

FLAVIO MARQUES LOPES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Klebsiella* DE SOLO
DE CERRADO E O USO DE SUAS ENZIMAS PARA
MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE FUNGICIDAS**

Goiânia
2008

FLAVIO MARQUES LOPES

**ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Klebsiella* DE SOLO
DE CERRADO E O USO DE SUAS ENZIMAS PARA
MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE FUNGICIDAS**

Tese apresentada à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia, área de concentração Biologia Celular e Molecular, da Universidade Federal de Goiás, como exigência para obtenção do título de Doutor em Biologia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Kátia Flávia Fernandes

Goiânia
2008

Dedico este trabalho em especial ao meu Pai, que não está mais entre nós,
mas foi o responsável por este desafio;

Meus Familiares: Mãe, irmã e sobrinho;

Minha Esposa;

Família LQP;

Família SIGMA.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

- ...Inicialmente à Deus pela vida, coragem, paciência e tolerância;**
- ...Aos meus pais, por terem me ensinado o caminho a seguir, pelo incentivo e amor;**
- ...Aos que me apoiaram desde o início, na maratona da vida científica;**
- ...Aos que deram apoio quando precisei;**
- ...Aos que me deram oportunidade de chegar até aqui;**
- ...Aos que me dão forças para seguir a diante;**

Agradeço...

- ...À minha equipe de trabalho, pela ajuda, apoio e descontração;**
- ...Aos que seguraram as pontas nas minhas ausências;**
- ...Aos que acreditaram na minha capacidade;**
- ...Aos que me estimularam a enfrentar este desafio.**

Agradeço enfim, pela compreensão, em todos os momentos da realização deste trabalho.

obrigado, Obrigado e OBRIGADO!!!

*"Seja qual for o seu sonho comece, ousadia tem genialidade, poder e magia."
Johann Goethe 1749-1832*

*"Que eu tenha coragem e força para mudar o que posso mudar, paciência e tolerância para aceitar o que não posso mudar e acima de tudo inteligência para saber a diferença entre as duas situações".
Reinhold Niebuhr 1892-1971*

RESUMO

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Klebsiella* DE SOLO DE CERRADO E O USO DE SUAS ENZIMAS PARA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DE FUNGICIDAS

Flavio Marques Lopes

Orientadora: Profa. Dra. Kátia Flávia Fernandes

Neste trabalho amostras de solo de cerrado provenientes de culturas de soja tratadas com Opera[®] (epoxiconazol e piraclostrobin) foram utilizadas como fonte de microrganismos resistentes ao fungicida. A coleta foi realizada no mês de julho de 2006, em três pontos de área plantada e em duas profundidades, 0 a 20 cm e de 80 cm a 1 m, próximo à rodovia estadual GO-139, no município de São Miguel do Passa Quatro, em uma fazenda modelo produtora de sementes, em que o Opera[®] foi utilizado desde o seu lançamento em 2002. O ponto de coleta foi caracterizado como um local de risco a acidentes ecológicos, apresentando área com atividade agrícola extensiva, uso intenso de defensivos agrícolas, solos com boa taxa de infiltração e armazenamento de água e áreas de declividade. A seleção dos microrganismos foi feita com meio seletivo J. E. sólido - suplementado com 0,1% de Opera[®], com microrganismos coletados na profundidade de 80 cm. Na primeira etapa 9 microrganismos foram isolados e, destes, o microrganismo 1805 foi o que apresentou melhor crescimento em meio seletivo J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] sendo escolhido para o desenvolvimento deste trabalho. A análise por coloração de Gram mostrou que o microrganismo isolado é um bacilococco Gram-negativo com características polimórficas, sendo sensível a todos os antibióticos testados. A identificação bioquímica pelo método de Bactray[®] apresentou correlação a nível de 99% com o gênero *Klebsiella*. Através de identificação molecular pelo gene 16S rDNA foi possível encontrar uma correlação de 99% de similaridade com as espécies *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*. As proteínas secretadas pela *Klebsiella* em meio suplementado com 0,03% de Opera[®] foram precipitadas com acetona, obtendo duas frações protéicas, uma solúvel (FS) e outra insolúvel (FI) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0. Na FS foi encontrada uma oxirredutase da família das peroxidases, que utiliza o peróxido de hidrogênio como

agente oxidante e vários substratos como agentes redutores, apresentando maior atividade para pirogalol, TMB, o-dianizidina e catecol. No cromatograma obtido na separação por exclusão molecular em Sephadex G-100 foram observados dois picos com atividade peroxidásica. O pico 1 apresentou duas bandas em SDS-PAGE, uma mais forte com 39,3 kDa e outra com 24,6 kDa. Na FI foi possível determinar a presença de uma hidrolase, com capacidade de degradação de ligações éster, da família das carboxilesterases – esterase B. A esterase B apresentou atividade contra os substratos caseína (9,3 UE), BApNA (1,31 UE), pNPP (0,01 UE), apresentando 5,4% de inibição com E₆₄, 6,5% de inibição após incubação com coquetel de inibidores contendo AEBSF e 7,5% de inibição após incubação com TLCK. A eletroforese da FI apresentou duas bandas de proteínas com massa molecular de aproximadamente 61,7 kDa para a banda superior e 60,7 kDa para a banda inferior. A caracterização enzimática utilizando pNPP mostrou atividade alta em pH 5,0 e em pH 7,0. A esterase B manteve 100% de atividade após 120 minutos de incubação a 60 °C. A presença de ZnCl₂ aumentou a atividade em 14,2%, FeCl₃ e MnSO₄ não tiveram efeito significativo sobre a atividade e os demais sais, CaCl₂, EDTA, MgSO₄ e CuSO₄ apresentaram um efeito inibitório de 16%, 16%, 23,2% e 40,8% respectivamente, na atividade da enzima. A esterase B apresentou atividade ligeiramente mais alta na presença de DMSO e acetona, e uma redução de até 87% frente ao isopropanol (solvente com menor polaridade). O valor de K_m encontrado utilizando pNPP como substrato foi de 3,4 mmol L⁻¹, com uma V_{máx} de 0,019 UE. Quando o meio seletivo J. E. suplementado com 0,03% de Opera foi tratado com a *Klebsiella* por 120 h, houve uma diminuição 43,7% na absorvância dos compostos com pico a 200 nm, 55,7% a 220 nm e 28,7% a 260 nm. Usando as enzimas secretadas pela *Klebsiella* para tratamento do padrão epoxiconazol a redução da absorvância observada em 200, 220 e 260 nm foi de 99,7%, 95,7% e 99,5% respectivamente. Para o piraclostrobin a redução observada foi de 95,5 e 80,2% nos comprimentos de onda 200 e 260 nm respectivamente.

Palavras-chave: *Klebsiella*. Opera[®]. Piraclostrobin. Epoxiconazol. Peroxidase. Esterase B.

ABSTRACT

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF KLEBSIELLA FROM BRAZILLIAN SAVANNAH SOIL AND THE USE FROM ITS ENZYMES FOR CHEMICAL MODIFICATION OF FUNGICIDES

Flavio Marques Lopes

Adviser: Professora Dra. Kátia Flávia Fernandes

In this research, open ground samples (Brazilian Savannah – Cerrado) proceeding from treated cultures of soy with Opera[®] (epoxiconazol and piraclostrobin) had been used as source of resistant microorganisms to fungicide. The sample were collected in July 2006, in three points of planted area and two depths, 0 to 20 cm, and from 80 cm to 1m, next to the state highway GO-139, in the towns of São Miguel do Passa Quatro, in a producing farm model of soy seeds, where Opera[®] was used since its launching in 2002. The collection point was characterized as a risk place for ecological accidents, presenting area with extensive agriculture activity, intense use of pest management, soil with good level of infiltration and storage of water, and areas of declivity. The microorganism's selection was carried through using selective solid J.E. – supplemented with 0.1% of Opera[®] with microorganisms collected in depth of 80cm. In a previous selection, 9 microorganisms were isolated, and from these, the one that showed a better growth within the selective J.E. liquid – supplemented with 0.03% of Opera[®] (1805) was chosen for the development of this research. The analysis for coloration of Gram-negative showed that the isolated microorganism is one bacillococcus Gram-negative with poliphormic characteristics, being sensible to all the tested antibiotics. Biochemical identification made through the method of Bactray[®], presented a correlation of 99% with the genus *Klebsiella*. Through molecular identification by the gene 16S rDNA, it was possible to find a correlation of 99% of similarity with the species *K.pneumoniae* and *K.oxytoca*. The proteins released by the *Klebsiella* in a supplemented environment with 0.03% of Opera had been precipitated with acetone, obtaining two proteinic fractions, a soluble (FS) and the other insoluble (FI) in a 0,1 mol L⁻¹ phosphate buffer, pH 6.0. In the soluble solution (FS), it was found an oxirredutase from the peroxidases family, which uses hydrogen peroxide as an agent and several substrates as reducing agents,

presenting greater activity for pyrogallol, TMB, o-dianisidine and catechol. In a chromatogram obtained through separation by molecular exclusion in Sephadex G-100, two peaks with peroxidasic activities had been observed. Peak 1 presented two bands in SDS-PAGE, one with 39.3 kDa and another one with 24.6 kDa. In the FI, it was possible to determine the presence of one hydrolysis with capacity to break the bonds between the ester molecule, from the family of carboxylesterases – esterase B. The esterase B presented activity against casein substrates (9.3 UE), BApNA (1.31 UE), pNPP (0.01), presenting 5.4% activity of inhibition after incubation with E₆₄, 6.5% activity of inhibition after incubation with protease inhibitors cocktail containing AEBSF and 7.5% of inhibition after incubation with TLCK. The electrophoreses of FI presented two protein bands with molecular mass of approximately 61.7 kDa for superior band and 60.7 kDa for the inferior band. The enzymatic characterization using pNPP showed high activity in pH 5.0 and pH 7.0. Esterase B kept 100% of activity after 120 minutes of incubation at 60°C. The presence of ZnCl₂, EDTA, MgSO₄ and CuSO₄ had presented an inhibition effect of 16%, 16%, 23.2% and 40.8% respectively, within the enzyme activity. Esterase B slightly presented higher activity in the presence of DMSO and acetone, and a reduction of up to 87% comparing to isopropyl alcohol (lower polarity). The value of K_m using pNPP as substratum was of 3.4 mmol L⁻¹, with a V_{max} of 0.019 UE. When the selective J.E. supplemented with 0.03% Opera was treated with *Klebsiella* for 120 h, it had a reduction of 43.7% in the absorbance of the compounds with a peak of 200 nm, 55.7% - 220 nm and 28.7% - 260 nm. Using released enzymes by *Klebsiella* for treatment of the epoxiconazol standards in the reduction of the absorbance 200, 220 and 260 nm the observed results were 99.7%, 95.7% and 99.5% respectively. Whereas for the pyraclostrobin, the observed reduction were 95.5% and 80.2% for the wave lengths 200 and 260 nm respectively.

