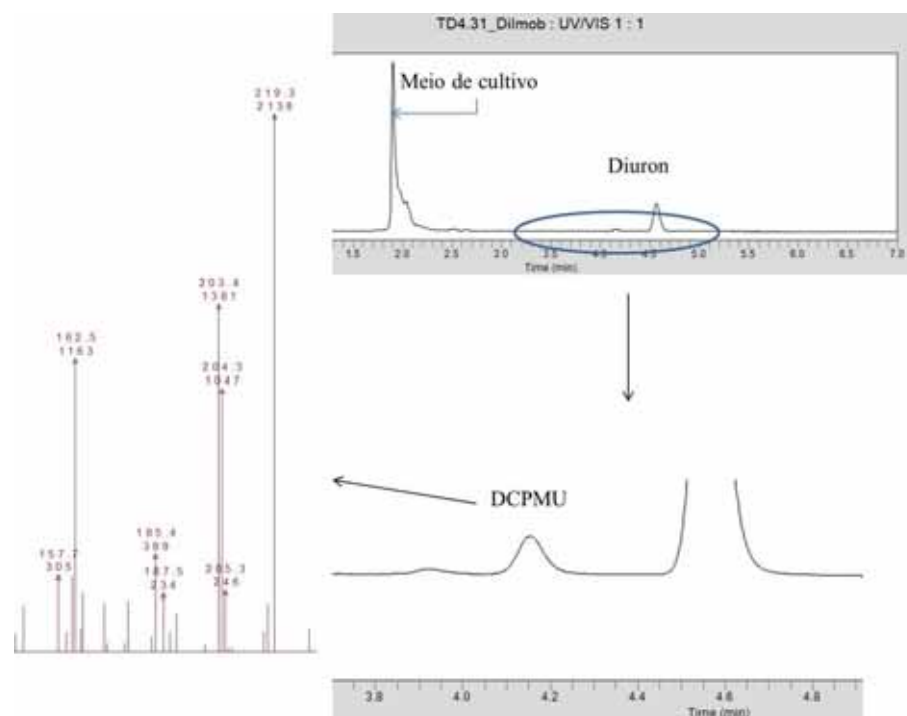


Figura 33: Confirmação do metabólito DCPU, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria *M. luteus* TG3.30.

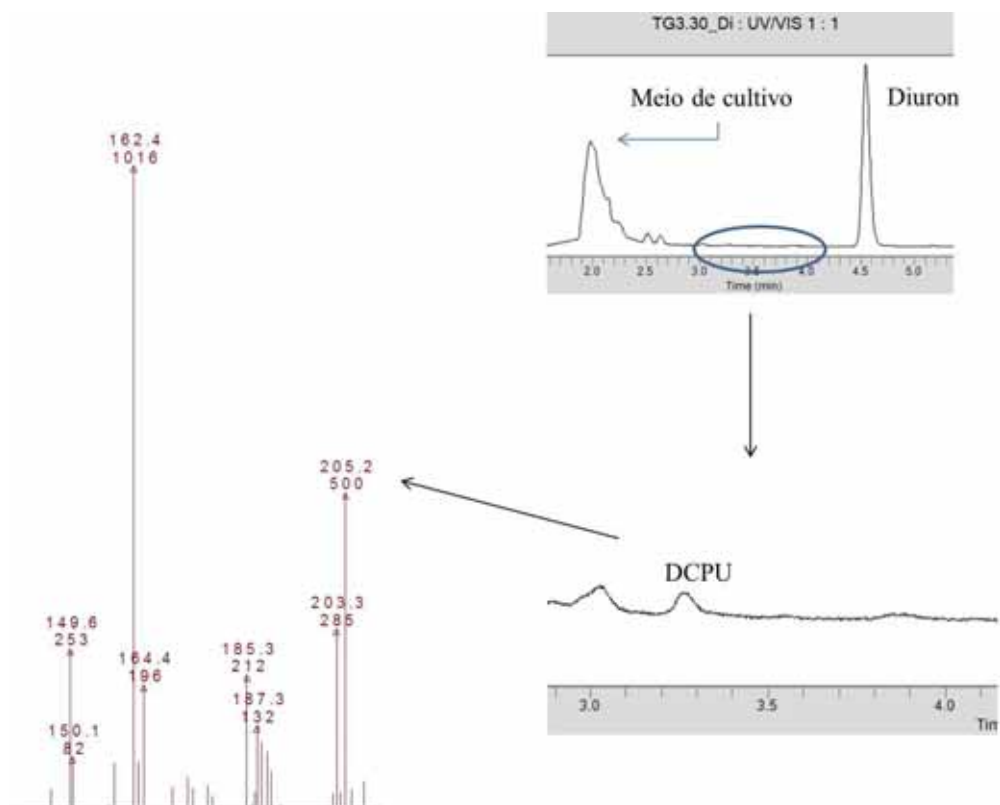
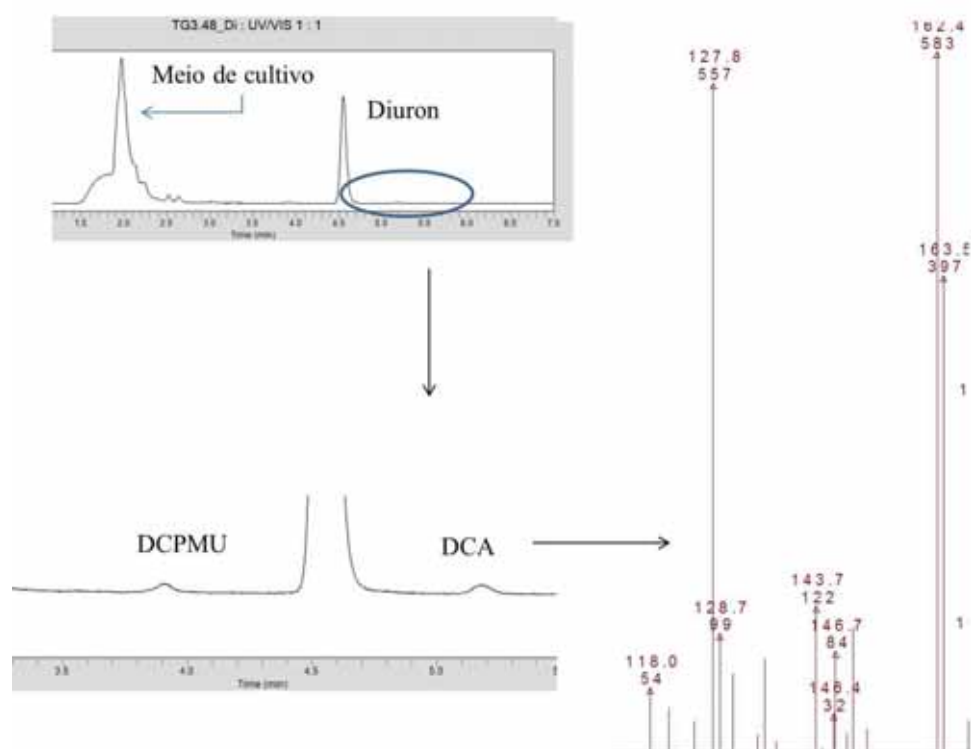


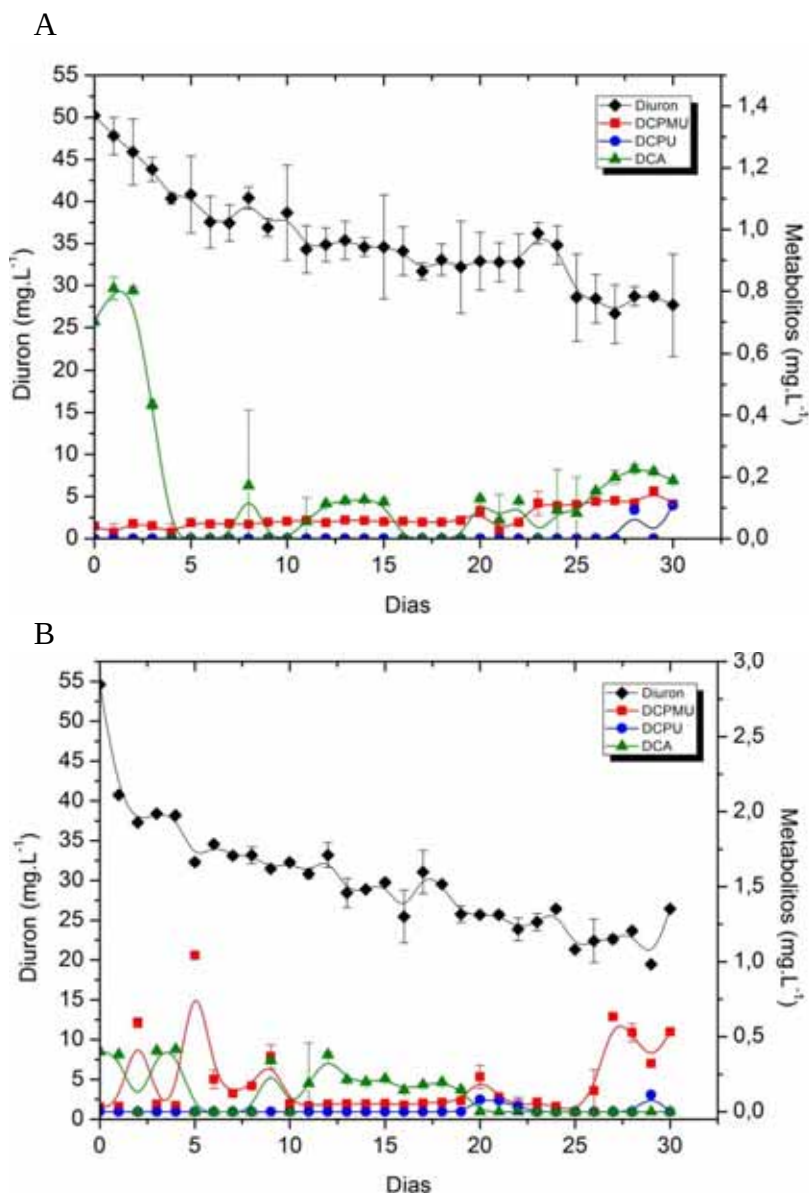
Figura 34: Confirmação do metabólito 3,4-DCA, em espectrômetro de massas, gerado pela degradação do diuron em cultivo com a bactéria *O. intermedium* TG3.48.



Baseado na hipótese de que as bactérias estariam consumindo os metabólitos gerados, as cepas foram cultivadas na presença de 50 mg.L^{-1} de diuron (aumento da concentração devido a ampliação do período de cultivo) e amostras foram retiradas a cada 24h, por um período de 30 dias. Para esses ensaios, as bactérias *Enterobacter* sp. TG1.15 e *Enterobacter* sp. TD1.46 foram selecionadas (Figura 35).

Após 30 dias, foi observada a taxa de degradação de 46 e 48% para *Enterobacter* sp. TG1.15 e *Enterobacter* sp. TD1.46, respectivamente, sendo a concentração dos metabólitos bastante variada ao longo do experimento. A bactéria *Enterobacter* sp. TG1.15 chegou a produzir $0,12$; $0,10$ e $0,20 \text{ mg.L}^{-1}$ de DCPMU, DCPU e 3,4-DCA, respectivamente e a bactéria *Enterobacter* sp. TD1.46, produziu $1,0$; $0,1$ e $0,4 \text{ mg.L}^{-1}$ de DCPMU, DCPU e 3,4-DCA, respectivamente.

Figura 35: Degradação de diuron e perfil de produção e consumo dos primeiros metabólitos. A: *Enterobacter* sp. TG1.15; B: *Enterobacter* sp. TD1.46 em meio composto de sais contendo 50 mg.L⁻¹ de diuron.



Devido os metabólitos apresentarem C e N em sua estrutura, estes podem ser utilizados como nutriente de mais fácil degradação, diminuindo, por consequência, o ataque dos microrganismos ao diuron, justificando as concentrações ainda altas desse composto no final dos cultivos.

A hipótese proposta nesse ponto do trabalho aponta que o 3,4-DCA, metabólito gerado em menores concentrações nos meios de cultivo estaria sendo utilizada pelas bactérias como fonte de nitrogênio, visto que sua estrutura molecular possui um grupamento amino quimicamente mais sujeito ao ataque enzimático microbiano. Nesse sentido, foram selecionadas oito bactérias (Tabela 25) para cultivo na presença de 10

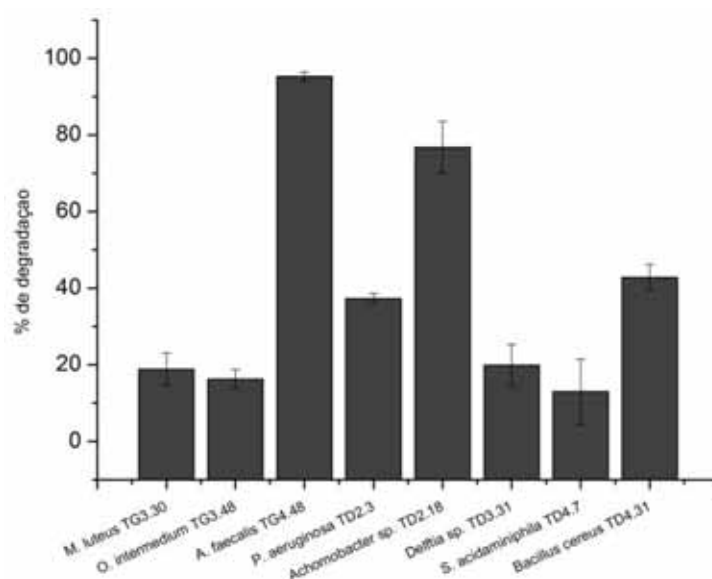
mg.L⁻¹ 3,4-DCA, em substituição ao diuron, por cinco dias para estudar a via de degradação para este metabólito.

Tabela 25: Bactérias selecionadas para cultivo na presença de 3,4-DCA

Código	Identificação
TG3.30	<i>Micrococcus luteus</i>
TG3.48	<i>Ochrobactrum intermedium</i>
TG4.48	<i>Alcaligenes faecalis</i>
TD2.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
TD2.18	<i>Achromobacter</i> sp.
TD3.31	<i>Delftia</i> sp.
TD4.7	<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>
TD4.31	<i>Bacillus cereus</i>

Exceto a bactéria *S. acidaminiphila* TD4.7, todas as cepas mostraram maiores taxas de degradação para 3,4-DCA, quando comparado com a mesma concentração de diuron, as quais variaram de 12 a 95%, sendo esta última pertencente à bactéria *Alcaligenes faecalis* TG4.48. Visto que essa bactéria degradou no máximo 13% do diuron do meio de cultivo (10 mg.L⁻¹) fica claro que a mesma participa da degradação do diuron, porém com maior habilidade de degradação do metabólito do que o precursor inicial. Os resultados indicaram também que a cepa *Achromobacter* TD2.18 também foi capaz de metabolizar o 3,4-DCA com alta eficiência (degradação de 80% - Figura 36).

Figura 36: Taxa de degradação do metabólito 3,4-DCA pelas bactérias selecionadas em cultivo de cinco dias.



Esses dados corroboram com outros trabalhos que reportam estirpes bacterianas consideradas com capacidade para mineralizar 3,4-DCA, porém, sem exibir a capacidade de degradar diuron a 3,4-DCA (TIXIER et al., 2000; DEJONGHE et al., 2002; BAZOT et al., 2007). Essas observações reforçam que a degradação de compostos xenobióticos no meio depende de uma sucessão de organismos agindo sobre o composto e seus derivados.

A aplicação das amostras em LC-MS e GC-MS evidenciou a presença do metabólito 3,4-CAC (3,4-dicloroacetanilida), metabólito correspondente a acetilação da molécula de 3,4-DCA, para as bactérias *P. aeruginosa* TD2.3, *S. acidaminiphina* TD4.7 e *B. cereus* TD4.31 (Figuras 37 e 38). Este composto já se encontra descrito na literatura como molécula participante da rota metabólica do diuron (TIXIER et al., 2002; ELLEGAARD-JENSEN et al., 2014; YAO et al., 2011).

A acetilação da molécula de 3,4-DCA é catalisada pela enzima acetiltransferase, sendo esta descrita como pertencente ao metabolismo dos gêneros *Pseudomonas* e *Bacillus*. Esta enzima é de característica plasmidial, envolvida principalmente na resistência a antibióticos do grupo aminoglicosídeos (TAKENAKA et. al., 2006; MULYONO et al., 2007). Considerando que os genes plasmidiais são comumente distribuídos entre as populações microbianas no ambiente por processos de transformação, é factível o envolvimento desses genes e das enzimas por eles codificadas na biotransformação dos xenobióticos.

Figura 37: Cromatograma e espectro de massas do metabólito 3,4-dicloroacetanilida (3,4-CAC) obtidos por LC-MS.

