

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CENTRO OESTE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR, ESTRUTURAL E GENÉTICA

KARIN CRISTINA SCHOVEIGERT

BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA MESOTRIONE POR LINHAGENS  
BACTERIANAS ISOLADAS DE FOLHAS DE MILHO

PONTA GROSSA

2009

KARIN CRISTINA SCHOVEIGERT

BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA MESOTRIONE POR LINHAGENS  
BACTERIANAS ISOLADAS DE FOLHAS DE MILHO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientador: Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

PONTA GROSSA

2009

Ficha Catalográfica Elaborada pelo Setor de Processos Técnicos BICEN/UEPG

S376b

Schoveigert, Karin Cristina

Biodegradação do herbicida mesotrione por linhagens bacterianas isoladas de folhas de milho. / Karin Cristina Schoveigert. Ponta Grossa, 2009. 93f.

Dissertação ( Mestrado em Biologia Evolutiva ) - Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná.

Orientador : Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

1. Mesotrione. 2. Biodegradação 3. Microrganismos endofíticos. 4. Microrganismos epifíticos. 5. Milho. I. Silveira, Rafael Bertoni da II. T.

CDD : 633.15



**Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva**

*Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)*



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 07/2009**

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **KARIN CRISTINA SCHOVEIGERT**.

Aos cinco dias do mês de outubro de dois mil e nove, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência do Dr. Rafael Bertoni da Silveira, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do(a) aluno(a) **KARIN CRISTINA SCHOVEIGERT**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr. Rafael Bertoni da Silveira (Orientador), Drª Maria Albertina de Miranda Soares e Drª Márcia Helena Appel. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao(a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Biodegradação do Herbicida Mesotrione por Linhagens Bacterianas Isoladas de Folhas de Milho**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, **com validade de sessenta dias**; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora.

Ponta Grossa, 05 de outubro de dois mil e nove.

Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira

*Rafael Bertoni da Silveira*

Profª Drª Maria Albertina de Miranda Soares

*Maria Albertina de Miranda Soares*

Profª Drª Márcia Helena Appel

*Márcia Helena Appel*

*Aos meus queridos pais, José e Ana Maria  
Schoveigert, pelo amor e apoio  
incondicionais, fundamentais para que eu  
chegasse até aqui. Não há palavras e ações  
que possam retribuir tudo que fizeram por  
mim. Só tenho a agradecer. Amo vocês. Muito  
obrigada.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Rafael Bertoni da Silveira, pela orientação competente, responsabilidade e profissionalismo acadêmicos e confiança profissional.

Aos professores Dr. Luís Antônio Esmerino, Dr. Paulo Irajara Borba Carneiro e Dra. Akemi Teramoto de Camargo, dos Departamentos de Análise Clínicas, Química e Biologia Geral, respectivamente, pelos conhecimentos transmitidos e sugestões neste trabalho.

Aos professores Dr. Roberto Ferreira Artoni e Dr. Paulo Roberto Favero, dos Departamentos de Biologia Estrutural, Molecular e Genética e de Análises Clínicas, por disponibilizar equipamentos e pelo auxílio na realização de procedimentos.

Aos técnicos de laboratório Maurício e Luzia, pela disposição em ajudar.

Aos funcionários do Departamento de Biologia Genética, Estrutural e Molecular, pela prontidão ao serem solicitados.

As professoras Dr. Julianne Milleo e Dr. Rosângela Capuano Tardivo, pelos ensinamentos.

A Wilson F. Paes Jr., pelo apoio, carinho e amizade, por ter entrado em minha vida no momento certo e ter me ajudado de todas as formas que mais precisei.

A Stela Becher, minha colega de pós-graduação e amiga, pelo companheirismo e incentivo, por termos juntas conseguido vencer esta etapa de nossas vidas.

A laboratorista Maria Janina Pinheiro Diniz pelo auxílio técnico, amizade e confiança.

Aos amigos e colegas de Pós-Graduação, pelo companheirismo nestes dois anos.

Aos colegas de laboratório Leilane, Paulo e Ricardo, pelo convívio agradável e apoio.

Aos amigos Geovan e Michelli, que mesmo distantes sempre me incentivaram de alguma forma.

A Fazenda Escola Capão da Onça, por disponibilizar o material necessário para este trabalho.

A Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da bolsa de estudo.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e a FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) / SETI (Secretária de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior) pelo auxílio financeiro a esta pesquisa.

A todos aqueles que, de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

Os adubos químicos e pesticidas tornaram-se parte integral da agricultura moderna. O emprego destas substâncias químicas trouxe grandes vantagens, mas também criou novos problemas, como a eliminação após o uso, a persistência ao longo do tempo e o acúmulo no ambiente, acarretando consequências adversas consideráveis à saúde pública e um impacto negativo nos ecossistemas. A cultura do milho merece atenção pela elevada quantidade de herbicidas usados. O mesotrione é um novo herbicida seletivo utilizado na cultura do milho. Devido sua introdução recente, há pouca informação referente ao risco ecotoxicológico do mesotrione e de seus produtos de degradação. Apenas duas linhagens bacterianas do gênero *Bacillus*, degradadoras do mesotrione, provenientes do solo e da água, já foram isoladas e identificadas. O objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar linhagens bacterianas endofíticas e epifíticas, isoladas das folhas de milho, com capacidade de biodegradar o herbicida mesotrione. As coletas foram realizadas em plantação de milho variedade Penta sem tratamento com o herbicida mesotrione e em plantação de milho variedade DKB 234 com tratamento com o herbicida, na Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa, PR. Os microrganismos foram isolados e cultivados em meio mineral com mesotrione como única fonte de carbono. Das vinte coletas foram isoladas 347 linhagens bacterianas tolerantes e/ou degradadoras. Estas foram selecionadas em concentrações crescentes do herbicida e tiveram sua capacidade de degradação investigada por espectrofotometria visível. Dez linhagens capazes de crescer na presença de altas concentrações do herbicida foram avaliadas. Destas, 9 linhagens (7 epifíticas e 2 endofíticas) foram isoladas de milho variedade Penta sem tratamento com o herbicida mesotrione e 1 foi isolada de milho variedade DKB 234 com tratamento com mesotrione. Cinco linhagens tiveram a capacidade de degradar o herbicida comprovada. Uma linhagem foi identificada como *Acinetobacter baumannii* e outra como *Micrococcus luteus*. Somente *Micrococcus luteus* é uma linhagem endofítica, sendo as demais epifíticas do milho. Quatro linhagens degradadoras foram isoladas de plantação de milho sem tratamento prévio com mesotrione; apenas uma linhagem de bacilo Gram-negativo não fermentador foi isolada de plantação sob tratamento com o herbicida. O crescimento, em alta concentração, das linhagens que não tiveram a capacidade de degradação do mesotrione detectada pela espectrofotometria indica a possibilidade destas linhagens participarem da degradação deste herbicida quando associadas com outros microrganismos em consórcios no ambiente. A capacidade quantitativa real de degradação do mesotrione pelas linhagens investigadas registrada pela espectrofotometria pode estar subestimada devido ao acúmulo dos produtos de degradação que possuem o mesmo comprimento de onda no espectro de absorção que a molécula de mesotrione. Este trabalho é o primeiro relato de isolamento de linhagens bacterianas degradadoras do herbicida mesotrione epifíticas e endofíticas de milho.

Palavras-chave: mesotrione; biodegradação; microrganismos endofíticos; microrganismos epifíticos; milho.

## ABSTRACT

Chemical fertilizers and pesticides have become an important part of modern agriculture. The use of these chemical brought great benefits but also created new problems, such as disposal after use, persistence over time and accumulation in the environment, resulting significant bad consequences to public health and adverse impact on ecosystems. Maize culture deserves attention because the large amount of herbicides used. Mesotrione is a new selective herbicide developed for use in maize culture. Due it has not been used for a long time, there is little information available on the ecotoxicological risk. Only two mesotrione-degrading strains, from soil and water, both the genus *Bacillus*, were isolated and identified. The aim of this study was to isolate and characterize endophytic and epiphytic bacterial strains collected from maize leaves, able to biodegrade the herbicide mesotrione. Samples were collected in maize planting variety Penta without treatment with mesotrione and maize planting variety DKB 234 treated with mesotrione, at Fazenda Escola Capão da Onça, Ponta Grossa, PR. The microorganisms were isolated and cultured in mineral medium supplemented with mesotrione as sole carbon source. Of the twenty samples were isolated 347 tolerant and/or mesotrione-degrading strains. These were selected in increasing concentrations of the herbicide and had their degradation capability evaluated by VIS spectrophotometry. Ten strains were able to grow in the presence of high concentrations of mesotrione. Of these, 9 strains (7 epiphytic and 2 endophytic) were isolated from maize variety Penta without treatment with mesotrione and only 1 epiphytic strain was isolated from maize variety DKB 234 treated with mesotrione. Five strains had the ability to degrade the herbicide confirmed. One strain was identified as *Acinetobacter baumannii* and other as *Micrococcus luteus*. Just *M. luteus* is an endophytic strain, the others are maize epiphytics. Four mesotrione-degrading strains were isolated from maize untreated with mesotrione, only one strain of Gram-negative bacilli non fermenter was isolated from maize treated with the herbicide. The growth in high concentration of the strains that didn't have the mesotrione degradation capability detected by spectrophotometry indicates the possibility of these strains degrade this herbicide when in association with other microorganisms consortia in the environment. The real quantitative capability of mesotrione degradation by the strains recorded by spectrophotometry may be underestimated due to the accumulation of degradation products which have the same wavelength as the mesotrione. This study reports the first isolation and characterization of mesotrione degrading strains endophytic and epiphytic from maize.

**Keywords:** mesotrione; biodegradation; endophytic microorganism; epiphytic microorganism; maize.

## LISTA DE FIGURAS

|           |                                                                                  |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. | Estrutura química do mesotrione, do MNBA e do AMBA.....                          | 14 |
| FIGURA 2. | Conversão do mesotrione em MNBA e AMBA (retirado de ALFERNES e WIEBE, 2002)..... | 15 |

## LISTA DE TABELAS

|           |                                                                                                    |    |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1. | Principais países produtores de milho de 2001 a 2005 (produção anual em toneladas).....            | 3  |
| TABELA 2. | Produção brasileira de milho de 2001 a 2005 (produção anual em toneladas).....                     | 4  |
| TABELA 3. | Consumo aparente e incremento relativo anual de defensivos agrícolas no Brasil de 1970 a 1991..... | 9  |
| TABELA 4. | Características ambientais dos defensivos agrícolas registrados no Brasil.....                     | 10 |
| TABELA 5. | Dados químicos do herbicida mesotrione.....                                                        | 12 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

aC: antes de Cristo

AMBA: ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico

ANDEF: Associação Nacional de Defesa Vegetal

CM: caldo mineral ou caldo mínimo

DO: densidade ótica

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Agropecuária

HNMR: “nuclear magnetic resonance spectroscopy” (espectroscopia de ressonância nuclear magnetica)

HPLC: “high performance liquid chromatography” (cromatografia líquida de alta performance)

MM: meio mineral ou meio mínimo

MNBA: ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico

MOBOT: “Missouri Botanical Garden”

N: Norte

O/F: oxidação/fermentação

rpm: rotações por minuto

TSA: “tryptic soy agar” (agar soja triptona)

TSB: “tryptic soy broth” (caldo soja triptona)

TSI: “triple sugar iron” (agar tríplice açúcar)

## SUMÁRIO

|                                                                              |           |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                     | <b>1</b>  |
| 1.1 MILHO.....                                                               | 1         |
| 1.1.1 História e origem.....                                                 | 1         |
| 1.1.2 Classificação botânica.....                                            | 2         |
| 1.1.3 Cultura do milho no Brasil.....                                        | 2         |
| 1.2 HERBICIDAS.....                                                          | 5         |
| 1.2.1 Conceito e classificação.....                                          | 5         |
| 1.2.2 Comportamento dos herbicidas no ambiente.....                          | 5         |
| 1.2.3 Impacto do uso de herbicidas na agricultura.....                       | 6         |
| 1.2.4 Uso de herbicidas no Brasil.....                                       | 8         |
| 1.3 MESOTRIONE (CALLISTO®) .....                                             | 11        |
| 1.3.1 Dados químicos.....                                                    | 11        |
| 1.3.2 Destino e comportamento do mesotrione no ambiente.....                 | 13        |
| 1.4 BIORREMEDIAÇÃO . .....                                                   | 15        |
| 1.4.1 Conceito e importância .....                                           | 15        |
| 1.4.2 Biodisponibilidade dos pesticidas .....                                | 17        |
| 1.4.3 Uso de microrganismos na biorremediação de pesticidas .....            | 17        |
| 1.4.4 Biodegradação do mesotrione por microrganismos.....                    | 19        |
| 1.5 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS .....                            | 20        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>                                                      | <b>22</b> |
| 2.1 OBJETIVO GERAL .....                                                     | 22        |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....                                              | 22        |
| <b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>                                            | <b>23</b> |
| 3.1 MATERIAIS.....                                                           | 23        |
| 3.1.1 Meios de cultura.....                                                  | 23        |
| 3.1.2 Isolamento e seleção das linhagens bacterianas .....                   | 23        |
| 3.1.3 Estoque das linhagens bacterianas selecionadas .....                   | 24        |
| 3.1.4 Identificação morfológica das linhagens bacterianas selecionadas ..... | 25        |
| 3.1.5 Identificação fenotípica das linhagens bacterianas selecionadas .....  | 27        |
| 3.1.6 Tratamento estatístico .....                                           | 28        |
| 3.2 MÉTODOS.....                                                             | 29        |
| 3.2.1 Coleta do material vegetal .....                                       | 29        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.2.2 Isolamento das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | 29        |
| 3.2.3 Teste preliminar de temperatura das linhagens isoladas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 30        |
| 3.2.4 Estoque das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 31        |
| 3.2.5 Seleção das linhagens tolerantes ao herbicida mesotrione.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 31        |
| 3.2.6 Teste de temperatura das linhagens selecionadas.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         | 31        |
| 3.2.7 Avaliação da capacidade de degradação do herbicida mesotrione por espectrofotometria .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | 32        |
| 3.2.8 Identificação das linhagens bacterianas degradadoras.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | 33        |
| <b>4 RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           | <b>38</b> |
| 4.1 CAPÍTULO I - ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS DE MILHO DEGRADADORAS DO HERBICIDA MESOTRIONE .....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 38        |
| <b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>58</b> |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>60</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 | <b>67</b> |
| ANEXO A - Total de linhagens de microrganismos endofíticos e epifíticos, incluindo fungos e bactérias, isoladas das plantações de milho variedade Penta sem tratamento com herbicida mesotrione e milho variedade DKB 234 com tratamento com herbicida mesotrione .....                                                                                                                                                            | 67        |
| ANEXO B - Fotos da etapa de isolamento dos microrganismos endofíticos e epifíticos de milho, em MM 28 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de mesotrione. Fotos 1 A – isolamento de linhagens bacterianas epifíticas; 1 B e 1 C – isolamento de linhagens bacterianas endofíticas; 1 D e 1 E – isolamento de linhagens fúngicas endofíticas .....                                                                                                | 68        |
| ANEXO C – Teste de temperatura das linhagens a 18°, 28° e 37°C, realizados em triplicata, e analisados em espectrofotometrom e fotocolorímetro. As amostras foram incubadas sem agitação. Figura 1 A – linhagem 61 ( <i>Micrococcus luteus</i> ); Figura 1 B – linhagem 74; Figura 1 C – linhagem 229 ( <i>Acinetobacter baumannii</i> ); Figura 1 D – linhagem 247; Figura 1 E – linhagem 661.....                                | 69        |
| ANEXO D - Curvas de crescimento das 5 linhagens bacterianas degradadoras do herbicida mesotrione. Crescimento em meio TSB medido em densidade ótica (DO) ao longo do período de incubação, em horas, em temperatura de 28°C. Curva 1 A – linhagem 61 ( <i>Micrococcus luteus</i> ); curva 1 B – linhagem 74; curva 1 C – linhagem 229 ( <i>Acinetobacter baumannii</i> ); curva 1 D – linhagem 247; curva 1 E – linhagem 661 ..... | 71        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>ANEXO E</b> - Pico de absorção do herbicida mesotrione, em comprimento de onda de 254nm, registrado em espectrofotometria UV-VIS, na concentração de 1,0 mmol.L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                      | 73 |
| <b>ANEXO F</b> - Curva de calibração do herbicida mesotrione, feita a partir da concentração de 0 até 0,12 mmol.L <sup>-1</sup> .....                                                                                                                                                                                       | 74 |
| <b>ANEXO G</b> - Fotomicrografias (aumento 1000X) da coloração de Gram das linhagens degradadoras do herbicida mesotrione. Foto 1 A – Linhagem 61 ( <i>Micrococcus luteus</i> ); foto 1 B – Linhagem 74; foto 1 C – linhagem 229 ( <i>Acinetobacter baumannii</i> ); foto 1 D – linhagem 247; foto 1 E – linhagem 661 ..... | 75 |
| <b>APÊNDICES</b> .....                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | 78 |
| <b>APÊNDICE A</b> - Tabelas para identificação fenotípica de cocos Gram-positivos.....                                                                                                                                                                                                                                      | 78 |
| <b>APÊNDICE B</b> - Tabelas para identificação fenotípica de bastonetes não fermentadores de glicose .....                                                                                                                                                                                                                  | 79 |
| <b>APÊNDICE C</b> - BD Sistemas de Identificação BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit .....                                                                                                                                                                                                                              | 80 |
| <b>APÊNDICE D</b> - Esquema resumido para diferenciação de espécies do gênero <i>Micrococcus</i> .....                                                                                                                                                                                                                      | 81 |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MILHO

### 1.1.1 História e origem

O milho é uma das mais antigas plantas cultivadas. Estudos arqueológicos afirmam que a cultura do milho, este já com as principais características morfológicas que o definem botanicamente na atualidade, existe há cerca de 4.000 anos. Alguns trabalhos afirmam que o milho teve origem na América do Norte, pois, quando Cristóvão Colombo descobriu a América, o milho constituía a base alimentícia vegetal dos indígenas que aqui viviam e era cultivado desde a Argentina até o Canadá. No México, foram encontrados grãos de pólen de milho com cerca de 60.000 anos e espigas de milho primitivo com cerca de 5.000 a 6.000 anos de idade. Outros estudos que sugerem uma origem asiática são menos convincentes. Seu cultivo espalhou-se no início dos anos 1500 e rapidamente alcançou distribuição mundial, obtendo o status de gramínea mais adaptável climaticamente. Hoje é cultivado praticamente no mundo todo, exceto em regiões que apresentam limitações climáticas (EMBRAPA, 2009; JUGENHEIMER, 1981; MOBOT, 2009).

Atualmente, os botânicos concordam que uma grama selvagem, a teosinte (*Zea mexicana*), é o antepassado do milho moderno, o qual foi originado por seleção artificial pelo homem entre 13000 e 6000 aC. Esta planta apresenta um ciclo de vida parecido e é facilmente cruzada com o milho, indicando significativas semelhanças genéticas. Escavações arqueológicas no Sul do México revelaram espigas de milho (datadas de cerca de 5000 aC) com características intermediárias entre a teosinte selvagem e o milho atual (CASTRO SOUZA e LORENZI, 2005; EMBRAPA, 2009; JUGENHEIMER, 1981; MOBOT, 2009).

### **1.1.2 Classificação botânica**

Dentro da classificação botânica, o milho pertence à divisão Angiospermae, grupo das monocotiledôneas, família Poaceae, ordem Poales, subclasse Commelinidae e classe Liliopsida. O gênero *Zea* é considerado monotípico e constituído por uma única espécie, ou seja, *Zea mays* L. (CASTRO SOUZA e LORENZI, 2005; JUGENHEIMER, 1981; MOBOT, 2009).

### **1.1.3 Cultura do milho no Brasil**

Os maiores produtores mundiais de milho são Estados Unidos, China e Brasil que, em 2005, produziram cerca de 280, 131 e 35 milhões de toneladas, respectivamente (EMBRAPA, 2009; FORNASIERI FILHO, 1992) (TABELA 1).

No Brasil, o milho é cultivado em praticamente todo o território, sendo que 90,0% da produção concentram-se nas regiões Sul (43,0%), Sudeste (25,0%) e Centro-Oeste (22,0%). A produção de milho, juntamente com a soja, contribui com cerca de 80,0% da produção de grãos no Brasil (BÜLL e CANTARELLA, 1993; EMBRAPA, 2009).

A produção de milho no Brasil caracteriza-se pela divisão da produção em duas épocas de plantio – a primeira safra ou plantio de verão e a segunda safra ou “safrinha”. A primeira é realizada durante o período chuvoso, que varia entre fins de agosto na região Sul até os meses de outubro/novembro no Sudeste e Centro Oeste e início do ano no Nordeste. A “safrinha” se refere ao milho de sequeiro, plantado em fevereiro ou março, quase sempre depois da soja precoce, predominantemente na região Centro-Oeste e nos estados do Paraná e São Paulo (BÜLL e CANTARELLA, 1993; EMBRAPA, 2009).

TABELA 1. Principais países produtores de milho de 2001 a 2005 (produção anual em toneladas).

| Países/Anos           | Produção (1.000 t) |         |         |         |         |
|-----------------------|--------------------|---------|---------|---------|---------|
|                       | 2001               | 2002    | 2003    | 2004    | 2005    |
| <b>Estados Unidos</b> | 241.485            | 228.805 | 256.905 | 299.917 | 280.228 |
| <b>China</b>          | 114.254            | 121.497 | 115.998 | 130.434 | 131.145 |
| <b>Brasil</b>         | 41.955             | 35.933  | 48.327  | 41.806  | 34.860  |
| <b>México</b>         | 20.134             | 19.299  | 19.652  | 22.000  | 20.500  |
| <b>Argentina</b>      | 15.365             | 15.000  | 15.040  | 15.000  | 19.500  |
| <b>Índia</b>          | 13.160             | 10.300  | 14.720  | 14.000  | 14.500  |
| <b>França</b>         | 16.408             | 16.440  | 11.991  | 16.391  | 13.226  |
| <b>Indonésia</b>      | 9.347              | 9.654   | 10.886  | 11.225  | 12.014  |
| <b>África do Sul</b>  | 7.772              | 10.076  | 9.705   | 9.965   | 11.996  |
| <b>Itália.</b>        | 10.554             | 10.554  | 8.702   | 11.375  | 10.622  |

Fonte: EMBRAPA (2009).

O milho tem evoluído como cultura comercial apresentando, nos últimos 28 anos, taxas de crescimento da produção de 3,0% ao ano e da área cultivada de 0,4%. Entre 2001 e 2005, a cultura do milho ocupou uma área em torno de 12,9 milhões de hectares, responsável por uma produção de cerca de 41,3 milhões de toneladas de grãos, apresentando um rendimento médio de 3.198 kg.ha<sup>-1</sup> (BÜLL e CANTARELLA, 1993; EMBRAPA, 2009) (TABELA 2).

Apesar de ser um dos grandes produtores mundiais, se comparado com países como Canadá, Suíça, EUA e França que apresentam rendimentos superiores a 4.500 kg.ha<sup>-1</sup>, o Brasil apresenta um rendimento muito baixo e inferior ao que poderia ser obtido, considerando-se o potencial produtivo desta cultura. Daí a preocupação em conscientizar os produtores de que, para uma produção aumentada e a custos baixos, há a necessidade de seguir as recomendações técnicas mais avançadas, para o que é indispensável a aquisição de máquinas, fertilizantes, defensivos, sementes de boa qualidade, etc. (BÜLL e CANTARELLA, 1993; EMBRAPA, 2009). Culturas importantes como o milho e o trigo dependem fortemente do uso de pesticidas (TER HALLE et al., 2006). Entretanto, o emprego de tais produtos químicos, como dos herbicidas para a destruição de ervas daninhas, aumenta

progressivamente devido, principalmente, à falta e ao elevado custo de mão de obra no meio rural (IPEF, 2009).

Quando os defensivos, como os herbicidas, são utilizados corretamente, podem economizar até 40,0 % das perdas nas colheitas, mas o uso indevido ou indiscriminado dessas substâncias químicas pode acarretar consequências adversas visto serem nocivos ao homem e causarem impacto negativo nos ecossistemas (BONNET et al., 2008; DEJONGHE et al., 2003; MARTINS et al., 2007 a).