Keywords: *Klebsiella*. Opera[®]. Pyraclostrobin. Epoxiconazole, Peroxidase, Esterase B.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Estrutura molecular do epoxiconazol	30
Figura 2.	Estrutura molecular do fungicida piraclostrobin.....	31
Figura 3.	Mapa de posicionamento dos pontos de coleta. Imagem obtida pelo satélite CBERS II, disponibilizada pelo INPE, referente ao mês de julho/2006 (órbita 158, ponto 119).....	47
Figura 4.	Carta-imagem da área de estudo e entorno próximo. Imagem do satélite CBERS II, disponibilizada pelo INPE, referente ao mês de julho/2006 (órbita 158, ponto 119).....	67
Figura 5.	Mapas hipsométrico (A) e de declividade (B) para a área de estudo (município de São Miguel do Passa Quatro)	70
Figura 6.	Mapa de solos para a área de estudo	72
Figura 7.	Crescimento dos microrganismos selecionados em meio de cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] como única fonte nutricional.....	76
Figura 8.	Crescimento do microrganismo 1805 em meio de cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] como única fonte nutricional.....	78
Figura 9.	Microscopia óptica do microrganismo 1805 em (a1) caldo nutriente, (a2) meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] como única fonte nutricional, e (a3) meio nutriente	79

- Figura 10.** Eletroforese do DNA cromossomal e fração amplificada (rDNA 16S). Raia 1 – marcador de DNA (500 pb a 10.000 pb); Raia 2 – DNA cromossomal; Raia 3 – fração amplificada83
- Figura 11.** Seqüência de nucleotídeos obtidos na amplificação do gene 16S rDNA do microrganismo 1805.....84
- Figura 12.** Alinhamento entre as seqüências de nucleotídeos do gene 16S rDNA do isolado 1805 com *Klebsiella* sp, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*86
- Figura 13.** Árvore filogenética baseada na análise da seqüência de nucleotídeos do gene 16S rDNA do microrganismo 1805. Os números de depósito das seqüências no GenBank encontram-se entre parênteses. A escala Bar denota uma substituição de 10 nucleotídeos a cada 100 nucleotídeos87
- Figura 14.** Cromatografia de exclusão molecular – Sephadex-G100. Teste de atividade com pirogalol e peróxido de hidrogênio. Eluição: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹; vazão: 500 µL min⁻¹; volume por tubo: 1 mL.....93
- Figura 15.** Eletroforese SDS-PAGE, sob condições desnaturantes de amostras secretadas pelo microrganismo 1805 em meio seletivo. Amostras: Raia R 1 – marcadores moleculares; R 2 – extrato bruto; R 3 – Fração concentrada dos tubos 63 a 6994
- Figura 16.** Análise de purificação da esterase do isolado 1805 em eletroforese SDS-PAGE 12%. Raia 1 – Marcador molecular;

	Raia 2 – perfil protéico; Raia 3 – proteína parcialmente purificada.....	96
Figura 17.	Efeito do pH na atividade da enzima.....	97
Figura 18.	Efeito da temperatura na estabilidade da enzima após 30 min de incubação.....	98
Figura 19.	Termoestabilidade da esterase B presente na FI.....	99
Figura 20.	Efeito dos sais na inibição e ativação da esterase B da FI	100
Figura 21.	Atividade da esterase da FI frente a diferentes solventes orgânicos – os solventes encontram-se em ordem de polaridade	101
Figura 22.	Relação entre concentração do pNPP e a velocidade de reação. (A) Determinação estimada do K_m e $V_{m\acute{a}x}$. (B) Lineweaver-Burk	103
Figura 23.	Espectro de absorvância dos padrões epoxiconazol 45,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e piraclostrobin 103 $\mu\text{mol L}^{-1}$	106
Figura 24.	Estrutura molecular dos padrões epoxiconazol e piraclostrobin	106
Figura 25.	Espectro de absorção do meio J. E. suplementado com Opera [®] após 120 horas. Ação da <i>Klebsiella</i> frente ao — meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] e — meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] sem microrganismo (meio controle, constituído de epoxiconazol 45,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e piraclostrobin 103,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$).....	107
Figura 26.	Principais grupos químicos do epoxiconazol e piraclostrobin	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Microrganismos envolvidos na biodegradação de poluentes.....	36
Tabela 2.	Ensaio bioquímico realizado no microrganismo selecionado.....	49
Tabela 3A.	Isolamento dos microrganismos resistentes ao Opera® à profundidade de 0 a 20 cm.....	73
Tabela 3B.	Isolamento dos microrganismos resistentes ao Opera® à profundidade de 80 cm a 1 m.....	74
Tabela 4.	Crescimento de colônias em Meio de Cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera®	75
Tabela 5.	Comparação entre as características bioquímicas do isolado 1805 com <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> , <i>Klebsiella oxycota</i> e <i>Klebsiella planticola</i>	81
Tabela 6.	Sensibilidade do isolado 1805 aos antibióticos testados.....	82
Tabela 7.	Teor de proteínas secretadas no meio seletivo J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera®	89
Tabela 8.	Atividade enzimática da fração solúvel frente a variados substratos.....	91
Tabela 9.	Atividade da esterase frente a diferentes substratos.....	94
Tabela 10.	Ação dos inibidores enzimáticos frente à ação das enzimas da fração insolúvel	95
Tabela 11.	Degradação do epoxiconazol e piraclostrobin por ação das enzimas secretadas pela <i>Klebsiella</i>	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF	Ácido 4-(2-Aminoetil) Benzenosulfonil Fluorídrico
AGE	Assesoria de Gestão Estratégica
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BApNA	Benzoil-DL-Arginina-p-Nitroanilida
BASF	Badische Anilin-Und Soda-Fabrik the Chemical Company
BSA	Albumin Sérica Bovina
CBERS II	Satélite Sino-Brasileiro de Recursos Terrestres II
CEPEA	Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada
°C	Temperatura em graus-Celsius
DFCs	Doenças de Final de Ciclo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO	Densidade Óptica
EDTA	Ácido Etilenotiaminotetracético
EU	Unidade de Enzima
FI	Fase Insolúvel
FS	Fase Solúvel
g L ⁻¹	Gramas por Litro
GPS	Sistema de Posicionamento Global
h	Hora
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
mA	Miliampére
MAPA	Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetros
mmol L ⁻¹	Milimol por Litro
mol L ⁻¹	Mol por Litro
µL	Microlitro
nm	Nanômetros
pM	PicoMolar
pNNP	p-Nitrofenilpalmitato
p/v	Peso/Volume
rDNA	Ácido Desoxirribonucléico Ribossomal
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	rotações por minuto
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
seg	Segundos
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TLCK	N _α -Tosil-L-Lisina Clorometil Cetona
TMB	Tetrametil Benzidina
UFCs	Unidades Formadoras de Colônias
UV	Ultravioleta
V	Volts
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	AGRONEGÓCIO.....	22
1.2	PRODUTIVIDADE DA SOJA	25
1.3	TECNOLOGIAS AGRÍCOLAS	28
1.4	SAÚDE AMBIENTAL.....	33
1.5	BIORREMEDIAÇÃO	34
2	OBJETIVOS	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAIS	40
3.1	MEIOS DE CULTURA.....	40
3.1.1	Caldo nutriente	40
3.1.2	Caldo nutritivo	40
3.1.3	Meio nutriente	40
3.1.4	Meio de cultura seletivo J. E. sólido (JONES; EDINGTON, 1968) - suplementado com Opera[®]	41
3.1.5	Meio NFb (DÖBEREINER et al., 1995)	41
3.1.6	Meio de cultura J. E. líquido (JONES; EDINGTON, 1968) - suplementado com Opera[®]	42
3.2	TAMPÕES.....	42

3.2.1	Tampão TEN	42
3.2.2	Tampão TR.....	43
3.2.3	Tampão TEB5X.....	43
3.2.4	Tampão SM	43
3.2.5	Tampão de amostra para eletroforese	43
3.3	GEL DE AGAROSE	44
3.4	GÉIS DE POLIACRILAMIDA.....	44
3.4.1	Gel de concentração (5%)	44
3.4.2	Gel de separação (12%).....	44
3.4.3	Solução fixadora	45
3.5	REAGENTES E MATERIAIS PRONTOS PARA USO	45
4	METODOLOGIA	46
4.1	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	46
4.1.1	Coleta do solo	46
4.1.2	Isolamento e contagem de colônias.....	46
4.1.3	Seleção de microrganismos resistentes ao Opera [®]	48
4.1.4	Caracterização morfológica do microrganismo selecionado	48
4.1.5	Identificação e caracterização bioquímica.....	49
4.1.6	Testes de susceptibilidade a antibióticos.....	50
4.1.7	Identificação molecular	50
4.1.7.1	Extração do DNA cromossomal	51
4.1.7.2	Eletroforese em gel de agarose	51
4.1.7.3	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	52
4.1.7.4	Seqüenciamento do gene rDNA 16S	52

4.1.8	Manutenção das colônias	53
4.2	ESTUDO DAS ENZIMAS SECRETADAS PELO ISOLADO	
	1805 - <i>Klebsiella</i>	54
4.2.1	Perfil protéico	54
4.2.1.1	Dosagem do teor protéico	54
4.2.1.2	Determinação do perfil protéico	55
4.2.1.3	Fracionamento das proteínas secretadas por precipitação com acetona	56
4.2.1.4	Avaliação enzimática da Fração Solúvel (FS).....	56
4.2.1.4.1	Lignina Peroxidase	56
4.2.1.4.2	Catalase	56
4.2.1.4.3	Lacase	57
4.2.1.4.4	Lipoxigenase	57
4.2.1.4.5	Polifenol-oxidase	57
4.2.1.4.6	Peroxidase - fenol	57
4.2.1.4.7	Peroxidase - orto-dianisidina	58
4.2.1.4.8	Peroxidase - catecol	58
4.2.1.4.9	Peroxidase - guaiacol	58
4.2.1.4.10	Peroxidase - pirogalol	59
4.2.1.4.11	Peroxidase - resorcinol e hidroquinona	59
4.2.1.4.12	Peroxidase - tetrametil benzidina - TMB	59
4.2.1.4.13	Esterase - p-nitrofenilpalmitato (pNPP)	60
4.2.1.4.14	Amidase - benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida - BApNA	60
4.2.1.4.15	Amidase - caseína	60
4.2.1.5	Cromatografia da Fração Solúvel em Sephadex – G100.....	61