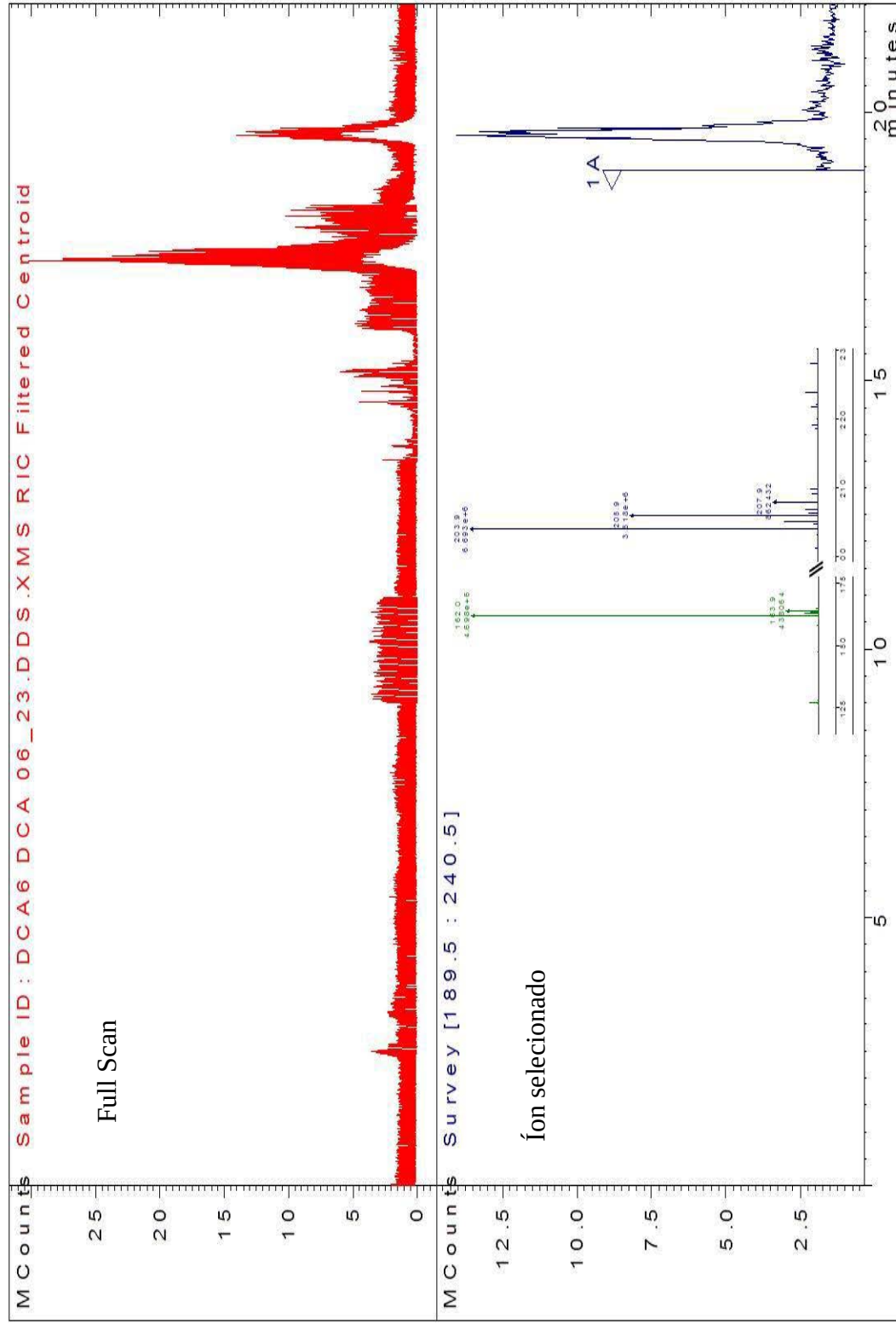
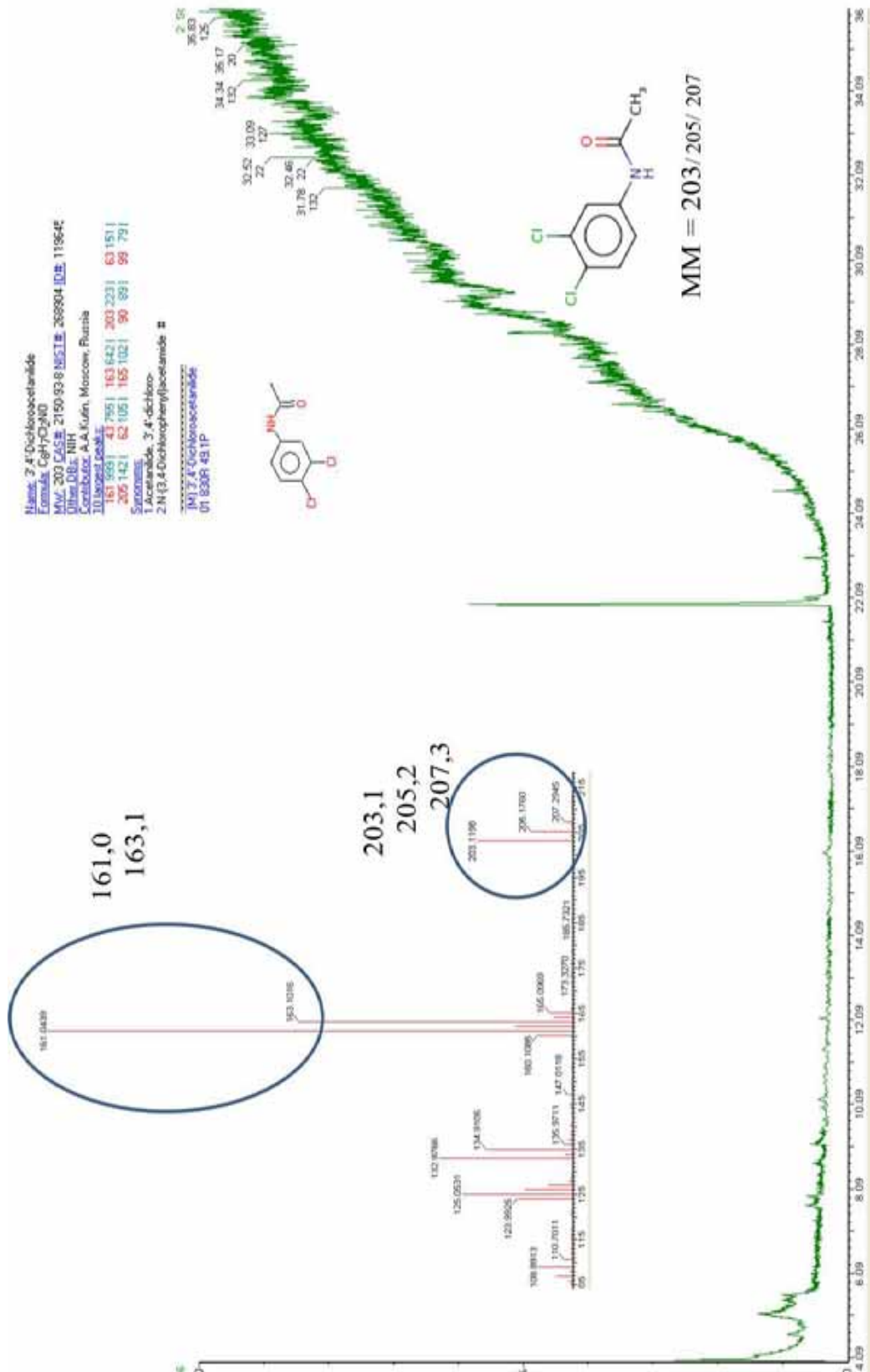


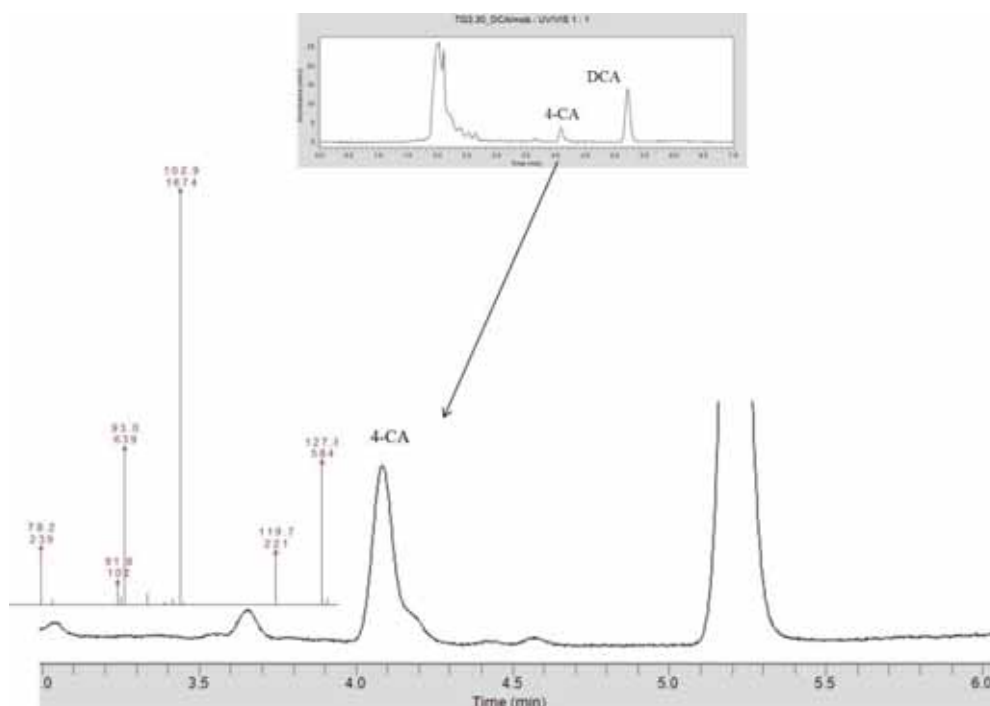
Figura 38: Cromatograma e espectro de massas de massas do metabólito 3,4-dicloroacetanilida (3,4-CAC) obtidos por GC-MS.



A aplicação das amostras em HPLC evidenciou a presença do metabólito 4-CA (4-Cloroanilina) para a cepa *M. luteus* TG3.30 (Figura 39), e em LC-MS, traços de 4-CA para as bactérias *A. faecalis* TG4.48 e *Achromobacter* sp. TD2.18. O composto 4-CA corresponde a um derivado desalogenado do 3,4-DCA. Esse metabólito chama a atenção por ser um produto de ação de enzimas desalogenases em processos de descloração redutiva as quais são pouco frequentes entre a população microbiana e foram descritas principalmente para bactérias anaeróbicas do gênero *Desulfomonile* e *Desulfitobacterium* (LOFFLER, et al., 2003).

O processo de descloração de uma molécula orgânica é caracterizado pela acidificação do meio, o qual resulta em um decréscimo do pH em ambientes com baixa capacidade de tamponamento. Este fato foi observado nos meios contendo as bactérias *M. luteus* TG3.30, *A. faecalis* TG4.48 e *Achromobacter* sp. TD2.18 os quais apresentaram mudança de pH de 7,0 para 5,9; 6,21 e 4,46, respectivamente.

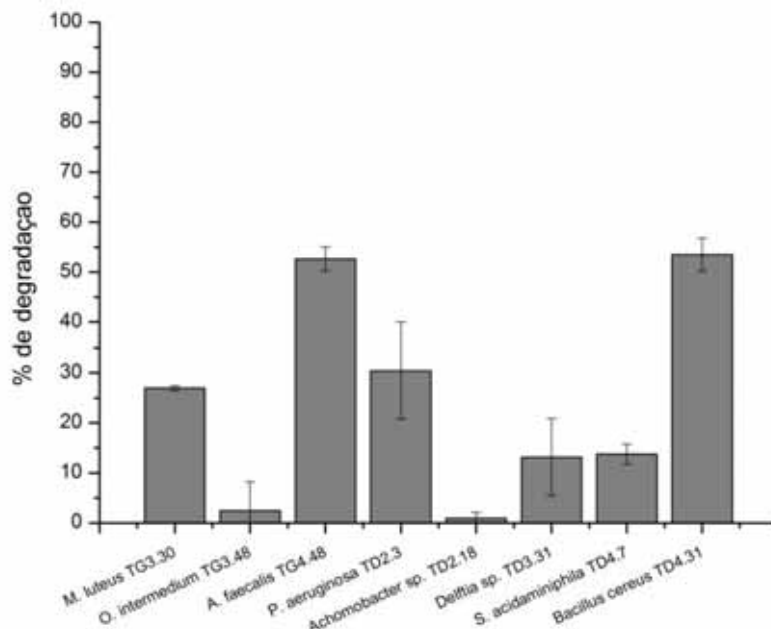
Figura 39: Cromatograma e espectro de massas da molécula de 4-CA formada a partir da degradação de 3,4-DCA pela bactéria *M. luteus*.



Procurando evidenciar uma sequência metabólica da degradação do diuron, a molécula de 4-CA foi utilizada para suplementar o meio de cultura nos moldes aplicados ao 3,4-DCA, utilizando as mesmas oito bactérias (Tabela 25). Os resultados

obtidos por aplicação de técnicas de HPLC mostraram que a degradação do 4-CA variou de 0,9 a 53% entre as oito bactérias (Figura 40).

Figura 40: Porcentagem de degradação do metabólito 4-CA pelas bactérias selecionadas.



Com relação aos compostos obtidos, foram detectados cinco sinais cromatográficos sendo somente dois identificados como anilina (Figura 41), resultante da segunda desalogenação do 4-CA, e 4-cloroacetanilida (4-CAC) (Figura 42), indicando a acetilação do composto, sem desalogenação.

Esses resultados nos permitiram dividir as oito bactérias estudadas em dois grupos: bactérias que desalogenam o 3,4-DCA, (*M. luteus* TG3.30 e *Achromobacter* sp. TD2.18) e as que não desalogenam mas acetilam o 3,4-DCA ou o 4-CA (*P. aeruginosa* TD2.3, *S. acidaminiphila* TD4.7, *B. cereus* TD4.31).

Na continuidade, novos experimentos foram realizados cultivando as oito bactérias em 4-CAC (4-cloroacetanilida), composto detectado como resultante da acetilação do 4-CA. A análise das amostras em HPLC apresentaram três sinais cromatográficos (3,4; 4,0 e 5,45 min), sendo o sinal em 4,0 min detectado nas amostras de *A. faecalis* TG4.48. Tal sinal corresponde à molécula de molécula de 4-CA, a qual foi confirmada após injeção em LC-MS, propondo que esta bactéria realizou uma desacetilação da molécula (Figura 43).

Figura 41: Cromatograma e espectro de massas do metabólito anilina a partir do cultivo em 4-CA.