TABELA 2. Produção brasileira de milho de 2001 a 2005 (produção anual em toneladas).

| <b>Safra</b>                           | <b>2001</b> | <b>2002</b> | <b>2003</b> | <b>2004</b> | <b>2005</b> |
|----------------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| <b>Produção (1.000 t)</b>              |             |             |             |             |             |
| <b>Total</b>                           | 42.290      | 35.267      | 47.411      | 42.192      | 39.040      |
| <b>1ª Safra</b>                        | 35.833      | 29.086      | 34.614      | 31.617      | 29.319      |
| <b>2ª Safra</b>                        | 6.457       | 6.181       | 12.797      | 10.574      | 9.721       |
| <b>Área plantada (1.000 ha)</b>        |             |             |             |             |             |
| <b>Total</b>                           | 12.973      | 12.298      | 13.226      | 12.822      | 12.297      |
| <b>1ª Safra</b>                        | 10.546      | 9.413       | 9.664       | 9.465       | 9.195       |
| <b>2ª Safra</b>                        | 2.426       | 2.885       | 3.563       | 3.357       | 3.102       |
| <b>Rendimento (kg.ha<sup>-1</sup>)</b> |             |             |             |             |             |
| <b>Total</b>                           | 3.260       | 2.868       | 3.585       | 3.291       | 3.175       |
| <b>1ª Safra</b>                        | 3.398       | 3.090       | 3.582       | 3.340       | 3.189       |
| <b>2ª Safra</b>                        | 2.661       | 2.142       | 3.592       | 3.150       | 3.134       |

Fonte: EMBRAPA (2009).

## 1.2. HERBICIDAS

### 1.2.1 Conceito e classificação

Herbicidas são compostos químicos que possuem a capacidade de matar diretamente ou controlar o crescimento de determinadas plantas. São empregados para matar ervas daninhas, na maioria das vezes sem causar prejuízo às culturas a serem protegidas, eliminando os prejuízos da interferência daquelas sobre as culturas (BAIRD, 2002).

Industrialmente, os herbicidas são divididos pela sua finalidade, seu modo de ação e época de aplicação. Quanto à finalidade, os herbicidas de ação total matam todas as plantas atingidas, enquanto os seletivos matam as plantas consideradas daninhas, causando pouco ou nenhum dano à planta cultivada. Entretanto, estas definições não são inflexíveis, pois dependem da dose de herbicida utilizada. Com base no modo de ação, os herbicidas podem ser sistêmicos, de contato e esterilizantes do solo. Os de ação sistêmica são absorvidos pelo tecido vascular e translocados ao longo de toda a planta. Os herbicidas de contato matam os tecidos vegetais atingidos pelo produto químico e geralmente não têm ação direta sobre as partes subterrâneas da planta apresentando, portanto, ação menos prolongada que os herbicidas de ação sistêmica. Os esterilizantes do solo tornam este tóxico para toda vida vegetal. Quanto à época de aplicação, os herbicidas são divididos em pré e pós-emergentes. Os primeiros têm ação sobre as sementes das ervas daninhas, enquanto os pós-emergentes atuam sobre estas após sua emergência (FOGARTY e TUOVINEN, 1991; IPEF, 2009; LAVIEILLE et al., 2008; OLIVEIRA JUNIOR, 2009).

### 1.2.2 Comportamento dos herbicidas no ambiente

Os herbicidas podem entrar em contato com o meio de várias formas e vários fatores determinarão seu comportamento e destino no local em que atuam, como os processos físico-

químicos e biológicos que causam a degradação e o movimento do produto e podem transformar a molécula inicial em vários metabólitos secundários. Entre os processos físico-químicos e biológicos, estão a decomposição química, fotoquímica ou biológica, a volatilização, a lixiviação, o arrastamento lateral, a solubilidade e o coeficiente de participação do produto, os processos de adsorção/dessorção e a retirada pelas plantas e microorganismos (BAIRD, 2002; CORREIA e ANDRADE, 1999; GUIMARÃES, 1987; SILVA et al., 2008).

Embora as substâncias químicas possam ser decompostas no solo por ação puramente química, a degradação microbiológica tem importância muito grande. Existem casos específicos onde um determinado microrganismo age somente sobre um determinado substrato e há aqueles microrganismos capazes de degradar vários produtos químicos. A população de algumas espécies de microrganismos aumenta após aplicações repetidas de um mesmo produto no solo. Este aumento pode ser devido ao produto representar uma fonte de carbono que o microrganismo é capaz de utilizar ou porque o produto elimina certas espécies competidoras. Por exemplo, após aplicações sucessivas de um herbicida, a população microbiana capaz de utilizá-lo como fonte de carbono aumenta, degradando o composto com mais rapidez e encurtando sua permanência no ambiente (CORREIA e ANDRADE, 1999; GUIMARÃES, 1987; SILVA et al., 2008).

### **1.2.3 Impacto do uso de herbicidas na agricultura**

Os adubos químicos e pesticidas em geral tornaram-se parte integral da agricultura moderna (MARTINS et al., 2007 a). O emprego destas substâncias químicas trouxe grandes vantagens, mas também criou novos problemas como a eliminação após o uso, a persistência ao longo do tempo e o consequente acúmulo no ambiente (ARAUJO e HUNGRIA, 1994). O uso indevido e o abuso dessas substâncias podem, portanto, acarretar consequências adversas consideráveis à saúde pública e um impacto negativo nos ecossistemas (BONNET et al., 2008; DEJONGHE et al., 2003; MARTINS et al., 2007 a). Além do uso indiscriminado e excessivo dos pesticidas, calcula-se que somente 0,1% das aplicações atingem o alvo

específico, enquanto que os demais 99,9% ficam livres para se mover em diferentes compartimentos ambientais, tais como o solo e águas residuais e subterrâneas (UETA et al., 2007). Muitos dos pesticidas utilizados ainda têm seu efeito tóxico agravado por serem pouco específicos e serem aplicados em concentrações relativamente altas, acumulando-se no ambiente (ARAUJO e HUNGRIA, 1994).

Várias formas de dissipação e a degradação, que está relacionada a fatores físicos, químicos e biológicos, influenciam na persistência dos pesticidas no solo. A preocupação mais frequente com o impacto ambiental dos pesticidas resulta de sua capacidade de lixiviação, a contaminação dos lençóis freáticos e sua persistência no solo (BENDING et al., 2003; EL-FANTROUSSI, 2000; PROCÓPIO et al., 2004). Os resultados de inúmeros trabalhos têm revelado a presença de níveis alarmantes de agroquímicos e seus produtos de degradação em solos e águas, fato que exige o estabelecimento de políticas ambientais severas, métodos alternativos de plantio e desenvolvimento de técnicas de descontaminação dos sítios poluídos (DURAND et al., 2006 b; UETA et al., 2007).

A influência dos pesticidas sobre a comunidade microbiana do ambiente ainda é motivo de preocupação, apesar de novos pesticidas que requerem menores doses de aplicação terem sido produzidos. A persistência destes no solo afeta a microbiota devido sua toxicidade aos organismos e à seleção de espécies resistentes. Pouco se sabe a respeito dos efeitos dos pesticidas sobre a abundância, composição e atividade dos microrganismos, as quais podem exercer grande influência na produtividade e sustentabilidade dos solos. Vários métodos têm sido utilizados para estudar a estrutura e diversidade das comunidades microbianas do ambiente e suas alterações em resposta à perturbação ambiental causada pelo homem, como o uso de pesticidas. Mas a diversidade geralmente é grosseiramente subestimada devido à limitação dos métodos, como a necessidade de culturas isoladas e o fato de as condições de laboratório não refletirem as condições reais de campo (BONNET et al., 2008; CRECCHIO et al., 2001; EMBRAPA, 2009).

#### 1.2.4 Uso de herbicidas no Brasil

O uso de herbicidas no Brasil está sob o Decreto N° 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamenta a Lei n° 7.802, de 11 de julho de 1989, *que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências*. Enquadra-se no artigo 1º, parágrafo IV que entende por agrotóxicos e afins *produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento* (BRASIL, 2009).

No Brasil, o consumo total de defensivos agrícolas passou de 27.728 toneladas em 1970 para 80.968 toneladas em 1980, fenômeno relacionado com a expansão do cultivo de cana-de-açúcar e da soja. No início da década de 80 apareceu uma tendência à queda no uso desses insumos decorrente de fatores como a elevação de preços, a redução da disponibilidade de crédito para custeio e o corte de subsídios ao crédito rural (ANDEF, 2009) (TABELA 3).

Em 2000, no Brasil, o consumo de herbicidas foi de aproximadamente 174 mil toneladas de produtos formulados (comerciais), o que significa mais de 81 mil toneladas em quantidade de ingrediente-ativo. O consumo foi maior nas regiões Sul (38,9%), Centro-Oeste (29,9%) e Sudeste (22,8%). Pela elevada quantidade total de herbicidas usados, algumas culturas merecem atenção por ocuparem extensas áreas, como é o caso da soja, do milho e da cana-de-açúcar que foram cultivadas, respectivamente, em cerca de 13, 11 e 5 milhões de hectares em 2000. Neste ano, a cultura do milho foi a segunda com maior uso de herbicidas (23,5%), sendo que a soja ocupou a primeira posição (39,8%) (SPADOTTO, 2009).

TABELA 3. Consumo aparente e incremento relativo anual de defensivos agrícolas no Brasil de 1970 a 1991.

| <b>Ano</b>                           | <b>Consumo Aparente</b> | <b>Incremento Relativo<br/>% Ano/Ano</b> |
|--------------------------------------|-------------------------|------------------------------------------|
| 1970                                 | 27.728                  | -                                        |
| 1975                                 | 60.592                  | - 31,13                                  |
| 1980                                 | 80.968                  | + 1,22                                   |
| 1985                                 | 43.081                  | - 16,58                                  |
| 1990                                 | 49.695                  | + 2,64                                   |
| 1991                                 | 60.188                  | + 21,11                                  |
| <b>Aumento Acumulado (1970/1991)</b> |                         | <b>117,06</b>                            |

Fonte: ANDEF (2009).

Segundo a ANDEF (2009), quanto à periculosidade ambiental, ainda considerando-se os defensivos clorados que não são mais utilizados, a grande maioria das moléculas de defensivos agrícolas registradas no Brasil não são persistentes no solo (74,1%), 19,5% têm baixa persistência (inferior a 3 meses) e 6,3% têm alta persistência (superior a 3 meses); 2,6% sofrem alta bioacumulação; 80,2% têm um potencial baixo de contaminação de águas superficiais e subterrâneas e 17,7% têm alto potencial; 54,3% apresentam baixa toxicidade apícola contrastando com 29,1% de alta toxicidade e 16,5% de toxicidade moderada; 64,2% apresentam baixa toxicidade a peixes e 15,9% alta, principalmente devido aos inseticidas (TABELA 4).

TABELA 4. Características ambientais dos defensivos agrícolas registrados no Brasil.

| <b>Característica</b>                                        | <b>Percentual</b> |                 |                         |
|--------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------|-------------------------|
| <b>1. Persistência no solo</b>                               | <b>Alta</b>       | <b>Pequena</b>  | <b>Não-Persistentes</b> |
| Herbicidas                                                   | 7.4               | 27.9            | 64.7                    |
| Fungicidas                                                   | 3.5               | 22.8            | 73.6                    |
| Inseticidas                                                  | 8.0               | 8.0             | 84.0                    |
| <b>Média:</b>                                                | 6.3               | 19.5            | 74.1                    |
| <b>2. Bioacumulação</b>                                      | <b>Alta</b>       | <b>Pequena</b>  | <b>Não-Bioacumulam</b>  |
| Herbicidas                                                   | 0.0               | 0.0             | 100.0                   |
| Fungicidas                                                   | 0.0               | 0.0             | 100.0                   |
| Inseticidas                                                  | 8.0               | 10.0            | 82.0                    |
| <b>Média:</b>                                                | 2.6               | 3.3             | 94.0                    |
| <b>3. Potencial Cont. de Águas Superficiais/Subterrâneas</b> | <b>Alta</b>       |                 | <b>Baixa</b>            |
| Herbicidas                                                   | 30.8              |                 | 69.1                    |
| Fungicidas                                                   | 10.5              |                 | 89.5                    |
| Inseticidas                                                  | 18                |                 | 82.0                    |
| <b>Média:</b>                                                | 17.7              |                 | 80.2                    |
| <b>4. Toxicidade Apícola</b>                                 | <b>Alta</b>       | <b>Moderada</b> | <b>Baixa</b>            |
| Herbicidas                                                   | 2.9               | 17.1            | 80.0                    |
| Fungicidas                                                   | 3.5               | 20.5            | 76.0                    |
| Inseticidas                                                  | 81.0              | 12.0            | 7.0                     |
| <b>Média:</b>                                                | 29.1              | 16.5            | 54.0                    |
| <b>5. Toxicidade Peixes</b>                                  | <b>Alta</b>       | <b>Moderada</b> | <b>Baixa</b>            |
| Herbicidas                                                   | 2.94              | 11.7            | 85.4                    |
| Inseticidas                                                  | 29.0              | 28.0            | 43.0                    |
| <b>Média:</b>                                                | 15.97             | 19.85           | 64.2                    |

Fonte: ANDEF (2009).

### 1.3 MESOTRIONE (CALLISTO®)

#### 1.3.1 Dados químicos

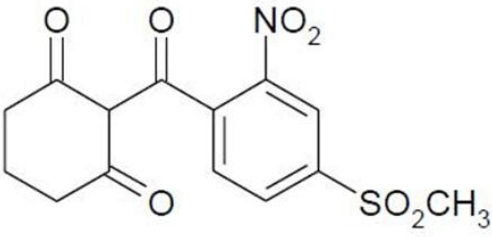
O herbicida mesotrione foi desenvolvido pela *Syngenta Crops Protection* e registrado na Europa em 2000, sendo comercializado sob o nome Callisto® (ALFERNES e WIEBE, 2002; BONNET et al., 2008; MITCHELL et al., 2001).

O mesotrione é um novo herbicida seletivo utilizado para o controle pré e pós-emergente de plantas daninhas na cultura do milho. Possui aplicação sistêmica e é indicado para combater os principais infestantes de folhas largas, com a particularidade de ser absorvido pelas folhas e pelas raízes de maneira rápida, sendo translocado pelo xilema e pelo floema (DYSON et al., 2002; SUTTON et al., 2002).

O herbicida mesotrione é um derivado químico de uma fitotoxina natural, a leptospermona, produzida pela planta conhecida popularmente como escova-de-garrafa (*Callistemon citrinus*) (BONNET et al., 2008; MITCHELL et al., 2001). Pertence, junto com o sulcotrione, à classe das tricetonas e apresenta propriedades ácidas (constante de dissociação [ $pK_a$ ] de 3,12 a 20°C), as quais são determinantes para seu comportamento ambiental (BÖGER e SANDMANN, 1998; FREITAS et al., 2004; KLEIER et al., 1998; MAYER et al., 1990; MAYER et al., 1992; MITCHELL et al., 2001; NORRIS et al., 1995; SANDMANN e BÖGER, 1997; SERRE et al., 1999) (TABELA 5).

O mesotrione é um derivado aprimorado do sulcotrione no qual o 2-cloro do anel benzênico foi substituído por um grupo nitro, este fornecendo maior efetividade. Atua como inibidor competitivo da 4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase, que converte a tirosina em plastoquinona e  $\alpha$ -tocoferol. A plastoquinona é um cofator crítico na via biossintética dos carotenóides. Assim, o mesotrione inibe a conversão da tirosina em plastoquinona e, consequentemente, a biossíntese de carotenóides, o que resulta na planta não proteger a clorofila da decomposição pela luz solar (MASTICHIADIS et al., 2003; MITCHELL et al., 2001).

TABELA 5. Dados químicos do herbicida mesotrione.

|                                                   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
|---------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----------------------------|--------------|-------|---------|------|------------------|------|---------|-----|---------|-----|--------|-----|
| <b>Nome Comercial</b>                             | Callisto®                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Nome Químico (IUPAC)</b>                       | 2-(4-metil-2-nitrobenzoil)-ciclohexano-1,3-diona                                                                                                                                                                                                                                                                                           |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Nome Químico (CA)</b>                          | 2-[4-(metilsulfonil)-2-nitrobenzoil]-1,3-ciclohexanodiona                                                                                                                                                                                                                                                                                  |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Formula molecular</b>                          | C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>7</sub> S                                                                                                                                                                                                                                                                                          |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Massa molecular</b>                            | 339,3 g.mol <sup>-1</sup>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Fórmula Estrutural</b>                         |                                                                                                                                                                                                                                                          |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Aparência</b>                                  | Amarelo pálido sólido à temperatura ambiente (99,3%)                                                                                                                                                                                                                                                                                       |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Solubilidade em água</b>                       | 160 mg.l <sup>-1</sup> em água não tamponada a 20°C<br>2200 mg.l <sup>-1</sup> em pH 9 a 20°C                                                                                                                                                                                                                                              |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Solubilidade em solventes orgânicos</b>        | <table> <tr> <td>Solvente</td><td>em g.l<sup>-1</sup> a 20°C</td></tr> <tr> <td>Acetonitrila</td><td>117,0</td></tr> <tr> <td>Acetona</td><td>93,3</td></tr> <tr> <td>Acetato de etila</td><td>18,6</td></tr> <tr> <td>Metanol</td><td>4,6</td></tr> <tr> <td>Tolueno</td><td>3,1</td></tr> <tr> <td>Xileno</td><td>1,6</td></tr> </table> | Solvente | em g.l <sup>-1</sup> a 20°C | Acetonitrila | 117,0 | Acetona | 93,3 | Acetato de etila | 18,6 | Metanol | 4,6 | Tolueno | 3,1 | Xileno | 1,6 |
| Solvente                                          | em g.l <sup>-1</sup> a 20°C                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Acetonitrila                                      | 117,0                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Acetona                                           | 93,3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Acetato de etila                                  | 18,6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Metanol                                           | 4,6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Tolueno                                           | 3,1                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| Xileno                                            | 1,6                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Estabilidade hidrolítica (DT<sub>50</sub>)</b> | Pouca degradação após 30 dias na faixa de pH entre 4 e 9, a 25 e a 50°C.<br>Considerado hidroliticamente estável.                                                                                                                                                                                                                          |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Absorção UV VIS (max.)</b>                     | At 256 nm<br>$\epsilon$ (1mol-1cm <sup>-1</sup> ) = 2,24 x 10 <sup>-4</sup><br>Sem adsorção máxima de UV >290 nm                                                                                                                                                                                                                           |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |
| <b>Fotoestabilidade em água</b>                   | 81-88 dias sob condições de verão a ca. 40 °latitude N.<br>89-97 dias sob condições de verão a ca. 50 °latitude N                                                                                                                                                                                                                          |          |                             |              |       |         |      |                  |      |         |     |         |     |        |     |

Fonte: European Comission (2009).

Devido à introdução recente deste herbicida, há pouca informação na literatura referente ao risco ecotoxicológico no ambiente do mesotrione e de seus produtos de degradação (BONNET et al., 2008). Segundo o relatório oficial da *European Commission* (2009) sobre o mesotrione, os resíduos deste herbicida, se resultantes das utilizações propostas (taxa máxima de aplicação de  $0,15 \text{ kg.ha}^{-1}$ ) e da aplicação coerente com boas práticas fitossanitárias, não têm efeitos nocivos para a alimentação humana ou saúde animal nem há quaisquer efeitos inaceitáveis sobre o ambiente.

Entretanto sabe-se que, na maioria das vezes, os agricultores têm como prática utilizar uma quantidade bem maior de pesticidas do que o recomendado e até permitido. E, embora tenha sido desenvolvido para minimizar os efeitos adversos no meio ambiente, o mesotrione pode afetar a atividade e diversidade microbiana (AGRITOX, 2009; BONNET et al., 2008; BATISSON et al., 2009). Apesar de apresentado como herbicida não persistente no solo, pesquisas têm mostrado que seus metabólitos podem apresentar maior toxicidade e ser mais persistentes no ambiente que a molécula original (MAEGHE et al., 2004; EMBRAPA, 2009). Bonnet et al. (2008) mostrou que dos dois metabólitos já identificados do mesotrione, o AMBA (ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico) é mais tóxico que o mesotrione, o MNBA (ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico) é menos tóxico e o produto comercial Callisto® apresenta maior toxicidade que o herbicida puro devido à presença de vários aditivos. Além destes fatos, o herbicida mesotrione é classificado como um produto perigoso ao meio ambiente (Classe III), altamente móvel, apresentando grande potencial de deslocamento no solo, podendo atingir águas subterrâneas (SYNGENTA, 2009). Interessante ressaltar que, conforme Pannacci e Covarelli (2009), as doses de mesotrione utilizadas nas aplicações pós-emergência podem ser substancialmente reduzidas dependendo das espécies a serem tratadas.

### **1.3.2 Destino e comportamento do mesotrione no ambiente**

A degradação aeróbica do mesotrione resulta na formação de dois compostos principais: o MNBA (ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico) e o AMBA (ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico) sendo, em geral, ambos encontrados ao mesmo tempo

que o mesotrione no solo e na água, enquanto que no milho, apenas o MNBA foi encontrado juntamente com o mesotrione (ALFERNES e WIEBE, 2002; BONNET et al., 2008; DYSON et al., 2002) (Figura 1). Desta forma, no milho, a biodegradação do mesotrione por esta rota ocorreria somente até o MNBA. Conforme Alferness e Wiebe (2002), a oxidação *in vitro* do mesotrione pela enzima catalase, a 70°C, gera o MNBA, enquanto a redução deste na presença de cloreto de estanho ( $\text{SnCl}_2$ ) e ácido clorídrico (HCl), a 70°C produz o AMBA (Figura 2). Na degradação anaeróbica não foi detectada a formação do MNBA. A fotólise do herbicida no solo ocorre em cerca de 22 dias a latitude 37°N e em cerca de 24 dias a latitude 50°N. Sua degradação é pH dependente, sendo mais rápida em maiores valores de pH (ALFERNES e WIEBE, 2002; BONNET et al., 2008; DYSON et al., 2002).

Os únicos produtos de degradação cuja presença no ambiente tem sido avaliada são o AMBA e o MNBA. Embora estes sejam os compostos formados pela degradação do mesotrione já identificados, não são os únicos. Vários outros compostos ainda não identificados foram encontrados em concentrações relativamente altas (BONNET et al., 2008; DURAND et al. 2006 a; DURAND et al., 2006 b; TER HALLE e RICHARD, 2006). Segundo Ter Halle e Richard (2006), fotoprodutos do mesotrione são formados em águas naturais. A capacidade de biodegradação do mesotrione por duas linhagens isoladas de bactérias do gênero *Bacillus* já foi comprovada (BATISSON et al., 2009; DURAND et al., 2006 a).

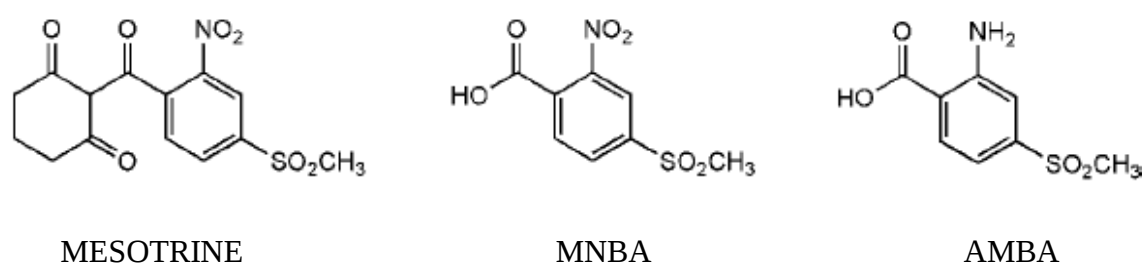


FIGURA 1. Estrutura química do mesotrione, do MNBA e do AMBA.

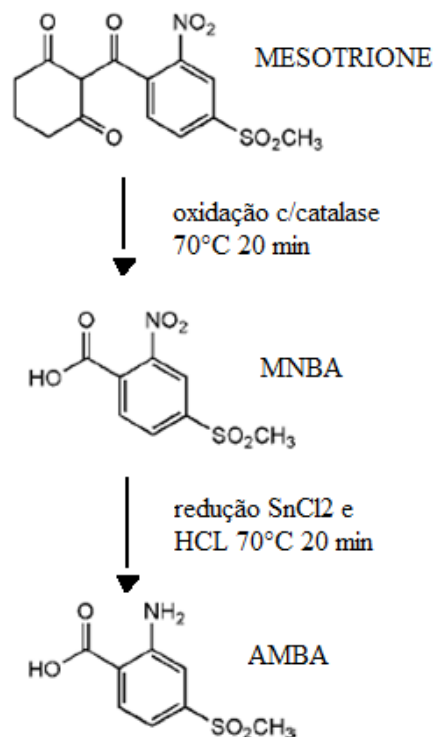


FIGURA 2. Conversão do mesotrione em MNBA e AMBA (Retirado de ALFERNES e WIEBE, 2002).