4.2.1.6	Avaliação enzimática da Fração Insolúvel (FI).....	61
4.2.1.6.1	Atividades enzimáticas.....	61
4.2.1.6.2	Avaliação do efeito dos inibidores de proteases.....	61
4.2.1.6.3	Solubilização da Fração Insolúvel.....	62
4.2.1.6.4	Preparo da FI para eletroforese.....	63
4.2.2	Caracterização enzimática da esterase B da FI.....	63
4.2.2.1	Efeito do pH na atividade da esterase B.....	63
4.2.2.2	Efeito da temperatura na estabilidade da esterase B.....	63
4.2.2.3	Efeito de solventes orgânicos e sais na atividade enzimática.....	64
4.2.2.4	Especificidade enzimática (K_m).....	64
4.2.3	Estudo da degradação do Opera[®].....	65
4.2.3.1	Caracterização espectrofotométrica do fungicida Opera [®] e seus componentes ativos.....	65
4.2.3.2	Ação do microrganismo na degradação do fungicida.....	65
4.2.3.3	Ação das oxidoredutases e esterase B da FI e FS na degradação do epoxiconazol e piraclostrobin.....	66
4.2.3.3.1	Ação das enzimas da FS e FI sobre o epoxiconazol.....	66
4.2.3.3.2	Ação das enzimas da FS e FI sobre o piraclostrobin.....	66
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA.....	67
5.1.1	Localização.....	67
5.1.2	Cobertura vegetal e uso do solo.....	68
5.1.3	Relevo.....	69
5.1.4	Solos.....	71

5.2	SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO.....	73
5.2.1	Isolamento e contagem de colônias.....	73
5.2.2	Seleção e microrganismos resistentes ao Opera®	75
5.2.3	Caracterização morfológica do microrganismo selecionado	78
5.2.4	Identificação e caracterização bioquímica.....	79
5.2.5	Testes de susceptibilidade a antibióticos.....	82
5.2.6	Identificação molecular	83
5.3	ESTUDO DAS ENZIMAS SECRETADAS PELO ISOLADO	
	1805 - <i>Klebsiella</i>	88
5.3.1	Teor de proteínas secretadas	88
5.3.2	Avaliação enzimática das frações	89
5.3.2.1	Avaliação da Fração Solúvel (FS).....	89
5.3.2.2	Avaliação da Fração Insolúvel (FI).....	94
5.3.2.2.1	<i>Eletroforese da fração insolúvel</i>	96
5.4	CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ESTERASE B DA FI.....	97
5.4.1	Efeito do pH na atividade da esterase B da FI.....	97
5.4.2	Efeito da temperatura na estabilidade da esterase B	98
5.4.3	Efeito dos sais e solventes orgânicos sobre a esterase B da FI.....	100
5.4.4	Especificidade enzimática (K_m).....	103
5.5	ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO OPERA®	104
5.5.1	Caracterização espectrofotométrica do fungicida Opera® e seus componentes ativos	104
5.5.2	Ação do microrganismo na degradação do fungicida	107

5.5.3	Ação das enzimas secretadas pela <i>Klebsiella</i> na degradação do epoxiconazol e piraclostrobin	108
6	CONCLUSÃO	112
7	PERSPECTIVAS.....	116
	REFERÊNCIAS	117
	ANEXOS	127

1 INTRODUÇÃO

A soja possui uma posição de destaque no setor agrícola brasileiro, sendo umas das culturas com maior área cultivada, ocupando cerca de 57% de toda a área de plantio de culturas temporárias no Brasil. Em 2005, o país produziu mais de 50 milhões de toneladas deste grão (EMBRAPA, 2007a) e na safra seguinte, 2006/07, foram plantados mais de 20 milhões de hectares de soja. A produção na safra de 2007/08 apresentou um aumento de 2,6 % na área plantada em relação à safra anterior, chegando a 21 milhões de hectares. A produção de soja nesta safra atingiu 60 milhões de toneladas, o que representa 41,8% de toda a produção brasileira de grãos, que deverá atingir 143,3 milhões de toneladas (CONAB, 2008).

Em contradição ao aumento da área plantada, observou-se na safra 2007/08 um decréscimo de 0,1% na produtividade, principalmente em função do evento climático La Niña, que traz como principais alterações os problemas de seca e de baixa temperatura observados nos meses de janeiro e fevereiro. Apesar da redução na produtividade, espera-se que a produção de soja mantenha-se alta em função da área plantada, o que reflete a expectativa do agricultor em relação aos bons preços do produto, aumento da demanda no mercado externo e as condições climáticas que favorecem lavouras deste grão nos demais meses do ano (GODOY et al., 2007; CONAB, 2008).

Neste cenário a Região Centro-Oeste se posiciona como a maior produtora de soja no País, participando no cenário brasileiro com 29 milhões de toneladas, o que representa 48,5% da produção nacional. A região sul aparece em

segundo lugar, com 21 milhões de toneladas, ou 34,5% da produção nacional (CONAB, 2008).

A soja é uma oleaginosa da família *Fabaceae*, originária da China, que foi introduzida no território brasileiro em 1882, na Bahia. Essa oleaginosa ficou por anos sem representatividade no cenário econômico nacional, começando a ganhar importância apenas a partir de 1940. Em 2004 tornou-se o maior destaque do agronegócio brasileiro, assumindo a liderança no mercado internacional do complexo soja – grão, farelo e óleo –, com exportações alcançando US\$ 8,1 bilhões (CONAB, 2006).

A cultura de soja representa um dos mais fortes elementos da economia brasileira, que transcende os patamares da economia rural. Em função do seu elevado valor econômico e do desenvolvimento de cultivares cada vez mais adaptados aos climas do país, a cultura da soja experimenta uma rápida expansão, avançando para áreas agrícolas até pouco tempo consideradas marginalizadas (MARTINS, 2003).

1.1 AGRONEGÓCIO

No cenário mundial, os avanços mais expressivos na agricultura ocorreram a partir do século XVIII, com as Revoluções Agrícolas na Europa. No final do século XIX e até meados do século XX, houve o surgimento dos primeiros fertilizantes artificiais e organossintéticos (biocidas), além de sementes melhoradas geneticamente, produzidos em escala industrial. Esses avanços permitiram a melhoria dos produtos oferecidos e, por conseguinte, significativo aumento da

produtividade agrícola nos países europeus (FOLADORI, 2001; MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

No Brasil, entre 1850 e 1930, dois métodos agrícolas eram utilizados: a agricultura extensiva, praticada em latifúndios com grandes extensões de terra, formada por monocultura e elevada independência operacional; e a agricultura de subsistência, praticada em pequenas extensões de terras com policultura. É válido ressaltar que até meados de 1930 não se observou grande expansão dos complexos agroindustriais brasileiros, sendo que o processo de tecnificação da base produtiva se iniciou na década de cinquenta e ocorreu com a implantação dos meios de produção (MARAFON, 1998; MONTOYA, 2002).

A partir de meados da década de sessenta teve início a modernização da agricultura brasileira com base nos princípios da Revolução Verde. Os sistemas produtivos agrícolas sofreram um rápido processo de modernização, cujos reflexos foram os ganhos de produtividade através da incorporação de novos fatores de produção, tais como uso de sementes melhoradas, adubos químicos, defensivos e maquinaria agrícola. No final da década de sessenta, a modernização do setor agrícola traduziu-se na consolidação do modelo de complexos agroindustriais ou de agronegócio (PARRÉ; GUILHOTO, 2001; MONTOYA, 2002; MORAGAS; SCHNEIDER, 2003; BALSAN, 2006).

O agronegócio é o maior negócio mundial e brasileiro, representando no cenário mundial, uma geração de aproximadamente U\$ 6,5 trilhões/ano. Constitui um dos setores mais dinâmicos da economia brasileira e de acordo com pesquisa do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (Cepea), este setor representou PIB, em 2006, de R\$ 355 bilhões. Cada vez mais, o agronegócio brasileiro ganha importância econômico-social e a cada dia se transforma, em face

das tendências do consumo e da indústria de alimentos (STEFANELO, 2002; BARROS, 2006; FERREIRA, 2007). Nos últimos anos, o agronegócio nacional provou ter competitividade e potencial, contribuindo consideravelmente para saldos positivos da balança comercial e para o aumento da competitividade do país no mercado externo (CONTINI et al, 2006). O agronegócio é o maior setor exportador brasileiro, representando 42% das exportações de nosso país, contribuindo fortemente para o superávit da balança comercial, sobretudo em função do cultivo da soja na Região Centro-Oeste (PERES; MOREIRA, 2007). Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica (AGE) do Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2008) o Brasil é o terceiro maior exportador agrícola mundial, o segundo maior produtor de soja e o segundo exportador desse grão.

Em Goiás, a trajetória do agronegócio mostrou-se bastante audaciosa e animadora, principalmente a partir de 1940, quando o estado começou a aparecer no cenário nacional, inicialmente fornecendo produtos primários para a região sudeste. Aos poucos incorporou-se ao processo produtivo nacional como fornecedor de produtos alimentícios e matérias-primas e como absorvedor de excedentes populacionais das outras regiões do país. Então, passou de mero produtor de matéria-prima para um forte gerador de divisas, emprego e renda (FERREIRA, 2007).

A matriz agroindustrial do estado encontra-se num estágio de modernização adiantado e com diversas possibilidades de articulação e desenvolvimento. Atualmente, Goiás é um grande pólo do agronegócio brasileiro, em função das suas condições de logística de produção e escoamento privilegiadas, recebendo um grande número de agroindústrias, fato que provocou um efeito multiplicador na economia da região (FERREIRA, 2007; TEIXEIRA, 2007).

O agronegócio ocupa papel de destaque na economia goiana, sendo responsável por cerca de 20% do PIB no ano de 2004. No ano de 2007, o agronegócio goiano apresentou melhoria em sua safra, refletida no aumento da produção de grãos e fibras, constituindo a maior safra da história do estado. O bom desempenho da agricultura nesta temporada resultou de uma série de fatores, tais como a condição climática, que favoreceu o desenvolvimento das culturas, o renegociamento de dívidas antigas e a disponibilidade de recursos para este setor (SAFRA..., 2007).

O setor de agronegócios é o responsável pela maioria das exportações de Goiás, respondendo por 84% das vendas externas do estado. O complexo soja foi o segmento de maior expressividade, com 40% do total de exportações (SANTANA, 2007).

1.2 PRODUTIVIDADE DA SOJA

A liderança mundial da produção de soja pertence aos Estados Unidos da América (USA) desde 1964, em termos de área colhida e produção. No entanto, dois concorrentes ameaçam esta liderança: Brasil e Argentina. Segundo a Assessoria de Gestão Estratégica do MAPA (2008), as áreas colhidas de soja no Brasil vêm convergindo a partir de 2001, e a projeção para 2008 será de 25,6 milhões de hectares nos USA contra 21 milhões de hectares no Brasil. Quanto à produtividade, o Brasil ultrapassou a dos Estados Unidos e Argentina a partir de 1999.

Apesar de todos os avanços conseguidos em relação à adaptabilidade ao solo brasileiro, um dos fatores que ainda impedem a obtenção de melhores

rendimentos da soja são as doenças, que provocam perdas anuais de aproximadamente 20% na produção, podendo chegar a quase 100% em casos de diagnóstico tardio ou tratamento equivocado (ADAMI et al, 2006; EMBRAPA, 2003). A rápida expansão da cultura em associação com a falta de cuidados fitossanitários possibilitou a disseminação de patógenos pelas regiões produtoras (MARTINS, 2003).