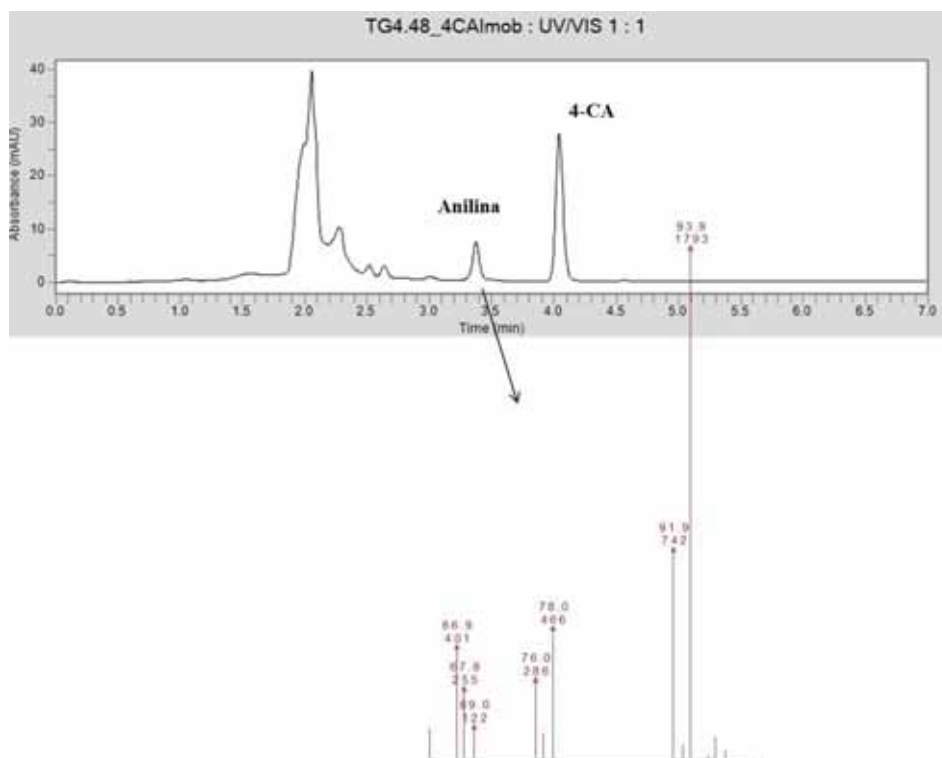
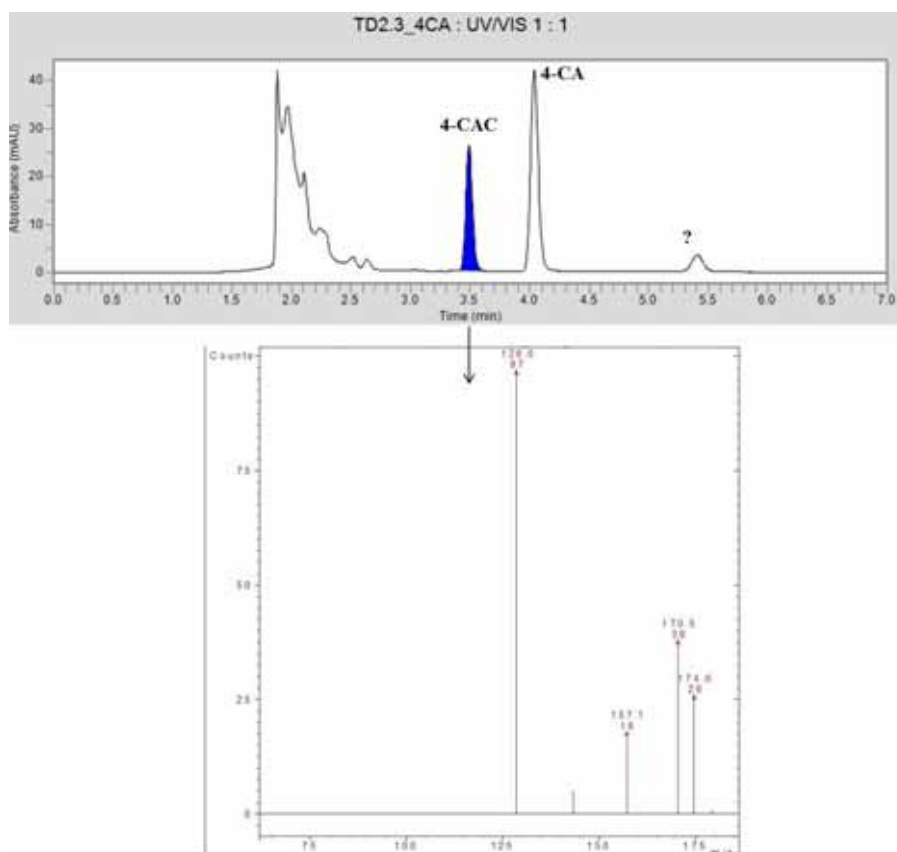
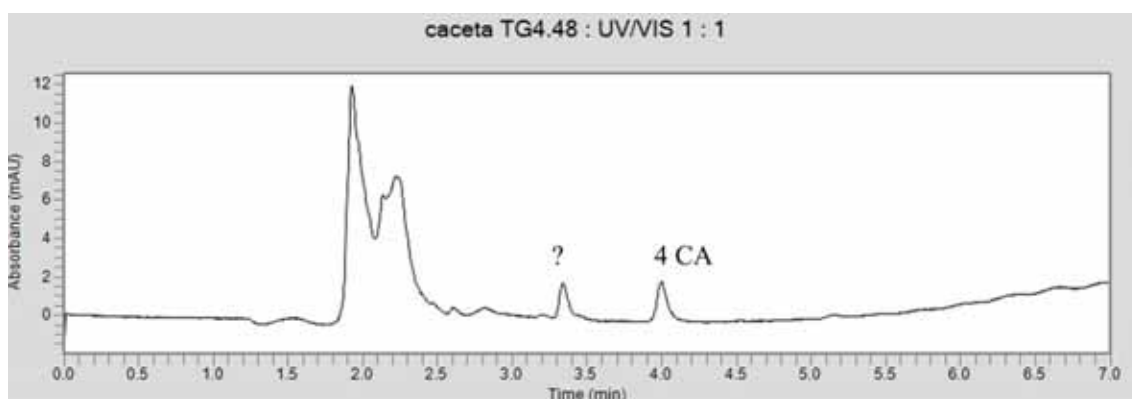


Figura 42: Cromatograma e espectro de massas do metabólito 4-cloroacetanilida a partir do cultivo em 4-CA.



Dois sistemas de acetilação-desacetilação são conhecidos por regular acetilação em bactérias (YANG, SETO, 2008). A acetilação e desacetilação foram determinadas pela primeira vez em eucariotos na regulação das histonas, e apresentam características de efeito regulatório nos organismos, principalmente referente à adaptação e sobrevivência celular por causa de sua resposta rápida em condições de estresse no ambiente (GARDNER et al., 2006).

Figura 43: Formação da molécula de 4-CA pela degradação de 4-CAC.

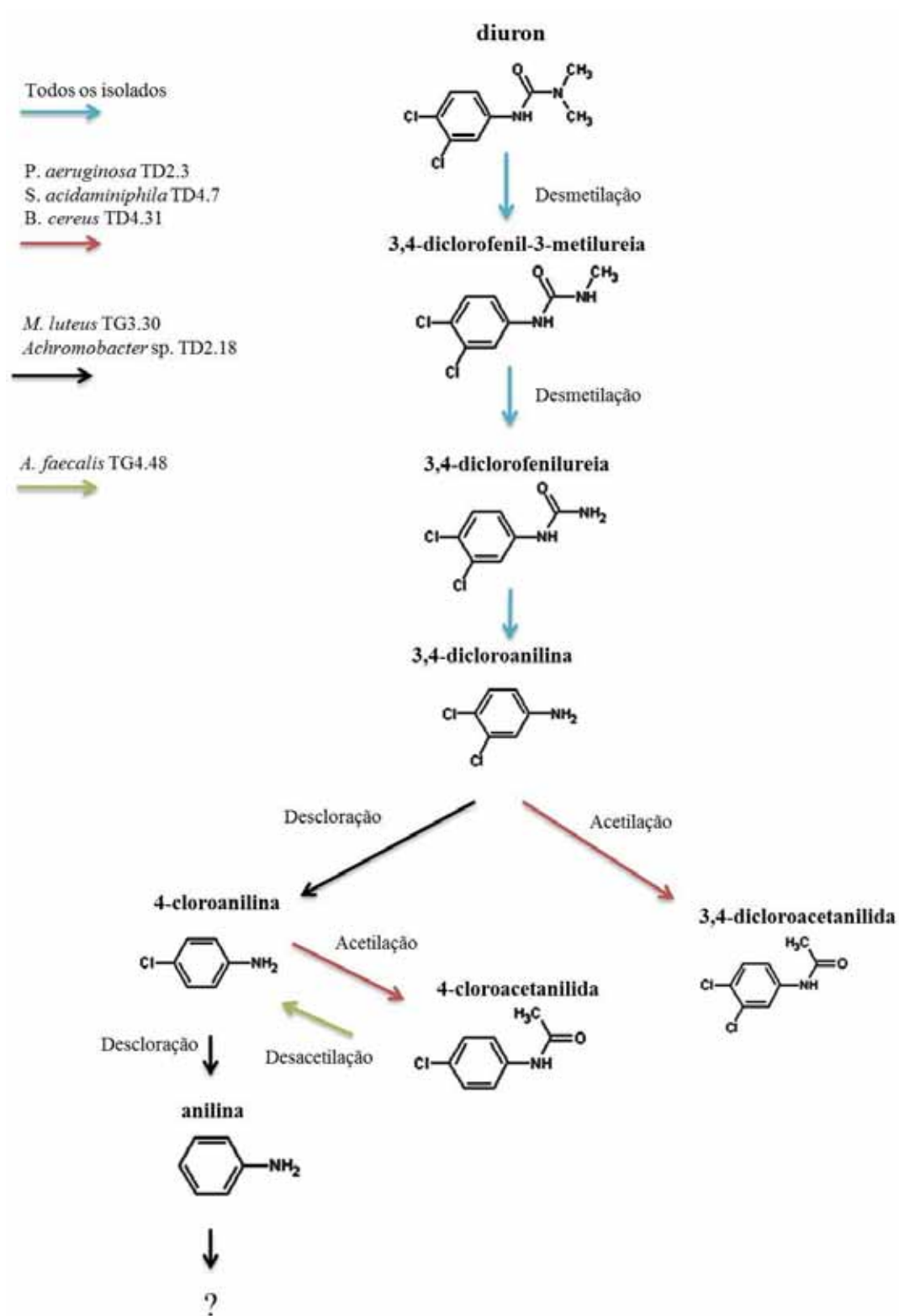


As oito bactérias selecionadas também foram cultivadas em 10 mg.L^{-1} de anilina, entretanto nenhum dos metabólitos gerados na degradação dessa molécula foi identificado para a continuação do estudo da rota de degradação.

Todos os metabólitos identificados ainda preservam seus grupamentos amina, o que não respaldaria a hipótese apresentada neste trabalho de que as bactérias estariam usando o 3,4-DCA como fonte de N. Entretanto, outros sinais cromatográficos não foram identificados, os quais poderiam corresponder a derivados desaminados do 3,4-DCA ou 4-CA.

De acordo com os metabólitos encontrados pelas técnicas de HPLC, LC-MS e GC-MS, propôs-se um mecanismo de degradação de diuron, que se encontra na figura 44.

Figura 44: Proposta de mecanismo de degradação de diuron no ambiente, por bactérias isoladas de solo de canavial.



A produção do metabólito 3,4-DCA a partir do diuron não apresenta discordância entre os autores da literatura. Entretanto, a degradação da molécula de 3,4-DCA é descrita por diferentes mecanismos. Como já mencionado, Giacomazzi e Cochet (2004) apresentam a degradação aeróbia do 3,4-DCA pela formação do diclorocatecol, sem passar pela formação do diclorobenzeno, fato observado por Sharma et al. (2010). O mecanismo proposto neste trabalho assemelha-se ao de Hongsawat e Vangnai (2011) ao descrever a degradação do 3,4-DCA pela formação de 4-cloroanilina (4-CA), e ao Tixier et al. (2002) e Ellegaard-Jensen et al. (2014) na formação de 3,4-dicloroacetanilida.

A formação de 4-cloroacetanilida ocorre a partir da molécula de 4-CA somente para algumas cepas em particular, sendo este fato observado por Kaufman et al. (1973), o qual expõe que a degradação de 4-CA pode ser realizada pela acetilação do grupo amina, ou seja, pela inserção do grupo acetila (COCH_3) na molécula orgânica, produzindo o metabólito 4-cloroacetanilida.

As bactérias *Achromobacter* TD2.18 e *Alcaligenes faecalis* TG4.48 apresentaram as maiores taxas de degradação de 3,4-DCA, e as bactérias *Alcaligenes faecalis* TG4.48 e *Bacillus cereus* TD4.31 apresentaram as maiores porcentagens de degradação da molécula de 4-CAC.

Para o presente trabalho, a análise da presença de catecol não mostrou confiabilidade, sendo esta molécula não encontrada nas análises de cromatografia gasosa (GC/MS/MS).

5. Considerações finais

Apesar de diversos relatos sobre a diversidade de microrganismos metabolicamente ativos em solos agrícolas, isolá-los e caracterizá-los na ausência de meios indutores ou de enriquecimento é uma tarefa difícil, porém essencial para o conhecimento de suas participações em processos biológicos. O conhecimento da existência de um determinado tipo microbiano num nicho específico pode restringir informações que podem fazer a diferença entre o conhecimento ou apenas a suposição de uma determinada via metabólica. A atuação dos microrganismos na degradação de um xenobiótico no ambiente é dependente de seu próprio metabolismo e também do sinergismo com outras formas biológicas. Desse modo, não se pode mensurar a importância de uma determinada cepa quando estudada separadamente.

A diversidade genética dos microrganismos, expressa em sua atividade metabólica, compreende processos extremamente complexos cujo entendimento/esclarecimento requer estudos detalhados. Assim, com vista nessas considerações e nas limitações do conhecimento atual sobre esse intrincado universo e à luz dos resultados obtidos no presente trabalho, colocam-se as seguintes conclusões.

6. Conclusões

- O solo de cultivo de cana de açúcar, utilizado como amostras para isolamento das bactérias, apresentou predominância de bactérias gram-positivas, embora as bactérias gram-negativas isoladas neste ambiente apresentaram as maiores taxas de degradação do herbicida diuron.
- a presença de glicose no meio de cultivo foi importante para a degradação do diuron pelas cepas bacterianas, indicando que as bactérias requerem fonte de carbono adicional mesmo quando apresentam habilidade em degradar aquele composto.
- a imobilização das bactérias em alginato-Ca aumentou entre 2 a 24% a capacidade das bactérias em degradar o diuron.
- ensaios em microcosmos na presença de solos não-estéreis revelaram que a microbiota nativa foi eficiente na degradação do diuron (73%), sendo que a adição de microrganismos não apresentou considerável aumento na degradação do herbicida (79%).

- Consórcios entre bactérias e fungos foram mais efetivos na degradação de diuron em comparação com as culturas aplicadas separadamente, indicando que o sinergismo entre os microrganismos auxilia o processo de biodegradação.
- Cepas bacterianas com maior potencial em degradar o diuron não necessariamente apresentaram potencial em degradar os metabólitos gerados, reforçando que a mineralização do composto é resultado de interações microbianas.
- foram evidenciadas o envolvimento de enzimas como desmetilases, desalogenases, acetilases e desacetilases no processo, as quais parecem ser produzidas por diferentes cepas bacterianas.
- Com bases nos dados deste trabalho, a rota metabólica de degradação do diuron sugerida segue primeiramente na formação de DCPMU, DCPU, 3,4-DCA, seguida por 4-CA, 3,4-CAC, 4-CAC e anilina.

Referências

- ACP. Environmental risk assessment of booster biocides in antifouling products, UK Advisory Committee on Pesticides, August 2002.
- ALFONSO-HERNANDEZ, M.M.; MARTINEZ-VIEIRA, R.; URDANIVIA, M.L. Descomposición del herbicida diurón por acción de los microorganismos de un suelo ferralítico amarillento lixiviado. *Ciencias de la Agricultura*, v. 19, p. 99-104, 1984.
- ANDRADE, S. P. Manual de terapêutica veterinária. 2.ed. São Paulo: Rocca, 2002, 697p.
- APVMA. Diuron Environmental Assessment, Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority. 2011, 247p.
- ARIVALAGAN, P.; SINGARAJ, D.; HARIDASS, V.; KALIANNAN, T. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecological Engineering*, v. 71, p. 728-735, 2014.
- ASSIH, E. A.; OUATTARA, A. S.; THIERRY, S.; CAYOL, J. L.; LABAT, M.; MACARIE, H. *Stenotrophomonas acidaminiphila* sp. nov., a strictly aerobic bacterium isolated from an upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 52, p. 559-68, 2002.
- ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Microbial ecology: fundamentals and applications. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA, USA, 1993.
- BADAWI, N.; RØNHEDE, S.; OLSSON, S.; KRAGELUND, B. B.; JOHNSEN, A. H.; JACOBSEN, O. S.; AAMAND, J. Metabolites of the phenylurea herbicides chlorotoluron, diuron, isoproturon and linuron produced by the soil fungus *Mortierella* sp. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 2806-2812, 2009.
- BALBA, M. T.; AL-AWADHI, N.; AL-DAHER, R. Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, p. 155-164, 1998.
- BENNDORF, D.; BABEL, W. Assimilatory detoxification of herbicides by *Desulfotomaculum acidovorans* MC1: induction of two chlorocatechol 1,2-dioxygenases as a response to chemostress. *Microbiology*, v. 148, p. 2883-2888, 2002.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Phenol degradation by *Bacillus cereus*: Pathway and kinetic modeling. *Bioresource Technology*, v. 101, p. 5501-5507, 2010.
- BANERJEE, A.; GHOSHAL, A. K. Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 65, n.7, p. 1052-1060, 2011.
- BANKS, M. L.; KENNEDY, A. C.; KREMER, R. J.; EIVAZI, F. Soil microbial community response to surfactants and herbicides in two soils. *Applied Soil Ecology*, v. 74, p. 12-20, 2014.