## 1.4 BIORREMEDIAÇÃO

### 1.4.1 Conceito e importância

Produtos químicos conhecidos como xenobiontes, que não existem naturalmente no ambiente, são hoje utilizados em quase todas as atividades humanas (ARAUJO e HUNGRIA, 1994). A necessidade da redução do consumo de xenobiontes como os agroquímicos tem aumentado o interesse por estratégias biológicas de controle de pragas, plantas daninhas e doenças de inúmeras espécies cultivadas (BIZI, 2009). Há várias rotas possíveis para a remoção de substâncias tóxicas de um ambiente, incluindo mineralização (biodegradação completa), biotransformação, polimerização, volatilização, lixiviação, e sorção (FOGARTY e TUOVINEN, 1991). Os processos biológicos de tratamento dos ambientes contaminados por xenobiontes são geralmente mais seguros e de menor custo quando comparados aos processos

físico-químicos, além de serem menos agressivos ao meio ambiente por se basearem, muitas vezes, na otimização de processos naturais. O processo biológico conhecido como biorremediação é uma das técnicas mais adequadas para a remoção de substâncias tóxicas de áreas contaminadas (AGSOLVE, 2009; BRITO et al., 2009; MARTINS et al., 2007 a).

A biorremediação tornou-se uma ferramenta importante para a limpeza de ambientes contaminados (DEVINNY e CHANG, 2000). É o processo de tratamento que utiliza organismos vivos, sobretudo microrganismos, para degradar substâncias toxicamente perigosas, como resíduos ambientais, transformando-as em substâncias menos ou não tóxicas que podem ser integradas nos ciclos biogeoquímicos naturais (BAIRD, 2002; BLACK, 2002; MARTINS et al., 2007 a; UETA et al., 2007). É uma das técnicas mais adequadas para a remediação de áreas contaminadas porque é um processo natural, de custo relativamente baixo, que oferece maior segurança e menor perturbação ao ambiente. Pode ser empregada para tratamento de diversos contaminantes, orgânicos e inorgânicos. Esta técnica tem apresentado um desenvolvimento rápido juntamente com a engenharia genética, a qual é utilizada para desenvolver linhagens de microrganismos capazes de degradar poluentes específicos (AGSOLVE, 2009; BACON e HINTON, 2002; BAIRD, 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Desta forma, embora outros processos físicos e químicos também sejam indicados para descontaminação de ambientes poluídos, a biorremediação tem sido recomendada como uma alternativa viável por ser ecologicamente mais adequada e permitir a descontaminação *in situ* (BENTO et al., 2003). A biorremediação pode ser uma técnica confiável e efetiva no tratamento de ambientes contaminados por pesticidas (EL- FANTROUSSI, 2000).

Existem dois tipos básicos de biorremediação, a bioaumentação e a bioestimulação, sendo esta última a mais utilizada no Brasil. O processo de bioestimulação consiste em introduzir nutrientes adicionais na forma de fertilizantes orgânicos e/ou inorgânicos (como nitrogênio e fósforo) na área contaminada, provocando o aumento da população de microrganismos e, conseqüentemente, uma degradação mais rápida do contaminante. A bioaumentação consiste na adição de mais microrganismos no ambiente (AGSOLVE, 2009; BAIRD, 2002; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

Para que a biorremediação seja efetiva, os resíduos a serem tratados devem ser suscetíveis e estar acessíveis aos microrganismos, tendo em vista que há algumas substâncias

recalcitrantes, ou seja, resistentes à biodegradação microbiana; os microrganismos apropriados devem ser utilizados; as condições ambientais precisam estar adequadas (BAIRD, 2002). Um dos cuidados principais que se deve ter na biorremediação é o controle dos produtos que serão formados secundariamente, os quais podem ser mais tóxicos que as moléculas originais. Portanto, se não for bem feito, o processo pode contaminar uma área muito maior, com resíduos ainda mais tóxicos (AGSOLVE, 2009).

#### **1.4.2 Biodisponibilidade dos pesticidas**

A disponibilidade de um pesticida à degradação biológica é variável devido às diferenças na estrutura molecular e nas propriedades físicas e químicas. Altas concentrações de pesticidas podem ser inibitórias para a comunidade microbiana. Por outro lado, a adsorção por partículas do solo diminui a concentração efetiva do pesticida, podendo assim manter a concentração disponível abaixo do limiar de indução enzimática. A sorção pode tornar estes compostos inviáveis para a degradação microbiológica ou pelo menos diminuir a taxa de degradação. Os pesticidas podem, ainda, ficar fisicamente protegidos da invasão e colonização microbiana. Como a biodegradação ativa da molécula de um pesticida é um evento intracelular, a entrada na célula é uma condição prévia necessária para sua degradação e depende das características individuais de cada pesticida (BAIRD, 2002; FOGARTY e TUOVINEN, 1991).

#### **1.4.3 Uso de microrganismos na biorremediação de pesticidas**

Os microrganismos possuem um papel integrante e freqüentemente único nas funções dos ecossistemas. As comunidades microbianas estão entre as mais complexas e diversas da biosfera (ZHOU et al., 2003). Pelo seu alto potencial enzimático, os microrganismos têm sido amplamente pesquisados como possíveis biorremediadores. O isolamento, caracterização e

identificação dos microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos materiais químicos potencialmente tóxicos são essenciais para utilizá-los na biorremediação como medida mitigadora nos problemas decorrentes do uso irracional de agroquímicos (UETA et al., 2007).

As bactérias possuem a capacidade de utilizar uma grande variedade de substâncias químicas como fonte de carbono. Também utilizam vários compostos inorgânicos como aceptores finais de elétrons. A exposição destes microrganismos a inúmeros compostos químicos diferentes criou uma pressão seletiva para a evolução de novas enzimas capazes de degradar ou modificar estes compostos (ARAUJO e HUNGRIA, 1994; LORENZO, 2001). A habilidade de degradar um pesticida muitas vezes é mediada por genes localizados em plasmídeos e, possivelmente, em elementos genéticos móveis como os transposons. Já a incapacidade de degradar um pesticida pode ser devido à perda de um plasmídeo ou de um transposon pela falta de pressão seletiva quando na presença de substratos alternativos (FOGARTY e TUOVINEN, 1991).

A degradação microbiológica é o principal processo que afeta a persistência dos pesticidas no ambiente. A remoção dos resíduos indesejados e a própria eficácia do pesticida é dependente da presença, número e capacidade enzimática dos microrganismos do solo. Entretanto, a biodisponibilidade e parâmetros físicos, como pH e tipo de solo, influenciam fortemente a taxa em que a biodegradação ocorre (TURNBULL et al., 2001).

Na natureza, os microrganismos existem em consórcios, raramente em culturas puras e isoladas. Estes consórcios apresentam diversas interações, com microrganismos degradadores primários produzindo metabólitos capazes de suportar o crescimento de microrganismos que não conseguem utilizar o composto original. Assim, é comum culturas mistas realizarem uma degradação mais rápida dos pesticidas do que as culturas puras (FOGARTY e TUOVINEN, 1991).

A ocorrência de biodegradação tem sido relatada para uma vasta gama de pesticidas. Cullington e Walker (1999) isolaram uma cepa bacteriana de um solo que tinha desenvolvido a capacidade de degradar rapidamente o herbicida diuron, o qual é relativamente persistente. Em meio mínimo esta linhagem foi também capaz de degradar os herbicidas isoproturon, clortoluron, linuron, e monolinuron (CULLINGTON e WALKER, 1999; TURNBULL et al., 2001). A biodegradação de vários xenobióticos por microrganismos, como do óleo diesel

(BENTO et al., 2003) e do petróleo (KOREN et al., 2003) e, mais especificamente de outros herbicidas, como do s-metolachlor (MARTINS et al., 2007 b) e do sulcotrione (CHERRIER et al., 2004), tem se mostrado possível.

#### **1.4.4 Biodegradação do mesotrione por microrganismos**

Durand et al. (2006 a, b) foram os primeiros a isolar e caracterizar uma linhagem bacteriana pura (*Bacillus* sp.), isolada de água, capaz de biotransformar o herbicida mesotrione. A capacidade da linhagem de degradar este composto foi investigada por HPLC (cromatografia líquida de alta performance) e *in situ* HNMR (espectroscopia de alta sensibilidade de ressonância magnética nuclear). Foi observada uma capacidade rápida desta linhagem em biotransformar o mesotrione em concentrações relativamente altas, sendo que a inativação do processo ocorreu após 24 horas de incubação em uma concentração de 10,0 mmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione. O AMBA foi identificado como um dos metabólitos, mas em baixa concentração. A maioria dos metabólitos observados não correspondeu nem ao AMBA nem ao MNBA.

Batisson et al. (2009) isolaram e caracterizaram uma outra linhagem do mesmo gênero, *Bacillus*, desta vez proveniente do solo, capaz de degradar o mesotrione. A avaliação da capacidade de degradação foi feita por HPLC. Foi também observada uma rápida degradação do mesotrione - em 24 horas e na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>, o herbicida foi completamente degradado. Vários metabólitos foram detectados, sendo o AMBA um deles. O MNBA não foi encontrado.

Há, portanto, poucos estudos publicados sobre microrganismos degradadores do herbicida mesotrione. As duas linhagens já isoladas e caracterizadas nestas pesquisas provêm do solo e do ambiente aquático. Entretanto, para uma biorremediação efetiva, a pesquisa com outros microrganismos degradadores do mesotrione é imprescindível.

## 1.5 MICRORGANISMOS ENDOFÍTICOS E EPIFÍTICOS

Microrganismos endofíticos são principalmente fungos e bactérias que vivem no interior das plantas sem causar, aparentemente, nenhum dano a seu hospedeiro, diferenciando-se assim dos microrganismos fitopatogênicos. Os microrganismos epifíticos vivem na superfície dos órgãos e tecidos vegetais. Entretanto, pode haver sobreposição entre esses grupos de microrganismos (MELO e AZEVEDO, 1998; ARAÚJO et al. 2000; MOREIRA e SIQUEIRA, 2002).

O conhecimento de microrganismos em tecidos vegetais assintomáticos iniciou-se antes de 1870 com Pasteur e foi neste contexto que foi definido que endofíticos são aqueles microrganismos que habitam o interior de tecidos vegetais sem causar aparentemente nenhum dano ao seu hospedeiro (AGSOLVE, 2009). Provavelmente todas as plantas possuem microrganismos endofíticos, sendo que várias podem ocorrer em uma mesma planta, incluindo fungos e bactérias. Mas, geralmente, há espécies ditas dominantes que são bastante freqüentes em um determinado hospedeiro em contraposição com as secundárias, mais raras. Existe certo grau de especificidade entre o endofítico e o hospedeiro. No milho comum (*Zea mays* L.), as bactérias endofíticas já encontradas são *Alcaligenes* spp., *Arthrobacter* spp., *Aurobacterium* (*A. barkeri* e *A. sapedae*), *Bacillus* (*Bacillus* spp. e *B. cereus*), *Brevibacterium* spp., *Burkholderia picketii*, *Citrobacter testaceum*, *Curtobacterium* spp., *Enterobacter* (*E. agglomerans* e *E. cloacae*), *Erwinia* spp., *Flavinomonas oryzihabitans*, *Flavobacterium* spp., *Hydrogenophaga* (*H. flavae*, *H. pseudoflava*), *Klebsiella terrigena*, *Kluyviera* spp., *Lactobacillus* spp., *Methylobacterium* spp., *Microbacterium imperiale*, *Microbispora* spp., *Micrococcus luteus*, *Moraxella* spp., *Morganella* spp., *Ochrobactrum anthropi*, *Phyllobacterium* spp., *Pseudomonas* (*P. corrugata*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*, *P. viridoflava* e *Pseudomonas* spp.), *Rhotia* spp., *Salmonella* spp., *Serratia marcescens*, *Shigella* spp., *Streptomyces* spp., *Streptosporangium* spp., *Staphylococcus* spp., *Vibrio* spp., *Xanthobacter* spp. (MELO e AZEVEDO, 1998).

Apesar de descritos como assintomáticos, vários endofíticos já demonstraram ter uma função bem determinada no hospedeiro. Alguns produzem antibióticos e outros metabólitos secundários de interesse farmacológico; servem como bioindicadores de vitalidade; têm sido

usados como agentes de controle biológico de pragas e doenças e como bioherbicidas; são usados como vetores para introdução de genes em plantas hospedeiras e podem ser usados na biorremediação de solos contaminados com poluentes (JORNAL DO ENDOFÍTICO, 2009; MELO e AZEVEDO, 1998; STROBEL et al., 1996; STROBEL e LONG, 1998).

Apenas microrganismos de solo e água já foram analisados quanto à capacidade de degradação do herbicida mesotrione. O presente estudo focou no isolamento de microrganismos endofíticos e epifíticos de folhas de milho capazes de biodegradar o mesotrione. Esta ainda não foi pesquisada quanto a este potencial. Como o herbicida mesotrione é absorvido pelas folhas do milho e translocado pelo xilema e pelo floema, a microbiota composta pelos microrganismos endofíticos e epifíticos está em constante contato com este xenobiótico nas plantações em que é utilizado e, desta forma, está sob pressão seletiva a favor daqueles microrganismos que possuam rotas enzimáticas capazes de utilizar o mesotrione ou que sejam ao menos tolerantes à presença deste herbicida, apresentando assim alta probabilidade de biodegradação do mesmo.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Isolar e caracterizar microrganismos endofíticos e epifíticos do milho com capacidade de biodegradar o herbicida mesotrione

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Isolar microrganismos endofíticos e epifíticos do milho com capacidade de crescer em presença do herbicida mesotrione.
2. Selecionar, dentre os isolados, as linhagens bacterianas com capacidade de crescer em concentrações de até 8,96 mmol.L<sup>-1</sup> do herbicida mesotrione.
3. Analisar, por espectrofotometria visível, a capacidade de biodegradação do herbicida mesotrione pelas linhagens bacterianas selecionadas.
4. Caracterizar e identificar bioquimicamente as linhagens bacterianas com a capacidade de degradação do herbicida mesotrione comprovada pela espectrofotometria.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 MATERIAIS

O herbicida Callisto<sup>®</sup> (suspensão concentrada com 480 g de mesotrione por litro), produzido pela *Syngenta Crops Protection*<sup>®</sup>, foi doado pela Fazenda Escola Capão da Onça, cidade de Ponta Grossa, estado do Paraná.

##### 3.1.1 Meios de cultura

Os meios de cultura comerciais utilizados foram: Ágar Soja Triptona (Biobrás<sup>®</sup>), Caldo Soja Triptona (Biobrás<sup>®</sup>), Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (Himedia<sup>®</sup>), Ágar MacConkey (Acumedia<sup>®</sup>), Caldo MRVP (Oxoid<sup>®</sup>), Ágar Cetrimide (Merck<sup>®</sup>), Meio de Citrato (Newprov<sup>®</sup>), Ágar Infuso de Cérebro e Coração (Acumedia<sup>®</sup>), Caldo Infuso de Cérebro e Coração (Acumedia<sup>®</sup>).

Foram utilizados sais inorgânicos, solventes, ácidos e bases da Vetec<sup>®</sup>.

##### 3.1.2 Isolamento e seleção das linhagens bacterianas

*Meio mineral ou meio mínimo (MM) (ROQUE e MELO, 2000, com modificações)*

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| NaNO <sub>3</sub> .....               | 3,0 g  |
| MgSO <sub>4</sub> .....               | 0,5 g  |
| KCl.....                              | 0,5 g  |
| FeSO <sub>4</sub> .....               | 0,01 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 6,9 g  |

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 11,2 g  
 Ágar..... 15,0 g  
 Água destilada p/..... 1000,0 mL

Misturar tudo e aquecer para completa dissolução. Autoclavar por 15 minutos.

Meio mineral original: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g); FeCl<sub>2</sub>.1H<sub>2</sub>O (10,0 mg); CaCl<sub>2</sub>(10,0 mg); MnCl<sub>2</sub> (0,1 mg); ZnSO<sub>4</sub> (0,01 mg) (ROQUE E MELO, 2000).

*Caldo mineral ou caldo mínimo (CM) (ROQUE e MELO, 2000, com modificações)*

NaNO<sub>3</sub>..... 3,0 g  
 MgSO<sub>4</sub>..... 0,5 g  
 KCl..... 0,5 g  
 FeSO<sub>4</sub>..... 0,01 g  
 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>..... 6,9 g  
 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 11,2 g  
 Água destilada p/..... 1000,0 mL

Misturar até completa dissolução. Autoclavar por 15 minutos.

Meio mineral original: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,5 g); (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,5 g); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,5 g); FeCl<sub>2</sub>.1H<sub>2</sub>O (10,0 mg); CaCl<sub>2</sub>(10,0 mg); MnCl<sub>2</sub> (0,1 mg); ZnSO<sub>4</sub> (0,01 mg) (ROQUE E MELO, 2000).

### 3.1.3 Estoque das linhagens bacterianas isoladas

*Solução estoque em leite desnatado 20% (REIMER e CARROLL, 2003)*

Leite desnatado em pó..... 200,0 g  
 Água destilada p/..... 1000,0 mL

Misturar até completa dissolução e autoclavar por 15 minutos.

### 3.1.4 Identificação morfológica das linhagens bacterianas selecionadas

#### *Coloração de Gram*

*Cristal violeta* (WINN JUNIOR et al., 2006)

##### Solução A

|                      |          |
|----------------------|----------|
| Cristal violeta..... | 2,0 g    |
| Etanol.....          | 100,0 mL |
| Metanol.....         | 100,0 mL |

Misturar 2,0 g de violeta de metila com 100,0 mL de etanol. Adicionar a esta solução 100,0 mL de metanol. Misturar lentamente até completa dissolução do corante.

##### Solução B

|                        |          |
|------------------------|----------|
| Oxalato de amônia..... | 0,8 g    |
| Água destilada.....    | 200,0 mL |

Misturar 0,8 g de oxalato de amônia com 200,0 mL de água destilada. Misturar lentamente até completa dissolução.

Misturar as duas soluções (A e B). Adicionar 200 mL de água destilada. Deixar em repouso por 24 horas e depois filtrar em papel comum. Armazenar em frasco escuro.

*Lugol concentrado* (WINN JUNIOR et al., 2006)

|                         |          |
|-------------------------|----------|
| Iodeto de potássio..... | 4,5 g    |
| Iodo metálico.....      | 3,0 g    |
| Água destilada.....     | 450,0 mL |

Misturar, até completa dissolução, 4,5 g de iodeto de potássio com 450,0 mL de água destilada. Adicionar 3,0 g de iodo metálico e misturar até completa dissolução. Armazenar em frasco escuro.

*Lugol diluído para uso* (WINN JUNIOR et al., 2006)

Em um frasco conta-gotas armazenar o lugol diluído (2,0 mL para 38,0 mL de água destilada).

*Safranina* (WINN JUNIOR et al., 2006)

Safranina..... 2,5 g  
Água destilada..... 500,0 mL

Misturar 2,5 g de safranina com 500,0 mL de água destilada até completa dissolução.

*Coloração de esporos*

*Caldo TGY* (MOESBY et al., 2005)

Triptona..... 5,0 g  
Extrato de levedura..... 5,0 g  
Glicose..... 1,0 g  
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>..... 1,0 g  
Água destilada..... 1000,0 mL

Misturar tudo até completa dissolução. Autoclavar por 15 minutos em tubos com 3,0 mL cada. Após a autoclavagem do material acrescentar, assepticamente, 1,0 mM de CaCl<sub>2</sub> e 1,0 mM de MnCl<sub>2</sub> aos tubos com caldo TGY.

*Verde malaquita 5%* (WINN JUNIOR et al., 2006)

Verde malaquita..... 2,5 g  
Água destilada..... 50,0 mL

Misturar e deixar em repouso por 24 horas para dissolução completa. Filtrar em papel comum.

### 3.1.5 Identificação fenotípica das linhagens bacterianas selecionadas

*Caldo triptofano* (para teste do indol) (WINN JUNIOR et al., 2006)

|                       |          |
|-----------------------|----------|
| Peptona.....          | 2,0 g    |
| Cloreto de sódio..... | 0,5 g    |
| Água destilada.....   | 100,0 mL |

Misturar até completa dissolução e autoclavar por 15 minutos.

*Meio base de oxidação/fermentação (Meio basal)* (WINN JUNIOR et al., 2006)

|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| Triptona (peptona).....                       | 2,0 g     |
| Extrato de levedura.....                      | 1,0 g     |
| NaCl.....                                     | 5,0 g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)..... | 0,2 g     |
| Ágar.....                                     | 2,5 g     |
| Azul de bromotimol.....                       | 0,8 g     |
| Carboidrato*.....                             | 1,0 g     |
| Água destilada p/.....                        | 1000,0 mL |

Misturar e aquecer até dissolução completa. Acrescentar o carboidrato de interesse (\*glicose, lactose, maltose ou xilose) para 1,0% (10,0 g.L<sup>-1</sup>). Aliquotar 3,0 mL em tubos e esterilizar em vapor fluente por 20 minutos.

*Meio nitrato e motilidade* (WINN JUNIOR et al., 2006)

|                                                |       |
|------------------------------------------------|-------|
| Triptona (peptona de caseína).....             | 5,0 g |
| Extrato de carne.....                          | 3,0 g |
| Galactose.....                                 | 5,0 g |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anidro)..... | 2,5 g |
| KNO <sub>3</sub> (nitrato de potássio).....    | 5,0 g |
| Ágar.....                                      | 3,0 g |

Água destilada p/..... 1000,0 mL

Dissolver a quente, aliquotar 3,0 mL em tubos e autoclavar por 15 minutos.

*Meio de Gelatina* (WINN JUNIOR et al., 2006)

Peptona..... 5,0 g

Extrato de carne..... 3,0 g

Gelatina..... 120,0 g

Água destilada p/..... 1000,0 mL

Dissolver a peptona e o extrato de carne em água destilada, acrescentar a gelatina (deixar hidratar por 15 minutos) e dissolver à quente. Aliquotar 3,0 mL em tubos e esterilizar em vapor fluente por 20 minutos.

Para revelação da prova de nitrato foi utilizado o kit de reagentes ( $\alpha$ -naftilamina e ácido sulfanílico) da Newprov.

Para identificação fenotípica das bactérias não fermentadoras, foi utilizado o Kit para Identificação de não fermentadores BBL Crystal™ Identification Systems Enteric/Non Fermenter ID Kit, da BD®.

### 3.1.6 Tratamento estatístico

Para o tratamento estatístico dos dados foi utilizado o *teste t de Student* (POCINHO e FIGUEIREDO, 2004) no programa GraphPad Prism for Windows Versão 5.0®1992-2007 GraphPad Software. Este teste foi utilizado para a comparação das médias do controle com as amostras, a fim de verificar se os valores de decréscimo no pico de absorção do herbicida mesotrione nas amostras, avaliado na espectrofotometria, foram estatisticamente significativos ou não.

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 Coleta do material vegetal

As coletas das folhas de milho comercial foram realizadas na Fazenda-Escola Capão da Onça, propriedade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, localizada no município de Ponta Grossa/PR. Foram realizadas, aleatoriamente, 20 coletas de folhas de milho. As primeiras 10 coletas foram feitas em 13 e 23 de novembro de 2007 e 4 de janeiro de 2008, em plantação de milho variedade Penta, plantado em 24 de setembro de 2007, sem aplicação do herbicida mesotrione (Callisto<sup>®</sup>). Os pesticidas utilizados nesta plantação foram: em 17 de outubro de 2007 - Primóleo (2,0 L.ha<sup>-1</sup>), Vexter (0,7 L.ha<sup>-1</sup>); em 30 de outubro de 2007 - Rimon (0,2 L.ha<sup>-1</sup>), Talcord (0,12 L.ha<sup>-1</sup>); em 8 de novembro de 2007 - Primóleo (2,5 L.ha<sup>-1</sup>), Sanson (0,4 L.ha<sup>-1</sup>), Certero (0,05 L.ha<sup>-1</sup>) e Decis-25 (0,2 L.ha<sup>-1</sup>). As 10 coletas seguintes foram realizadas em 30 de janeiro de 2008, em plantação de milho variedade DKB 234, plantado em 24 de outubro de 2007, com aplicação do herbicida mesotrione (Callisto<sup>®</sup>) (0,15 L.ha<sup>-1</sup>). Os demais pesticidas que foram aplicados nesta plantação, em 8 de novembro de 2007, foram Primóleo (2,5 L.ha<sup>-1</sup>), Decis-25 (0,2 L.ha<sup>-1</sup>) e Certero (0,03 L.ha<sup>-1</sup>).