No Brasil, cerca de 50 doenças da soja causadas por vírus, bactérias, fungos e nematódeos já foram identificadas. Dentre essas doenças, as “doenças de final de ciclo” (DFCs) podem causar danos na lavoura que comprometem até 44% da produção, principalmente quando associadas aos danos causados por outras doenças. Entre as principais DFCs relacionadas à diminuição da produtividade estão a ferrugem asiática e a antracnose (UZEIKAL, 2004; EMBRAPA, 2003).

A antracnose é uma das principais doenças que afetam a soja nas regiões do cerrado em decorrência da maior precipitação e temperatura mais elevada. Essa doença é causada pelo fungo *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e afeta o início da formação das vagens, causando o apodrecimento, queda e abertura das vagens imaturas, o que ocasiona a germinação dos grãos em formação (GALLI et al., 2005). A antracnose pode, em casos extremos, levar à perda total da produção, mas geralmente provoca alta redução do número de vagens e induz a retenção foliar e prolongamento do tempo de haste verde na planta. Como medida de controle da antracnose pode-se adotar o sistema de rotação de culturas, tratamento de sementes, manutenção de densidades populacionais adequadas (250 a 300 mil plantas por hectare), manejo correto do solo e tratamento químico com fungicidas (ADAMI et al., 2006).

A ferrugem asiática, causada pelo fungo *Phakopsora pachurhizi* causa severos danos à soja, dentre eles o rápido amarelamento e queda prematura das folhas, o que prejudica a formação e desenvolvimento de vagens e o peso final dos grãos (GODOY; CANTERI, 2004; SOARES et al., 2004; NAVARINI et al., 2007). O controle da ferrugem da soja engloba diversas medidas, como aumentar a área de rotação, semear cultivares mais precoces, evitar a semeadura em várias épocas e com cultivares tardias (EMBRAPA, 2003). O controle químico com fungicidas é o principal método de controle (SOARES et al., 2004). Deve-se proceder a aplicação do fungicida após o surgimento dos sintomas iniciais da doença na lavoura ou nas regiões próximas, mesmo que apenas como método preventivo. O desenvolvimento de cultivares resistentes é dificultado pela variabilidade genética do fungo. Dessa forma, a utilização de fungicidas ainda é a forma mais eficaz de controle dessa doença (UGALDE, 2005; EMBRAPA, 2007b).

Para alcançar os resultados favoráveis e promover uma maior produtividade, importantes mudanças tecnológicas e organizacionais foram inseridas no novo contexto de produção. Dentre eles, podem ser citados a substituição da mão-de-obra pela maquinaria, introdução de fertilizantes químicos e agrodefensivos (PIGNATI et al., 2007). Esta análise pode ser reforçada pelos indicadores de utilização de insumos como tratores, defensivos e fertilizantes. Em termos relativos, o maior crescimento ocorreu em vendas de agrodefensivos, seguido de tratores e fertilizantes. O aumento do consumo de defensivos se deu como processo decorrente da expansão da produção. No período de 1995 a 2005, a venda de defensivos agrícolas no país aumentou em 180%, totalizando 4,2 bilhões de dólares (MAPA, 2008).

1.3 TECNOLOGIAS AGRÍCOLAS

A partir do século XVII, inúmeros pesquisadores começaram a realizar experimentos sobre a utilização de produtos químicos no intuito de melhorar o desempenho da agricultura. Contudo, apenas em 1840, o pesquisador alemão Justus Von Liebig consolida este método agrícola (IYAMA; SILVA, 2004). Os defensivos agrícolas surgiram com a finalidade de facilitar o manejo agrícola, eliminando organismos que representassem obstáculos à produção (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003). Nos primórdios de seu uso, apenas um pequeno número de compostos inorgânicos, baseados em formulações envolvendo o cobre e o arsênio eram utilizados (VEIGA et al., 2006).

A síntese dos primeiros compostos organossintéticos foi realizada durante a Segunda Guerra Mundial, com o intuito de dizimar o inimigo, como por exemplo, o agente laranja. Com o término da guerra, o uso militar de tais compostos tornou-se ocioso. No entanto, as estruturas laboratoriais e o conhecimento a respeito da manipulação de substâncias químicas foram direcionados para o combate de insetos causadores de redução na produção agrícola (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003).

O desenvolvimento tecnológico no setor de agronegócios a partir da introdução de compostos orgânicos deu nova importância a esta classe de produtos, tanto no aumento da produtividade agrícola quanto no controle de vetores de doenças (VEIGA et al., 2006).

Atualmente vários produtos são sintetizados para o combate das pragas que acometem as plantações. O Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos em função do modelo agrícola adotado e da ampla diversidade biológica,

que favorece a incidência de pragas e moléstias (MORAGAS; SCHNEIDER, 2003; SILVA; FAY, 2004; VEIGA, 2007).

Segundo a Lei Federal nº 7802, de 11 de julho de 1989 artigo 2º, são considerados defensivos agrícolas e produtos afins:

- “a) os produtos e os agentes do processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;
- b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (MAPA, 2007)”.

Como a função do defensivo agrícola é matar, exterminar e combater pragas agrícolas, para que esse produto seja considerado eficiente, deve proporcionar a eliminação de aproximadamente 95% da praga (VEIGA, 2007).

No Brasil, a importância e representatividade dos fungicidas como principais agrodefensivos aumentou consideravelmente a partir de 1998, em decorrência do abalo ocorrido na economia brasileira, em função das perdas ocorridas na safra 97/98 (US\$ 1,6 bilhões), relacionadas com as doenças de final de ciclo, causadas por fungos necrotróficos (YORINORI, 1999).

Em relação à aplicação de fungicidas para controlar doenças da soja, devem ser considerados fatores como a condição climática, potencial produtivo e grupo de maturação da cultivar, além do local e data da semeadura (PICININI; FERNANDES, 1999; PRADO; YORINORI, 1999). O uso de fungicidas para o controle das DFCs é uma prática recomendada nas lavouras, sendo indicados nestes casos, fungicidas do grupo dos triazóis – promovem o bloqueio da

biossíntese de ergosterol; as estrobilurinas – inibem o transporte de elétrons na respiração celular; e os benzimidazóis – inibem a síntese de DNA (MARTINS, 2003; GODOY; CANTERI, 2004).

Estudos recentes prescrevem a utilização de combinações de agrodefensivos com ações diferenciadas para potencializar a ação erradicante e protetora contra as DFCs. Dentre eles, a associação de trifloxistrobina + propiconazol; defeconazol + propiconazol; piraclostrobin + epoxiconazol são recomendadas. Esses compostos proporcionam maior produtividade quando aplicados em estágio de desenvolvimento R4, ou seja, início do enchimento da vagem (SOARES et al., 2004).

Dentre os fungicidas compostos, o primeiro representante do grupo lançado comercialmente foi o Opera[®], produto fabricado e distribuído pela BASF, possui como princípios ativos o epoxiconazol e o piraclostrobin. O produto foi lançado no Brasil na safra 2002/2003 com o intuito de controlar doenças na cultura de soja (BASF, 2007a). Com esta estratégia, este fungicida tornou-se líder no seguimento, sendo utilizado em mais de 10 milhões de hectares na safra 2003/04 (CONAB, 2006).

O epoxiconazol (2RS,3SR)-1-[3-(2-clorofenil)-2,3-epoxi-2-(4-fluorfenil)propil]-1H-1,2,4-triazol, é um fungicida pertencente ao grupo químico triazol, cuja fórmula estrutural está esquematizada na **Figura 1**.

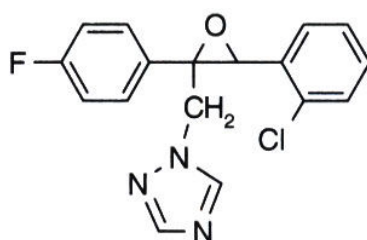


Figura 1. Estrutura molecular do epoxiconazol

Segundo classificação da ANVISA (2007), o epoxiconazol é um composto medianamente tóxico (classe III). Seu mecanismo de ação baseia-se na interrupção das funções da membrana das células fúngicas pela inibição da desmetilação do C14 dos esteróis, impossibilitando a síntese do ergosterol, importante para a manutenção da integridade da membrana celular dos fungos (UGALDE, 2005; SANTOS, 2007).

O piraclostrobin (N-metil-{2-[1-(4-clorophenil)-1H-pirazol-3-il]oximetil} phenil} (N-metoxi)carbamato) (**Figura 2**), pertence ao grupo químico das estrobilurinas e, segundo a ANVISA (2007), apresenta toxicidade de nível II (altamente tóxico). É um composto da ordem dos metoxi-carbamatos e exerce sua ação inibindo o complexo III da respiração celular fúngica a nível do citocromo b no sítio Qo (UGALDE, 2005; KARADIMOS et al., 2005). Segundo Azevedo (2003), as estrobilurinas apresentam um amplo espectro de ação, manifestando ação protetora, curativa e erradicante com efeito residual prolongado.

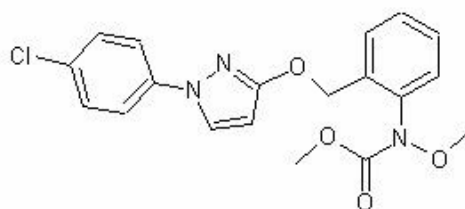


Figura 2. Estrutura molecular do fungicida piraclostrobin

De acordo com informações da BASF (2007b), o piraclostrobin além de ação fungicida, apresenta o efeito fisiológico “F 500”, responsável por ganhos de produtividade e/ou qualidade na produção final. O efeito F 500 é resultado do aumento da fotossíntese líquida e da atividade da enzima nitrato-redutase, em combinação com a diminuição da produção de etileno (BASF, 2007b).

O efeito F 500 proporciona um aumento da fotossíntese líquida da planta através da redução de sua respiração, o que ocasiona um aumento da quantidade de energia armazenada. Essa energia é convertida em carboidratos, os quais originarão a fitomassa para produzir folhas maiores e encher mais os grãos (BASF, 2007b). Ao aumentar a atividade da enzima nitrato-redutase, responsável pela conversão de nitrato (NO_3) em nitrito (NO_2), a quantidade de nitrito disponível é maior e, por conseguinte, aumenta-se a quantidade de proteínas produzidas. A aplicação do piraclostrobin reduz a produção de etileno, minimizando o estresse ambiental e a senescência, o que proporciona uma atividade foliar mais prolongada, fazendo com que a planta complete todo o seu ciclo com mais eficiência (BASF, 2007b).

O Opera[®] é cadastrado na ANVISA (2007), como um produto de classificação toxicológica nível II – produto altamente tóxico e muito perigoso ao meio ambiente, por tratar-se de um composto altamente persistente. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis (IBAMA, 1990), a classificação dos compostos químicos, quanto à sua persistência, é dada pela porcentagem de desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ em 28 dias. Segundo tal definição, o Opera[®] é classificado como defensivo agrícola de alta persistência, com meia-vida acima de 180 dias, sendo altamente tóxico para organismos aquáticos e microrganismos do solo.