- BATISSON, I.; CROUZET, O.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; MANGOT, J. F.; MALLET, C.; BOHATIER, J. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. *Environmental Pollution*, v. 157, p. 1195-1201, 2009.
- BATISSON, I.; PESCE, S.; BESSE-HOGGAN, P.; SANCELME, M.; BOHATIER, J. Isolation and Characterization of Diuron-degrading Bacteria from Lotic Surface Water. *Microbial Ecology*, v. 54, p. 761-770, 2007.
- BAZOT, S.; BOIS, P.; JOYEUX, C.; LEBEAU, T. Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Delftia acidovorans*. *Biotechnology Letters*, v. 29, p. 749-754, 2007.
- BAZOT, S.; LEBEAU, T. Effect of immobilization of a bacterial consortium on diuron dissipation and community dynamics. *Bioresource Technology*, v. 100, p. 4257-4261, 2009.
- BENNETT, J. W.; CONNICK, W. J.; DAIGLE, D.; WUNCH, K. Formulation of fungi for in situ bioremediation. In: Gadd GM, Watkinson SC, Dyer PS, editors. *Fungi in the Environment*. Cambridge: Cambridge University Press, p. 97-112, 2007.
- BEOLCHINI, F.; ROCCHETTI, L.; REGOLIB, F.; DELL'ANNO, A. Bioremediation of marine sediments contaminated by hydrocarbons: Experimental analysis and kinetic modeling. *Journal of Hazardous Materials*, v. 182, p. 403-407, 2010.
- BETIGERI, S.S.; NEAU, S.H. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads, *Biomaterials*, v. 23, p. 3627-3636, 2002.
- BLANCO, F. M. G. Controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. In: Reunião itinerante de fitossanidade do instituto biológico, 9.. *Anais*. [São Paulo]: Instituto Biológico, p. 83-89, 2003.
- BOIS, P.; HUGUENOT, D.; JÉZÉQUEL, K.; LOLLIER, M.; CORNU, J. Y.; LEBEAU, T. Herbicide mitigation in microcosms simulating stormwater basins subject to polluted water inputs. *Water Res.*, v. 47, p. 1123-1135, 2013.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies: Review paper. *Bioresource Technology*, v. 74, p. 63-67, 2000.
- BOUWER, E. J.; ZEHNDER, A. J. B. Bioremediation of organic compounds - putting microbial metabolism to work. *TIBTECH AUGUST*, v. 11, p. 360-367, 1993.
- BREUGELMANS, P.; D'HUYS, P. J.; DE MO, R.; SPRINGAEL, D. Characterization of novel linuron-mineralizing bacterial consortia enriched from long-term linuron-treated agricultural soils. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 62, p. 374-385, 2007.
- BRUSSLAN, J.; HASELKORN, R. Resistance to the photosystem II herbicide diuron is dominant to sensitivity in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942. *The EMBO Journal*, v. 8, p. 1237-1245, 1989.

BURROWS, L. A.; EDWARDS, C. A. The use of integrated soil microcosms to predict effects of pesticides on soil ecosystems European Journal of Soil Biology, v. 38, p. 245-249, 2002.

CARACCIOLO, A. B.; BOTTONI, P.; GRENNI, P. Microcosm studies to evaluate microbial potential to degrade pollutants in soil and water ecosystems. Microchemical Journal, v. 107, p. 126-130, 2012.

CARDONE, A.; COMITATO, R.; ANGELINI, F. Spermatogenesis, epididymis morphology and plasma sex steroid secretion in the male lizard *Podarcis sicula* exposed to diuron. Environmental Research, v. 108, p. 214-223, 2008.

CASTILLO, J. M.; CASAS, J.; ROMERO, E. Isolation of an endosulfan-degrading bacterium from a coffee farm soil: Persistence and inhibitory effect on its biological functions. Science of the Total Environment, v. 412-413, p. 20-27, 2011.

CHANIKA, E.; GEORGIADOU, D.; SOUEREF, E.; KARAS, P.; KARANASIOS, E.; TSIROPOULOS, N. G.; TZORTZAKAKIS, E. A.; KARPOUZAS, C. G. Isolation of soil bacteria able to hydrolyze both organophosphate and carbamate pesticides. Bioresource Technology, v. 102, p. 3184-3192, 2011.

CHAKRABORTY, S.; BEHRENS, M.; HERMAN, P. L.; ARENDSSEN, A. F.; HAGEN, W. R.; CARLSON, D. L.; WANG, X. Z.; WEEKS, D. P. A three-component dicamba O-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6: purification and characterization. Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 437, p. 20-28, 2005.

CHAUDHRY, G. R.; CHAPALAMADUGU, S. Biodegradation of Halogenated Organic Compounds. Microbiological Reviews, p. 59-79, 1991.

CHEN, J.; HU, L. B.; ZHOU, W.; YAN, S. H.; YANG, J. D.; XUE, Y. F.; SHI, Z. Q. Degradation of microcystin-LR and RR by a *Stenotrophomonas* sp. strain EMS isolated from Lake Taihu, China. International Journal of Molecular Sciences, v.11, p. 896-911, 2010.

COLLERAN, E. Uses of bacteria in bioremediation. In: Methods in biotechnology (ed. D. Sheehan), Bioremediation Protocols, Humana Press, New Jersey, v. 2, p. 3-22, 1997.

CROUZET, O.; BATISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; BONNEMOY, F.; BARDOT, C.; POLY, F.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: A dose-effect microcosm approach. Soil Biology & Biochemistry, v. 42, p. 193-202, 2010.

CRUZ, A.; HENRIQUES, I.; SOUSA, A. C. A.; BAPTISTA, I.; ALMEIDA, A.; TAKAHASHI, S.; TANABE, S.; CORREIA, A.; SUZUKI, S.; ANSELMO, A. M.; MENDO, S. A microcosm approach to evaluate the degradation of tributyltin (TBT) by *Aeromonas molluscorum* Av27 in estuarine sediments. Environmental Research, v. 132, p. 430-437, 2014.

DALTON, R. L.; EVANS, A. W.; RHODES, R. C. Disappearance of diuron from cotton field soils. Weeds, v. 14, p. 31-33, 1966.

- DEJONGHE, W.; GORIS, J.; DIERICKX, A.; DE DOBBELEER, V.; CRUL, K.; DEVOS, P.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Diversity of 3-chloroaniline and 3,4-dichloroaniline degrading bacteria isolated from three different soils and involvement of their plasmids in chloroaniline degradation. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 42, p. 315-325, 2002.
- DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, n. 6, p. 999-1003, 2004.
- DEVERS-LAMRANI, M.; PESCE, S.; ROUARD, N.; MARTIN-LAURENCE, F. Evidence for cooperative mineralization of diuron by *Arthrobacter* sp. BS2 and *Achromobacter* sp. SP1 isolated from a mixed culture enriched from diuron exposed environments. *Chemosphere*, v. 117, p. 208-215, 2014.
- DHANKHAR, R.; GURIYAN, R. B. Strategies for Management of Metal Contaminated Soil. *International Journal of Environmental Sciences*, v. 1, n. 7, p. 1884-1898, 2011.
- DÍAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology*, v. 7, p.173-180, 2004.
- DOU, J.; DING, A.; LIU, X.; DU, Y.; DENG, D.; WANG, J. Anaerobic benzene biodegradation by a pure bacterial culture of *Bacillus cereus* under nitrate reducing conditions. *Journal of Environmental Sciences*, v. 22, n. 5, p. 709-715, 2010.
- DWIVEDI, S.; SINGH, B. R.; AL-KHEDHAIRY, A. A.; ALARIFI, S.; MUSARRAT, J. Isolation and characterization of butachlor-catabolizing bacterial strain *Stenotrophomonas acidaminiphila* JS-1 from soil and assessment of its biodegradation potential. *Letters in Applied Microbiology*, v. 5: p. 54-60, 2010.
- EL-DEEB, B.; SOLTAN, S.; ALI, A.; ALI, K. Detoxication of the herbicide diuron by *Pseudomonas* sp. *Folia Microbiologica*, v. 45, v. 3, p. 211-216, 2000.
- ELLEGAARD-JENSEN, L.; AAMAND, J.; KRAGELUND, B. B.; JOHNSEN, A. H.; ROSENDAHL, S. Strains of the soil fungus *Mortierella* show different degradation potentials for the phenylurea herbicide diuron. *Biodegradation*, v. 24, p. 765-774, 2013.
- ELLEGAARD-JENSEN, L.; KNUDSENA, B. E.; JOHANSEN, A.; ALBERS, C. N.; AAMAND, J.; ROSENDAHL, S. Fungal–bacterial consortia increase diuron degradation in water-unsaturated systems. *Science of the Total Environment*, v. 466-467, p. 699-705, 2014.
- ELLIS, R. J.; MORGAN, P.; WEIGHTMAN, A. J.; FRY J. C. Cultivation-dependent and independent approaches for determining bacterial diversity in heavy-metal-contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3223-3230, 2003.

EMTIAZI, G.; SATARII, M.; MAZAHHERION, F. The utilization of aniline, chlorinated aniline, and aniline blue as the only source of nitrogen by fungi in water. *Water Research*, v. 35, n. 5, p. 1219-1224, 2001.

FENOLL, J.; HELLÍN, P.; MARTÍNEZ, C. M.; FLORES, P.; NAVARRO, S. High performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for quantifying phenylurea herbicides and their main metabolites in amended and unamended soils. *Journal of Chromatography A*, v. 1257, p. 81-88, 2012.

FRAGOEIRO, S.; MAGAN, N. Impact of *Trametes versicolor* and *Phanerochaete chrysosporium* on differential breakdown of pesticide mixtures in soil microcosms at two water potentials and associated respiration and enzyme activity. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 62, p. 376-383, 2008.

GARDNER, J. G.; GRUNDY, F. J.; HENKIN, T. M.; ESCALANTE-SEMERENA, J. C. Control of Acetyl-Coenzyme A Synthetase (AcsA) Activity by Acetylation/Deacetylation without NAD⁺ Involvement in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, p. 5460-5468, 2006.

GATIDOU, G.; KOTRIKL, A.; THOMAIDIS, N. S.; LEKKAS, T. D. Determination of the antifouling booster biocides irgarol 1051 and diuron and their metabolites in seawater by high performance liquid chromatography–diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, v. 528, p. 89-99, 2005.

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: A review. *Chemosphere*, v. 56, p. 1021-1032, 2004.

GIANFREDA, L.; MORA, M. L.; DIEZ, M. C. Restoration of polluted soils by means of microbial and enzymatic processes. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, v. 6, p. 20-40, 2006.

HAGGBLOM, M. M. Microbial breakdown of halogenated aromatic pesticides and related compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 103, p. 29-72, 1992.

HAGGBLOM, M. M.; BOSSERT, I. D. Dehalogenation: microbial processes and environmental implications. Kluwer Academic Publishers, Boston, Mass, 2003.

HAPEMAN-SOMIC, C. J. Mineralization of Pesticide Degradation Products. *Pesticide Transformation Products*. Chapter 10, p. 133-147, 1991.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Applied and Industrial Microbiology*, v. 9, p. 177-192, 2011.

HEAD, I. M. Bioremediation: Towards a credible technology. *Microbiology*, v. 144, p. 599-608, 1998.

HERRERA-GONZALEZ, V. E.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALINDEZ-MAYER, J.; JUAREZ-RAMIREZ, C.; SANTOYO-TEPOLE, F.; MONTIEL, E. M. Biodegradation

of the herbicide propanil, and its 3,4-dichloroaniline by-product in a continuously operated biofilm reactor. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2012.

HONG, H. A.; TO, E.; FAKHRY, S.; BACCIGALUPI, L.; RICCA, E.; CUTTING, S. M. Defining the natural habitat of *Bacillus* spore-formers. *Research in Microbiology*, v. 160, p. 375-379, 2009.

HONGSAWAT, P.; VANGNAI, A. S. Biodegradation pathways of chloroanilines by *Acinetobacter baylyi* strain GFJ2. *Journal of Hazardous Materials*, v. 186, p. 1300-1307, 2011.

HUANG, H. L.; ZHANG, S. Z.; WU, N. Y.; LUO, L.; CHRISTIE, P. Influence of *Glomus etunicatum*/*Zea mays mycorrhiza* on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 726-734, 2009.

IFEN, Pesticides in water - Sixth annual report - 2002.

JUÁREZ-JIMÉNEZ, B.; MANZANERA, M.; RODELAS, B.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; GONZALEZ-LÓPEZ, J.; CROGNALE, S.; PESCIAROLI, C.; FENICE, M. Metabolic characterization of a strain (BM90) of *Delftia tsuruhatensis* showing highly diversified capacity to degrade low molecular weight phenols. *Biodegradation*, v. 21, p. 475-489, 2010.

JUHASZ, A. L.; STANLEY, G. A.; BRITZ, M. L. Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003. *Letters in Applied Microbiology*, v. 30, p. 396-401, 2000.

KANMANI, P.; KUMAR, R.S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K.A.; PATTIKUMAR, V.; ARUL, V. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, v. 16, p. 1106-1114, 2011. APUD TRABELSI, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate-coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 84-89, 2014.

KARPOUZAS, D. G.; MORGAN, J. A. W.; WALKER, A. Isolation and characterisation of ethoprophos-degrading bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 33, p. 209-218, 2000.

KASTNER, M.; BREUER-JAMMALI, M.; MAHRO, B. Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic hydrocarbons (PAH). *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 41, p. 267-273, 1994.

KAUFMAN, D. D.; PLIMMER, J. R.; KLINGEBIEL, U. I. Microbial Oxidation of 4-Chloroaniline. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 21, n. 1, p. 127-132, 1973.

KING, R. B.; LONG, G. M.; SHELDON, J. K. *Practical Environmental Bioremediation: The Field Guide*, 2ª edição, Lewis Publishers, p. 184, 1998.

KOHLMEIER, S.; SMITS, T. H. M.; FORD, R. M.; KEEL, C.; HARMS, H.; WICK, L. Y. Taking the fungal highway: immobilization of pollutant-degrading bacteria by fungi. *Environmental Science & Technology*, v. 39, p. 4640-6, 2005.

KONG, L.; ZHU, S.; ZHU, L.; XIE, H.; SU, K.; YAN, T.; WANG, J.; WANG, J.; WANG, F.; SUN, F. Biodegradation of organochlorine pesticide endosulfan by bacterial strain *Acaligenes faecalis* JBW4. *Journal of Environmental Sciences*, v.25, n.11, p. 2257-2264, 2013.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on Bioremediation of polluted environment: A management tool, *Int. J. of Environmental Sciences*, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

LAKSHMIKANDAN, M.; SIVARAMAN, K.; RAJA, S. E.; VASANTHAKUMAR, P.; RAJESH, R.P.; SOWPARTHANI, K.; JEBASINGH, S. E. J. Biodegradation of acrylamide by acrylamidase from *Stenotrophomonas acidaminiphila* MSU12 and analysis of degradation products by MALDI-TOF and HPLC. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 94, p. 214-221, 2014.

LIANG, Z.; AN, T.; LI, G.; ZHANG, Z.; Aerobic biodegradation of odorous dimethyl disulfide in aqueous medium by isolated *Bacillus cereus* GIGAN2 and identification of transformation intermediates. *Bioresource Technology*, v. 175, p. 563-568, 2015.

LOFFLER, F. E.; COLE, J. R.; RITALAHTI, K. M.; TIEDJE, J. M. Chapter 3 Diversity of Dechlorinating Bacteria. *Dehalogenation, Microbial Processes and Environmental Applications*, p. 53-87, 2003.

LOKESHWARI, N.; JOSHI, K. Biosorption of Heavy Metals (Chromium) using Biomass. *Global Journal of Environmental Research*, v. 3, p. 29-35, 2009.

MARCHESI, J. R.; SATO, T.; WEIGHTMAN, A. J.; MARTIN, T. A.; FRY, J. C.; HIOM, S. J.; WADE, W. G. Design and evaluation of useful Bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 2, p. 795-799, 1998.

MARTINS, S. C. S.; MARTINS, C. M.; FIÚZA, L. M. C. G.; SANTAELLA, S. T. Immobilization of microbial cells: A promising tool for treatment of toxic pollutants in industrial wastewater. *African Journal of Biotechnology*, v. 12, n. 28, p. 4412-4418, 2013.

MIKESKOVÁ, H.; NOVOTNÝ, Č.; SVOBODOVÁ, K. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 95, p. 861-70, 2012.

MILLIKEN, C. E.; MEIER, G. P.; WATTS, J. E. M.; SOWERS, K. R.; MAY, H. D. Microbial Anaerobic Demethylation and Dechlorination of Chlorinated Hydroquinone Metabolites Synthesized by Basidiomycete Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 70, n. 1, p. 385-392, 2004.

MONCADA, A. Environmental fate of diuron. Environmental Monitoring Branch, 2005. Disponível em: <<http://www.cdpr.ca.gov/docs/emon/pubs/fatememo/diuron.pdf>>. Acesso em: Abril/2012.

MORGAN, E.; KNACKER, T. The role of laboratory terrestrial model ecosystems in the testing of potentially harmful substances, *Ecotoxicology*, v. 3, p. 213-223, 1994.