As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, devidamente etiquetadas e transportadas imediatamente ao laboratório para isolamento dos microrganismos.

### 3.2.2. Isolamento das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas

Para isolamento das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas seguiu-se, respectivamente, metodologia de Bastos (2005, com modificações) e Petrini (1991, com modificações). As folhas de milho foram primeiramente lavadas por 30 segundos em água corrente. Em seguida, cada folha foi colocada em um frasco com 500,0 mL de água destilada

estéril por 1 minuto, tendo-se o cuidado para que a parte em que foi realizado o corte da folha não entrasse em contato com a água e que a folha não estivesse cortada em nenhum ponto, para não haver contaminação pelos microrganismos endofíticos. Esta água foi plaqueada (100,0 µL/placa) em meio mineral (MM) com concentração de 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione (concentração próxima a utilizada na plantação de milho onde foram realizadas as coletas), sendo que foram inoculadas 9 placas, três para cada temperatura (18°, 28° e 37°C), as quais foram incubadas por 10 dias. Os microrganismos epifíticos foram retirados e estocados isoladamente à medida que cresciam.

Na sequência, as folhas de milho foram tratadas completamente em etanol 70,0% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3,0%, por 6 minutos, etanol 70,0 % por 30 segundos e água destilada estéril por 6 minutos. Cada folha foi cortada com bisturi estéril em 36 fragmentos de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>, assepticamente. Cada 4 fragmentos foram transferidos para uma placa com MM na concentração de 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione. Foram incubadas três placas em cada temperatura (18°C, 28°C e 37°C), por dez dias. Os microrganismos endofíticos foram retirados e estocados isoladamente à medida que cresciam.

Como controle do processo de desinfecção, foram inoculados 100,0 µL da última água de lavagem em 9 placas de Petri com o mesmo meio, cada três incubadas em uma das temperaturas utilizadas, sob as mesmas condições.

### **3.2.3 Teste preliminar de temperatura das linhagens isoladas**

Preliminarmente foi realizado um teste de temperatura com todas as linhagens isoladas para o posterior estoque, seleção, novo teste de temperatura com as linhagens selecionadas e avaliação da capacidade de degradação destas. Este teste foi realizado inoculando-se os microrganismos em placas com MM na concentração de isolamento de 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione, incubadas em estufa nas três temperaturas (18°, 28° e 37°C). O teste foi realizado em triplicata. A avaliação do crescimento da biomassa bacteriana foi apenas visual, independente do tempo de incubação para cada microrganismo.

### **3.2.4 Estoque das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas**

As linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas isoladas foram estocadas em tubos de 5,0 mL com TSA inclinado; tubos de 5,0 mL com MM com concentração de  $28,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mesotrione inclinados; papel filtro em geladeira; papel filtro em freezer e estoque em leite desnatado 20% (REIMER e CARROLL, 2003) em freezer. Para os estoques em papel filtro, este foi cortado em discos (semelhantes aos discos de antibiograma), autoclavado e seco. Após, o papel filtro foi umedecido com caldo TSB com o microrganismo (incubado por 24 horas em temperatura ótima) em questão, seco naturalmente no fluxo laminar, acondicionado em tubos de plástico de 1,5 mL e guardado em geladeira e em freezer.

### **3.2.5 Seleção das linhagens tolerantes ao herbicida mesotrione**

As linhagens isoladas em  $28,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  foram selecionadas por plaqueamento em MM com concentrações crescentes de mesotrione, a partir da concentração de  $1,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $2,24 \text{ mmol.L}^{-1}$ ,  $3,36 \text{ mmol.L}^{-1}$ , até uma concentração de  $8,96 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Os testes foram realizados em triplicatas e na temperatura ótima. Aquelas linhagens que apresentaram melhor crescimento na maior concentração foram selecionadas como possíveis degradadoras e/ou tolerantes ao herbicida mesotrione.

### **3.2.6 Teste de temperatura das linhagens selecionadas**

Para testar qual a real temperatura ótima de crescimento dos microrganismos (melhor temperatura de crescimento de biomassa), foi feita a curva de crescimento baseada na turvação da cultura (medida como unidades de DO, em 580 nm). Cada colônia pura foi inoculada diretamente, sem incubação, em 5,0 ml de meio rico líquido (TSB), até alcançar

DO de 0,15. Uma alíquota de 100,0 µL desta suspensão foi transferida para tubos de 10,0 mL com 5,0 mL de TSB. Mediu-se a DO. Estes tubos foram incubados em estufa, sem agitação, a 18°, 28° e 37°C. A DO foi medida até a fase estacionária (0, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 36, 48, 72, etc. horas).

Para fins de comparação, o teste de temperatura também foi realizado analisando-se o crescimento dos microrganismos em MM 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione. Para tanto, cada microrganismo foi inoculado em placas de MM com mesotrione (28,0 µmol.L<sup>-1</sup>). A partir destas, inoculou-se uma colônia pura do microrganismo em 5,0 mL de CM com mesotrione (28,0 µmol.L<sup>-1</sup>), em tubos de 10,0 mL, até alcançar uma DO de 0,15. De cada tubo foi retirada uma alíquota de 100,0 µL, a qual foi transferida para 5,0 mL de CM com mesotrione (28,0 µmol.L<sup>-1</sup>), em tubos de 10,0 mL. A DO do controle negativo deste procedimento foi acompanhada inoculando-se o microrganismo retirado das placas de MM com mesotrione (28,0 µmol.L<sup>-1</sup>) em placas com MM sem mesotrione e incubando na temperatura de isolamento (dependente do microrganismo, 18°, 28°C ou 37°C) a partir de 0 horas até atingir a fase estacionária.. No caso de haver crescimento, a partir destas placas, cada microrganismo seria inoculado em 5,0 mL de CM sem mesotrione, em tubos de 10,0 mL, até alcançar DO de 0,15. Desta suspensão se retiraria uma alíquota de 100,0 µL, a qual seria transferida para 5,0 mL de CM sem mesotrione, em tubos de 10,0 mL. Seria então medida a DO a partir de 0 hora até a fase estacionária e os tubos seriam incubados e tratados nas mesmas condições acima descritas.

### **3.2.7 Avaliação da capacidade de degradação do herbicida mesotrione por espectrofotometria**

Para o preparo do pré-inóculo, os microrganismos foram inoculados em TSA e incubados em temperatura ótima por 24 horas. Cada colônia pura foi inoculada em 200,0 ml de TSB, em frascos de 500,0 mL. Estes foram incubados em temperatura ótima a 200 rpm. Quando em fase *midlog*, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado primeiro com solução de NaCl

0,9% (9 g.L<sup>-1</sup>), centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm, lavado com água destilada e novamente centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 200,0 mL de solução de mesotrione 0,1 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 7,0, em frascos de 500,0 mL. A solução já com a biomassa bacteriana foi refrigerada até o momento da realização dos experimentos do dia 0. Posteriormente, os frascos foram incubados em temperatura ótima, a 200 rpm, por 5 dias. Foram retiradas amostras diárias (13,0 mL de cada amostra). Estas foram centrifugadas a 2000 rpm por 30 minutos por duas vezes, sempre transferindo o sobrenadante para um tubo limpo. Após a última centrifugação, os sobrenadantes foram filtrados (em filtros com porosidade de 0,22 µm). Os sobrenadantes foram imediatamente congelados até análise por espectrofotometria.

Foram utilizados como controles negativos, água destilada com herbicida mesotrione, água destilada com herbicida mesotrione e *Escherichia coli* ATCC 25922 (linhagem não degradadora do mesotrione) e água destilada com microrganismo em questão. Estes foram incubados e tratados sob as mesmas condições das amostras.

A degradação do herbicida pelos microrganismos foi avaliada pelo monitoramento do decréscimo do pico de absorção do mesotrione, ao longo do período de incubação. A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS Photodiode Array Spectrophotometer *MultiSpec-1501*, com cubetas de quartzo, caminho óptico de 10,0 mm, altura de 45,0 mm, volume de 3,5 mL e 2 janelas polidas. A leitura foi feita pela varredura do espectro de absorção de 200,0 nm a 800,0 nm.

### **3.2.8 Identificação das linhagens bacterianas degradadoras**

Para identificação morfológica das linhagens bacterianas degradadoras, foi realizada a coloração de Gram, conforme metodologia descrita por Winn Junior et al. (2006). Foi feita também a coloração negativa para determinação da presença de cápsula nas linhagens bacterianas selecionadas, seguindo-se a metodologia descrita pelo mesmo autor.

Para identificação fenotípica, foram aplicados os seguintes testes para todas as linhagens selecionadas:

*Crescimento em ágar MacConkey:* para diferenciação dos microrganismos Gram-negativos fermentadores e não-fermentadores de lactose. Este meio é seletivo para bactérias Gram-negativas, pois contém cristal violeta e sais biliares que inibem o crescimento da maioria das bactérias Gram-positivas. Possui também lactose, sendo que as colônias dos microrganismos capazes de fermentar este carboidrato ficam vermelhas devido à produção de ácidos que causam a mudança de cor do indicador de pH vermelho neutro. Uma cultura pura do microrganismo em questão foi inoculada em estrias em placa com ágar MacConkey, a qual foi incubada a 28°C por 24 horas. O crescimento de colônias com coloração vermelha indica microrganismo Gram-negativo fermentador de lactose (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Crescimento em TSI (triple sugar iron):* a identificação neste meio é feita atendendo às diferenças de fermentação dos carboidratos e à produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S). Este meio contém 0,1% de glicose, 1,0% de lactose e 1,0% de sacarose, indicador de pH vermelho de fenol, tiosulfato de sódio e sulfato de ferro. O microrganismo foi inoculado por picada central e estrias e incubado a 28°C por 24 horas. Na rampa do tubo se faz a leitura da lactose e/ou da sacarose, no fundo do tubo a da glicose e no meio do tubo a de H<sub>2</sub>S. Se somente a glicose for fermentada, apenas o fundo do tubo apresenta viragem da cor para amarelo. Se todo o tubo ficar amarelo, ocorreu fermentação da glicose e da lactose e/ou sacarose. A produção de gás é observada pela ocorrência de fraturas no meio de cultura e a de H<sub>2</sub>S pelo enegrecimento, principalmente na região média do tubo. Se o tubo ficar alcalino (vermelho) ou inalterado (tijolo), não ocorreu fermentação dos carboidratos, nem produção de gás ou de H<sub>2</sub>S (WINN JUNIOR et al. 2006).

*Teste do indol:* o indol é um dos produtos da degradação metabólica do aminoácido triptofano pela enzima triptofanase. O microrganismo foi inoculado em caldo triptofano a 28°C por 24 horas. Após este período adicionou-se ao caldo 3 gotas de reagente de Kovacs (p-dimetilaminobenzaldeído em solução de HCl e álcool isoamílico). O aparecimento de um anel de cor vermelho fúcsia na interface entre o reagente e o caldo revela resultado positivo (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Teste da oxidase:* revela a presença da enzima citocromo oxidase. Uma colônia pura do microrganismo foi espalhada, com auxílio de uma alça não metálica, em uma tira impregnada com reagente para oxidase (tetrametil-p-fenileno-diamina-dihidrocloreto). A mudança de cor

do reagente para azul, roxo ou preto indica a presença da enzima citocromo oxidase (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Teste da catalase:* para avaliar se o microrganismo produz a enzima catalase. Esta enzima decompõe o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma espécie reativa de oxigênio comum do metabolismo aeróbico, em água e oxigênio. Uma colônia pura do microrganismo foi transferida para uma lâmina de vidro. Adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio 10%. A formação de bolhas ou efervescência indica resultado positivo (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Teste de O/F (oxidação/fermentação) da glicose:* os microrganismos sacarolíticos podem metabolizar glicose pela via fermentativa e/ou oxidativa. Com uma agulha bacteriológica, o microrganismo a ser testado foi inoculado em três tubos, sendo o primeiro de O/F em meio base (meio basal) (sem glicose, como controle de estabilidade do meio), e dois tubos com glicose, um deles sendo depois vedado com 0,5cm de vaselina estéril e o outro incubado com a tampa entreaberta. Todos foram incubados a 28°C por 24 horas. A produção de ácidos a partir da glicose é detectada pela mudança de cor do meio para amarelo. Se ambos os tubos com glicose ficarem amarelos, o microrganismo é um fermentador. Se apenas o tubo entreaberto ficar amarelo, o microrganismo realizou apenas a oxidação. Não havendo mudança de cor em nenhum dos tubos, o microrganismo é tido como assacarolítico positivo (WINN JUNIOR et al., 2006).

Para identificação fenotípica dos bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, foram empregados ainda os seguintes testes:

*Redução do nitrato e motilidade:* este teste revela a capacidade do microrganismo reduzir nitrato a nitrito. O microrganismo foi inoculado no meio de nitrato e incubado por 24 horas a 28°C. Ao fim da incubação, foram adicionadas 2 gotas de  $\alpha$ -naftilamina e 2 gotas de ácido sulfanílico. A mudança de cor do meio para o vermelho, dentro de um período de 30 segundos após a adição dos reagentes indica a presença de nitritos e representa uma reação positiva para a redução de nitratos. Não havendo mudança de cor, adicionou-se zinco em pó, para confirmar se o microrganismo não reduziu o nitrato a nitrito (o zinco reduz o nitrato a nitrito, mudando a coloração para vermelho e comprovando que o microrganismo não reduziu o nitrato) ou se reduziu o nitrato a outros produtos que não o nitrito (não havendo mais

nitratos presentes no meio, a adição do zinco não altera a cor, indicando que houve redução total dos nitratos a outros produtos pelo microrganismo). No mesmo meio foi avaliada a motilidade dos microrganismos pelo crescimento além do local da inoculação (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Teste de citrato:* algumas bactérias são capazes de utilizar o citrato como fonte de carbono. Esta utilização é detectada pela produção de produtos alcalinos no meio, aumentando o pH. Uma colônia isolada foi inoculada em estrias na superfície do meio de citrato e incubada a 28°C por 24 horas. O desenvolvimento de cor azul na superfície do tubo indica aumento do pH e representa resultado positivo, pois a produção de produtos alcalinos vem da utilização do citrato pelo microrganismo (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Oxidação da maltose, xilose e lactose:* para estes testes foi utilizado o mesmo meio basal do teste de O/F, com adição dos carboidratos de interesse em 1%. O microrganismo foi inoculado por picada central e incubado a 28°C por 24 horas. A mudança de cor para amarelo indica resultado positivo para o metabolismo oxidativo dos carboidratos em questão (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Crescimento a 42°C:* as colônias foram semeadas em meio BHA (ágar infuso de cérebro e coração) e incubadas a 42°C por 24 horas, para identificação de *Acinetobacter baumannii*, as quais apresentam bom crescimento nestas condições (DIJKSHOORN, 1996).

*Crescimento em ágar cetrimide:* meio altamente inibitório que permite o crescimento de um grupo muito restrito de bactérias, especialmente *Pseudomonas aeruginosa*. Os microrganismos foram inoculados em estrias na superfície do meio e incubados a 28°C por 24 horas (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Liquefação da gelatina:* para indicar a presença de enzimas proteolíticas (degradação de proteínas). O microrganismo foi inoculado em meio sólido com gelatina e incubado a 28°C por 7 dias. A liquefação à temperatura ambiente ou a incapacidade de ressolidificar quando refrigerado indica a presença de enzimas proteolíticas (WINN JUNIOR et al., 2006).

Para identificação destas linhagens não fermentadoras foi também utilizado o Kit para Identificação de não fermentadores BBL Crystal™ Identification Systems Enteric/Non Fermenter ID Kit, da BD.

Para identificação fenotípica de cocos Gram-positivos foram empregados adicionalmente os seguintes testes:

*Teste de citrato*: descrito acima (WINN JUNIOR et al., 2006).

*Redução do nitrato e motilidade*: descrito acima (MOESBY et al., 2005).

*Teste de oxidase modificado*: tiras com reagente para oxidase (tetrametil-p-fenileno-diamina-dihidrocloreto) foram impregnadas com DMSO (dimetil sulfoxido). Uma colônia pura do microrganismo foi espalhada, com auxílio de alça não metálica sobre a tira. Desenvolvimento de cor azul, roxa ou negra indica resultado positivo (FALLER e SCHLEIFER, 1981).

*Susceptibilidade à lisozima*: o teste de susceptibilidade a enzima lisozima é utilizado para diferenciar espécies do gênero *Micrococcus*, sendo que *M. luteus* é susceptível (concentração inibitória mínima abaixo de  $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e *M. varians* é resistente (concentração inibitória mínima acima de  $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (KLOOS et al., 1974).

*Teste de Voges-Proskauer*: utilizado para verificar produção de acetoína a partir de ácido pirúvico (WINN JUNIOR et al., 2006).

Para identificação fenotípica de bacilos Gram-positivos foi empregado, adicionalmente, o seguinte teste:

*Produção de esporos*: o microrganismo foi incubado em caldo TGY suplementado com 1 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 1 mM de  $\text{MnCl}_2$  para promover a esporulação, a  $28^\circ\text{C}$ , sob agitação. A presença de endosporos no caldo foi analisada pela realização de esfregaços submetidos à Coloração de Esporos (verde-malaquita). Foi feito um esfregaço em lâmina, este foi fixado em chama e corado à quente por 6 minutos com corante verde-malaquita. Após esfriar, a lâmina com o esfregaço foi lavada delicadamente em água até retirada de todo corante e corada com safranina por 1 minuto (MOESBY et al., 2005, com modificações).

## **4 RESULTADOS**

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

### **4.1 CAPÍTULO I**

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGENS BACTERIANAS  
ENDOFÍTICAS E EPIFÍTICAS DE MILHO DEGRADADORAS DO HERBICIDA  
MESOTRIONE**

## RESUMO

A cultura do milho merece atenção pela elevada quantidade de herbicidas usados. O mesotrione é um novo herbicida seletivo utilizado nas plantações de milho. Devido sua introdução recente, há pouca informação referente ao risco ecotoxicológico no ambiente. Apenas duas linhagens bacterianas do gênero *Bacillus* degradadoras do mesotrione, provenientes do solo e da água, já foram isoladas e identificadas. Neste trabalho foram isolados, selecionados e caracterizados microrganismos endofíticos e epifíticos do milho capazes de crescer na presença do mesotrione, sendo assim potencialmente tolerantes e/ou degradadores deste. Os microrganismos foram isolados e cultivados em meio mineral com mesotrione como única fonte de carbono. Aqueles que cresceram foram selecionados em concentrações crescentes do herbicida e tiveram sua capacidade de degradação do mesotrione investigada e confirmada por espectrofotometria visível. Dez linhagens bacterianas capazes de crescer em altas concentrações do herbicida foram avaliadas. Destas, cinco apresentaram decréscimo no pico de absorção do mesotrione, registrado pelo espectrofotômetro, ao longo do período de incubação, o que indica a degradação do herbicida. Uma linhagem foi identificada como *Acinetobacter baumannii* e outra como *Micrococcus luteus*. Apenas *Micrococcus luteus* é uma linhagem endofítica, sendo as demais epifíticas de milho. Quatro linhagens degradadoras foram isoladas de plantação de milho sem tratamento prévio com mesotrione; apenas uma linhagem de bacilo Gram-negativo não fermentador foi isolada de plantação sob tratamento com o herbicida. Este trabalho é o primeiro relato de isolamento de linhagens microbianas degradadoras do herbicida mesotrione epifíticas e endofíticas de milho.

Palavras-chave: mesotrione; biodegradação; microrganismos endofíticos; microrganismos epifíticos; milho.

## INTRODUÇÃO

Os adubos químicos e pesticidas em geral tornaram-se parte integral da agricultura moderna. O emprego destas substâncias químicas trouxe grandes vantagens, mas também criou novos problemas, como a eliminação após o uso, a persistência ao longo do tempo e o acúmulo no ambiente, acarretando conseqüências adversas consideráveis à saúde pública e um impacto negativo nos ecossistemas (ARAUJO e HUNGRIA, 1994; BONNET et al., 2008; DEJONGHE et al., 2003; DURAND et al., 2006 a; MARTINS et al., 2007 a).

Culturas importantes como o milho e o trigo dependem fortemente do uso de pesticidas (TER HALLE et al., 2006). O emprego destes produtos aumenta progressivamente, sendo que o milho é uma das culturas que merece atenção pela elevada quantidade de herbicidas usados por ocupar extensas áreas (IPEF, 2009; SPADOTTO, 2009).

O mesotrione é um novo herbicida seletivo indicado para o controle pré e pós-emergente de plantas daninhas na cultura do milho. Foi desenvolvido pela *Syngenta Crops Protection*, registrado na Europa em 2000 e comercializado sob o nome comercial Callisto® (ALFERNES e WIEBE, 2002; BONNET et al., 2008; MITCHELL et al., 2001). Possui aplicação sistêmica e é indicado para combater os principais infestantes de folhas largas, com a particularidade de ser absorvido pelas folhas e pelas raízes de maneira rápida, sendo translocado pelo xilema e pelo floema (DYSON et al., 2002; SUTTON et al., 2002).

Devido à introdução recente deste herbicida, há pouca informação na literatura referente ao risco ecotoxicológico no ambiente do mesotrione e de seus produtos de degradação (BONNET et al., 2008). Apesar de ser apresentado como herbicida não persistente no solo, é classificado como produto perigoso ao meio ambiente, altamente móvel, mostrando grande potencial de deslocamento podendo atingir águas subterrâneas (SYNGENTA, 2009). Bonnet et al. (2008) mostrou que os dois metabólitos já identificados do mesotrione, o AMBA (ácido 2-amino-4-metilsulfonil benzóico) e o MNBA (ácido 4-metilsulfonil-2-nitrobenzóico) são, respectivamente, mais e menos tóxicos que a molécula original, da mesma forma que o produto comercial Callisto® apresenta maior toxicidade devido à presença de vários aditivos (EMBRAPA, 2009). Vários outros metabólitos ainda não

identificados foram encontrados em concentrações relativamente altas (BONNET et al., 2008; DURAND et al. 2006 a; DURAND et al., 2006 b; TER HALLE e RICHARD, 2006).

A biorremediação se tornou uma ferramenta importante para a limpeza de solos e água contaminados e pode ser uma técnica confiável e efetiva no tratamento de ambientes tratados com pesticidas (DEVINNY e CHANG, 2000; EL- FANTROUSSI, 2000). É um dos métodos mais adequados por ser um processo natural, de custo relativamente baixo, que oferece maior segurança e menos perturbação ao ambiente. (BAIRD, 2002; BLACK, 2002; MARTINS et al., 2007 a; UETA et al., 2007). Por seu alto potencial enzimático, os microrganismos têm sido amplamente pesquisados como possíveis biorremediadores. A degradação microbiológica é o principal processo que afeta a persistência dos pesticidas no ambiente. O isolamento, caracterização e identificação dos microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos materiais químicos potencialmente tóxicos são essenciais para utilizá-los em biorremediação como medida mitigadora nos problemas decorrentes do uso irracional de agroquímicos (TURNBULL et al., 2001; UETA et al., 2007).

A biodegradação de vários herbicidas por microrganismos, como do diuron (CULLINGTON e WALKER, 1999; TURNBULL et al., 2001), do s-metolachlor (MARTINS et al., 2007 b) e do sulcotrione (CHERRIER et al., 2004), tem se mostrado possível. Durand et al. (2006 a, b) foram os primeiros a isolar e caracterizar uma linhagem bacteriana pura (*Bacillus* sp.), isolada de água, capaz de biotransformar o herbicida mesotrione. Foi detectada uma capacidade rápida desta linhagem biotransformar o mesotrione em concentrações relativamente altas, sendo que a inativação do processo ocorreu após 24 horas de incubação em uma concentração de 10,0 mmol.L<sup>-1</sup>. O AMBA foi identificado como um dos metabólitos, mas em baixa concentração. A maioria dos metabólitos observados não correspondeu nem ao AMBA nem ao MNBA. Batisson et al. (2009) isolaram e caracterizaram uma outra linhagem do mesmo gênero, *Bacillus*, proveniente do solo, capaz de degradar o mesotrione. Foi também observada uma rápida degradação do mesotrione, sendo que em 24 horas, na concentração de 1,0 mmol. L<sup>-1</sup>, o herbicida foi completamente degradado. Vários metabólitos foram detectados, sendo o AMBA um deles. O MNBA não foi encontrado.