A principal forma de aplicação do Opera[®] é por meio de pulverização por tratores ou aviões agrícolas, o que leva a uma melhor abrangência do agrodefensivo na área plantada, diminuição nos custos com mão-de-obra e contaminação de pessoal envolvido. Estas características somadas à sua larga aplicação em território

nacional alertam as autoridades quanto aos riscos de um acidente ambiental envolvendo estes compostos (SILVA, 2004).

1.4 SAÚDE AMBIENTAL

Vários estudos realizados evidenciam que o grande desafio na produção de monoculturas é o enfrentamento dos problemas de saúde e de ordem ambiental relacionados com o manejo de agrotóxicos, exposição dos trabalhadores, contaminação do ambiente intradomiciliar, descarte inadequado de embalagens vazias, pouca atenção dada à destinação dos resíduos do processo produtivo, transtornos e modificação ambiental, acúmulo nos segmentos bióticos dos ecossistemas (biota, água, ar, solo, sedimentos) e perda da fertilidade dos solos (BALSAN, 2006; PERES; MOREIRA, 2007). A Empresa Estadual de Pesquisa Agropecuária do Rio de Janeiro (PESAGRO-RIO, 2007) relata que dos 32 agrotóxicos mais usados, 17 sofrem restrições em outros países, sendo que muitos deles são proibidos. Isso acontece com o epoxiconazol, banido pela Comissão Européia em 1997 (EUROPEAN COMMISSION, 1997) devido à sua baixa degradabilidade, toxicidade para organismos aquáticos e efeitos endócrinos (EPA, 2006). Cocco (2002) relata efeitos indesejáveis em compostos triazólicos como o epoxiconazol, que estão associados ao aparecimento de alguns tipos de cânceres hormônio dependentes.

Dentre os agravos à saúde relacionados ao processo produtivo e o impacto negativo para a saúde humana e ambiental estão as poluições, contaminações, intoxicações agudas e/ou crônicas relacionada ao contato com os

agrotóxicos. Os problemas ambientais são ampliados quando se observa a forma de aplicação dos produtos, uma vez que a aplicação por meio de equipamentos de pulverização, mesmo que calibrados e em temperaturas e ventos ideais, deixam cerca de 32% dos compostos retidos nas plantas, 49% vão para o solo e 19% vão pelo ar para áreas circunvizinhas de aplicação. Além disso, há pulverizações em plantações próximas a residências e córregos, desrespeitando a proibição de pulverização próxima de fontes de água, córregos/rios e residências, como preconiza o código florestal e a lei dos agrotóxicos (CHAIM, 2004).

1.5 BIORREMEDIAÇÃO

Apesar de sua ação benéfica no controle das pragas que afetam as plantações, os defensivos agrícolas constituem uma das três principais fontes de contaminação do meio ambiente, que também incluem a atividade industrial e rejeitos da indústria bélica (GIANFREDA; RAO, 2004). Com a evolução tecnológica, os defensivos agrícolas que surgem são cada vez mais tóxicos e persistentes, o que aumenta ainda mais seu potencial nocivo para o meio ambiente (VEIGA et al., 2006).

O aumento populacional observado nos últimos anos tem como consequência uma demanda crescente por produção de alimentos, o que exige sistemas cada vez mais complexos de cultivo, transporte, estocagem e processamento dos produtos agrícolas. A busca por rendimentos maximizados impele ao proporcional aumento no uso dos agrodefensivos. Tais práticas, de uso intensivo de agrodefensivos trazem consigo o risco potencial da contaminação das coleções de água e por vezes dos reservatórios que abastecem a população urbana,

haja visto a capacidade de persistência destes produtos devido a sua lipofilicidade. Mesmo com os potenciais riscos de toxicidade, o uso intensivo destes produtos é justificado pela necessidade de uma agricultura cada vez mais produtiva, sendo esta uma das poucas soluções para o problema da fome mundial. Outra justificativa do uso intensivo destes produtos é a diminuição das terras disponíveis para a agricultura, que ocorre de maneira muito rápida em função da substituição das áreas de cultivo de alimentos por culturas para produção de biocombustíveis (CARDOSO; MÉLO, 2007).

A preocupação com o avanço do processo degradativo instalado em grande parte dos solos brasileiros e com a preservação da degradação de novas áreas, tem mostrado a necessidade de uso de práticas de recuperação do solo. Dentre estes processos podem ser citados os métodos de correção química com uso de cálcio solúvel, plantio direto, rotação e sucessão de culturas, plantio de leguminosas como adubos verdes, intercaladas com as espécies comerciais, queima e biorremediação (WADT et al, 2003).

Por definição, a biorremediação consiste no uso de organismos vivos, principalmente microrganismos, para a transformação de contaminantes em formas menos tóxicas ou atóxicas (VIDALI, 2001; MARTINS et al., 2007). Trata-se de uma tecnologia emergente para a limpeza de poluentes ambientais que se fundamenta nas atividades biodegradativas dos microrganismos (SINGH et al., 2006; GIANFREDA; RAO, 2004).

A eficiência da transformação dos poluentes orgânicos pelos microrganismos deve-se à presença de componentes enzimáticos que atuam modificando a estrutura e as propriedades tóxicas dos contaminantes, ou ainda,

mineralizando completamente as moléculas orgânicas a produtos finais (GIANFREDA; RAO, 2004).

Atualmente, a aplicação desta tecnologia está voltada para tratamento de locais poluídos muito variados, pois ela possui potenciais de limpeza em solos, sedimentos e águas. Os processos biológicos de tratamento de resíduos tóxicos são na maioria das vezes melhores que os métodos químicos e físicos de tratamento em termos de eficácia e economia (SINGH et al., 2006). Entretanto, a eficácia dos processos biológicos de biorremediação depende da biodegradabilidade do resíduo tóxico, associada a uma população microbiana adaptada ao consumo destes contaminantes. A biodegradabilidade é influenciada pela estrutura química, concentração, propriedades do contaminante e condições ambientais (GIANFREDA; RAO, 2004).

Diversas bactérias e fungos produzem enzimas extracelulares envolvidas na transformação de poluentes, incluindo proteases, carboidratases como amilase e celulase, esterases e fosfatases. Além de serem fisiologicamente necessárias à sobrevivência dos microrganismos, estas enzimas contribuem para a nutrição das plantas e desempenham um importante papel nos processos de biodegradação de contaminantes. Na **Tabela 1** são listados alguns microrganismos produtores de enzimas envolvidas na transformação de compostos sintéticos.

Tabela 1. Microrganismos envolvidos na biodegradação de poluentes

Contaminante	Microrganismo	Enzima
Poliuretano	<i>Corynebacterium</i> , <i>Comamonas acidovarans</i> , <i>Curvularia senegalensis</i>	Esterase
Álcool polivinílico	<i>Pseudomonas vesicularis</i> , <i>Pucnoporus cinnabarinus</i>	2-4-pentanediona esterase, lacase

Poli (L-ácido láctico)	<i>Amycolatopsis, Bacillus sp.</i>	Despolimerase, protease alcalina
Policlorados bifenis (PCBs)	<i>Coriolopsis polyzona, Pleurotus ostratus, Trametes versicolor</i>	Lignina Peroxidase (LiP), Manganês Peroxidase (MnP)
Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	<i>Phanerochaete chrysosporium, Trametes versicolor</i>	Sistema enzimático de degradação de lignina (LDSs), Lacase
Pentaclorofenol	<i>Phanerochaete chrysosporium, Trametes. versicolor, Inonatus dryophilus</i>	LDSs
CCl ₄ , CHCl ₃	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	LiP, MnP, Celulobiose desidrogenase (CDH)

Fonte: Modificado de Gianfreda; Rao, 2004

Para o desenvolvimento de uma biorremediação eficaz, torna-se necessário a busca de microrganismos específicos para a degradação total ou parcial de um composto contaminante. Vários trabalhos têm sido conduzidos com microrganismos e enzimas isoladas para biotransformação de fungicidas (BELLINASSO et al., 2003; GIANFREDA; RAO, 2004; HARADA et al., 2006).

Considerando o exposto, fica claro a importância do uso de defensivos para garantir a produtividade agrícola e conseqüentemente a liderança comercial do agronegócio brasileiro. Não menos importante, o aumento da produtividade atende a demanda mundial por alimentos em tempos de crise, quando 830 milhões de pessoas passam fome no mundo. Entretanto, a contaminação ambiental deve ser vista como extremo cuidado. Se por um lado os defensivos são responsáveis por safras cada vez mais produtivas, por outro, seu uso continuado pode comprometer a

fertilidade dos solos, podendo, em casos extremos levar à desertificação. É preciso então que sejam desenvolvidas tecnologias capazes de solucionar o impasse.

Neste cenário, a biorremediação parece ser uma tecnologia extremamente promissora, sobretudo considerando a biodiversidade da microbiota. Estudos prospectivos e seleção de microrganismos capazes de degradar defensivos e recompor solos degradados revestem-se de importância estratégica, garantindo a soberania de produção e o desenvolvimento sustentável do agronegócio.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar, identificar e caracterizar microrganismo de solo degradado capaz de sobreviver em meio suplementado com o fungicida Opera[®], e modificar quimicamente seus componentes ativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Selecionar e analisar o crescimento de um microrganismo em meio seletivo contendo o fungicida Opera[®];
- Realizar a caracterização morfológica do microrganismo que apresentar melhor adaptabilidade ao fungicida;
- Realizar a identificação bioquímica do microrganismo que apresentar adaptabilidade na presença do Opera[®];
- Realizar a identificação molecular do microrganismo que apresentar melhor crescimento na presença do fungicida;
- Analisar as proteínas e as atividades enzimáticas secretadas no meio;
- Purificar e caracterizar parcialmente uma das enzimas secretadas pelo microrganismo selecionado;
- Analisar a ação de enzimas sobre os defensivos piraclostrobin e epoxiconazol.