MÜLLER, R.H.; BABEL, W. *Delftia acidovorans* MC1 Resists High Herbicide Concentrations - a Study of Nutristat Growth on (RS)-2-(2,4-Dichlorophenoxy)propionate and 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v. 68, n. 3, p. 622-630, 2004.

MULYONO.; TAKENAKA, S.; SASANO, Y.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. *Bacillus cereus* strain 10-L-2 produces two arylamine N-acetyltransferases that transform 4-phenylenediamine into 4-aminoacetanilide. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 103, p. 147-154, 2007.

MUSUMECI, M. P.; NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C.; MATALLO, M. B.; ANDREA, M. M. Degradação do diuron-14C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp.). *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 30, p. 775-778, 1995.

NAKANO, M.; NIWA, M.; NISHIMURA, N. Development of a PCR-Based Method for Monitoring the Status of *Alcaligenes* Species in the Agricultural Environment. *Biocontrol Science*, v. 19, n. 1, p. 23-31, 2014.

NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G. S. Chronic effects of the herbicide diuron on freshwater Cladocerans, Amphipods, Midges, Minnows, Worms and Snails. *Archives of Environmenta Contamination and Toxicology*, v. 35, p. 441-446, 1998.

NOJIRI, H.; TSUDA, M. Functional evolution of bacteria in degradation of environmental pollutants. *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, v. 50, n. 12, p. 1505-1509, 2005.

OKAMURA, H.; AOYAMA, I.; ONO, Y.; NASHIDA, T. Antifouling herbicides in the coastal waters of western Japan. *Marine Pollution Bulletin*, v. 47, p. 59-67, 2003.

OLSEN, R. A.; BAKKEN, L. R. Viability of soil bacteria: optimization of plate counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups. *Microbial Ecology*, v. 13, p. 59-74, 1987.

PATEL, V.; PATEL, J.; MADAMWAR, D. Biodegradation of phenanthrene in bioaugmented microcosm by consortium ASP developed from coastal sediment of Alang-Sosiya ship breaking yard. *Marine Pollution Bulletin*, v. 74, n. 1, p. 199-207, 2013.

PATIL, N. K.; KUNDAPUR, R.; SHOUICHE, Y. S.; KAREGOUDAR, T. B. Degradation of Plasticizer Di-*n*-butylphthalate by *Delftia* sp. TBKNP-05. *Current Microbiology*, v. 52, p. 369-374, 2006.

PEREIRA, J. C.; NEVES, M. C. P.; DROZDOWICZ, A. Quantificações das populações de bactérias em geral, de bactérias resistentes a antibióticos e de actinomicetos em solos. Seropédica: Embrapa- CNPAB, p. 20. (Embrapa-CNPAB. Documentos, p. 26). 1996.

PLAZA, G.; ULFIG, K.; HAZEN, T. C.; BRIGMON, R. L. Use of Molecular Techniques in Bioremediation. *Acta Microbiologica Polonica*, v. 50, n. 3-4, p. 205-218, 2001.

RADIANINGTYAS, H.; ROBINSON, G. K.; BULL, A. T. Characterization of a soil-derived bacterial consortium degrading 4-chloroaniline, *Microbiology*, v. 149, p. 3279-3287, 2003.

RAGO, J. P.; COLSON, A. M. Molecular basis for resistance for Antimycin and Diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Qi site in the mitochondrial ubiquinolcytochrome c reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 239, p. 12564-12570, 1988.

RAYMOND, D. D.; BARTHA, R. Biodegradation of Some Polynuclear Aromatic Petroleum Components by Marine Bacteria. *Developments in industrial microbiology*, v. 16, p. 97-110, 1975.

REINEKE, W. Construction of bacterial strains with novel degradative capabilities for chloroaromatics. *Journal of Basic Microbiology*, v. 9, p. 551-567, 1986.

REIS, P.J.M.; REIS, A. C.; RICKEN, B.; KOLVENBACH, B. A.; MANAIA, C. M.; CORVINI, P. F. X.; NUNES, O. C. Biodegradation of sulfamethoxazole and other sulfonamides by *Achromobacter denitrificans* PR1. *Journal of Hazardous Materials*, v. 208, p. 741-749, 2014.

REREGISTRATION ELIGIBILITY DECISION (RED) for Diuron. United States Environmental Protection Agency, p. 210, 2003.

RICART, M.; BARCELÓ, D.; GEISZINGER, A.; GUASCH, H.; ALDA, M. L.; ROMANÍ, A. M.; VIDAL, G.; VILLAGRASA, M.; SABATER, S. Effects of low concentrations of the phenylurea herbicide diuron on biofilm algae and bacteria. *Chemosphere*, v. 76, p. 1392-1401, 2009.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. Guia de herbicidas, 5.ed. Londrina, p. 592, 2005.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos. 2ª Edição revisada e ampliada. Campinas, p. 358, 2009.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. *Scientia Agrícola*, v. 57, n. 4, p. 723-728, 2000.

ROUSSEAU, S.; HARTMANN, A.; SOULAS, G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 36, p. 211-222, 2001.

SAFI, J.; AWAD, Y.; EL-NAHHA, Y. Bioremediation of Diuron in Soil Environment: Influence of Cyanobacterial Mat. American Journal of Plant Sciences, v. 5, p.1081-1089, 2014.

SANTOS, R. M.; RIZZO, A. C. L.; SOBRAL, L. G. S. Remediação de solo contaminado por petróleo em biopilhas – escala piloto. Campinas: Centro de tecnologia mineral CETEM, 2007.

SHARMA, P.; CHOPRA, A.; CAMEOTRA, S. S.; SURI, C. R. Efficient biotransformation of herbicide Diuron by bacterial strain *Micrococcus* sp. PS-1. Biodegradation, v. 21, p. 979-987, 2010.

SIMONSEN, A.; HOLTZE, M. S.; SØRENSEN, S. R.; SØRENSEN, S. J.; AAMAND, J. Mineralisation of 2,6-dichlorobenzamide (BAM) in dichlobenil-exposed soils and isolation of a BAM-mineralising *Aminobacter* sp. Environ Pollut, v. 144, n.1, p.289-295, 2006.

SØRENSEN, S. R.; ALBERS, C. N.; AAMAND, J. Rapid Mineralization of the Phenylurea Herbicide Diuron by *Variovorax* sp. Strain SRS16 in Pure Culture and within a Two-Member Consortium. Applied and Environmental Microbiology, p. 2332-2340, 2008.

STANBROUGH, R.; CHUABOONMEE, S.; PALOMBO, E.A.; MALHERBE, F.; BHAVE, M. Heavy metal phytoremediation potential of a heavy metal resistant soil bacterial isolate, *Achromobacter* sp. strain AO22. APCBEE Procedia, v. 5, p. 502-507, 2013.

STARK, J.; FIRESTONE, M. Mechanisms for soil-moisture effects on activity of nitrifying bacteria. Applied and Environmental Microbiology, v. 61, p. 2182-2191, 1995.

STASINAKIS, A. S.; KOTSIFA, S.; GATIDOU, G.; MAMAI, D. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. Water Research, v. 43, p. 1471-9, 2009.

SUZUKI, T. Methylation and hydroxylation of pentachlorophenol by *Mycobacterium* sp. isolated from soil. J. Pesticide Sci. v. 8, p. 419-428, 1983.

TADONLÉKÉ, R. D.; LEBERRE, B.; PERREAU, F.; HUMBERT, J. F.; Responses of lake bacterioplankton activities and composition to the herbicide diuron. Aquatic Toxicology, v. 94, p.103-113, 2009.

TAKAKU, S.; KODAIRA, A.; KIMOTO, M.; NASHIMOTO, M.; TAKAGI. Microbial communities in the garbage composting with rice hull as an amendment revealed by culture-dependent and -independent approaches. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 101, p. 42-50, 2006.

TAKENAKA, S.; MUYONNO.; SASANO, Y.; TAKAHASHI, Y.; MURAKAMI, S.; AOKI, K. Microbial transformation of aniline derivatives: regioselective

biotransformation and detoxification of 2-phenylenediamine by *Bacillus cereus* strain PDa-1. Journal of Bioscience and Bioengineering, v. 102, p. 21-27, 2006

TAM, A. C.; BEHKI, R. M.; KHAN, S. U. I. Isolation and characterization of an s-ethyl-N, N-dipropylthiocarbamate-degrading *Arthrobacter* strain and evidence for plasmid-associated s-ethyl-N, N-dipropylthiocarbamate degradation. Appl Environ Microbiol, v. 53, n. 5, p. 1088-1093, 1987.

TANG, H.; LI, J.; HU, H.; XUA, P. A newly isolated strain of *Stenotrophomonas* sp. hydrolyzes acetamiprid, a synthetic insecticide. Process Biochemistry, v. 47, p. 1820-1825, 2012.

TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; ROSSEL, D. Chapter 13: Toxicity Testing Using Microcosm. Soil Ecotoxicology, p. 353, 1996.

THAVASI, R.; NAMBARU V. R. M. S.; JAYALAKSHMI, S.; BALASUBRAMANIAN, T.; BANAT, I. M. Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* from Renewable Resources. Indian Journal of Microbiology; v. 51, n.1, p.30-36, 2011.

THOMAS, K. V.; FILEMAN, T. W.; READMAN, J. W.; WALDOCK, M. J. Antifouling paint booster biocides and tributyltin in U.K. coastal environment and potential risks of biological effects. Marine Pollution Bulletin, v. 42, p. 677-688, 2001.

TIXIER, C.; BOGAERTS, P.; SANCELME, M.; BONNEMOY, F.; TWAGILIMANA, L.; CUER, A.; BOHATIER, J.; VESCHAMBRE, H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, Diuron: structure and toxicity of metabolites. Pest Management Science, v. 56, p. 455-462, 2000.

TIXIER, C.; SANCELME, M.; AIT-AISSA, S.; WIDHEM, P.; BONNEMOY, F.; CUER, A.; TRUFFAUT, N.; VESCHAMBRE, H. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. Chemosphere, v. 46, p. 519-526, 2002.

TIXIER, C.; SANCELME, M.; BONNEMOY, F.; CUER, A.; VESCHAMBRE, H. Degradation Products of a Phenylurea Herbicide, Diuron: Synthesis, Ecotoxicity, And Biotransformation. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 20, n. 7, p. 1381-1389, 2001.

TRABELSI, I.; AYADI, D.; BEJAR, W.; BEJAR, S.; CHOUAYEKH, H.; SALAH, R. B. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. International Journal of Biological Macromolecules, v. 64, p. 84-89, 2014.

TRABULSI, L. R. et al. Microbiologia. 4. ed. São Paulo: Atheneu, p. 586, 2004.

TURNBULL, G. A.; CULLINGTON, J. E.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W. Identification and characterisation of a diuron-degrading bacterium. Biology and Fertility of Soils, v. 33, p. 472-476, 2001.

TURNBULL, G. A.; OUSLEY, M.; WALKER, A.; SHAW, E.; ALUN, J.; MORGAN, W. Degradation of Substituted Phenylurea Herbicides by *Arthrobacter globiformis* Strain D47 and Characterization of a Plasmid-Associated Hydrolase Gene, puhA. Applied and Environmental Microbiology, p. 2270-2275, 2001.

TULEVA, B.; CHRISTOVA, N.; JORDANOV, B.; NIKOLOVA-DAMYANOVA, B.; PETROV, P. Naphthalene degradation and biosurfactant activity by *Bacillus cereus* 28BN. Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences, v. 60, p. 577-582, 2002.

VALLERO, D. A. Chapter 7 - Applied Microbial Ecology: Bioremediation. Environmental Biotechnology: A Biosystems Approach, p. 795, 2010.

VASIL, M. L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. Journal of Pediatrics, v. 108, p. 800-805, 1986.

VAZ-MOREIRA, I.; EGAS, C.; NUNES, O. C.; MANAIA, C. M. Culture-dependent and culture-independent diversity surveys target different bacteria: a case study in a freshwater sample. Antonie Van Leeuwenhoek, v. 100, p. 245-257, 2011.

VAZQUEZ, S.; RUBERTO, L.; MAC CORMACK, W. Properties of extracellular proteases from three psychrotolerant *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Antarctic soil. Polar Biology, v. 28, p. 319-325, 2005.

VERCRAENE-EAIRMAL, M.; LAUGA, B.; LAURENT, S. S.; MAZZELLA, N.; BOUTRY, S.; SIMON, M.; KARAMA, S.; DELMAS, F.; DURAN, R. Diuron biotransformation and its effects on biofilm bacterial community structure. Chemosphere, v. 81, p. 837-843, 2010.

VIEIRA, F. C. S.; NAHAS E. Comparison of microbial numbers in soils by using various culture media and temperatures. Microbiological Research, v. 160, p. 197-202, 2005.

VROUMSIA, T.; STEIMAN, R.; SEIGI, F.; MURANDI, E.; BENOIT-GUYOD, J. L.; KHADRANI, A. Biodegradation of three Substituted Phenylurea Herbicides (Chlortoluron, Diuron, And Isoproturon) by Soft Fungi. A Comparative Study. Chemosphere, v. 33, n. 10, p. 2045-2056, 1996.

WARANUSANTIGUL, P.; LEE, H.; KRUATRACHE, M.; POKETHITIYOOK, P.; AUESUKAREE, C. Isolation and characterization of lead-tolerant *Ochrobactrum intermedium* and its role in enhancing lead accumulation by *Eucalyptus camaldulensis*. Chemosphere, v. 85, p. 584-590, 2011.

WARMINK, J. A.; VAN ELSAS, J. D. Migratory Response of Soil Bacteria to *Lyophyllum* sp. Strain Karsten in Soil Microcosms. Applied and Environmental Microbiology, v. 75, p. 2820-30, 2009.

WENDEROTH, D. F.; REBER, H. H. Correlation between structural diversity and catabolic versatility of metal-affected prototrophic bacteria in soil. Soil Biology and Biochemistry, v. 31, p. 345-352, 1999.

WIEGEL, J.; WU, Q. Microbial reductive dehalogenation of polychlorinated biphenyls. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 32, p. 1-15, 2000.

WORRALL, F.; FERNANDEZ-PEREZ, M.; JOHNSON, A.C.; FLORES-CESPEREDES, F.; GONZALEZ-PRADAS, E. Limitations on the role of incorporated organic matter in reducing pesticide leaching. *Journal of Contaminant Hydrology*, v. 49, p. 241-262, 2001.

YANG, Y. H.; YAO, J.; HU, S.; QI, Y. Effects of agricultural chemicals on DNA sequence diversity of soil microbial community: a study with RAPD marker. *Microbial Ecology*, v. 39, p. 72-79, 2000.

YANG, X. J.; SETO, E. The Rpd3/Hda1 Family of Lysine Deacetylases: From Bacteria and Yeast to Mice and Men. *Nature reviews. Molecular cell biology* v. 9, n. 3, p. 206-218, 2008.

YAO, X. F.; KHAN, F.; PANDEY, R.; PANDEY, J.; MOURANT, R. G.; JAIN, R. K.; GUO, J. H.; RUSSELL, R. J.; OAKESHOTT, J. G.; PANDEY, G. Degradation of dichloroaniline isomers by a newly isolated strain, *Bacillus megaterium* IMT21. *Microbiology*, v. 157, p. 721-726, 2011.

YUAN, Y.J.; LU, Z.X.; WU, N.; HUANG, L.J.; LU, F.X.; BIE, X.M. Isolation and preliminary characterization of a novel nicotine-degrading bacterium, *Ochrobactrum intermedium* DN2. *International Biodeterioration & Biodegradation*, v. 56, p. 45-50, 2005.

ZABALOY, M. C.; GARLAND, J. L.; GOMEZ, M. A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. *Applied Soil Ecology*, v. 40, p. 1-12, 2008.

ZHANG, L.; HU, J.; ZHU, R.; ZHOU, Q.; CHEN, J. Degradation of paracetamol by pure bacterial cultures and their microbial consortium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, p. 3687-3698, 2013.

ZHANG, T.; ZHANG, J. L.; LIU, S. J.; LIU, Z. P. A novel and complete gene cluster involved in the degradation of aniline by *Delftia* sp. AN3, *Journal of Environmental Sciences*, v. 20, p. 717-724, 2008.

ZHANG, Y.; XU, J.; DONG, F.; LIU, X.; WU, X.; ZHENG, Y. Response of microbial community to a new fungicide fluopyram in the silty-loam agricultural soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 108, p. 273-280, 2014.

Apêndice A

Apresentação do potencial de degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas.

Para os resultados a seguir, considerar a concentração do herbicida diuron em 5 mg.L⁻¹ e cultivo bacteriano de cinco dias (120h).