Há, portanto, poucos estudos publicados sobre microrganismos degradadores do herbicida mesotrione. As duas linhagens já isoladas e caracterizadas nestas pesquisas provêm do solo e do ambiente aquático. Por isso, a pesquisa com outros microrganismos degradadores

do mesotrione, é imprescindível. Este estudo focou no isolamento de microrganismos endofíticos e epifíticos de milho capazes de biodegradar este herbicida. Esta microbiota ainda não foi pesquisada quanto a este potencial. Como o herbicida mesotrione é absorvido pelas folhas do milho e translocado pelo xilema e pelo floema, estes microrganismos estão em constante contato com este xenobiótico nas plantações em que é utilizado e, desta forma, estão sob pressão seletiva a favor daqueles que possuam rotas enzimáticas capazes de utilizar o mesotrione ou que sejam ao menos tolerantes à presença deste herbicida, apresentando assim alta probabilidade de biodegradação do mesmo. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi isolar e caracterizar os microrganismos endofíticos e epifíticos, isolados das folhas de milho, com capacidade de biodegradar o herbicida mesotrione.

## MATERIAL E MÉTODOS

O herbicida Callisto<sup>®</sup> (suspensão concentrada com 480 g de mesotrione por litro), produzido pela *Syngenta Crops Protection*<sup>®</sup>, foi doado pela Fazenda Escola Capão da Onça, cidade de Ponta Grossa, estado do Paraná. Os meios de cultura prontos utilizados foram: Ágar Soja Triptona (Biobrás<sup>®</sup>), Caldo Soja Triptona (Biobrás<sup>®</sup>), Ágar Tríplice Açúcar e Ferro (Himedia<sup>®</sup>), Ágar MacConkey (Acumedia<sup>®</sup>), Caldo MRVP (Oxoid<sup>®</sup>), Ágar Cetrimide (Merck<sup>®</sup>), Meio de Citrato (Newprov<sup>®</sup>), Ágar Infuso de Cérebro e Coração (Acumedia<sup>®</sup>), Caldo Infuso de Cérebro e Coração (Acumedia<sup>®</sup>). Foram utilizados sais inorgânicos, solventes, ácidos e bases da Vetec<sup>®</sup>.

### *Coleta das folhas de milho comercial*

As coletas foram realizadas na Fazenda-Escola Capão da Onça, propriedade da Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa/PR. Foram realizadas 20 coletas, as primeiras 10 em plantação de milho variedade Penta, sem aplicação do herbicida mesotrione

(Callisto<sup>®</sup>) e as outras 10 em plantação de milho variedade DKB 234, com aplicação do herbicida (Callisto<sup>®</sup> 0,15 L.ha<sup>-1</sup>). As folhas coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos estéreis, etiquetadas e transportadas imediatamente ao laboratório.

#### *Isolamento e estocagem das linhagens bacterianas endofíticas e epifíticas do milho*

Para isolamento e seleção das linhagens bacterianas foi utilizado meio mineral ou mínimo (MM) adaptado de Roque e Melo (2000, com modificações), com a seguinte composição NaNO<sub>3</sub> (3,0 g), MgSO<sub>4</sub> (0,5 g), KCl (0,5 g), FeSO<sub>4</sub> (0,01 g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (6,9 g), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (11,2 g), ágar ágar (15,0 g) e água destilada (p/ 1000,0 mL). Foi utilizado também caldo mineral ou mínimo (CM), com a mesma composição do MM, sem o ágar ágar.

Para isolamento das linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas seguiu-se, respectivamente, metodologia de Bastos (2005, com modificações) e Petrini (1991, com modificações). As folhas de milho foram primeiramente lavadas por 30 segundos em água corrente. Em seguida, cada folha foi colocada em um frasco com 500,0 mL de água destilada estéril por 1 minuto, tendo-se o cuidado para que a parte em que foi realizado o corte da folha não entrasse em contato com a água e que a folha não estivesse cortada em nenhum ponto, para não haver contaminação pelos microrganismos endofíticos. Esta água foi plaqueada (100,0 µL/placa) em meio mineral (MM) com concentração de 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione (concentração próxima a utilizada na plantação de milho onde foram realizadas as coletas), sendo que foram inoculadas 9 placas, três para cada temperatura (18°, 28° e 37°C), as quais foram incubadas por 10 dias. Os microrganismos epifíticos foram isolados conforme cresciam e estocados em leite desnatado 20,0% em freezer (REIMER e CARROL, 2003), em tubos com TSA e MM 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione inclinados em geladeira e em papel filtro em freezer e em geladeira. Na sequência, as folhas de milho foram tratadas completamente em etanol 70,0% por 1 minuto, hipoclorito de sódio (NaOCl) 3,0%, por 6 minutos, etanol 70,0% por 30 segundos e água destilada estéril por 6 minutos. Cada folha foi cortada com bisturi estéril em 36 fragmentos de aproximadamente 1,0 cm<sup>2</sup>, assepticamente. Cada 4 fragmentos foram transferidos para uma placa com MM na concentração de 28,0 µmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione.

Foram incubadas três placas em cada temperatura (18°C, 28°C e 37°C), por dez dias. À medida que os microrganismos endofíticos cresciam, foram isolados e estocados conforme metodologia descrita para os epifíticos.

#### *Seleção das linhagens bacterianas endofíticas e epifíticas de milho*

As linhagens isoladas na concentração de 28,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  foram selecionadas por plaqueamento em MM em concentrações crescentes de mesotrione, a partir da concentração de 1,12  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 2,24  $\text{mmol.L}^{-1}$ , 3,36  $\text{mmol.L}^{-1}$  até a concentração de 8,96  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Os testes foram realizados em triplicatas e na temperatura ótima. Aquelas linhagens que apresentaram melhor crescimento na maior concentração foram selecionadas como possíveis degradadoras e/ou tolerantes ao herbicida mesotrione.

#### *Avaliação da capacidade de degradação do herbicida mesotrione por espectrofotometria pelas linhagens selecionadas*

Os microrganismos que cresceram nas concentrações mais altas de mesotrione foram inoculados em 200,0 ml de TSB, em frascos de 500,0 mL. Estes foram incubados em temperatura ótima a 200 rpm. Quando em fase *midlog*, as células foram recuperadas por centrifugação a 2000 rpm por 30 minutos. O precipitado foi lavado com NaCl 0,9 %, centrifugado por 30 minutos a 2000 rpm, lavado com água destilada e centrifugado novamente por 30 minutos a 2000 rpm. As foram células ressuspensas em 200,0 mL de solução de mesotrione 0,1  $\text{mmol.L}^{-1}$ , pH 7,0, em frascos de 500,0 mL. A solução já com a biomassa bacteriana foi refrigerada até o momento da realização dos experimentos do dia 0. Posteriormente, os frascos foram incubados em temperatura ótima, a 200 rpm, por 5 dias. Foram retiradas amostras diárias (13,0 mL de cada amostra). Estas foram centrifugadas a 2000 rpm por 30 minutos por duas vezes. Após a última centrifugação, os sobrenadantes

foram filtrados (em filtros com porosidade de 0,22  $\mu\text{m}$ ). Os sobrenadantes foram imediatamente congelados até análise por espectrofotometria. Foram utilizados como controles negativos, água destilada com herbicida mesotrione, água destilada com herbicida mesotrione e *Escherichia coli* ATCC 25922 (linhagem não degradadora do mesotrione) e água destilada com microrganismo em questão. Estes foram incubados e tratados sob as mesmas condições das amostras. A degradação do herbicida pelos microrganismos foi avaliada pelo monitoramento do decréscimo do pico de absorção do mesotrione, ao longo do período de incubação. A leitura foi feita em espectrofotômetro Shimadzu UV-VIS Photodiode Array Spectrophotometer *MultiSpec-1501*, com cubetas em quartzo, caminho óptico de 10,0 mm, altura de 45,0 mm, volume de 3,5 mL e 2 janelas polidas. A leitura foi feita pela varredura do espectro de absorção de 200,0 nm a 800,0 nm.

#### *Identificação das linhagens bacterianas degradadoras do herbicida mesotrione*

Para identificação morfológica das linhagens bacterianas degradadoras foi realizada a coloração de Gram e presença de cápsula por coloração negativa, ambas seguindo-se metodologia descrita por Winn Junior et al. (2006). Para identificação fenotípica, para todas as linhagens degradadoras, foram aplicados o teste de crescimento em ágar MacConkey, crescimento em TSI (triple sugar iron), teste da produção de indol, teste da oxidase, teste da catalase, teste de O/F (oxidação/fermentação) da glicose (WINN JUNIOR et al., 2006). Para identificação fenotípica dos bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose, foram empregados ainda o teste redução do nitrato e motilidade, teste de citrato, oxidação da maltose, xilose e lactose, crescimento em ágar cetrimide, liquefação da gelatina (WINN JUNIOR et al., 2006) e crescimento a 42°C (DIJKSHOORN, 1996). Para identificação destas linhagens não fermentadoras foi também utilizado o Kit para Identificação de não fermentadores BBL Crystal™ Identification Systems Enteric/Non Fermenter ID Kit, da BD. Para identificação fenotípica de cocos Gram-positivos foram empregados adicionalmente teste de citrato, teste de Voges-Proskauer para produção de acetoina (WINN JUNIOR et al., 2006), redução do nitrato e motilidade (MOESBY et al., 2005), teste de oxidase modificado

(FALLER e SCHLEIFER, 1981) e susceptibilidade à lisozima (KLOOS et al., 1974). Para identificação fenotípica de bacilos Gram-positivos foi empregado, adicionalmente, o teste de produção de esporos (MOESBY et al., 2005, com modificações).

## RESULTADOS

### *Isolamento das linhagens endofíticas e epifíticas de milho tolerantes e/ou degradadoras do mesotrione*

Foram feitas 20 vinte coletas de folhas de milho comercial, sendo as primeiras 10 em plantação de milho variedade Penta, sem aplicação do herbicida mesotrione e as outras 10 em plantação de milho DKB 234 com aplicação do mesotrione ( $0,15 \text{ L.ha}^{-1}$ ). Das vinte coletas foram isoladas, em meio contendo mesotrione a  $28 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , 347 linhagens bacterianas tolerantes e/ou degradadoras. Destas, 178 linhagens foram isoladas das coletas realizadas na plantação de milho Penta sem tratamento com o mesotrione, sendo 114 linhagens bacterianas epifíticas e 64 endofíticas. Da plantação de milho variedade DKB 234 com tratamento com o mesotrione foram isoladas 169 linhagens bacterianas, 132 epifíticas e 37 endofíticas (TABELA 1).

TABELA 1. Número de linhagens tolerantes e/ou degradadoras do herbicida mesotrione na concentração de  $28 \mu\text{mol.L}^{-1}$  isoladas de plantação de milho comercial variedade Penta sem tratamento com herbicida mesotrione e de plantação de milho comercial variedade DKB 234 com tratamento com herbicida mesotrione.

| <b>Plantação sem aplicação de mesotrione</b>                   |            |
|----------------------------------------------------------------|------------|
| <b>Variedade Milho Penta</b>                                   |            |
| <b>Plantio 24/09/2007    Coleta 13 e 23/11/2007 e 4/1/2008</b> |            |
| Nº de linhagens bacterianas isoladas                           |            |
| 178                                                            |            |
| Endofíticas                                                    | Epifíticas |
| 64                                                             | 114        |
| <b>Plantação com aplicação de mesotrione</b>                   |            |
| <b>Variedade Milho DKB 234</b>                                 |            |
| <b>Plantio 24/10/2007    Coleta 30/01/2008</b>                 |            |
| Nº de linhagens bacterianas isoladas                           |            |
| 169                                                            |            |
| Endofíticas                                                    | Epifíticas |
| 37                                                             | 132        |

*Seleção das linhagens tolerantes e/ou degradadoras do mesotrione*

As linhagens foram isoladas em concentração de  $28,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de mesotrione, similar à concentração utilizada em campo. Após, foram incubadas em concentrações crescentes de MM com mesotrione nas concentrações de  $1,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $2,24 \text{ mmol.L}^{-1}$ ;  $3,36 \text{ mmol.L}^{-1}$  até  $8,96 \text{ mmol.L}^{-1}$ . Na concentração inicial, de  $28,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , da plantação de milho variedade Penta, foram selecionadas 178 linhagens bacterianas (64 endofíticas e 114 epifíticas) e, da variedade DKB 234, 168 linhagens (37 endofíticas e 132 epifíticas); na concentração seguinte, de  $1,12 \text{ mmol.L}^{-1}$ , do milho variedade Penta, foram selecionadas 100 linhagens (35 linhagens endofíticas e 65 epifíticas) e, da variedade DKB 234, 64 linhagens (6 endofíticas e 58 epifíticas); na concentração de  $2,24 \text{ mmol.L}^{-1}$ , da variedade Penta, foram selecionadas 52 linhagens bacterianas (15 endofíticas e 37 epifíticas) e, da variedade DKB 234, 24 linhagens (2 endofíticas e 22 epifíticas); na concentração de  $3,36 \text{ mmol.L}^{-1}$ , da variedade Penta, foram selecionadas 30 linhagens bacterianas (8 endofíticas e 22 epifíticas) e, da variedade DKB 234,

18 linhagens, todas epifíticas; na maior concentração, de 8,96 mmol.L<sup>-1</sup> de mesotrione, foram selecionadas as 10 linhagens que apresentaram melhor crescimento como possíveis degradadoras e/ou tolerantes ao mesotrione sendo que destas, 9 linhagens (7 epifíticas e 2 endofíticas) foram isoladas de milho variedade Penta sem tratamento com o herbicida mesotrione e 1 linhagem epifítica foi isolada de milho variedade DKB 234, com tratamento com herbicida mesotrione (TABELA 2).

TABELA 2. Seleção das linhagens isoladas de milho comercial variedade Penta (sem tratamento com herbicida mesotrione) e variedade DKB 234 (com tratamento com herbicida mesotrione) em concentrações crescentes do herbicida (28,0 µmol.L<sup>-1</sup> a 8,96 mmol.L<sup>-1</sup>).

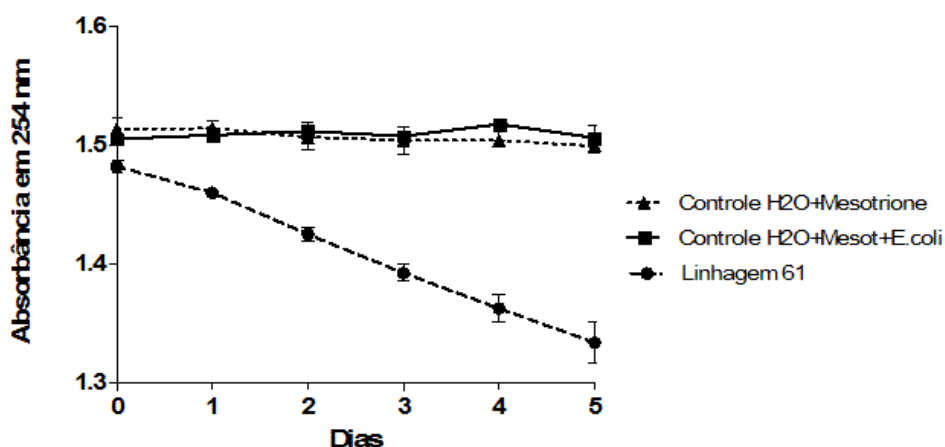
| Concentração de mesotrione em mmol.L <sup>-1</sup> | Variedade Milho Penta sem tratamento com mesotrione |            | Variedade Milho DKB 234 com tratamento com mesotrione |            |
|----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------|------------|
|                                                    | Endofíticos                                         | Epifíticos | Endofíticos                                           | Epifíticos |
| 28,0 µmol.L <sup>-1</sup>                          | 64                                                  | 114        | 37                                                    | 153        |
|                                                    | 178                                                 |            | 190                                                   |            |
| 1,12 mmol.L <sup>-1</sup>                          | 35                                                  | 65         | 6                                                     | 58         |
|                                                    | 100                                                 |            | 64                                                    |            |
| 2,24 mmol.L <sup>-1</sup>                          | 15                                                  | 37         | 2                                                     | 22         |
|                                                    | 52                                                  |            | 24                                                    |            |
| 3,36 mmol.L <sup>-1</sup>                          | 8                                                   | 22         | -                                                     | 18         |
|                                                    | 30                                                  |            | 18                                                    |            |
| 8,96 mmol.L <sup>-1</sup>                          | 2                                                   | 7          | -                                                     | 1          |
|                                                    | 9                                                   |            | 1                                                     |            |

#### *Avaliação da capacidade de degradação do mesotrione por espectrofotometria*

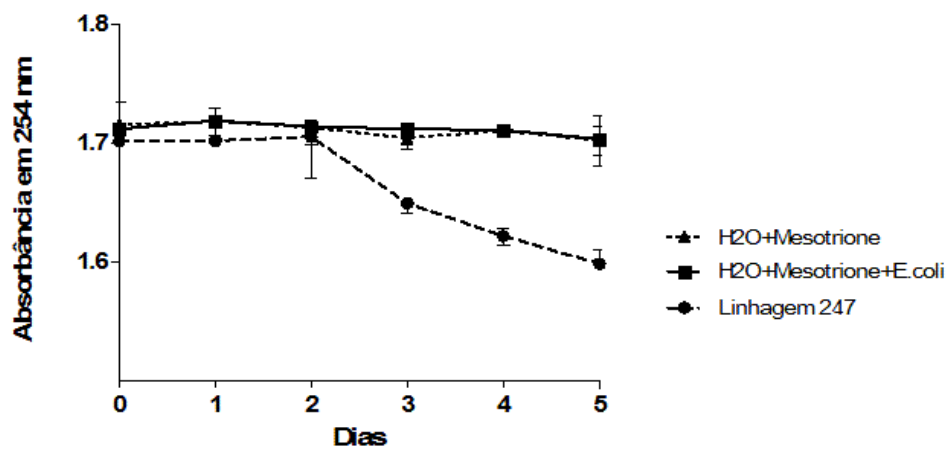
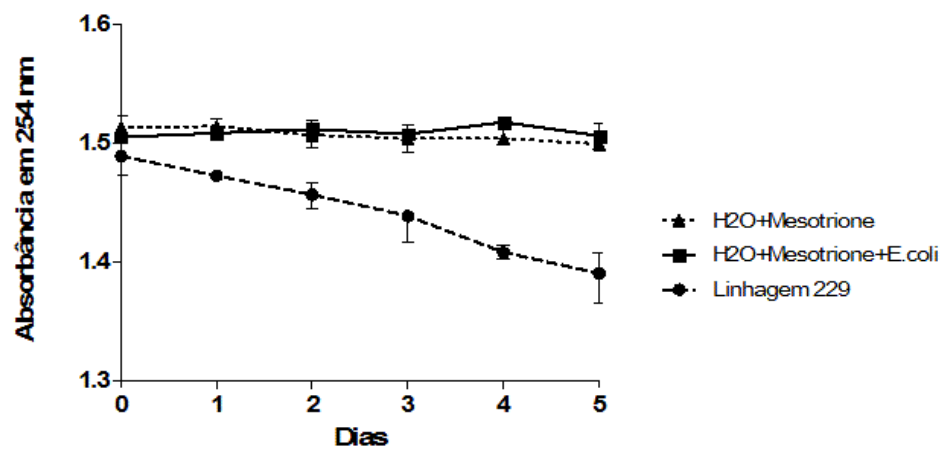
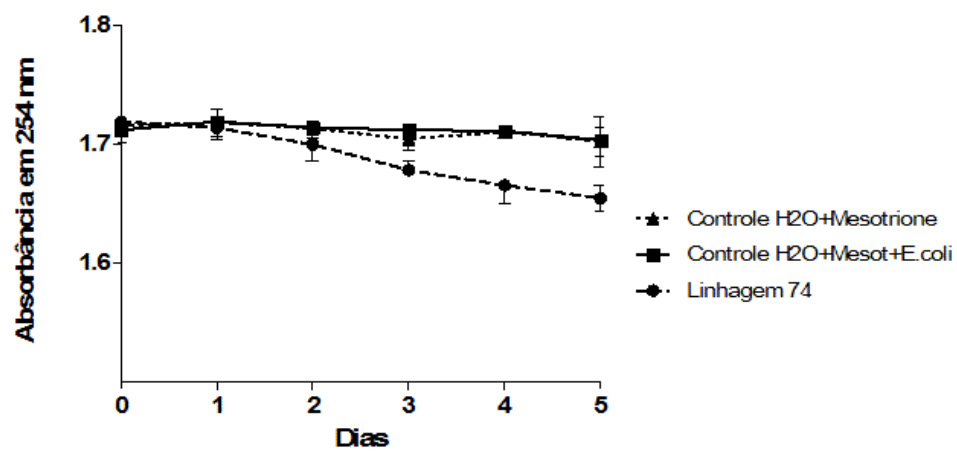
As 10 linhagens selecionadas, na maior concentração de mesotrione (8,96 mmol.L<sup>-1</sup>), tiveram sua capacidade de degradar o herbicida analisada por espectrofotometria. A degradação do herbicida pelos microrganismos foi avaliada pelo monitoramento do decréscimo do pico de absorção do mesotrione, ao longo do período de incubação de 5 dias. A leitura no espectrofotômetro foi feita pela varredura do espectro de absorção de 200 nm a 800

nm, sendo que o pico do mesotrione foi registrado em 254 nm. Das 10 linhagens selecionadas, denominadas de 61, 74, 229, 247 e 661, 5 apresentaram decréscimo no pico de absorção do mesotrione (Figuras 1 A, 1 B, 1 C; 1 D e 1 E). As demais 5 linhagens não apresentaram diminuição no pico de absorção na análise pela espectrofotometria, mas foram capazes de crescer na presença do mesotrione até a concentração de 8,96 mmol.L<sup>-1</sup>.

Após o período de incubação de 5 dias, as linhagens que apresentaram um maior decréscimo no pico de absorção do mesotrione e, conseqüentemente, na concentração deste, foram a linhagem 61 (Figura 1 A), com 9,78% de diminuição, a linhagem 661 (Figura 1 E), com 8,05% e a linhagem 229 (Figura 1 C), com 7,88%. As linhagens 247 (Figura 1 D) e 74 (Figura 1 B) apresentaram um decréscimo de 6,02% e 3,29%, respectivamente. O controle de água destilada estéril e herbicida mesotrione sem microrganismos não apresentou decréscimo no espectro de absorção ao longo do período de incubação. Estatisticamente, os valores das médias das amostras da linhagem 74 não são significativamente diferentes do controle (valor de  $P = 0,1797$ ; se  $P < 0,05$ , médias são significativamente diferentes). Da mesma maneira, o controle de água destilada estéril, herbicida mesotrione e *Escherichia coli* também não foi significativamente diferente do controle de água e mesotrione (valor de  $P = 0,4848$ ). As médias dos valores de decréscimo no pico de absorção observados ao longo do período de incubação das demais amostras foram significativamente diferentes do controle (linhagem 61,  $P = 0,0022$ ; linhagem 229,  $P = 0,0022$ ; linhagem 247,  $P = 0,0411$ ; linhagem 661,  $P = 0,0022$ ).



1 A



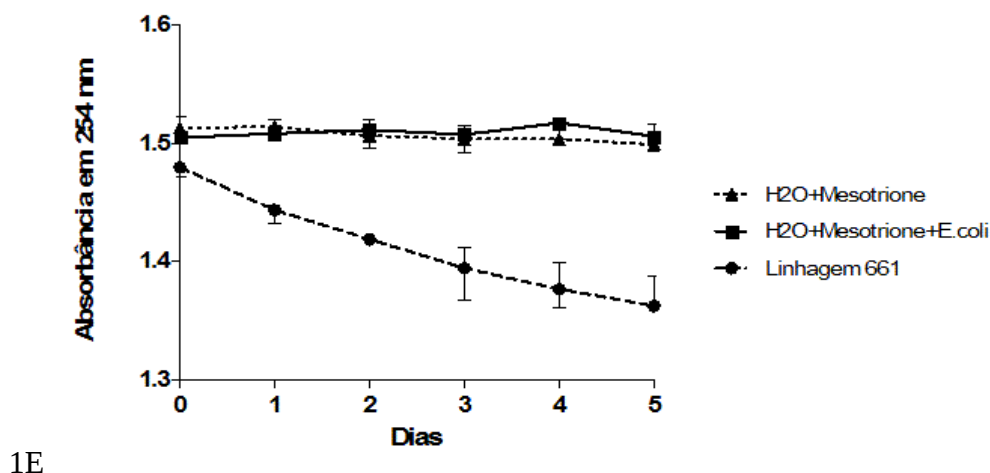


Figura 1. Decréscimo na concentração do herbicida mesotrione em absorbância (registrada por espectrofotômetro UV-VIS) ao longo do período de incubação de 5 dias, pelas linhagens 61 (Figura 1 A), 74 (Figura 1 B), 229 (Figura 1 C), 247 (Figura 1 D) e 661 (Figura 1 E), todas em comparação com os controles de água e herbicida; água, herbicida mesotrione e *Escherichia coli* ATCC 25922. O controle realizado de água destilada mais microrganismo não apresentou resultados por isso fica como dados não mostrados.