3 MATERIAIS

3.1 MEIOS DE CULTURA

3.1.1 Caldo nutriente

Extrato de carne	3 g
Peptona.....	5 g
Glicose	10 g
Água.....	q.s.p 1 L

3.1.2 Caldo nutritivo

Extrato de carne	3 g
Peptona.....	5 g
Água.....	q.s.p 1 L

3.1.3 Meio nutriente

Extrato de carne	3 g
Peptona.....	5 g
Glicose	10 g
Agar.....	15 g
Água.....	q.s.p 1 L

**3.1.4 Meio de cultura seletivo J. E. sólido (JONES; EDINGTON, 1968) -
suplementado com Opera[®]**

K ₂ HPO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₂ .1H ₂ O.....	10 mg
CaCl ₂	10 mg
MnCl ₂	0,1 mg
ZnSO ₄	0,01 mg
Agar.....	15 g
Opera [®]	[0,1%; 0,2%; 0,3% e 1% (v/v)]
Água destilada.....	q.s.p. 1 L

3.1.5 Meio NFb (DÖBEREINER et al., 1995)

Ácido málico	5 g
K ₂ HPO ₄ 10%	5 mL
MgSO ₄ . 2 H ₂ O 10%	2 mL
NaCl	0,1 g
CaCl ₂ . 2 H ₂ O 10%	0,2 mL
Solução de micronutrientes.....	2 mL
Azul de bromotimol	2 mL
FeEDTA (solução 1,64%).....	4 mL
Solução de vitaminas	1 mL

KOH4,5 g
Agar.....2 g
Água destilada..... q.s.p. 1 L
pH \approx 6,5-6,8

**3.1.6 Meio de cultura seletivo J.E. líquido (JONES; EDINGTON, 1968) –
suplementado com Opera[®]**

K₂HPO₄0,5 g
(NH₄)₂SO₄.....0,5 g
MgSO₄.7H₂O0,5 g
FeCl₂.1H₂O..... 10 mg
CaCl₂ 10 mg
MnCl₂.....0,1 mg
ZnSO₄.....0,01 mg
Opera[®]0,3% (v/v)
Água destilada q.s.p. 1 L

3.2 TAMPÕES

3.2.1 Tampão TEN

Tris – HCl 10 mmol L⁻¹
EDTA..... 1 mmol L⁻¹
NaCl 100 mmol L⁻¹
pH 8,0

3.2.2 Tampão TR

Tris – HCl 10 mmol L⁻¹

EDTA..... 1 mmol L⁻¹

pH 7,5

3.2.3 Tampão TEB5X

Tris – HCl 450 mmol L⁻¹

Ácido Bórico 450 mmol L⁻¹

EDTA..... 4,8 mmol L⁻¹

pH 8,0

3.2.4 Tampão SM

Tris – HCl 2 mmol L⁻¹

MgCl₂..... 0,05 mmol L⁻¹

pH 9,0

3.2.5 Tampão de amostra para eletroforese

Tampão Tris – HCl 1 mol L⁻¹ pH 6,8 12 µL

2-mercaptoetanol (para eletroforese) 10 µL

SDS 10% (p/v)..... 40 µL

Glicerol 50 µL

Azul de bromofenol 5 µg

Água destilada..... q.s.p 1 mL

3.3 GEL DE AGAROSE

Agarose.....	1,0 g
Tampão TEB5X.....	10 mL
Brometo de etídio (26,3 mmol L ⁻¹).....	5,0 µL
Água.....	q.s.p. 100mL

3.4 GÉIS DE POLIACRILAMIDA

3.4.1 Gel de concentração (5%)

Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	1,7 mL
Água destilada e deionizada	5,7 mL
Tampão Tris-HCl 0,5 mol L ⁻¹ pH 6,8.....	2,5 mL
SDS 10%.....	100 µL
Persulfato de amônia 10%	50 µL
TEMED.....	10 µL

3.4.2 Gel de separação (12%)

Acrilamida/Bis-acrilamida 30%	4,0 mL
Água destilada e deionizada	3,4 mL
Tampão Tris-HCl 0,5 mol L ⁻¹ pH 6,8.....	2,5 mL
SDS 10%.....	100 µL
Persulfato de amônia 10%	50 µL
TEMED.....	5 µL

3.4.3 Solução Fixadora

Metanol	50 mL
Ácido acético glacial.....	12 mL
Formaldeído P.A.	50 µL
Água destilada.....	q.s.p. 100 mL

3.5 REAGENTES E MATERIAIS PRONTOS PARA USO

- Meio Müller Hinton – pronto para uso – placas com dimensão de 90x15 mm – Laborclin
- Conjunto para coloração de Gram – Laborclin
- Kit Comercial Bactray® – Laborclin
- Discos para testes de susceptibilidade a antibióticos – Laborclin
- Kit DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing – GE
- Coquetel inibidor de proteases contendo Ácido 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil fluorídrico (AEBSF), E₆₄, bestatina, leupeptina, aprotinina e EDTA – Sigma-Aldrich.
- TLCK – Sigma-Aldrich.

4 METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

4.1.1 Coleta do solo

O solo foi coletado próximo à rodovia estadual GO-139, km 30, no município de São Miguel do Passa Quatro, em uma fazenda modelo produtora de soja em que o Opera[®] foi utilizado desde o seu lançamento em 2002. A coleta foi realizada no mês de julho de 2006, em três pontos de área plantada e em duas profundidades, 0 a 20 cm e de 80 a 100 cm, como realizado por UETA (2007). Os pontos foram demarcados com auxílio de sistema de posicionamento global (GPS) e interpretados por imagem obtida pelo satélite CBERS II (Satélite Sino-Brasileiro de Recursos Terrestres), disponibilizada gratuitamente pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2007) (**Figura 3**).

4.1.2 Isolamento e contagem de colônias

As amostras de solo foram peneiradas em tamis com abertura de 0,42 mm e homogeneizadas. Em seguida foi preparada uma suspensão contendo 1 g de solo e 9 mL de solução salina ($\text{NaCl } 0,15 \text{ mol L}^{-1}$), homogeneizada por 30 minutos. A suspensão obtida foi diluída até obter uma diluição de 10^{-4} . 100 μL da suspensão foram aplicados e espalhados com auxílio de alça de Drigalsky em meio de cultura nutriente (controle) e meio de cultura seletivo J. E. sólido, contendo o fungicida Opera[®] em concentrações de 0,01, 0,02, 0,03 e 0,1 % na composição (ROQUE; MELO, 2000; HARADA, 2006). Após 24 horas de incubação a 37 °C foi realizada a

contagem de unidades formadoras de colônias – UFC g⁻¹ de solo (ROQUE; MELO, 2000).

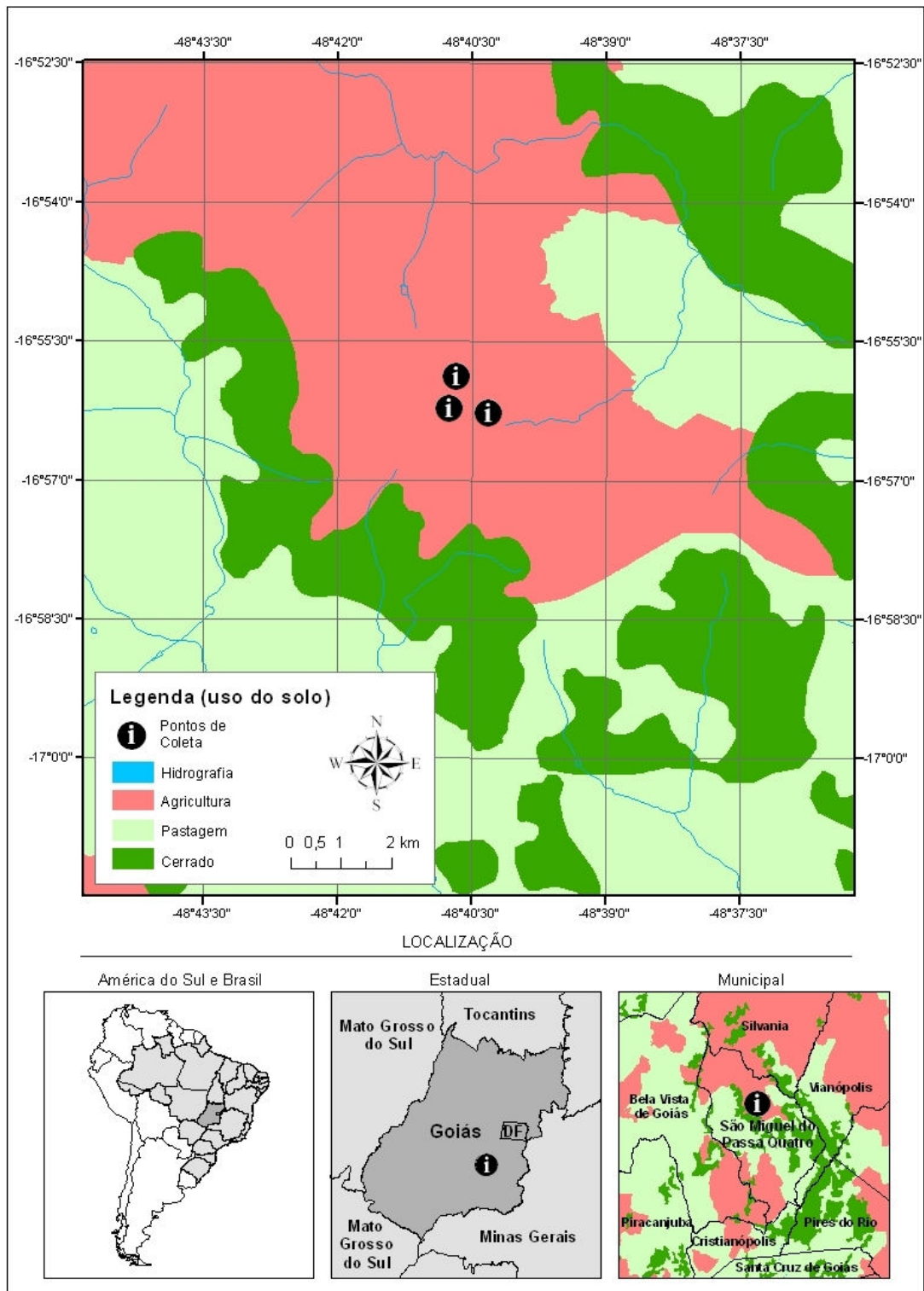


Figura 3. Mapa de posicionamento dos pontos de coleta. Imagem obtida pelo satélite CBERS II, disponibilizada pelo INPE, referente ao mês de julho/2006 (órbita 158, ponto 119).

4.1.3 Seleção de microrganismos resistentes ao Opera®

Os microrganismos que cresceram no meio de cultura seletivo J. E. sólido - suplementado com 0,1% de Opera® a 37 °C, foram repicados em meio de cultura seletivo J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera® como única fonte de carbono. As curvas de crescimento foram observadas por 120 horas utilizando densidade óptica (DO) a 600 nm. Para a análise da DO seguiu-se o seguinte procedimento: 1,0 mL do meio foi retirado, centrifugado a 5.000 rpm por 10 min, e o líquido desprezado; à massa de células foi adicionado 1,0 mL de NaCl 0,15 mol L⁻¹, homogeneizado com auxílio de um vortex e analisado em espectrofotômetro UV/visível (Pharmacia Ultrospec 2000) a 600 nm. O procedimento foi realizado em triplicata.

4.1.4 Caracterização morfológica do microrganismo selecionado

O microrganismo selecionado foi caracterizado por microscopia óptica, corado pelo método de Gram, nos meios de cultura seletivo J. E. líquido - suplementado com Opera®, meio nutriente e caldo nutriente. As lâminas foram analisadas utilizando-se microscópio óptico Leica DME equipado com câmera Leica EC 3. As fotos foram capturadas com auxílio do programa Leica Application Suite, versão 2.4.0 e tratadas no programa Microsoft Office Picture Manager 2003.

A caracterização macroscópica das colônias foi efetuada de acordo com os parâmetros utilizados por Fonseca et al. (2000). O tamanho, forma, borda, homogeneidade, transparência e elevação foram analisados nas colônias isoladas enquanto cor, muco e elasticidade foram observados na massa celular sobre as estrias mais densas.