- * DO₆₀₀<0,3 : bactérias sem crescimento satisfatório;
- * 0%: quantidade de bactérias sem habilidade em degradar o herbicida;
- * 1-10%: quantidade de bactérias com capacidade em degradar de 1 a 10% de diuron;
- * 11-20%: quantidade de bactérias com capacidade em degradar de 11 a 20% de diuron;
- * 21-40%: quantidade de bactérias com capacidade em degradar de 21 a 40% de diuron;
- * Acima de 40%: quantidade de bactérias com capacidade em degradar acima de 40% de diuron.

Tabela 26: Distribuição potencial de degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas em meio controle.

	Porcentagem de degradação de diuron						Total
	DO ₆₀₀ <0,3	0%	1-10%	11-20%	21-40%	Acima de 40%	
TG1.01 a TG1.50	5	9	21	12	3	0	50
TG2.01 a TG2.50	0	8	15	23	4	0	50
TG3.01 a TG3.50	6	0	1	35	8	0	50
TG4.01 a TG4.50	8	1	13	22	6	0	50

Tabela 27: Distribuição potencial de degradação do herbicida diuron pelas bactérias isoladas em meio indutor.

	Porcentagem de degradação de diuron						Total
	DO ₆₀₀ <0,3	0%	1-10%	11-20%	21-40%	Acima de 40%	
TD1.01 a TD1.50	2	25	5	16	2	0	50
TD2.01 a TD2.50	7	19	7	11	6	0	50
TD3.01 a TD3.50	1	27	7	10	5	0	50
TD4.01 a TD4.50	1	10	2	26	9	2	50

Apêndice B

Identificação molecular e sequenciamento das bactérias selecionadas.

> *Enterobacter* TG1.15 (99%)

ATCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAGCACAGAGAGCTTGCTCTC
GGGTGACGAGCGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATGG
AGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGA
CCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGGG
ATTAGCTAGTAGGTGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTCC
TACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGC
AGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAG
CGGGGAGGAAGGTGTTGAGGTTAATAACCTCAGCAATTGACGTTACCCGC
AGAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGG
TGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCTG
TCAGTCGGTGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCAAA
CTGGCAGGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGG
ACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCTATTTGGAGGTTGTGCCCT
TGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACCGGTTAAATAGACCGCCTGGGGAGTA
CGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG
TGGAGCTAGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTCT
GACATCCACAGAATTTAGCAGAGATGCTTTAGTGCCTTCGGGAACCTGA
GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTCCGGCCG
GGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGAC
GTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGG
CGTATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTA
CGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATC
GCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG
TACACACCGCCCAA

> *Enterobacter asburiae* TG2.31 (99%)

TCACGCCTAACACACGCAAGTCGAGCGGCAGCGGAAAGTAGCTTGCTTCT
TTGCCGCGAGCGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCTGATG
GAGGGGGATAACTACTGGAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAG
ACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCAGATGTGCCAGATGG
GATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCT
GGTCTGAGAGGATGACCAGCCACTCTGGAAGTACACACGGTCCACACTC
CTACGAGAGGCAGCAGTGGAAAATATTGCACAATGGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCC
GCAAGAAGCACC GGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAG
GGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTC
TGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTGCA
AACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGTAGCG
GTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCT
GGACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTA
GATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGACTTGGAGGTTGTGCC
CTTGAGGCGTGGCTTCGGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAG
TACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTACTC
TTGACATCCAGAGAACTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCTCT
GAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGTGAAATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGC
CGGGAAGTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGAGTAGGGCTACACACGTGCTACAAT
GGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAG
TGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGTAGATCAGAATGCTACGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCCAA

> *Leucobacter* sp. TG3.14 (99%)

GTCTTGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGC
TGATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCATGGGGTCGAGTTGCAGACC
CCAATCCGAACGTAGACCGACTTTTTGGGATTTCGCTCCACCTCGCGGTAT
CGCAGCCCTTTGTATCGGCCATTGTAGCATGCGTGAAGCCCAAGACATAA
GGGGCATGATGATTTGACGTATCCCCACCTTCCTCCGTGTTGACCACGG
CAGTATCCCATGAGTTCCCACCATAACGTGCTGGCAACATAGGACGAGGG
TTGCGCTCGTTGCCGACTTAACCGAACATCTCACGACACGAGCTGACGA
CAACCATGCACCACCTGTAACCGAGTGTCAAAAGAGTTGACGATCTCTCG
CCCGTTCTCGGTTATGTCAAGCCTTGGTAAAGTTCTTCGCGTTGCATCGA
ATTAATCCGCATGCTCCGCCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGA
GTTTTAGCCTTGGCCGTACTCCCCAGGCGGGGAACCTAATGCGTTAGC
TACGACACAGAACCCGTGGAACAGGCCCTACATCTAGTTCCCAACGTTTA
CGGCATGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCATGCTTTCGC
TCCTCAGCGTCAGTAGCGGCCAGAGATCTGCCTTCGCCATCGGTGTTC
TCCTGATATCTGCGCATTCACCGCTACACCAGGAATTCCAATCTCCCT
ACCGCACTCTAGCTTGCCCGTACCCACTGCAGGCCCGGGTTGAGCCCCG
GGATTTACAGCAGACGCGACAAGCCGCCTACGAGCTCTTTACGCCCAAT
AATTCGGGACAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGT
AGTTAGCCGGTGCTTTTTCTGCAGGTACCGTCACTCTCGCTTCTTCCCTA
CTAAAAGAGTTTACAACCCGAAGGCAGTCATCCCTCACGCGGCGTTGCT
GCATCAGGCTTGCGCCCATTGTGCAATATTCCCCACTGCTGCCTCCCGTA
GGAGTCTGGGCGGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCACCTCTCAGGC
CGGCTACCCGTCGTCGCCATGGTGAGCCATTACCTCACCATCTAGCTGAT
AGGCCGCGAGTCCATCCAAAACCGATAAATCTTCCACCCACACACCATG
CGGTGATAGGTCGTATCCAGTATTAGACACCGTTTCCAGTGCTTATCCCA
GAGTTCAGGGCAGGTTACTCACGTGTTACTACCCGTTTCGCCACTCTTCC
ACCCAGCAAGCTGGGCTTCATCGTTCGACTTGATGTGTTAGGCCTGA

> *Micrococcus luteus* TG3.30 (99%)

CTCAGGCCCTAACACATGCAAGTCGAACGATGAAGCCCAGCTTGCTGGGTG
GATTATGGCGAACCGGTGAGTAACACGTGAGTAACCTGCCCTTAACCTCT
GGGATAAGCCTGGGAAACTGGGTCTAATACCGGATAGGAGCGTCCACCGC
ATGGTGGGTGTTGGAAAGATTTATCGGTTTTGGATGGACTCGCGGCCTAT
CAGCTTGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGC
CTGAGAGGGTGACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTA
CGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAG
CGACGCCCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTCTTTCAGTA
GGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTAT
TGGGCGTAAAGAGCTCGTAGGCGGTTTGTGCGGTCTGTCTGTGAAAGTCCG
GGGCTTAACCCCGGATCTGCGGTGGGTACGGGCAGACTAGAGTGCAGTAG
GGGAGACTGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGCAGATATCAGGAGG
AACACCGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGGCTGTAAGTACGCTGAGGAGC
GAAAGCATGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTA
AACGTTGGGCACTAGGTGTGGGGACCATTCACGGTTTCCGCGCCGCAGC
TAACGCATTAAAGTGCCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTC
AAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTC
GATGCAACGCGAAGAACCTTACCAAGGCTTGACATGTTCTCGATCGCCGT
AGAGATACGGTTTCCCTTTGGGGCGGGTTCACAGGTGGTGCATGGTTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAAC
CCTCGTTCCATGTTGCCAGCACGTGCTGGTGGGGACTCATGGGAGACTGC
CGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCT
TATGTCTTGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAATGGGTGCGGA
TACTGTGAGGTGGAGCTAATCCCAAAAAGCCGGTCTCAGTTCCGATTGGG
GTCTGCAACTCGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCTAGTAATCGCAGATCAG
CAACGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGATACACACCGCCCAAGAC

> *Ochrobactrum intermedium* TG3.48 (98%)

TTTGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTCACCGCGGCATGCTGA
TCCGCGATTACTAGCGATTCCAACCTTCATGCACTCGAGTTGCAGAGTGCA
ATCCGAACTGAGATGGCTTTTGGAGATTAGCTCACACTCGCGTGCTCGCT
GCCCCTGTCAACCACTTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGCCCGTAAGGGC
CATGAGGACTTGACGTATCCCCACCTTCCTCTCGGCTTATCACCGGCAG
TCCCCTTAGAGTGCCCAACTGAATGCTGGCAACTAAGGGCGAGGGTTGCG
CTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCC
ATGCAGCACCTGTCTCCGATCCAGCCGAAGTGAAGGATAGTGTCTCCACT
AACC CGATCGGGATGTCAAGGGCTGGTAAGGTTCTGCGCGTTGCTTCGA
ATTAAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCTTTGA
GTTTTAATCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAATGTTTAATGCGTTAGC
TGCGCCACCGAAGAGTAAACTCCCCAACGGCTAACATTCATCGTTTACGG
CGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACC
TCAGCGTCAGTAATGGTCCAGTGAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTCTCTCC
GAATATCTACGAATTTACCTCTACACTCGGAATTCACCTCACCTCTACC
ATACTCAAGACTAACAGTATCAAAGGCAGTTCCGGGGTTGAGCCCCGGGA
TTTCACCCCTGACTTATTAGCCCGCTACGTGCGCTTACGCCCAGTAAA
TCCGAACAACGCTAGCCCCCTTCGTATTACCGCGGCTGTGGCACGAAGT
TAGCCGGGGCTTCTTCTCCGGTTACCGTCATTATCTTCACCGGTGAAAGA
GCTTTACAACCTAGGGCTTCATCACTCACGCGGCATGGCTGGATCAGG
CTTGCGCCCATTTGTCCAATATTCCTCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTG
GGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGCTATG
GATCGTCGCCCTTGGTAGGCCTTTACCCACCAACTAGCTAATCCAACGCG
GGCCGATCATTTGCCGATAAATCTTTCCCTTTTCGGGCACATACGGTATT
AGCACAAAGTTTCCCTGAGTTATTCCGTAGCAAATGGTACGTTCCCACGCG
TACTCACCCGTCTGCCGCTCCCTTGCGGGGCGCTCGACTTGCATGTGT
TAGGCCTGAGTATGGTAGAGGTGAGTGGA

> *Alcaligenes faecalis* TG4.48 (99%)

TCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCGCGAGAGAGCTTGCTCTC
TTGGCGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATATATCGGAACGTGCCAGTA
GCGGGGGATAACTACTCGAAAAGAGTGGCTAATACCGCATACGCCCTACGG
GGGAAAGGGGGGATCGCAAGACCTCTCACTATTGGAGCGGCCGATATCG
GATTAGCTAGTTGGTGGGGTAAAGGCTCACCAAGGCAACGATCCGTAGCT
GGTTTGAGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGACAATGGGGGAAACCCTGATC
CAGCCATCCCCGCTGTATGATGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTACTTTTG
GCAGAGAAGAAAAGGTATCCCTAATACGGGATACTGCTGACGGTATCTG
CAGAATAAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGG
GTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGTGTAGGCGGTTT
GGAAAGAAAGATGTGAAATCCCAGGGCTCAACCTTGGAAGTGCATTTTAA
ACTGCCGAGCTAGAGTATGTGAGAGGGGGTAGAATTCCACGTGTAGCAG
TGAAATGCGTAGATATGTGGAGGAATACCGATGGCGAAGGCAGCCCCCTG
GGATAACTGACGCTCAGACACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCG
TTAGGCCTTAGTAGCGCAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTA
CGGTGCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGG
TGGATGATGTGGATTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCTT
GACATGTCTGGAAGCCGAAGAGATTTGGCCGTGCTCGCAAGAGAACCGG
AACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCTACGCAAGAGCA
CTCTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCCCTCATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCCG
GACAGAGGGTCGCCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCTCAGAAACCCGATC
GTAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTA
GTAATCGCGGATCAGAATGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
CACCGCCCAA

> *Enterobacter* TD1.46 (99%)

CTTGGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTACCGTAGCATTCTGA
TCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCA
ATCCGGACTACGACGTACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGC
TTCTCTTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTACTCGTAAGGG
CCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTCCTCCAGTTTATCACTGGCAG
TCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGAACCGCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGC
GCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACACAACACGAGCTGACGACAGC
CATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCTCGAAGGCACTAAAGCATCTCTGCTA
AATTCTGTGGATGTCAAGAGTAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATT
AAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTT
TTAACCTTGCGGCCGTACTCCCCAGGCGGTCTATTTAACGCGTTAGCTCC
GGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAACTCCAAATAGACATCGTTTACGGCG
TGGACTACCAGGTATCTAATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCACCTG
AGCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCAG
ATCTCTACGCATTTACCGCTACACCTGGAATTCTACCCCCCTCTACGAG
ACTCAAGCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCACAGGTTGAGCCCCGGGATT
TCACATCCGACTTGACAGACCGCCTGCGTGCGCTTTACGCCCAGTAATTC
CGATTAAACGCTTTCGCTTTCGACGTTATACCGCGGTGCTGGCACGGAGTTA
GCCGGTGCTTCTTCTGCGGGTAACGTCAATTGCTGAGGTTATTAACCTCA
ACACCTTCCTCCCCGCTGAAAGTACTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTCAT
ACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCTTGCGCCCATTTGTGCAATATTCCCCA
CTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGACCGTGTCTCAGTTCCAGTGTGGCTG
GTCATCCTCTCAGACCAGCTAGGGATCGTCGCCTAGGTGAGCCGTTACCC
CACCTACTAGCTAATCCCATCTGGGCACATCTGATGGCAAGAGGCCCGAA
GGTCCCCCTCTTTGGTCTTTCGACGTTATGCGGTATTAGCTACCGTTTCC
AGTAGTTATCCCCCTCCATCAGGCAGTTTCCCAGACATTACTACCCGTC
CGCCGCTCGTCACCCGAGAGCAAGCTCTCTGTGCTACCGCTCGACTTGCA
TGTGTTAGGCCTGA

> *Pseudomonas aeruginosa* TD2.3 (100%)

TCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGATGAAGGGAGCTTGCTCCTGGA
TTCAGCGCGGACGGGTGAGTAATGCCTAGGAATCTGCCTGGTAGTGGGG
GATAACGTCCGGAACGGGCGCTAATACCGCATACGTCCTGAGGGAGAAA
GTGGGGGATCTTCGGACCTCACGCTATCAGATGAGCCTAGGTCCGATTAG
CTAGTTGGTGGGGTAAAGGCCTACCAAGGCGACGATCCGTAAGTGGTCTG
AGAGGATGATCAGTCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCCA
TGCCGCGTGTGTGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAAAGCACTTTAAGTTGGG
AGGAAGGGCAGTAAGTTAATAACCTTGCTGTTTTGACGTTACCAACAGAAT
AAGCACCGGCTAAGTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCGCTAGGTGGTTCAGCAAG
TTGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCCAAAAGTACT
GAGCTAGAGTACGGTAGAGGGTGGTGGAAATTCCTGTGTAGCGGTGAAAT
GCGTAGATATAGGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGACCACTGGACTGA
TACTGACACTGAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTCGACTAGCCGTTGGGATCCTTGAGA
TCTTAGTGCGCAGCTAACGCGATAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCC
GCAAGGTTAAAAGTCAAATGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAG
CATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGCCTTGACAT
GCTGAGAACTTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAAGTCAAGACACAG
GTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTCC
CGTAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTACCAGCACCTCGGGTGGGCAC
TCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAA
GTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGTTCGGT
ACAAAGGGTTGCCAAGCCGCGAGGTGGAGCTAATCCCATAAAACCGATCG
TAGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAG
TAATCGTGAATCAGAATGTCACGGTGAATACGTTCCTCCGGGCCTTGACAC
ACCGCCCAT

> *Achromobacter* sp. TD2.18 (99%)

TCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACGGACTTCGGTCTGGTG
GCGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATGTATCGGAACGTGCCCAGTAGCGGGG
GATAACTACGCGAAAGCGTAGCTAATACCGCATAACGCCCTACGGGGGAAA
GCAGGGGATCGCAAGACCTTGCACTATTGGAGCGGGCCGATATCGGATTAG
CTAGTTGGTGGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCGTAGCTGGTTTG
AGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGGGAAACCCTGATCCAGCCA
TCCCCGCGTGTGCGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTTGGCAGGA
AAGAAACGTCATGGGCTAATACCCCGTGAACTGACGGTACCTGCAGAAT
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCAA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTTCGGAAAAG
AAAGATGTGAAATCCCAGAGCTTAACTTTGGAAGTGCATTTTAACTACC
GGGCTAGAGTGTGTCAGAGGGAGGTGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAAT
GCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAGCCTCCTGGGATAA
CACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTAGCTGTTGGGGCCTTCGGGC
CTTGGTAGCGCAGCTAAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGTCG
CAAGATTAAAACCTAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATG
ATGTGGATTAAATTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCTACCCCTGACATG
TCTGGAATGCCGAAGAGATTTGGCAGTGCTCGCAAGAGAACCAGAACACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCTACGAAAGGGCACTCTAA
TGAGACTGCCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCCT
CATGGCCCTTATGGGTAGGGCTTCACACGTCATACAATGGTCGGGACAGA
GGGTGCGCAACCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCAGAAACCCGATCGTAGTC
CGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGTAATC
GCGGATCAGCATGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGC
CCAAA