#### Identificação das linhagens degradadoras do mesotrione

Das 5 linhagens que apresentaram diminuição no pico de absorção do mesotrione ao longo do período de incubação, apenas 61 é uma linhagem endofítica, sendo as demais todas epifíticas. Quatro linhagens (61, 74, 229 e 247) foram isoladas da plantação de milho variedade Penta sem tratamento com o herbicida mesotrione. Somente a linhagem 661 foi isolada de plantação de milho variedade DKB 234 com tratamento com o herbicida mesotrione.

Quanto à identificação morfológica, as linhagens 74 e 661 foram identificadas como bacilos Gram-negativos, com colônias de coloração rosa em meio BHA; 229 como cocobacilo Gram-negativo; 61 como coco Gram-positivo com predominância de tetracocos com colônias de coloração amarela em meio BHA; 247 como bacilo Gram-positivo. Todas as linhagens apresentaram formação de cápsula (TABELA 3).

TABELA 3. Resultados dos testes e provas bioquímicas realizados para todas as linhagens bacterianas selecionadas.

| Testes/Provas bioquímicas              | Linhagens bacterianas |     |      |     |     |
|----------------------------------------|-----------------------|-----|------|-----|-----|
|                                        | 61                    | 74  | 229  | 247 | 661 |
| <b>Coloração de Gram</b>               | CGP                   | BGN | BGN  | BGP | BGN |
| <b>Coloração negativa para cápsula</b> | +                     | +   | +    | +   | +   |
| <b>Crescimento em ágar MacConkey</b>   | -                     | -   | Lac- | -   | -   |
| <b>Reações em TSI</b>                  | neg                   | -   | neg  | neg | -   |
| <b>Produção de Indol</b>               | neg                   | neg | neg  | neg | neg |
| <b>Teste da oxidase</b>                | neg                   | neg | neg  | neg | neg |
| <b>Teste da catalase</b>               | +                     | +   | +    | +   | +   |
| <b>Teste O/F glicose</b>               | -                     | A   | O    | neg | A   |

CGP – coco Gram-positivo; BGN – bacilo Gram-negativo; BGP – bacilo Gram-positivo; Lac- - lactose negativo; A – assacarolítico; O – oxidativo; neg – negativo; + - positivo; - - sem crescimento.

A linhagem 229 identificada como cocobacilo Gram-negativo apresentou os seguintes resultados para as provas bioquímicas: crescimento em meio MacConkey sem fermentação da lactose; teste TSI negativo para utilização dos carboidratos e produção de H<sub>2</sub>S; teste indol negativo para presença da enzima triptofanase; teste negativo para presença da enzima citocromo oxidase; positivo para enzima catalase; metabolismo oxidativo no teste de O/F glicose; positivo para oxidação da maltose, xilose e lactose; positivo para utilização do citrato; negativo para redução do nitrato; negativo para motilidade; negativo para liquefação da gelatina; crescimento a 42°C; sem crescimento no meio cetrimide. Os resultados das provas bioquímicas identificaram a linhagem 229 como da espécie *Acinetobacter baumannii* (TABELAS 3 e 4). O teste pelo BBL Crystal™ Identification Systems Enteric/Non Fermenter ID Kit, da BD confirmou esta identificação.

As linhagens 74 e 661, identificadas como bacilos Gram-negativos, apresentaram os seguintes resultados para as provas bioquímicas: sem crescimento em meio MacConkey; sem crescimento em TSI; teste indol negativo para presença da enzima triptofanase; teste negativo para presença da enzima citocromo oxidase; positivo para enzima catalase; assacarolíticas no teste de O/F glicose; negativo para redução do nitrato; positivo e negativo para motilidade, respectivamente; negativo para liquefação da gelatina (TABELAS 3 e 4).

A linhagem 61, identificada como coco Gram-positivo com predominância de tetracocos, apresentou os seguintes resultados para as provas bioquímicas: sem crescimento em meio MacConkey; teste TSI negativo para utilização dos carboidratos e produção de H<sub>2</sub>S; teste indol negativo para presença da enzima triptofanase; teste negativo para presença da enzima citocromo oxidase; positivo para enzima catalase; sem fermentação nem oxidação da glicose no teste de O/F glicose; sem crescimento no meio citrato; negativo para redução do nitrato; negativo para motilidade; susceptível a lisozima; negativo para acetoina. Os resultados às provas bioquímicas identificam a linhagem 61 como da espécie *Micrococcus luteus* (TABELAS 3 e 5).

TABELA 4 - Resultados dos testes e provas bioquímicas realizados para as linhagens bacterianas Gram-negativas não fermentadoras de glicose (linhagens 74, 229, 661).

| Testes/Provas Bioquímicas             | Linhagens bacterianas |     |     |
|---------------------------------------|-----------------------|-----|-----|
|                                       | 74                    | 229 | 661 |
| <b>Redução do nitrato</b>             | neg                   | neg | neg |
| <b>Motilidade em meio semi-sólido</b> | +                     | neg | neg |
| <b>Crescimento em citrato</b>         | NA                    | +   | NA  |
| <b>Liquefação da gelatina</b>         | neg                   | neg | neg |
| <b>Oxidação da maltose</b>            | NA                    | +   | NA  |
| <b>Oxidação da xilose</b>             | NA                    | +   | NA  |
| <b>Oxidação da lactose</b>            | NA                    | +   | NA  |
| <b>Crescimento a 42°C</b>             | NA                    | +   | NA  |
| <b>Crescimento em cetrimide</b>       | NA                    | neg | NA  |

NA – não aplicado; neg – negativo; + - positivo.

TABELA 5 - Resultados dos testes e provas bioquímicas realizados para a linhagem de coco Gram-positivo (linhagem 61).

| Linhagem<br>61 | Testes/Provas Bioquímicas |                                |                            |
|----------------|---------------------------|--------------------------------|----------------------------|
|                | Redução do nitrato        | Motilidade em meio semi-sólido | Crescimento em citrato     |
|                | neg                       | neg                            | neg                        |
|                | Oxidação da glicose       | Susceptibilidade a lisozima    | Acetoina (Voges-Proskauer) |
|                | neg                       | S                              | neg                        |

Neg – negativo; S – susceptível.

A linhagem 247, identificada como bacilo Gram-positivo, apresentou os seguintes resultados para as provas bioquímicas: sem crescimento em meio MacConkey; teste TSI negativo para oxidação dos carboidratos e produção de H<sub>2</sub>S; teste indol negativo para presença da enzima triptofanase; teste negativo para presença da enzima citocromo oxidase; positivo para enzima catalase; sem produção de esporos.

## DISCUSSÃO

A avaliação, por espectrofotometria, da capacidade de degradação do herbicida mesotrione pelas 10 linhagens selecionadas, revelou que 5 destas apresentaram diminuição no pico de absorção do herbicida ao longo do período de incubação de 5 dias, o que indica que houve degradação do mesmo. A estrutura química dos dois metabólitos já identificados, o AMBA e o MNBA, faz com que estes apresentem picos de absorção próximo ou no mesmo comprimento de onda que a molécula do mesotrione. Assim sendo, a formação do AMBA, do MNBA ou de outros metabólitos pode subestimar os valores de decréscimo no pico de absorção do herbicida registrados pela espectrofotometria, em consequência da sobreposição de picos na mesma região do espectro de absorção do mesotrione. Assim, o acúmulo destes produtos no meio pode dificultar a avaliação da real capacidade de degradação do mesotrione pelas linhagens microbianas analisadas neste estudo, tendo em vista também que, neste caso, a técnica de espectrofotometria fornece uma análise qualitativa e não quantitativa dos dados (ALFERNESS e WIEBE, 2002; DURAND et al. 2006 b; BATISSON et al., 2009). Conforme Alferness e Wiebe (2002), Bonnet et al. (2008) e Dyson et al. (2002), em contraste com o observado no solo e no ambiente aquático, no milho apenas o MNBA foi encontrado juntamente com o mesotrione; portanto, é possível que o AMBA não esteja entre os metabólitos presentes nas amostras que estão absorvendo no mesmo comprimento de onda que a molécula original. Estes resultados serão melhor elucidados após análise das amostras em cromatografia líquida de alta performance. Entretanto, a realização de dois experimentos independentes e em triplicata, a não alteração no pico de absorção dos controles ao longo do

período de incubação e a degradação tempo dependente do mesotrione na presença dos microrganismos, indica à biodegradação do herbicida pelas linhagens investigadas.

De acordo com o estudo de Batisson et al. (2009), algumas linhagens sobre as quais o mesotrione não teve efeito tóxico não foram capazes de degradar o mesmo quando isoladas. Da mesma forma, neste estudo, das 10 linhagens que foram selecionadas por crescerem em altas concentrações do herbicida, apenas 5 apresentaram decréscimo no pico de absorção ao longo do período de incubação, conforme registrado pela espectrofotometria. Uma linhagem destas 5 (linhagem 74) não apresentou resultados significativamente diferentes dos controles, mas isto não indica que não houve degradação do herbicida, tendo em vista que mesmo o baixo decréscimo dos valores de absorção foi tempo dependente. As demais 5 linhagens que também cresceram em altas concentrações do herbicida ( $8,96 \text{ mmol.L}^{-1}$ ) não tiveram a capacidade de degradar o mesotrione demonstrada pela análise na espectrofotometria. Isto pode ser explicado pelo fato que, no meio ambiente os microrganismos existem em consórcios, raramente em culturas puras e isoladas (Fogarty e Tuovinen, 1991). Estes consórcios apresentam diversas interações, como por exemplo, a presença de microrganismos degradadores primários produzindo metabólitos que suportam o crescimento de outros microrganismos que não podem utilizar o composto original. Assim, é comum culturas mistas realizarem uma degradação mais rápida que culturas puras. Portanto, estas linhagens que não tiveram a capacidade de degradação do mesotrione detectada, quando em consórcio com outros microrganismos, podem vir a participar da biodegradação deste herbicida.

Todas as linhagens selecionadas formam cápsula. Como quatro das cinco linhagens são epifíticas, a cápsula exerce um papel importante na proteção contra a dessecação, na adesão e na formação de biofilmes. A formação de biofilmes facilita a formação dos consórcios microbianos e mesmo a apreensão das moléculas do herbicida, facilitando a degradação do mesmo (BAIRD, 2002; BLACK, 2002).

Apenas uma das 5 linhagens bacterianas (linhagem 661) foi isolada de plantação de milho onde houve prévia aplicação de mesotrione. Este contato com o herbicida pode atuar como pressão seletiva favorecendo aqueles microrganismos capazes de tolerar a presença do herbicida ou que possuam a capacidade enzimática de degradá-lo. Entretanto, as demais linhagens foram isoladas de plantação sem aplicação recente do mesotrione. Esta capacidade de degradação de herbicidas da classe das tricetonas em solo sem tratamento com os mesmos

já foi encontrada e analisada por Chaabane et al. (2008) e Batisson et al. (2009). Isto pode indicar que a capacidade de degradação do mesotrione, assim como de outros herbicidas da classe das tricetonas, faz parte da rota metabólica da microbiota sem que tenha havido seleção prévia da mesma pela presença destes xenobióticos.

Todas as 5 linhagens foram positivas para o teste da enzima catalase. Segundo Alferness e Wiebe (2002), a degradação *in vitro* do herbicida mesotrione em MNBA é feita pela oxidação da molécula original pela enzima catalase (a 70°C por 20 minutos). Estes resultados indicam que a enzima catalase pode também, *in vivo*, ter um papel importante na rota metabólica de degradação do mesotrione nestes organismos.

A linhagem 229 foi identificada como *Acinetobacter baumannii* e a linhagem 61 *Micrococcus luteus*. As linhagens 74 e 661 parecem pertencer ao mesmo gênero, pois possuem características morfológicas semelhantes (bacilos pequenos, Gram-negativos e com produção de pigmento rosa) e apresentaram os mesmos resultados nos testes bioquímicos realizados, com exceção do teste de motilidade, positivo que foi a a linhagem 74 e negativo para a linhagem 661.

A biodegradação do herbicida mesotrione já foi relatada nos estudos de Durand et al. (2006 a, b) e Batisson et al. (2009). Durand et al. (2006 a, b) foram os primeiros a isolar e caracterizar uma linhagem bacteriana pura (*Bacillus* sp.), isolada de água, capaz de biotransformar o herbicida mesotrione. A capacidade da linhagem de degradar este composto foi investigada por HPLC (cromatografia líquida de alta performance) e *in situ* H NMR (espectroscopia de alta sensibilidade de ressonância magnética nuclear). Foi detectada uma rápida biotransformação do mesotrione por esta linhagem em concentrações relativamente altas, sendo que a inativação do processo ocorreu após 24 horas de incubação em uma concentração de 10 mmol.L<sup>-1</sup>. O AMBA foi identificado como um dos metabólitos, mas em baixa concentração. A maioria dos metabólitos observados não corresponderam nem ao AMBA nem ao MNBA. Batisson et al. (2009) isolaram e caracterizaram uma outra linhagem do mesmo gênero *Bacillus*, proveniente do solo, capaz de degradar o mesotrione. A avaliação da capacidade de degradação foi feita por HPLC. Foi também observada uma rápida degradação do mesotrione - em 24 horas na concentração de 1 mmol.L<sup>-1</sup>, o herbicida foi completamente degradado. Vários metabólitos foram detectados; o AMBA foi encontrado mas o MNBA não.

Há, portanto, poucos estudos publicados sobre microrganismos degradadores do herbicida mesotrione, sendo que as duas linhagens já isoladas e caracterizadas nestas pesquisas provêm do solo e do ambiente aquático. Este trabalho é o primeiro relato de isolamento de linhagens microbianas degradadoras do herbicida mesotrione epifíticas e endofíticas de milho.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelo CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) e SETI (Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Das 347 linhagens tolerantes e/ou degradadoras do mesotrione na concentração de 28  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , isoladas de folhas de milho, 10 foram capazes de crescer em altas concentrações do herbicida (8,96  $\text{mmol.L}^{-1}$ ). Destas, 5 linhagens apresentaram decréscimo no pico de absorção do herbicida ao longo do período de incubação, registrado pela espectrofotometria, o que indica a biodegradação do mesmo.

O crescimento, em alta concentração, das linhagens que não tiveram a capacidade de degradação do mesotrione detectada pela espectrofotometria indica a possibilidade destas participarem da degradação do mesotrione quando associadas com outros microrganismos em consórcios no ambiente.

A capacidade quantitativa real de degradação do mesotrione pelas linhagens investigadas registrada pela espectrofotometria pode estar subestimada devido ao acúmulo dos produtos de degradação que podem possuir o mesmo ou semelhante comprimento de onda no espectro de absorção que a molécula original.

A maioria das linhagens degradadoras são epifíticas, o que está de acordo com o fato de que estes microrganismos estão por mais tempo e em maior contato com o herbicida mesotrione que os microrganismos endofíticos.

Apenas uma das 5 linhagens bacterianas com decréscimo no pico de absorção do mesotrione foi isolada de plantação de milho onde houve a prévia aplicação do mesotrione. As demais linhagens foram isoladas de plantação sem aplicação recente deste herbicida. Isso indica que a capacidade de degradação do mesotrione, assim como de outros herbicidas da classe das tricetonas, pode fazer parte da rota metabólica da microbiota sem que tenha havido seleção prévia dos microrganismos pela presença dos herbicidas.

Todas as 5 linhagens foram positivas para a presença da enzima catalase. Estes resultados indicam que esta enzima pode ter um papel importante na rota metabólica de degradação do mesotrione nestes organismos.

Uma linhagem foi identificada como *Acinetobacter baumannii*, outra como *Micrococcus luteus*, dois bacilos Gram-negativos assacarolíticos e um bacilo Gram-positivo não formador de esporos.

Este é o primeiro relato de isolamento e caracterização de linhagens bacterianas epifíticas e endofíticas de milho degradadoras do herbicida mesotrione.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRITOX. **Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques.** Disponível em: <<http://www.dive.afssa.fr/agritox/php/fiches.php>>. Acesso em: 10 mar. 2009.

AGSOLVE. **Biorremediação é solução eficaz para contaminações.** Disponível em: <<http://www.agsolve.com.br/noticia.php?cod=669>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

ALFERNESS, P.; WIEBE, L. Determination of mesotrione residues and metabolites in crops, soil and water by liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 3926-3934, 2002.

ANDEF. **Associação Nacional de Defesa de Vegetal.** Disponível em: <[http://www.andef.com.br/util\\_defensivos/](http://www.andef.com.br/util_defensivos/)>. Acesso em: 22 jun. 2009.

ARAÚJO, J. M.; SILVA, A. C.; AZEVEDO, J. L. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of maize (*Zea mays* L.). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 43, n. 4, p. 447-451, 2000.

ARAUJO, R. S.; HUNGRIA, M. **Microrganismos de importância agrícola.** Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994. 236 p.

BACON, C. W.; HINTON, D. M. Endophytic and biological control potential of *Bacillus mojavensis* and related species. **Biological Control**, v. 23, p. 274–284, 2002.

BASTOS, D. Z. L. **Biotransformação por Fungos do Ácido Betulínico e Derivados.** 2005. 120 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

BATISSON, I. et al. Isolation and characterization of mesotrione-degrading *Bacillus* sp. from soil. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 1195-1201, 2009.

BAIRD, C. **Química Ambiental.** Porto Alegre: Bookman, 2002. 622 p.

BENDING, G.D. et al. In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, p. 827–834, 2003.

BENTO, F.M. et al. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, n. 1, p. 65-68, 2003.

BIZI, R. M. **Microrganismos endofíticos**. Disponível em: <<http://www.floresta.ufpr.br/~lpf/contbio02.html>>. Acesso em: 20 jun. 2009.

BLACK, J. G. Microbiologia, fundamentos e perspectivas. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2002, 829 p.

BÖGER, P.; SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis inhibitor herbicides - mode of action and resistance mechanisms. **Pesticide Outlook**, v. 9, n. 6, p. 29-35, 1998.

BONNET, J. L. et al. Toxicity assessment of the herbicides sulcotrione and mesotrione toward two reference environmental microorganisms: *Tetrahymena pyriformis* and *Vibrio fischeri*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 55, p. 576–583, 2008.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. In: Presidência da República Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. Disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/Leis/L7802.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm). Acesso em: 20 jul. 2009.

BRITO, N. N. et al. **Biorremediação e controle ambiental**. IV Fórum de Estudos Contábeis, 2004. Disponível em: <[http://www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/4fec02\\_2004](http://www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/4fec02_2004)>. Acesso em: 22 jun. 2009.

BÜLL, L. T.; CANTARELLA, H. **Cultura do milho**: fatores que afetam a produtividade. Piracicaba: Potafos, 1993. 301 p.

CASTRO SOUZA, V.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para uma identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005. 639 p.

CHAABANE, H. et al. Behaviour of sulcotrione and mesotrione in two soils. **Pest Management Science**, v. 64, n. 1, p. 86-93, 2008.

CHERRIER, R.; PERRIN-GANIER; C., SCHIAVON; M. Degradation of sulcotrione in a brown soil amended with various organic matters. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 24, p. 29-33, 2004.

CORREIA, M. E. F.; ANDRADE, A. G. Formação de serapilheira e ciclagem de nutrientes. In: SANTOS, G. de A.; CAMARGO, F. A. de O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo**: ecossistemas tropicais e subtropicais. Porto Alegre: Gênises, 1999. p. 197-225.

CRECCHIO, C. et al. Molecular approaches to investigate herbicide-induced bacterial community changes in soil microcosms. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 460–466, 2001.

CULLINGTON; J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. **Soil Biology Biochemistry**, v. 31, p. 677–686, 1999.

DEJONGHE, W. et al. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1532–1541, 2003.

DEVINNY, J.; CHANG, S. H. Bioaugmentation for soil bioremediation. In: WISE, D. L.; TRANTOLO, D. J. (eds.) **Bioremediation of contaminated soils**. New York: Marcel Dekker Inc., 2000. 903 p.

DIJKSHOORN, L. *Acinetobacter*—microbiology. In: BERGOGNE-BÉREZIN, E.; JOLY-GUILLOU, M.; TOWNER, K. J. (Eds.) **Acinetobacter: Microbiology, epidemiology, infections, management**. Boca Raton: CRC Press, 1996. p. 37–69.

DURAND, S. et al. Biotransformation of the triketone herbicide mesotrione by a *Bacillus* strain. Metabolite profiling using liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 20, n. 17, p. 2603–2613, 2006. (a)

DURAND, S. et al. First isolation and characterization of a bacterial strain that biotransforms the herbicide mesotrione. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 222–228, 2006. (b)

DYSON, J. S. et al. Adsorption and degradation of the weak acid mesotrione in soil and environmental fate implications. **Journal of Environmental Quality**, v. 31, p. 613–618, 2002.

EL-FANTROUSSI, S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n.12, p. 5110–5115, 2000.

EMBRAPA. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em: <[http://www.embrapa.br/kw\\_storage/keyword.2007-07-19.5363093788](http://www.embrapa.br/kw_storage/keyword.2007-07-19.5363093788)>. Acesso em: 20 jul. 2009.

EUROPEAN COMISSION. Health e consumer protection. Directorate-general. Mesotrione. Disponível em: <[http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list1-20\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list1-20_en.pdf)>. Acesso em: 20 jul. 2009.

FALLER, A.; SCHLEIFER, K. H. Modified oxidase and benzidine tests for separation of Staphylococci from Micrococci. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1031-1035, 1981.

FOGARTY, A. M.; TUOVINEN, O. H. Microbiological degradation of pesticides in yard waste composting. **Microbiological Reviews**, v. 55, n. 2, p. 225-233, 1991.

FORNASIERI FILHO, D. **A cultura do milho**. Jaboticabal: FUNEP, 1992. 273 p.

FREITAS, L. G. et al. Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 1028, n. 2, p. 277–286, 2004.

GUIMARÃES, G. L. **Impactos ecológicos do uso de herbicidas ao meio ambiente**. Série Técnica IPEF, v. 4, n. 12, p. 159-180, 1987.

IPEF. **Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais**. Disponível em: <<http://www.ipef.br/publicacoes/ctecnica/nr017.pdf>>. Acesso em: 23 jun. 2009.

JORNAL DO ENDOFÍTICO. Disponível em: <<http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/endofiticos/>>. Acesso em: 21 jul. 2009.

JUGENHEIMER, R. M. **Maíz: variedades mejoradas, métodos de cultivo y producción de semillas**. Mexico: Editorial Limusa, 1981. 841 p.

KLEIER, D. A.; GRAYSON, B. T.; HSIU, F. The phloem mobility of pesticides. **Pesticide Outlook**, v. 9, p. 26-30, 1998.

KLOOS, W. E.; TORNABENE, T. G.; SCHLEIFER, K. H. Isolation and characterization of Micrococci from human skin, including two new species: *Micrococcus zyzae* and *Micrococcus kristinae*. **International Journal os Systematic Bacteriology**, v. 24, n. 1, p. 79-101, 1974.

KOREN, O. et al. Petroleum pollution bioremediation using water-insoluble uric acid as the nitrogen source. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 10, p. 6337–6339, 2003.

LAVIEILLE, D.; TER HALLE, A.; RICHARD, C. Understanding mesotrione photochemistry when applied on leaves. **Environmental Chemistry**, v. 5, p. 420-425, 2008.

LORENZO, V. Cleaning up behind us. **European Molecular Biology Organization Reports**, v. 21, n. 51, 2001.

MAEGHE, L., DESMET, E.M.; BULCKE, R. Soil activity and persistence of sulcotrione and mesotrione. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**, v. 69, n. 3, p. 41-48, 2004.