4.1.5 Identificação e caracterização bioquímica

A identificação bioquímica do microrganismo isolado foi realizada por Kit Comercial Bactray[®] (Tabela 2). A seleção do kit Bactray para os testes de identificação foi realizado após a execução do teste da catalase e fermentação da glicose segundo Harada et al. (2006). Para a realização dos testes através do sistema Bactray[®] preparou-se uma suspensão bacteriana em água destilada estéril (pH 6,8- 8,2), com turvação 0,5 na escala MacFarland (DO = 0,152 a 600 nm), que foi transferida para o conjunto de reação, homogeneizada, incubada a 35 °C por 18-24 horas em estufa bacteriológica. Terminada a incubação, realizou-se a leitura dos compartimentos de reação, e os dados obtidos foram analisados através do Sistema Bactray, versão 2.1, para se obter o resultado dos testes realizados.

Tabela 2. Ensaio bioquímicos realizados no microrganismo selecionado

Sigla	TESTE	Sigla	TESTE
CAT	Catalase	CIT	Citrato
ONPG	Galactopiranosidase	RHA	Raminose
LAC	Lactose	ADO	Adonitol
LDC	Lisina Descarboxilase	RAF	Rafinose
ODC	Ornitina Descarboxilase	ARA	Arabinose
H ₂ S	Ácido Sulfídrico	FIX	Fixação de N ₂
URE	Uréia	SOR	Sorbitol
VP	Vogesproskauer	SAC	Sacarose
MAL	Malonato	MAN	Manitol
OF	Fermentação da Glicose	IND	Indol

Para o teste de fixação de nitrogênio os microrganismos foram primeiramente semeados em caldo nutriente, incubados a 30°C por 24 horas. Em seguida, uma alíquota de 100 µL da cultura foi semeada em recipientes de vidro de 10 mL, contendo 5 mL de meio de cultivo semi-sólido NFb, sem adição de nitrogênio, deixada à temperatura ambiente e analisada após 48 horas (Döbereiner et al., 1995).

4.1.6 Testes de susceptibilidade a antibióticos

Os testes de susceptibilidade foram realizados adicionando 0,1 mL da suspensão do microrganismo em meio Agar Mueller-Hinton, e espalhada com auxílio de alça de Drigalsky. Discos contendo os antibióticos foram dispostos nas placas, e então incubados a 28 °C por 24 horas. A inibição do crescimento bacteriano foi avaliada após este período. As cepas foram caracterizadas como sensíveis intermediárias ou resistentes de acordo com a área de inibição produzida pelos microrganismos medida por paquímetro. Cepas de *Escherichia coli* foram usadas como organismo controle, para a verificação do efeito antimicrobiano dos discos (Cai et al., 2008).

4.1.7 Identificação molecular

O microrganismo selecionado foi submetido à identificação molecular por meio da análise da seqüência do gene rDNA 16S conforme procedimentos descritos abaixo.

4.1.7.1 Extração do DNA cromossomal

Para a extração do DNA cromossomal foi realizado o seguinte procedimento: o microrganismo foi inoculado em caldo nutriente e deixado sob agitação a 35 °C e 150 rpm por 24 horas. A suspensão de células obtida foi centrifugada a 10.000 rpm e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi lavado por 2 vezes com tampão TR e em seguida lavado por 2 vezes com tampão TEN. Ao precipitado resultante foram adicionados 5 mL de tampão TEN, 500 µL de SDS 20% (p/v) e levado ao banho-maria à 70 °C por 20 minutos. Após o material chegar à temperatura ambiente foram adicionados 500 µL de NaCl para que a concentração resultante fosse equivalente a 300 mmol L⁻¹. Em seguida, ao volume total foram adicionados 15 mL de álcool etílico 95% (v/v) pelas bordas do tubo. O precipitado obtido foi transferido para um tubo de ensaio contendo NaCl 300 mmol L⁻¹ e álcool etílico 95% (v/v) com auxílio de um bastão de vidro e posteriormente centrifugado por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspendido com 500 µL de tampão TR, para tratamento posterior com 500 µL de fenol hidratado. O DNA foi retirado da parte superior do eppendorf com auxílio de pipetadores. A presença e o grau de integridade do DNA foram avaliados por eletroforese em gel de agarose.

4.1.7.2 Eletroforese em gel de agarose

A análise do DNA cromossomal foi realizada segundo Sambrook et al. (1989), através de eletroforese em gel de agarose 1% (p/v). O gel foi submetido a uma amperagem de 30 mA até que a amostra entrasse no poço, sendo posteriormente ajustada para 60 mA. A corrida foi interrompida quando a amostra

atingiu dois terços do gel. A visualização das bandas de DNA cromossomal foi feita por irradiação ultravioleta de baixa intensidade.

4.1.7.3 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

A amplificação do gene rDNA 16S foi realizado através de PCR utilizando os “primers” R 16A 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' e R 16B 5'-ACGGCTACCTTGTACGACTT-3' (WEISBURG et al., 1991). As reações de amplificação seguiram o seguinte protocolo: 2µL do DNA cromossomal, 1 µL do primer a 2,5 pM, 2µL do tampão SM, 1µL do kit DYEnamic™. A amplificação foi realizada em termociclador GeneAmp PCR Systems 9700, seguindo o programa: 96 °C durante 3 min, 35 ciclos de 94 °C durante 30 seg, 55 °C durante 30 seg, 72 °C 1 min, 72 °C por 5 min e finalizando com temperatura ambiente.

A visualização do gene 16S rDNA amplificado foi feita, após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v), por irradiação ultravioleta de baixa intensidade

4.1.7.4 Seqüenciamento do gene rDNA 16S

A precipitação do produto da PCR foi realizada adicionando 40µL de isopropanol 65% (v/v) aos 10 µL de reação. A mistura foi homogeneizada no vortex (Vortex Genie-2-Scientific Industries) por 30 segundos. A precipitação do material foi realizada a temperatura ambiente por 20 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 10.000 rpm por 45 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com 250 µL de etanol 60% (v/v), e centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos. O processo de lavagem com álcool foi repetido utilizando 100 µL do mesmo e o sobrenadante descartado. A placa contendo as amostras foi centrifugada de maneira invertida a 500 rpm por um minuto para garantir que todo álcool fosse

eliminado. Uma secagem complementar foi realizada deixando-se a placa por aproximadamente 10 minutos em capela de fluxo laminar. Este material foi ressuspenso em 10 μ L de formamida, desnaturado a 95 °C por cinco minutos e levado ao seqüenciador.

As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do GenBank usando o programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) e alinhadas através do programa BioEdit (HALL, 1999). A árvore filogenética foi construída utilizando o programa CLUSTALX (THOMPSON et al., 1997).

4.1.8 Manutenção das colônias

As colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de caldo nutriente, incubadas a 30 °C e 150 rpm por 24 horas e posteriormente centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos em centrífuga clínica. O sobrenadante foi descartado e adicionou-se 2 mL de glicerol 50% (v/v) em caldo nutriente. O material suspenso foi armazenado em congelador em temperatura inferior a 0 °C.

Inoculou-se esta suspensão em meio nutriente inclinado e procedeu-se incubação a 30 °C por 24 horas em estufa bacteriológica mantida sob refrigeração a 8°C. Antes da realização dos testes, uma amostra foi retirada do meio inclinado e inoculada em caldo nutriente a 30 °C por 24 horas. 100 μ L da suspensão com DO de 0,200 foram utilizados nos experimentos. Para efeito de controle de qualidade foi realizado teste de Gram para todas as colônias antes da realização dos experimentos.

4.2.1 Perfil protéico

O microrganismo selecionado e identificado teve seu perfil protéico avaliado quando submetido ao crescimento em meio de cultura seletivo J. E líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] como única fonte de carbono. Foram adicionado 100 µL da suspensão celular com DO de 0,2 a 100 mL de meio e deixado a 30 °C a 150 rpm por 120 horas. Após este período a suspensão foi filtrada em membrana com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm. Do sobrenadante obtido, parte foi utilizada para avaliação de atividade enzimática e parte foi congelada e posteriormente liofilizada até redução de 2/3 do volume total. A amostra concentrada foi dialisada contra água destilada e deionizada por 48 horas, com trocas em intervalos de tempo regulares. A amostra dialisada foi liofilizada novamente e ressuspensa em 300 µL de água para determinação do teor de proteínas totais e perfil protéico.

4.2.1.1 Dosagem do teor protéico

O teor de proteínas da amostra foi dosado pelo método de micro-Bradford (1976). Em 100 µL da amostra foram adicionados 1 mL do reagente de Bradford e após reagir por 10 min a mistura foi submetida à leitura a 595 nm em espectrofotômetro Ultrospec 2000 UV-Vis, Amersham Biosciences. A quantidade de proteína foi determinada através de padrão com solução de Albumina Sérica Bovina (BSA).

4.2.1.2 Determinação do perfil protéico

Para a análise do perfil de proteínas secretadas pelo microrganismo selecionado, bem como das frações solúvel e insolúvel, foi utilizado o sistema de eletroforese (Mini-Gel/ BIO RAD) e gel de poliacrilamida 12% (p/v) pH 8,8 (LAEMMLI, 1970). As amostras foram preparadas em tampão de amostra, fervidas durante 5 minutos e aplicadas no gel.

A corrida foi realizada sob voltagem inicial de 100 V e amperagem de 40 mA e posteriormente, quando a amostra entrou no gel de separação, a voltagem foi alterada para 170 V. Os marcadores de massa molecular utilizados foram: Ribonuclease A (12,6 kDa), Quimotripsinogênio A (25 kDa), Ovoalbumina (45 kDa), BSA (69 kDa)

Após a corrida o gel foi corado de acordo com o método descrito por Blum et al. (1987). O gel foi transferido para uma solução fixadora, deixado em repouso por 2 horas. Em seguida foi submetido a três lavagens com solução de etanol 50% (v/v), durante 20 minutos cada lavagem. Após as lavagens o gel foi incubado com solução de tiosulfato de sódio 0,02% (p/v) durante 1 minuto, lavado três vezes com água destilada por 20 segundos cada lavagem. Em seguida o gel foi incubado por 20 minutos com solução de nitrato de prata $2,0 \text{ g L}^{-1}$ contendo $75 \text{ }\mu\text{L}$ de formaldeído, lavado novamente com água destilada por três vezes durante 20 segundos cada lavagem. A revelação foi realizada com solução de carbonato de sódio 6,0% (p/v) acrescido de $50 \text{ }\mu\text{L}$ de formaldeído. A revelação foi interrompida com adição de uma solução contendo metanol 50% (v/v) e ácido acético 6% (v/v).

4.2.1.3 Fracionamento das proteínas secretadas por precipitação com acetona

A presença de atividade enzimática foi testada no sobrenadante originado do inóculo do microrganismo em meio seletivo após filtração em membrana (3.2.9). O sobrenadante livre de células foi precipitado com acetona (3:1 v/v), deixado sob repouso em câmara fria (4 °C) por aproximadamente 12 h e centrifugado a 10.000 rpm por 30 min. O precipitado foi tratado com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 resultando em duas porções protéicas: uma fração solúvel no tampão utilizado e uma fração insolúvel.