> *Delftia* sp. TD3.31 (99%)

CGTCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAACAGGTCTTCGGACGCTG
ACGAGTGGCGAACGGGTGAGTAATACATCGGAACGTGCCCAGTCGTGGGG
GATAACTACTCGAAAGAGTAGCTAATACCGCATAACGATCTGAGGATGAAA
GCGGGGGACCTTCGGGCCTCGCGCGATTGGAGCGGGCCGATGGCAGATTAG
GTAGTTGGTGGGATAAAAGCTTACCAAGCCGACGATCTGTAGCTGGTCTG
AGAGGACGACCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGG
GAGGCAGCAGTGGGGAATTTTGGACAATGGGCGAAAGCCTGATCCAGCAA
TGCCGCGTGCAGGATGAAGGCCTTCGGGTTGTAACTGCTTTTGTACGGA
ACGAAAAAGCTTCTCCTAATACGAGAGGGCCCATGACGGTACCGTAAGAAT
AAGCACCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGTGCGA
GCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGCAGGCGGTTATGTAAG
ACAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATTTGTGACTGCA
TGGCTAGAGTACGGTAGAGGGGGATGGAATTCCGCGTGTAGCAGTGAAAT
GCGTAGATATGCGGAGGAACACCGATGGCGAAGGCAATCCCCTGGACCTG
TACTGACGCTCATGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCC
TGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGTCAACTGGTTGTTGGGAATTAGTTTT
CTCAGTAACGAAGCTAACGCGTGAAGTTGACCGCCTGGGGAGTACGGCCG
CAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGATG
ATGTGGTTTAATTTCGATGCAACGCGAAAAACCTTACCCACCTTTGACATG
GCAGGAAGTTTCCAGAGATGGATTTCGTGCTCGAAAGAGAACCTGCACACA
GGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTAAAGTC
CCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCAATTAGTTGCTACATTTAGTTGGGCACT
CTAATGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAG
TCCTCATGGCCCTTATAGGTGGGGCTACACACGTCATACAATGGCTGGTA
CAGAGGGTTGCCAACCCGCGAGGGGGAGCTAATCCCATAAAACCAGTCGT
AGTCCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGTCGGAATCGCTAGT
AATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
CCGCCCCATGT

> *Stenotrophomonas acidaminiphila* TD4.7

TCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGCAGCACAGGAGAGCTTGCTCTC
TGGGTGGCGAGTGGCGGACGGGTGAGGAATGCATCGGAATCTACTCTGTC
GTGGGGGATAACGTAGGGAACTTACGCTAATACCGCATAACGACCTACGG
GTGAAAGCAGGGGATCTTCGGACCTTGCGCGATTGAATGAGCCGATGCC
GATTAGCTAGTTGGCGGGGTAAGAGCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCT
GGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGAAGTGAACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGCGCAAGCCTGATC
CAGCCATACCGCGTGGGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCCCTTTG
TTGGGAAAGAAAAGCAGCCGGTTAATACCCGGTTGTTCTGACGGTACCCA
AAGAATAAGCACCAGCTAATTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGG
GTGCAAGCGTTACTCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGTGCGTAGGTGGTTG
TTTAAGTCTGTCGTGAAAGCCCTGGGCTCAACCTGGGAATGGCGATGGAA
ACTGGACGACTAGAGTGTGGCAGAGGGTAGTGGAATTCCTGGTGTAGCAG
TGAAATGCGTAGAGATCAGGAGGAACATCCGTGGCGAAGGCGACTGCCTG
GGCCAACTGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAG
ATACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCGAACTGGATGTTGGGTGCA
ATTTGGCAGCAGTATCGAAGCTAACGCGTTAAGTTCGCCGCTGGGGAG
TACGGTCGCAAGAGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAAG
GGTGGAGTATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCCTTACCTGGCC
TTGACATGCACGGAACCTTCCAGAGATGGATTGGTGCCTTCGGGAACCGT
GACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTTAGTTGCCAGCACGTAATG
GTGGGAACCTAAGGAGACCGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGAT
GACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGGCCAGGGCTACACACGTAATAAA
TGGTAGGGACAGAGGGCTGCAAGCCGGCGACGGTGAGCCAATCCAGAAA
CCCTATCTCAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGA
ATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATTGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
CTTGACACACCGCCCAA

> *Bacillus cereus* TD4.31 (99%)

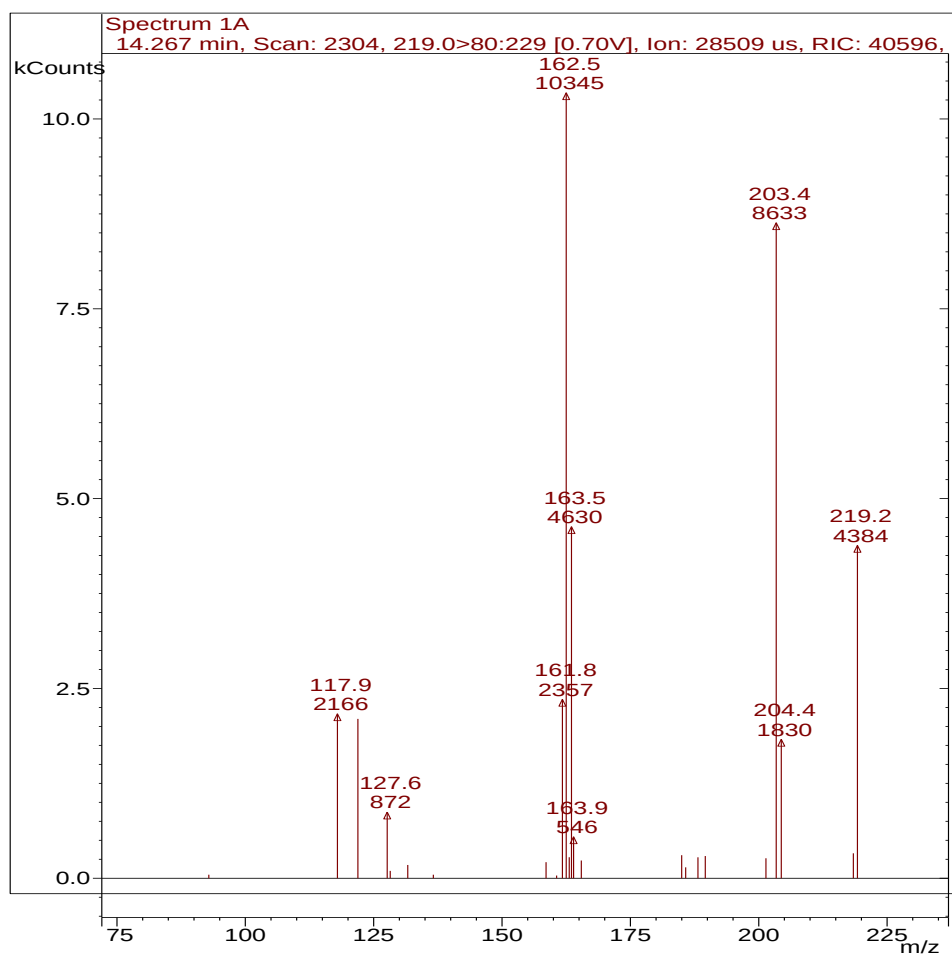
TCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGAATGGATTAAGAGCTTGCTCTTA
TGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCATAAG
ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAAC
CGCATGGTTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCATTATGGATGGAC
CCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAGGCAACGAT
GCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGC
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAA
GTCTGACGGAGCAACGCCCGGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTGCTAAAA
CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGA
CGGTACCTAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA
ATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGAATTATTGGGCGTAAAGCGCGCGC
AGGTGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCACGGCTCAACCGTGGAGGG
TCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAAGAGGAAAGTGGAAATCCAT
GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATATGGAGGAACACAGTGGCGAAGGC
GACTTTCTGGTCTGTAAGTACACTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTG
TTAGAGGGTTTCCGCCCTTTAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGCACTCCG
CCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCT
TACCAGGTCTTGACATCCTCTGAAAACCCTAGAGATAGGGCTTCTCCTTC
GGGAGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAG
ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAT
CATTAAAGTTGGGCACTTAAGGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAG
TGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGT
GCTACAATGGACGGTACAAAGAGCTGCAAGACCGCGAGGTGGAGCTAATC
TCATAAAACCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCTACATGA
AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCGGGCCCTTGACACACCGCCCATG

Apêndice C

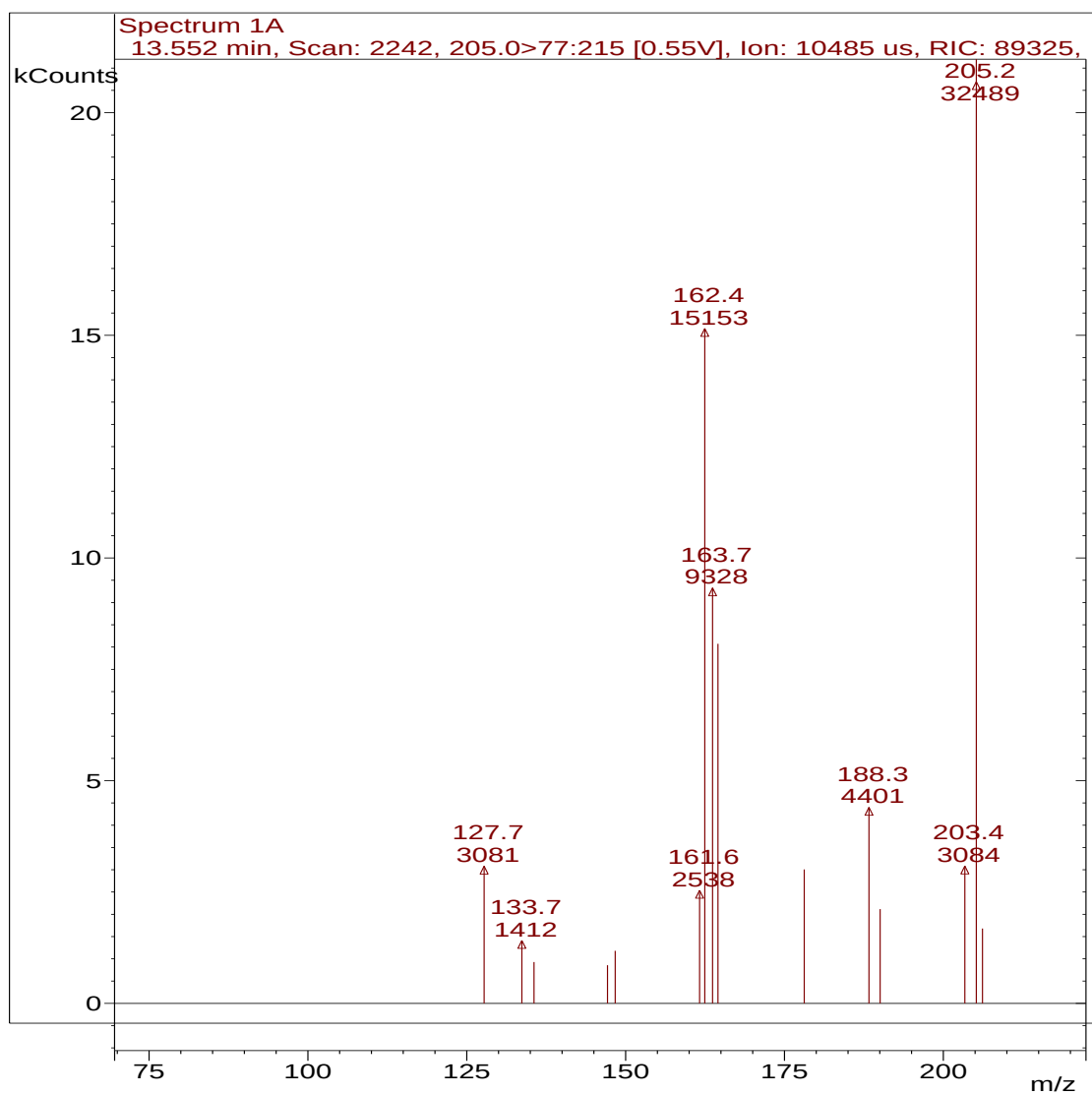
Confirmação dos metabólitos do diuron presente nas amostras por comparação dos padrões analíticos em LC-MS.

As amostras de cultivo bacteriano em diuron e seus metabólitos foram analisadas em LC-MS e os espectros de massas gerados foram comparados com os obtidos pela injeção dos padrões analíticos. As amostras foram injetadas em LC-MS como descrito no item 3.7.4 e a seguir, encontram-se representados os espectros de massas para cada padrão analisado.

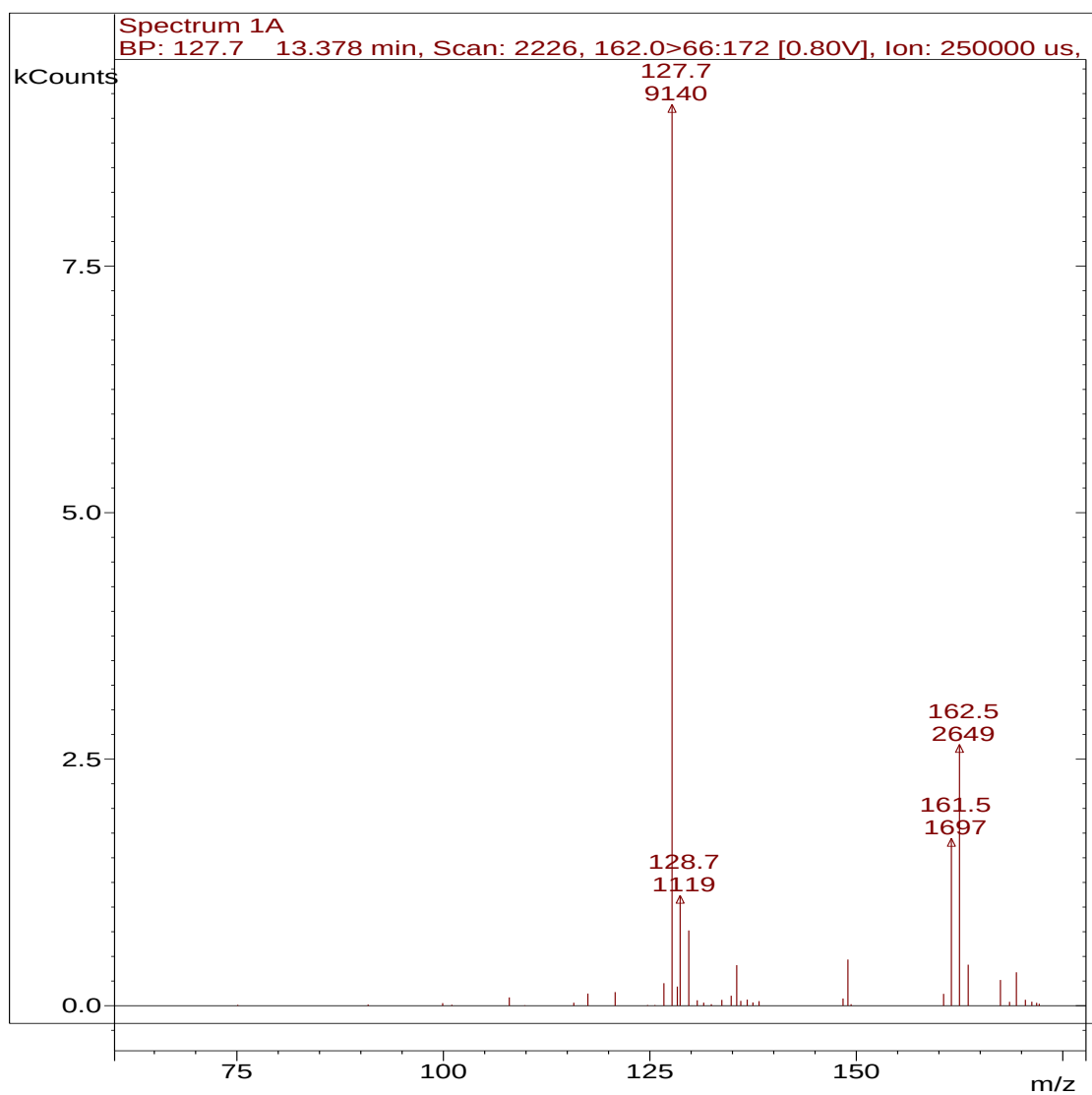
Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos
DCPMU	218/222	14,26	219/223	203,4 162,5