MARTINS, A. et al. **Biorremediação**. III Fórum de Estudos Contábeis, 2003. Disponível em: <<http://www.ceset.unicamp.br/ite/Artigos/3fec2401.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2007.(a)

MARTINS, P.F. et al. Selection of microorganisms degrading s-metalochlor herbicide. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 50, n. 1, p. 153-159, 2007. (b)

MASTICHIADIS, C. et al. Solid-phase fluoroimmunoassay for the determination of mesotrione - a novel triketone herbicide - in water with direct measurement of the fluorescence onto the solid support. **The Analyst**, v. 128, n. 4, p. 404-410, 2003.

MAYER, M. P.; BEYER, P.; KLEINIG, H. Quinone compounds are able to replace molecular oxygen as terminal electron acceptor in phytoene desaturase in chromoplast of *Narcissus pseudonarcissus* L. **European Journal of Biochemistry**, v. 191, p. 359-363, 1990.

MAYER, M. P.; NIEVELSTEIN, V.; BEYER, P. Purification and characterization of a NADPH dependent oxidoreductase from chromoplast of *Narcissus pseudonarcissus*: a redox-mediator possibly involved in carotene desaturation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, p. 389-398, 1992.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Ecologia microbiana**. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1998. 488 p.

MOBOT. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em: <[http://www.mobot.org/gardeninghelp/PlantFinder/plant.asp?code=B138#lbl\\_culture](http://www.mobot.org/gardeninghelp/PlantFinder/plant.asp?code=B138#lbl_culture)>. Acesso em: 01 abr. 2009.

MITCHELL, G. et al. Mesotrione: a new selective herbicide for use in maize. **Pest Management Science**, v. 57, p. 120-128, 2001.

MOESBY, L. et al. Dry and moist heat sterilization cannot inactivate pyrogenicity of Gram positive microorganisms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 26, p. 318-323, 2005.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: UFLA, 2002. 626 p.

NORRIS, S. R.; BARRETTE, T.; DELLAPENNA, D. Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastoquinone as an essential component of phytoene desaturation. **The Plant Cell**, v. 7, p. 2139-2149, 1995.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S. **Introdução ao controle químico**. Disponível em: <[http://www.dag.uem.br/napd/disciplinas/atualizacao/graduacao/cien\\_plan\\_dan/cap\\_6.pdf](http://www.dag.uem.br/napd/disciplinas/atualizacao/graduacao/cien_plan_dan/cap_6.pdf)>. Acesso em : 20 jun. 2009.

PANNACCI, E.; COVARELLI, G. Efficacy of mesotrione used at reduced doses for post-emergence weed control in maize (*Zea mays* L.). **Crop Protection**, v. 28, p. 57-61, 2009.

PETRINI, O. **Fungal endophytes of tree leaves**. In: ANDREWS, J. H.; HIRANO, S. S. (Eds.). New York: Springer-Verlag, 1991, p. 179-197.

POCINHO, M.; FIGUEIREDO, J. P. **Estatística e Bioestatística**. Madeira, 2004. 139 p.

PROCÓPIO, S.O. et al. Plant selection with potential for phytoremediation of soils contaminated with trifloxysulfuron sodium. **Planta Daninha**, v. 22, n. 2, p. 315-322, 2004.

REIMER, L.G.; CARROLL, K.C. Procedures for the storage of microorganisms. In: MURRAY, P. R. (ed.) **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, 2003. p. 67-73.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida Diuron. **Scientia Agricola**, v. 57, n. 4, 2000.

SANDMANN, G.; BÖGER, P. Phytoene desaturase as target for bleaching herbicides. In: ROE, R. M.; BURTON, J. D.; KUHR, R. J. (Eds.) **Herbicide activity: toxicology, biochemistry, and molecular biology**. Amsterdam: IOS Press, 1997. p. 1-10.

SERRE, L. et al. Crystal structure of *Pseudomonas fluorescens* 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase: an enzyme involved in the tyrosine degradation pathway. **Structure**, v. 7, n. 8, p. 977-988, 1999.

SILVA, R. G. et al. Produtividade de variedades de milho nos sistemas de cultivo orgânico e convencional. **Caatinga**, v. 21, n. 3, 2008.

SPADOTTO, C. A. **Uso de Herbicidas no Brasil**. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, 2002. Disponível em: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/>. Acesso em: 21 jun. 2009.

STROBEL, G. A. et al. Taxol from fungal endophytes and the issue of biodiversity. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 17, p. 417-423, 1996.

STROBEL, G. A.; LONG, D. M. Endophytic microbes embody pharmaceutical potential. **American Society for Microbiology News**, v. 64, p. 263-268, 1998.

SUTTON, P. et al. Activity of mesotrione on resistant weeds in maize. **Pest Management Science**, v. 58, n. 9, p. 981-984, 2002.

SYNGENTA. Ficha de dados de segurança - Callisto. Disponível em: <http://www.syngenta.pt/docs/produtos/sec/callisto.pdf>. Acesso em: 21 jun. 2009.

TER HALLE, A.; DRNCOVA, D.; RICHARD, C. Phototransformation of the herbicide sulcotrione on maize cuticular wax. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 9, p. 2989-2995, 2006.

TER HALLE, A.; RICHARD, C. Simulated solar light irradiation of mesotrione in natural Waters. **Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 3842-3847, 2006.

TURNBULL, G. et al. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, puhA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 5, p. 2270-2275, 2001.

UETA, J. et al. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação**: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. Disponível em: [http://www.bioteecnologia.com.br/bio/10\\_i.html](http://www.bioteecnologia.com.br/bio/10_i.html). Acesso em: 06 jun. 2007.

WINN JUNIOR, W. et al. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. USA: Lippincott Williams e Wilkins, 2006. 1535 p.

ZHOU, J. et al. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 35, p. 915-924, 2003.

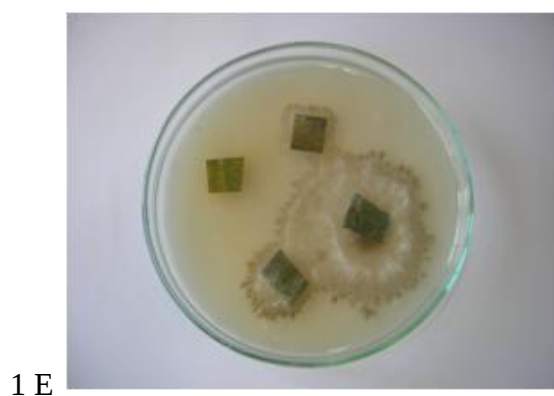
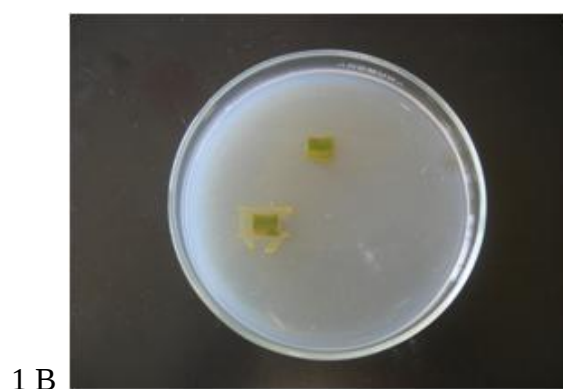
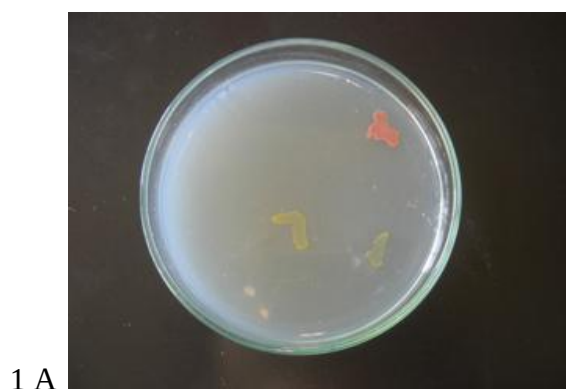
**ANEXO A** - Total de linhagens de microrganismos endofíticos e epifíticos (fungos e bactérias) isoladas de plantações de milho variedade Penta sem tratamento com herbicida mesotrione e milho variedade DKB 234 com tratamento com herbicida mesotrione.

| <b>Plantação sem aplicação de mesotrione</b><br><b>Variedade Milho Penta</b><br><b>Plantio 24/09/2007</b><br><b>Coleta 13 e 23/11/2007 e 4/1/2008</b> |            |             |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|------------|
| Bactérias                                                                                                                                             |            | Fungos      |            |
| 178                                                                                                                                                   |            | 122         |            |
| Endofíticas                                                                                                                                           | Epifíticas | Endofíticos | Epifíticos |
| 64                                                                                                                                                    | 114        | 77          | 45         |

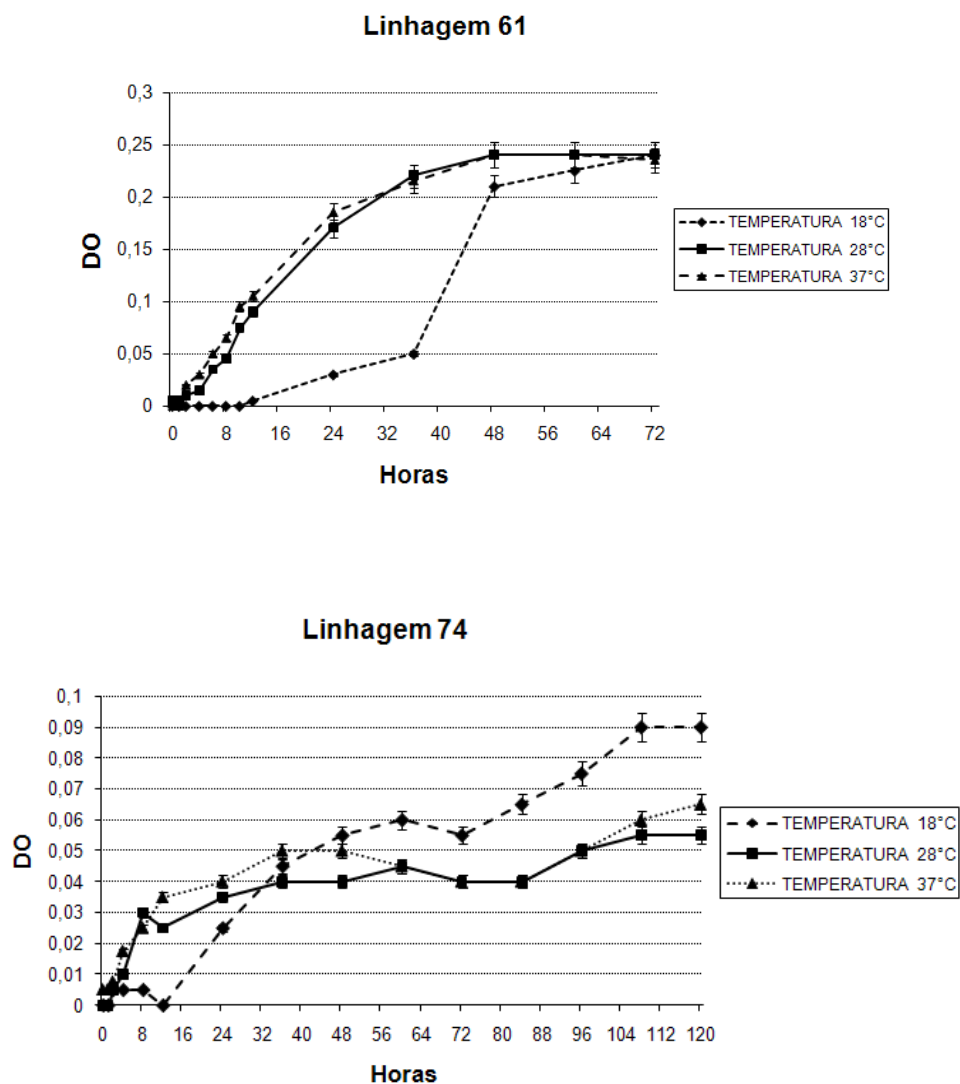
  

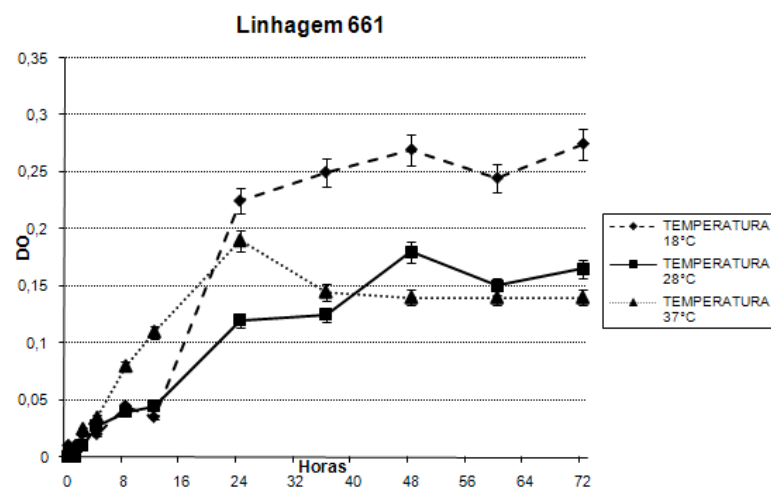
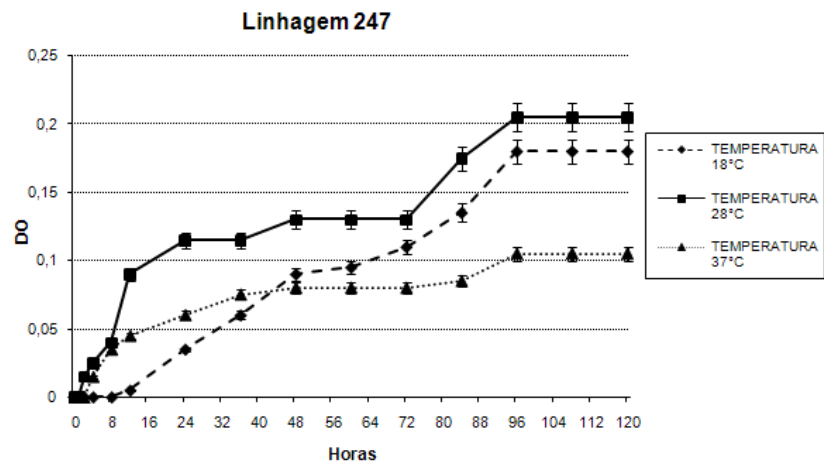
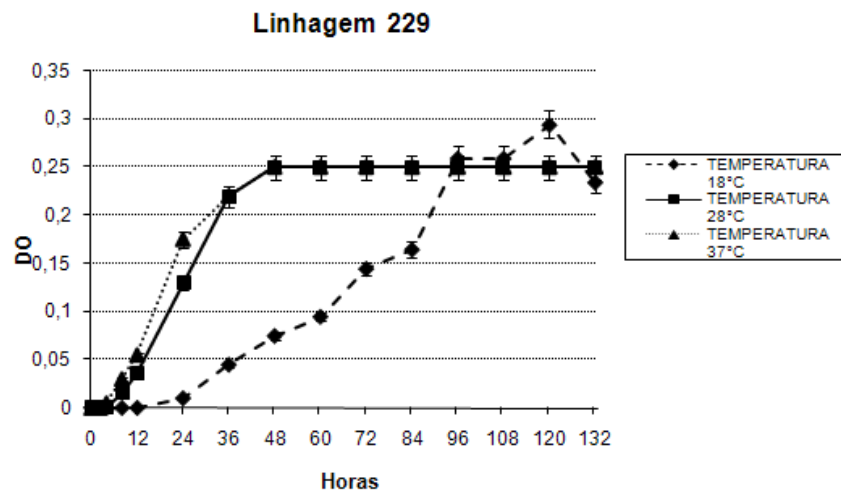
| <b>Plantação com aplicação de mesotrione</b><br><b>Variedade Milho DKB 234</b><br><b>Plantio 24/10/2007</b><br><b>Coleta 30/01/2008</b> |            |             |            |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|-------------|------------|
| Bactérias                                                                                                                               |            | Fungos      |            |
| 169                                                                                                                                     |            | 219         |            |
| Endofíticas                                                                                                                             | Epifíticas | Endofíticos | Epifíticos |
| 37                                                                                                                                      | 132        | 153         | 66         |

**ANEXO B** - Fotos da etapa de isolamento dos microrganismos endofíticos e epifíticos de milho, em MM 28  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de mesotrione. Fotos 1 A – isolamento de linhagens bacterianas e fúngicas epifíticas; 1 B e 1 C – isolamento de linhagens bacterianas endofíticas; 1 D e 1 E – isolamento de linhagens fúngicas endofíticas.



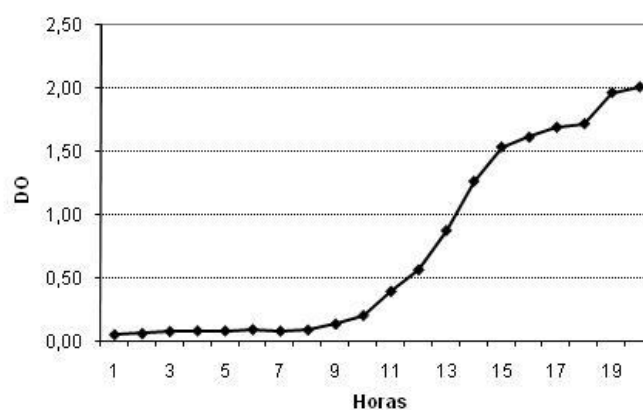
**ANEXO C** – Teste de temperatura das linhagens a 18°, 28° e 37°C, realizados em triplicata, e analisados em espectrofotometro e fotocolorímetro. As amostras foram incubadas sem agitação. Figura 1 A – linhagem 61 (*Micrococcus luteus*); Figura 1 B – linhagem 74; Figura 1 C – linhagem 229 (*Acinetobacter baumannii*); Figura 1 D – linhagem 247; Figura 1 E – linhagem 661.





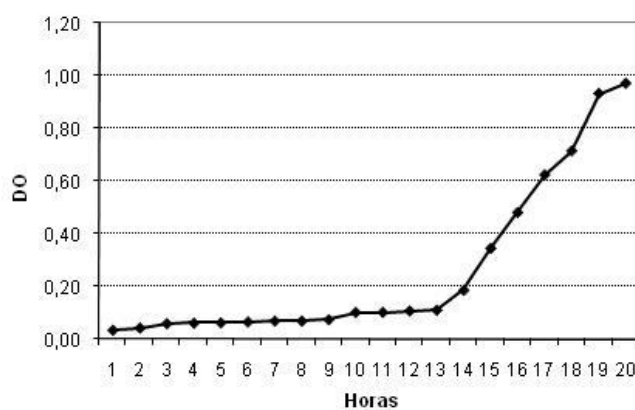
**ANEXO D** - Curvas de crescimento das 5 linhagens bacterianas degradadoras do herbicida mesotrione. Crescimento em meio TSB medido em densidade ótica (DO) ao longo do período de incubação, em horas, em temperatura de 28°C. Curva 1 A – linhagem 61 (*Micrococcus luteus*); curva 1 B – linhagem 74; curva 1 C – linhagem 229 (*Acinetobacter baumannii*); curva 1 D – linhagem 247; curva 1 E – linhagem 661.

**Linhagem 61**



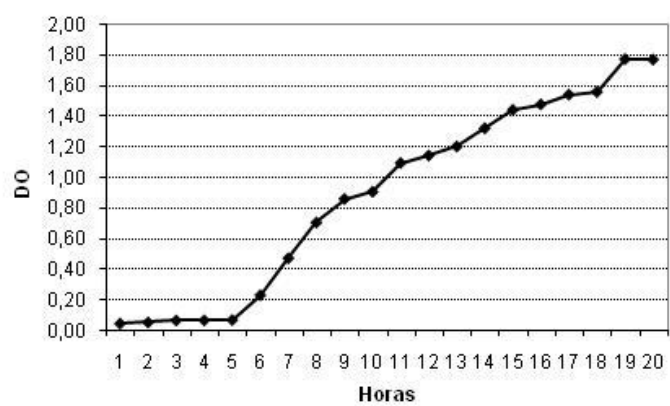
1 A

**Linhagem 74**



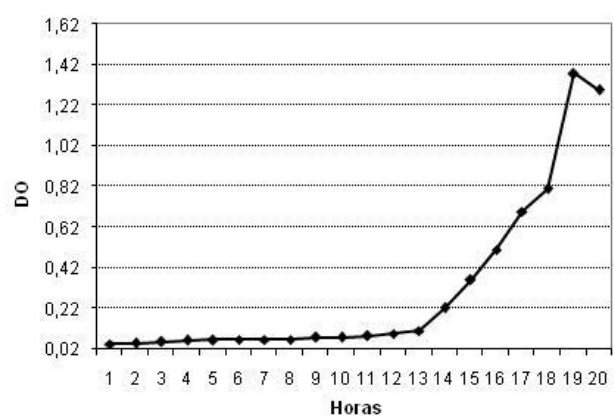
1 B

**Linhagem 229**



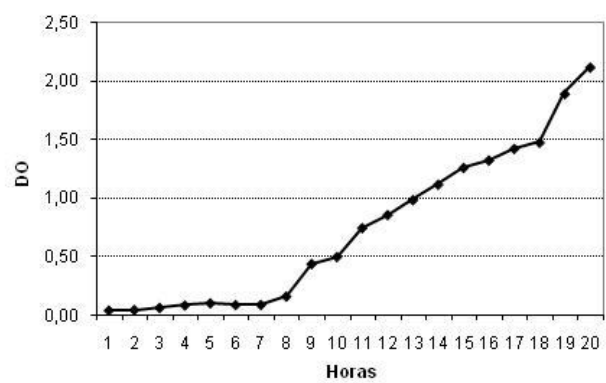
1 C

**Linhagem 247**



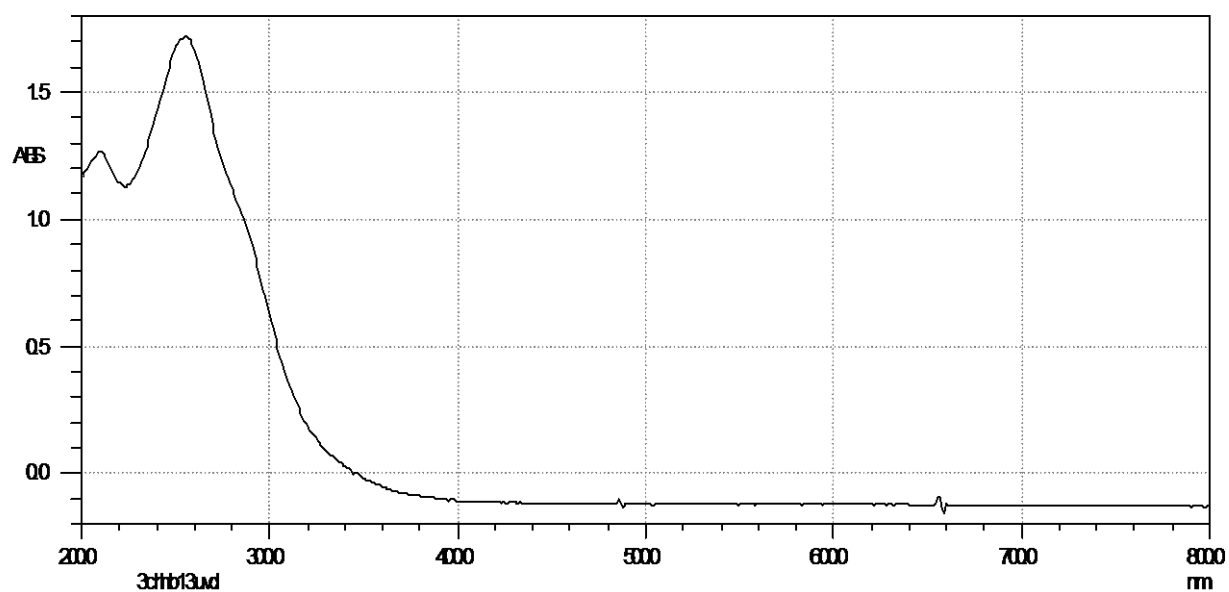
1 D

**Linhagem 661**

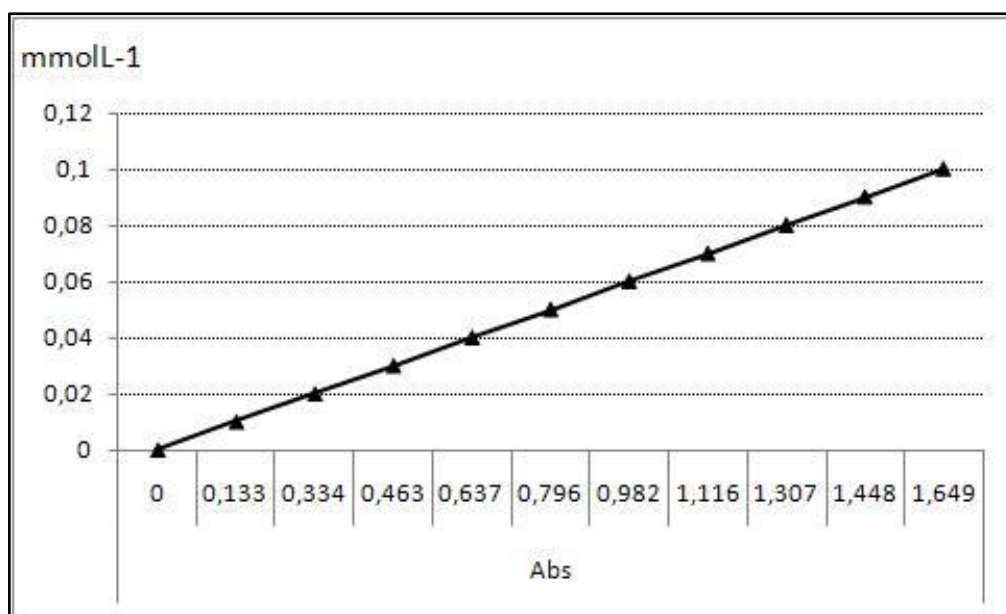


1 E

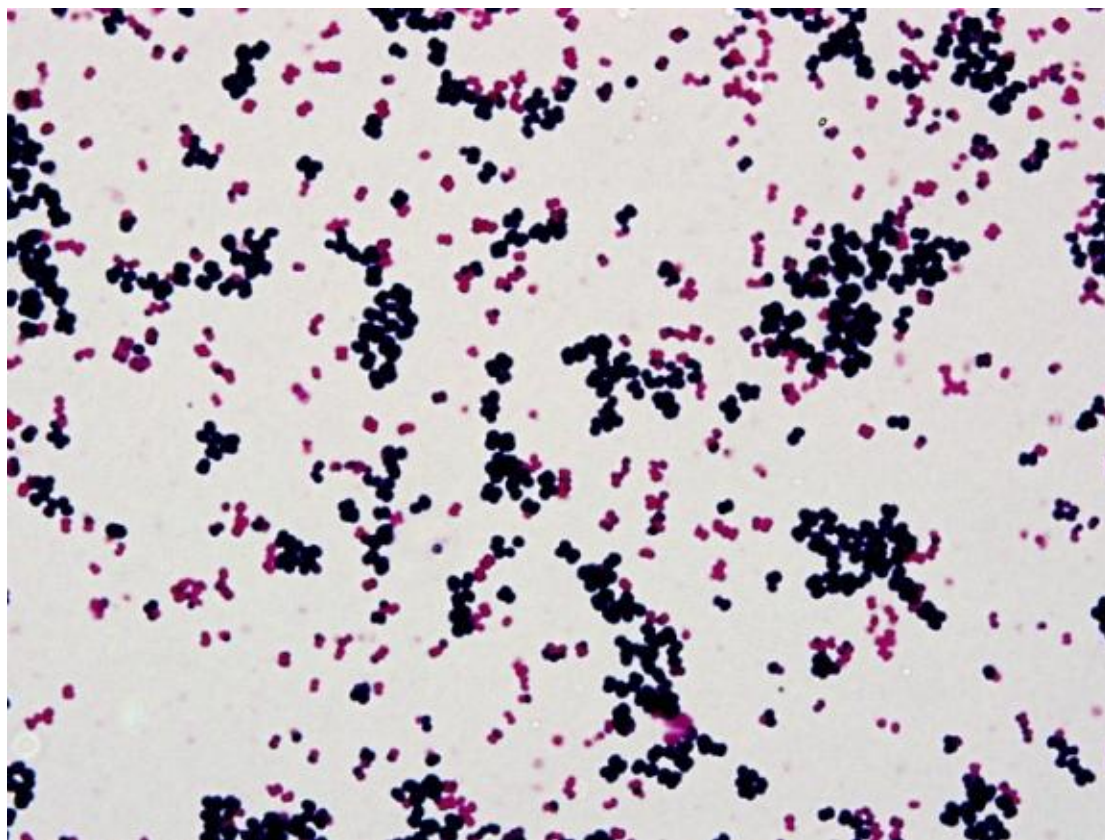
**ANEXO E - Pico de absorção do herbicida mesotrione, em comprimento de onda de 254nm, registrado em espectrofotometria UV-VIS, na concentração de 1,0 mmol.L<sup>-1</sup>.**



**ANEXO F** - Curva de calibração do herbicida mesotrione, feita a partir da concentração de 0 até a 0,12 mmol.L<sup>-1</sup>.



**ANEXO G** - Fotomicrografias (aumento 1000X) da coloração de Gram das linhagens degradadoras do herbicida mesotrione. Foto 1 A – Linhagem 61 (*Micrococcus luteus*); foto 1 B – Linhagem 74; foto 1 C – linhagem 229 (*Acinetobacter baumannii*); foto 1 D – linhagem 247; foto 1 E – linhagem 661.

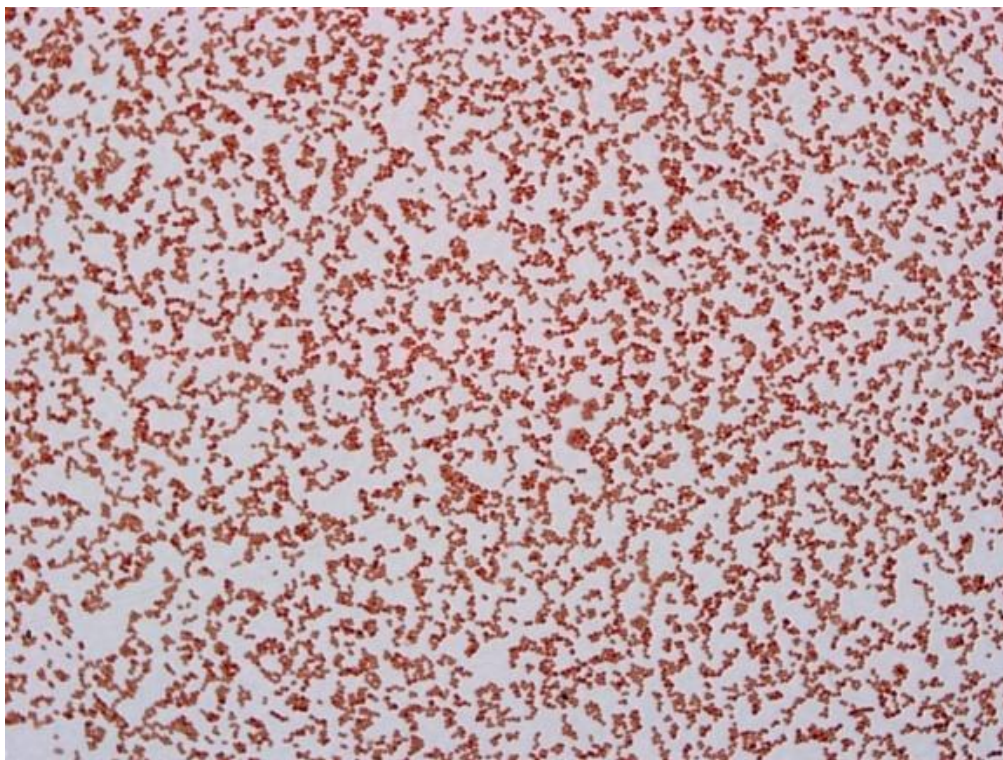


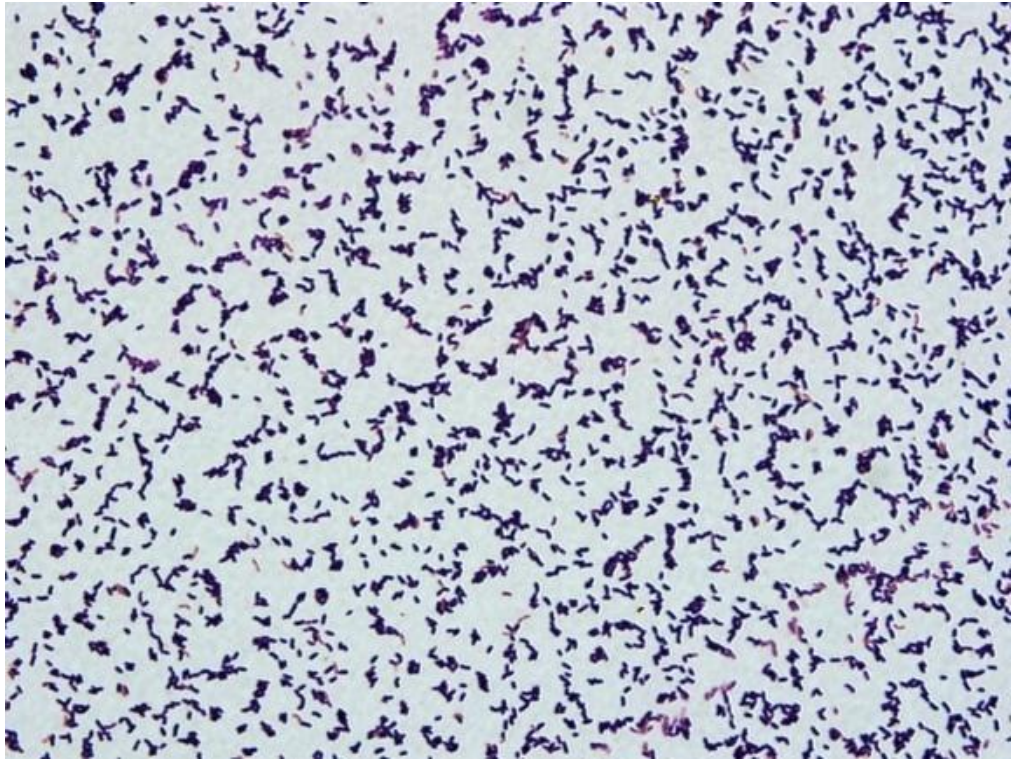
1 A

1 B

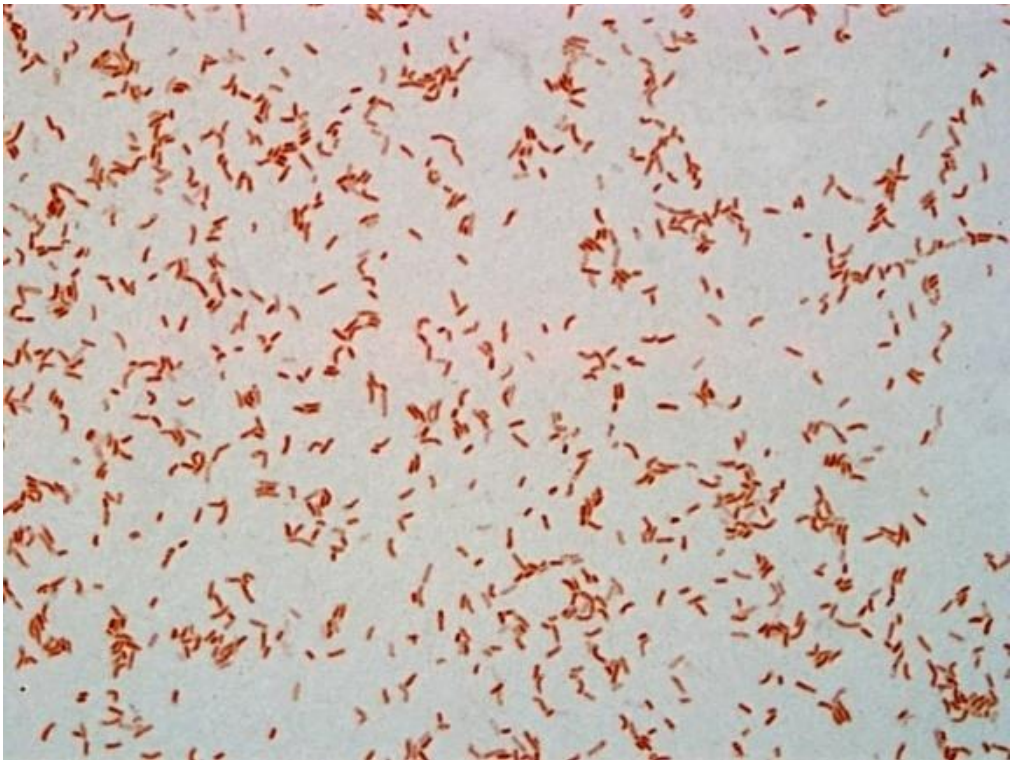


1 C





1 D



1 E

## APÊNDICE A - Tabelas para identificação fenotípica de cocos Gram-positivos.

### Divisão dos cocos Gram positivo pela prova da catalase

| Catalase positivos         | Catalase negativos                                 |
|----------------------------|----------------------------------------------------|
| <i>Staphylococcus</i> spp. | <i>Enterococcus</i> spp.                           |
| <i>Micrococcus</i> spp.    | <i>Streptococcus</i> spp.                          |
| <i>Planococcus</i> spp.    | <i>Aerococcus</i> spp.                             |
| <i>Stomatococcus</i> spp.  | <i>Gemella</i> spp., <i>Leuconostoc</i> spp.       |
|                            | <i>Lactococcus</i> spp., <i>Stomatococcus</i> spp. |

### Identificação simplificada dos cocos Gram positivo de importância clínica

| Gênero                 | Catalase | Motilidade | NaCl 5%  | Oxidase | Aeróbio estrito | Tétrade  |
|------------------------|----------|------------|----------|---------|-----------------|----------|
| <i>Staphylococcus</i>  | +        | neg        | +        | neg     | não             | variável |
| <i>Planococcus</i>     | +        | +          | +        | neg     | +               | variável |
| <i>Micrococcus</i>     | +        | neg        | +        | +       | variável        | variável |
| <i>Enterococcus</i>    | neg      | variável   | +        | neg     | não             | não      |
| <i>Streptococcus</i>   | neg      | neg        | variável | neg     | não             | não      |
| <i>Aerococcus</i>      | neg      | neg        | +        | neg     | não             | +        |
| <i>Stomatococcus</i> * | variável | neg        | neg      | neg     | não             | variável |

\* aderente ao meio

### Provas diferenciais dos generos Catalase positivos

| Gênero                | Motilidade | NaCl 5% | Oxidase | Aeróbio estrito | Tétrade  |
|-----------------------|------------|---------|---------|-----------------|----------|
| <i>Staphylococcus</i> | neg        | +       | neg     | não             | variável |
| <i>Planococcus</i>    | +          | +       | neg     | +               | variável |
| <i>Micrococcus</i>    | neg        | +       | +       | +               | +        |
| <i>Stomatococcus</i>  | neg        | neg     | neg     | não             | variável |

Fonte: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Módulo V.

## APÊNDICE B - Tabelas para identificação fenotípica de bastonetes não fermentadores de glicose.

### TABELAS DE IDENTIFICAÇÃO DOS BNFS

**Tabela 1. Coco-bacilos ou cocos Gram negativo, Oxidase negativa e Motilidade negativa**

| Microorganismos         | OF-glicose       | Cresc. 42°C | Citrato | Gelatina |
|-------------------------|------------------|-------------|---------|----------|
| <i>A. baumannii</i>     | O                | +           | +       | neg      |
| <i>A. calcoaceticus</i> | O                | neg         | +       | neg      |
| <i>A. haemolyticus</i>  | Inerte/oxidativo | neg         | +       | +        |
| <i>A. lwoffii</i>       | inerte           | neg         | neg     | neg      |

### TABELAS DE CONSULTA PARA IDENTIFICAÇÃO DE NÃO FERMENTADORES

#### Oxidase e motilidade negativos

| Microorganismos           | OXI | MOT | Morf. | OF-G             | Cresc. a 42°C | CIT | MAL      | GEL      | HEM      |
|---------------------------|-----|-----|-------|------------------|---------------|-----|----------|----------|----------|
| <i>A. baumannii</i>       | neg | neg | coco  | O                | +             | +   | +        | neg      | neg      |
| <i>A. calcoaceticus</i>   | neg | neg | coco  | O                | neg           | +   | +        | neg      | neg      |
| <i>A. haemolyticus</i>    | neg | neg | coco  | Inerte/oxidativo | neg           | +   | neg      | +        | +        |
| <i>A. lwoffii</i>         | neg | neg | coco  | inerte           | neg           | neg | neg      | neg      | neg      |
| <i>Acinetobacter</i> spp. | neg | neg | coco  | Inerte/oxidativo | neg           | +   | variável | variável | variável |

OXI = oxidase MOT = motilidade Morf = morfologia CIT = citrato MALO = malonato GEL = gelatina  
 OFG = meio de oxidação fermentação da glicose de Leifson HEM = hemólise em ágar sangue

Fonte: Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Módulo V.

## APÊNDICE C - BD Sistemas de Identificação BBL Crystal Enteric/Nonfermenter ID Kit.

Reagentes e Princípios dos Testes Utilizados no Sistema BBL Crystal E/NF ID

| Localização no Painel | Princípio ativo | Código | Qtd. Aprox. (g/10 mL) | Pos.            | Neg.             | Princípio (Referência)                                                                                                          |
|-----------------------|-----------------|--------|-----------------------|-----------------|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4A                    | Arabinose       | ARA    | 3,5                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho | A utilização dos hidratos de carbono origina a diminuição do pH e a alteração do indicador (Vermelho de fenol). <sup>7-10</sup> |
| 4B                    | Manose          | MNS    | 3,0                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4C                    | Sacarose        | SUC    | 2,8                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4D                    | Melibiose       | MEL    | 1,0                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4E                    | Ramnose         | RHA    | 3,0                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4F                    | Sorbitol        | SOR    | 3,5                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4G                    | Manitol         | MNT    | 1,8                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4H                    | Adonitol        | ADO    | 2,5                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4I                    | Galactose       | GAL    | 1,5                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |
| 4J                    | Inositol        | INO    | 1,3                   | Dourado/Amarelo | Laranja/Vermelho |                                                                                                                                 |

Reagentes e Princípios dos Testes Utilizados no Sistema BBL Crystal E/NF ID (continuação)

| Localização no Painel | Princípio ativo                      | Código | Qtd. Aprox. (g/10 mL) | Pos.                   | Neg.               | Princípio (Referência)                                                                                                                  |
|-----------------------|--------------------------------------|--------|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 2A                    | p-n-p-fosfato                        | PHO    | 0,025                 | Amarelo                | Incolor            | A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor ou do éster de fosfato liberta o p-nitrofenol amarelo. <sup>1-5</sup> |
| 2B                    | p-n-p- $\alpha$ - $\beta$ -glucósido | BGL    | 0,025                 | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2C                    | p-n-p- $\beta$ -galactósido          | NPG    | 0,06                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2D                    | Prolina nitroanilido                 | PRO    | 0,07                  | Amarelo                | Incolor            | A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. <sup>1-5</sup>                               |
| 2E                    | p-n-p bis-fosfato                    | BPH    | 0,02                  | Amarelo                | Incolor            | A hidrólise enzimática do glicosídeo substituído por aril incolor ou do éster de fosfato liberta o p-nitrofenol amarelo. <sup>1-5</sup> |
| 2F                    | p-n-p-xilósido                       | BXY    | 0,03                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2G                    | p-n-p- $\alpha$ -arabinósido         | AAR    | 0,03                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2H                    | p-n-p-fosforilcolina                 | PHC    | 0,03                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2I                    | p-n-p- $\beta$ -glucuronídeo         | GLR    | 0,02                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 2J                    | p-n-p-N-acetil-glucosaminídeo        | NAG    | 0,04                  | Amarelo                | Incolor            |                                                                                                                                         |
| 1A                    | $\gamma$ -L-glutamil                 | GGL    | 0,03                  | Amarelo p-nitroanilido | Incolor            | A hidrólise enzimática do substrato amida incolor liberta a p-nitroanilina de cor amarela. <sup>1-5</sup>                               |
| 1B                    | Esculina                             | ESC    | 0,14                  | Castanho/Bordeaux      | Transparente/Palha | Na presença do ião férrico, a hidrólise da esculina produz um precipitado preto. <sup>11</sup>                                          |
| 1C                    | p-nitro-DL-fenilalanina              | PHE    | 0,1                   | Dourado/Laranja escuro | Amarelo            | Na presença do ião férrico, a desaminação oxidativa da fenilalanina produz uma cor castanha. <sup>7,11</sup>                            |
| 1D                    | Ureia                                | URE    | 0,2                   | Aqua/Azul              | Amarelo/Verde      | A hidrólise da ureia e a amônia resultante alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). <sup>7,11,12</sup>                    |
| 1E                    | Glicina                              | GLY    | 0,7                   | Aqua/Azul              | Amarelo/Verde      | A degradação da glicina produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). <sup>13</sup>           |
| 1F                    | Citrato                              | CIT    | 0,8                   | Aqua/Azul              | Amarelo/Verde      | A utilização do citrato produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). <sup>7,14</sup>         |
| 1G                    | Ácido malónico                       | MLO    | 1,5                   | Aqua/Azul              | Amarelo/Verde      | A utilização do malonato produz metabolitos alcalinos que alteram a cor do indicador de pH (Azul de bromotimol). <sup>11</sup>          |
| 1H                    | Cloreto de tetrazólio trifênil       | TTC    | 0,15                  | Rosa/Vermelho*         | Transparente       | A redução do composto tetrazólio origina a formação de um composto de cor vermelha. <sup>13</sup>                                       |
| 1I                    | Arginina                             | ARG    | 1,5                   | Vermelho/Púrpura       | Amarelo/Castanho   | O catabolismo anaeróbico origina um aumento do pH e a alteração de cor do indicador (Violeta de bromocresol). <sup>7,15</sup>           |
| 1J                    | Lisina                               | LYS    | 0,5                   | Vermelho/Púrpura       | Amarelo/Castanho   |                                                                                                                                         |

\*O precipitado pode ou não ser visível.

**APÊNDICE D** - Esquema resumido para diferenciação de espécies do gênero *Micrococcus*.

| Espécies              | Pigmento predominante | Crescimento ágar Citrato Simmons | Acetoína | Redução nitrato | Oxidase | Ácido aerobico de glicose | Susceptibilidade a lisozima | Crescimento a 37°C |
|-----------------------|-----------------------|----------------------------------|----------|-----------------|---------|---------------------------|-----------------------------|--------------------|
| <i>M. luteus</i>      | Y>CW                  | -                                | -        | ->+             | +/-     | -                         | S                           | +                  |
| <i>M. lylae</i>       | CW, U                 | -                                | ->+      | ->+             | +/-     | -                         | SR                          | +                  |
| <i>M. varians</i>     | Y                     | +>+/-                            | +>-      | +>+             | -/+     | +                         | R                           | +                  |
| <i>M. roseus</i>      | PR>OR                 | ->+                              | +>-      | +>+             | -/+     | +/-                       | SR-R                        | +                  |
| <i>M. agilis</i>      | R                     | ND                               | -        | -               | +       | -                         | R                           | -                  |
| <i>M. kristinae</i>   | PO                    | -                                | +        | ->+             | +/-     | ++                        | R                           | +                  |
| <i>M. nishino</i>     | O                     | -                                | ->+      | +,+,-           | +/-     | ->+                       | SR-R                        | +                  |
| <i>M. Miyaensis</i>   |                       |                                  |          |                 |         |                           |                             |                    |
| <i>M. sedentarius</i> | CW>BY                 | -                                | -        | -               | -       | ->+                       | S-SR                        | +                  |
| <i>M. halobius</i>    | U                     | ND                               | -        | -               | +       | +                         | R                           | +                  |

Um símbolo único indica uma frequência do carácter de cerca de 70-100%; a notação > indica “frequência maior que”; /entre os símbolos indica frequência similar. CW, branco-creme; U, sem pigmento; PR, vermelho pastel; OR, laranja vermelho; R, vermelho; PO, laranja fraco; O, laranja; BY, amarelo manteiga; Y, amarelo. S, suscetível (concentração inibitória mínima, MIC: abaixo de 5 µg.mL<sup>-1</sup>), SR, pouco resistente (MIC: 5-50 µg.mL<sup>-1</sup>); R, resistente (MIC: acima de 100µg.mL<sup>-1</sup>). ++, fortemente positivo; +, positivo; +-, fraco; -, negativo; ND, não determinado.

Adaptado de: KOCUR, M.; KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. The genus *Micrococcus*. In: Prokaryotes, v. 3, p. 961-971, 2006.