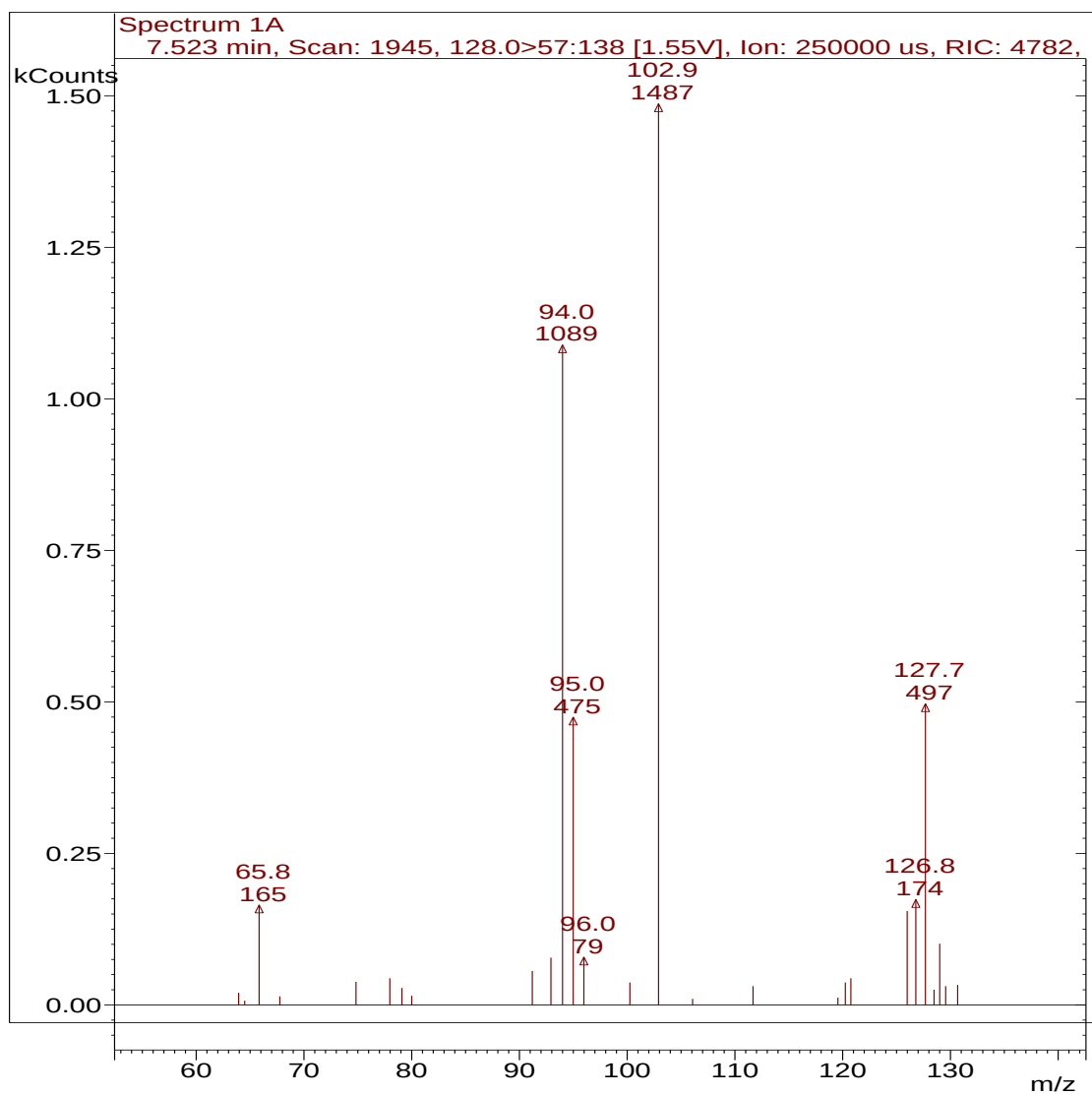
Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos		
DCPU	204/208	13,55	205/209	188,4	162,4	127,7



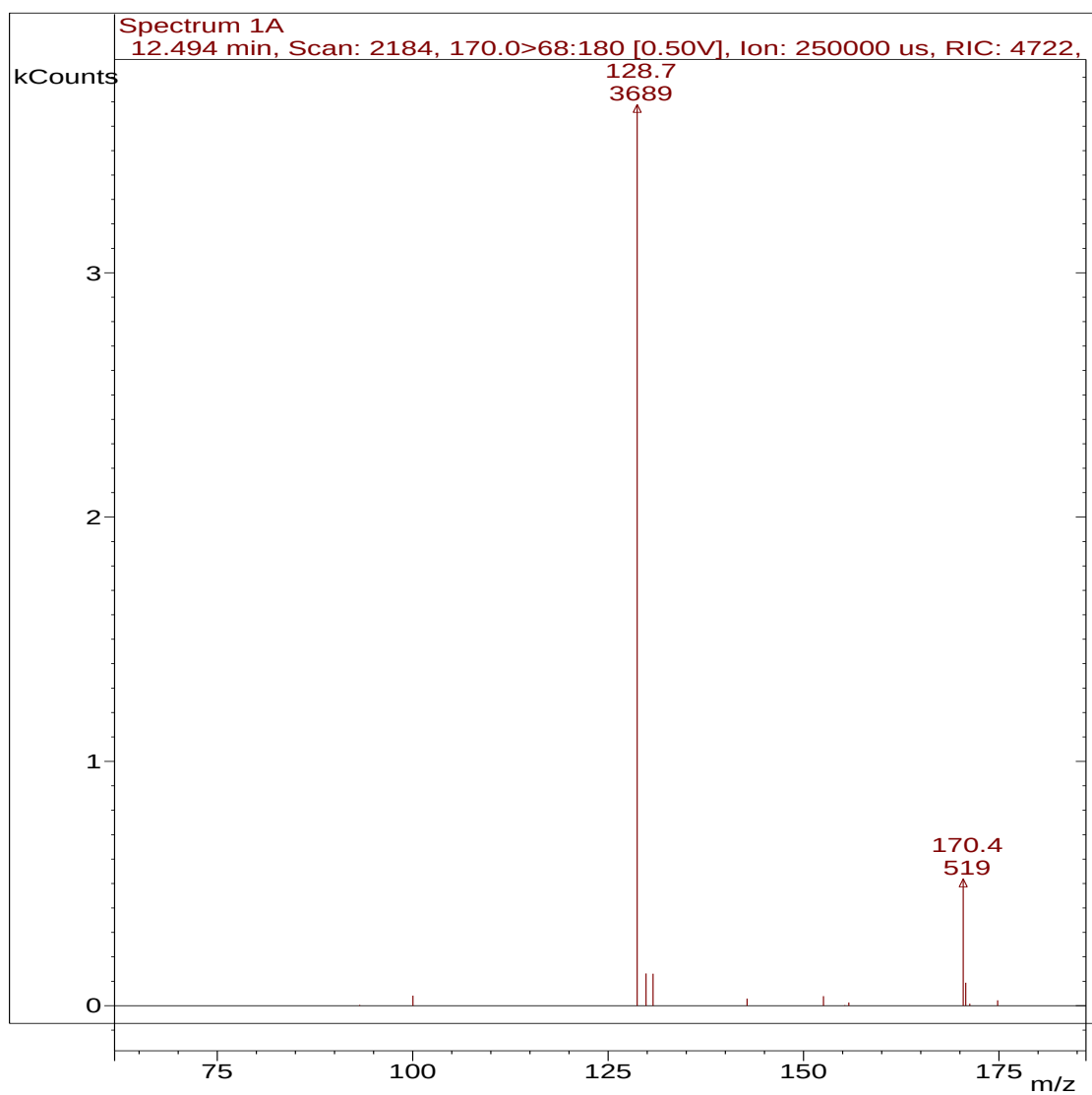
Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos
3,4-DCA	161/165	13,37	162/166	127,7/128



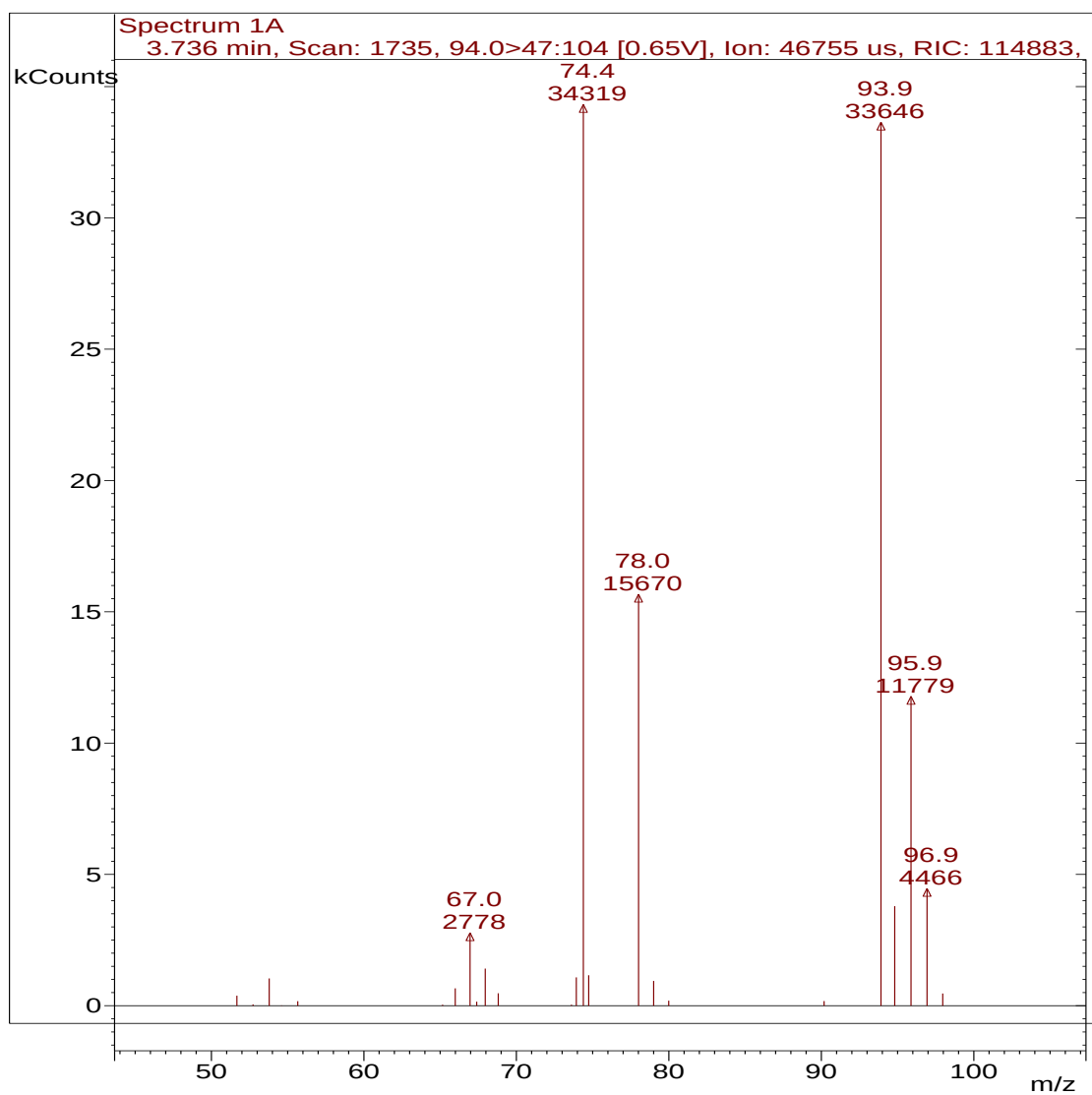
Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos		
4-CA	127/129	7,52	128/130	102,9	94	65,8



Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos
4-CAC	169/171	12,49	170/172	128,7



Padrão analítico	Massa Molar	TR (min)	Íon	Fragmentos		
Anilina	93	3,77	94	74,4	78	67



Anexo A – Laudo da análise do solo de amostragem utilizado no isolamento das bactérias e experimentos de microcosmo.



Rua Frei Balthazar XIX, 83, Vila Maria
CEP 15025-390 - São José do Rio Preto - SP
Fone: (17) 3305-1074 - Fax: (17) 3305-0974
www.cienciaemsolo.com.br | contato@cienciaemsolo.com.br

Resultados de Análise de Solo

Solicitante:	TÁSSIA CHIACHIO EGEA	Convênio:	PESQUISAS
Proprietário:	USINA VIRGULINO DE OLIVEIRA	Data Entrada:	31/10/2013
Propriedade:	ÁREA CANA-DE-AÇÚCAR	Data Saída:	07/11/2013
Município:	José Bonifácio - SP	Laudo Nº:	888/2013

Resultado de Análise Química

Cod. Lab.	Descrição Amostra	pH(CaCl ₂)	P(res)	S-SO ₄ ²⁻	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	Al ³⁺	H + Al	M.O.	C.O.
		-	mg dm ⁻³									
4529	Am. 01 - 0-10 CM	6,1	14	3	3,1	35	18	ns	0,0	12	13	7,5
4530	Am. 02 - 0-10 CM	5,3	6	2	3,2	28	18	ns	0,0	18	13	7,3
4531	Am. 03 - 0-10 CM	6,1	7	3	2,4	41	24	ns	0,0	12	13	7,5
4532	Am. 04 - 0-10 CM	6,1	5	2	1,8	34	17	ns	0,0	13	13	7,7

Resultados Complementares

Cod. Lab.	Descrição Amostra	SB	CTC	V	m	Ca/CTC	Mg/CTC	K/CTC	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K
		mmol _c dm ⁻³		%							
4529	Am. 01 - 0-10 CM	56,1	67,7	83	0	52	27	5	1,9	11,3	5,8
4530	Am. 02 - 0-10 CM	49,2	67,0	73	0	42	27	5	1,6	8,8	5,6
4531	Am. 03 - 0-10 CM	67,4	79,1	85	0	52	30	3	1,7	17,1	10,0
4532	Am. 04 - 0-10 CM	52,8	65,5	81	0	52	26	3	2,0	18,9	9,4

Resultados de Micronutrientes

Resultados de Análise Física

Cod. Lab.	Descrição Amostra	B	Cu	Fe	Mn	Zn	Areia Grossa	Areia Fina	Areia Total	Argila	Silte	Classificação Textura:
4529	Am. 01 - 0-10 CM	0,09	0,3	23	11,8	0,8	ns	ns	814	117	69	Arenosa
4530	Am. 02 - 0-10 CM	0,11	0,4	52	17,7	0,9	ns	ns	812	117	71	Arenosa
4531	Am. 03 - 0-10 CM	0,14	0,3	27	13,0	0,8	ns	ns	796	134	70	Arenosa
4532	Am. 04 - 0-10 CM	0,08	0,3	21	8,8	1,3	ns	ns	800	135	65	Arenosa

Observações:

ns: não solicitado.
pH da solução do solo, determinado em solução de cloreto de cálcio.
M.O. e C.O.: matéria orgânica e carbono orgânico, respectivamente, determinação por método colorimétrico.
P: fósforo disponível, extraído por resina de troca iônica.
K⁺, Ca²⁺ e Mg²⁺: teores trocáveis de potássio, cálcio, magnésio, respectivamente, extraídos por resina de troca iônica.
Na⁺: sódio trocável, extraído por solução de cloreto de amônio.
S-SO₄²⁻: enxofre na forma de sulfatos, extraído por fosfato de cálcio e determinado por turbidimetria.
Al³⁺: alumínio trocável, extraído por solução de cloreto de potássio a 1 mol L⁻¹.
H+Al: acidez total do solo, determinada em solução tampão SMP a pH 7,5.
SB: soma de bases (K⁺ + Ca²⁺ + Mg²⁺ + Na⁺)₂₊.
CTC: capacidade de troca de cátions (K⁺ + Ca²⁺ + Mg²⁺ + Na⁺ + H+Al).
V: saturação por bases do solo (relação SB/CTC).
m: saturação por alumínio (relação Al³⁺/(SB+Al³⁺)).
B: Boro, extração por microondas.
Cu, Fe, Mn e Zn: cobre, ferro, manganês e zinco, extraídos por solução DTPA-TEA em pH 7,3.
Resultados de análises realizadas em amostra de solo coletada pelo solicitante.
As amostras de solo serão descartadas após 30 (trinta) dias da emissão dos resultados.

Procure um Eng. Agrônomo para recomendações de correção e fertilização do solo.

Adolfo Valente Marcelo

Eng. Agr. Dr. Adolfo Valente Marcelo
Responsável Técnico
5061992141

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ____/____/____

Assinatura