4.2.1.4 Avaliação enzimática da Fração Solúvel (FS)

4.2.1.4.1 *Lignina Peroxidase*

A atividade enzimática baseou-se na metodologia descrita por Arara e Paramjit (2001). 100 µL do extrato protéico foram adicionados a 1,4 mL de tampão tartarato de sódio 125 mmol L⁻¹, pH 3,0 e 500 µL de álcool veratrílico 10 mmol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de peróxido de hidrogênio 2 mmol L⁻¹. A quantidade de produto formado foi medida a 310 nm após 10 min de reação.

4.2.1.4.2 *Catalase*

A atividade para catalase foi realizada segundo procedimento descrito por Beers e Sizer (1952). A 100 µL da enzima foram adicionados 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de peróxido de hidrogênio 14 mmol L⁻¹. A determinação da DO do peróxido de hidrogênio antes e após a reação foi acompanhada a 240 nm.

4.2.1.4.3 Lacase

A atividade da lacase foi medida pela oxidação da siringaldazina observada a 525 nm. A atividade foi testada adicionando 400 μL de tampão fosfato de sódio 20 mmol L^{-1} pH 7,0 e 500 μL da enzima. A reação iniciou-se após a adição de 100 μL de siringaldazina 1 mmol L^{-1} (McMAHON et al., 2007).

4.2.1.4.4 Lipoxigenase

A atividade da lipoxigenase foi verificada pela determinação do aumento da absorvância a 234 nm. A atividade foi testada adicionando 50 μL de enzima, 940 μL de tampão fosfato 50 mmol L^{-1} pH 6,3 contendo 0,06% de Tween-20. A reação iniciou-se após adição de ácido oléico 20 mmol L^{-1} . A atividade foi determinada pelo aumento do hidroperóxido de ácido graxo usando a absortividade molar de 25.000 L mol.cm^{-1} a 234 nm (KUO et al., 2006).

4.2.1.4.5 Polifenol-oxidase

A atividade enzimática foi medida seguindo metodologia descrita por Halpin et al. (1989). Em 0,1 mL de enzima foram adicionados 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 6,0. A reação foi iniciada pela adição de 1,0 mL de solução de pirogalol 0,013 mol L^{-1} e deixada proceder por 10 min.

4.2.1.4.6 Peroxidase - fenol

A atividade enzimática usando fenol foi determinada segundo metodologia descrita por Weng et al (1991). 100 μL da enzima foram adicionados a 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L^{-1} , pH 7,0 e 1,0 mL de solução contendo 82,1 mmol L^{-1} de fenol e 1,2 mmol L^{-1} de 4-aminoantipirina. A reação foi iniciada pela adição de

0,5 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de H₂O₂, deixada proceder por 10 min. A quantidade de produto foi mensurado a 510 nm.

4.2.1.4.7 Peroxidase - orto-dianisidina

A metodologia utilizada para a medida de atividade usando o-dianizidina como substrato baseou-se no procedimento descrito por Padiglia et al. (1995). O substrato foi dissolvido em pequeno volume de HCl 0,1 mol L⁻¹ e em seguida o volume foi completado com tampão acetato 0,1 mol L⁻¹, pH 5,0, a fim de se obter uma concentração final de o-dianizidina de 2,2 mmol L⁻¹. A reação procedia como descrito no item 4.2.1.4.6. A quantidade de produto foi mensurado a 470 nm.

4.2.1.4.8 Peroxidase - catecol

Os ensaios de atividade usando catecol foram feitos seguindo metodologia de Halpin e Lee (1987). Em um ensaio padrão 2,4 mL de solução substrato contendo 50 mmol L⁻¹ de catecol preparado em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 foi adicionado a 100 µL de enzima, o ensaio procedia conforme descrito no item 4.2.1.4. A quantidade de produto foi mensurado a 380 nm.

4.2.1.4.9 Peroxidase - guaiacol

Os ensaios usando guaiacol como substrato foram feitos segundo método descrito por Yemenicioglu et al. (1998), adicionando-se a 100 µL da enzima, 2,4 mL de solução substrato contendo tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,8 e guaiacol 1% (v/v), preparado em etanol 50% (v/v). A reação iniciava-se pela adição de 0,5 mL de peróxido de hidrogênio 0,05 mol L⁻¹. A quantidade de produto foi mensurado a 410 nm após 10 min de reação.

4.2.1.4.10 Peroxidase - pirogalol

A atividade enzimática foi medida seguindo metodologia descrita por Halpin et al. (1989). Em 100 µL de enzima foram adicionados 1,4 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 e 1,0 mL de solução 0,013 mol L⁻¹ de pirogalol. A reação iniciava-se pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de H₂O₂, deixada proceder por 10 min, e lida a 420 nm.

4.2.1.4.11 Peroxidase - resorcinol e hidroquinona

O ensaio de atividade enzimática utilizando resorcinol como substrato foi realizado adicionando 0,1 mL de enzima a 2,4 mL de uma solução preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 contendo resorcinol 0,1 mol L⁻¹ e 4-aminoantipirina 0,013 mol L⁻¹. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de H₂O₂, deixada proceder por 10 min. Provas em branco foram feitas na ausência da enzima e na ausência de peróxido de hidrogênio (FERNANDES, 2000).

4.2.1.4.12 Peroxidase - tetrametil benzidina - TMB

A atividade enzimática utilizando TMB foi realizada segundo Ryan e Ó'Fágáin (2007), com modificações. 100 µL da enzima foi adicionada a 1,4 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0 e 1,0 mL do reativo TMB. A reação foi iniciada pela adição de 0,5 mL de uma solução 0,05 mol L⁻¹ de H₂O₂, deixada proceder por 10 min. O produto formado foi medido a 450 nm. Provas em branco foram feitas na ausência da enzima e na ausência de peróxido de hidrogênio.

4.2.1.4.13 Esterase - p-nitrofenilpalmitato (pNPP)

A atividade esterásica foi determinada utilizando pNPP como substrato (ERTUGRUL et al, 2007). A solução de substrato foi preparada pela adição da solução A contendo 30 mg de pNPP em 10 mL de isopropanol, na solução B contendo 0,1 g de goma Arábica e 0,4 mL de triton X-100 em 90 mL de tampão Tris-HCl 50 mmol L⁻¹, pH 8,0 com agitação branda até total dissolução. 900 µL da emulsão obtida foram adicionados a 100 µL da amostra, incubado a 40 °C, por 10 min. O produto foi analisado a 410 nm. Uma unidade de enzima foi definida como a quantidade de enzima capaz de produzir 1 µmol de pNPP em um minuto, nas condições do ensaio.

4.2.1.4.14 Amidase - benzoil-DL-arginina-p-nitroanilida - BApNA

A atividade amidásica foi medida segundo metodologia de Alencar et al (2003). 150 µL da enzima foi adicionado a 0,85 mL de BApNA 0,6 mM em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0, incubado a 37 °C, por 10 min. O produto formado foi medido a 404 nm. Uma unidade de enzima foi definida pela capacidade de produção de 1 µmol de p-nitrofenol por minuto.

4.2.1.4.15 Amidase - caseína

A atividade caseinolítica foi avaliada utilizando caseína como substrato, como descrito por Arnon (1970). 100 µL da amostra foram adicionados a 500 µL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,6. A reação foi iniciada pela adição de 500 µL de caseína 1% (p/v), mantida a 37 °C por 10 min e finalizada pela adição de 1,5 mL de TCA 20% (p/v). A mistura foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min. O sobrenadante

foi mensurado a 280 nm. Uma unidade de enzima foi considerada como a quantidade de enzima capaz de degradar a caseína alterando 0,1 na absorvância.

4.2.1.5 Cromatografia da Fração Solúvel em Sephadex – G100

1,0 mL da fração solúvel foi aplicado em cromatografia de exclusão molecular, utilizando como fase estacionária Sephadex – G100. A coluna foi montada em cilindro de vidro 40 x 2,3 cm com capacidade para 90 mL. A fase móvel foi constituída por tampão fosfato 50 mmol L⁻¹ pH 7,0, em fluxo de 500 µL min⁻¹. As alíquotas foram coletadas a cada dois minutos e analisadas a 280 nm. A atividade enzimática foi testada como no item 4.2.1.4.10. A fração intitulada Pico I (FI) foi analisada em SDS-PAGE (4.2.1.2).

4.2.1.6 Avaliação enzimática da Fração Insolúvel (FI)

4.2.1.6.1 Atividades enzimáticas

Todos os testes enzimáticos realizados para a fração solúvel, foram feitos para a fração insolúvel, com a diferença que as reações foram paradas por centrifugação a 5.000 rpm. Os produtos foram analisados conforme metodologia de cada ensaio.

4.2.1.6.2 Avaliação do efeito dos inibidores de proteases

Com o propósito de identificar a atividade amidásica, foram feitos testes da FI após a incubação por 30 min, a 37 °C com solução dos inibidores E₆₄, TLCK e coquetel inibidor de proteases.

O teste de inibição com E₆₄ foi feito adicionando-se a 100 µL da solução enzimática, 10 µL de uma solução contendo 0,5 mM de E₆₄ e 0,5 mL de tampão

fosfato de sódio 0,1 M pH 7,6. A solução foi incubada por 30 min a 37 °C e posteriormente foram adicionados 0,5 mL de uma solução de caseína 1% (p/v) deixando reagir por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de TCA 10% (p/v), a solução centrifugada a 4500 rpm por 5 min e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 280 nm.

No teste com TLCK, a 100 µL da solução enzimática foram adicionados 10 µL de uma solução contendo 2 mM de TLCK e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹, pH 7,6. A solução foi incubada por 30 min a 37 °C e em seguida foram adicionados 0,5 mL de uma solução de caseína 1% (p/v) deixando reagir por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de TCA 10% (p/v), a solução centrifugada a 4500 rpm por 5 min e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 280 nm.

Para o ensaio de inibição com coquetel de inibidores, a 100 µL da solução enzimática foram adicionados 10 µL de uma solução 0,2 g mL⁻¹ de coquetel inibidores de proteases e 0,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 7,6. A solução foi incubada por 30 min a 37 °C, posteriormente foram adicionados 0,5 mL de uma solução de caseína 1% (p/v) deixando reagir por 10 min. A reação foi interrompida pela adição de 1,5 mL de TCA 10% (p/v), a solução foi centrifugada a 4500 rpm por 5 minutos e o sobrenadante lido em espectrofotômetro a 280 nm.

4.2.1.6.3 Solubilização da Fração Insolúvel

Para se proceder a quantificação e análise das proteínas presentes na fração insolúvel esta foi submetida a protocolos de solubilização. Nestes foram adicionados a 100 µL da fração insolúvel o mesmo volume de cada um dos reagentes: 3-(N-morfolino) ácido propanosulfônico/ 4-morfolino ácido

propanosulfônico (MOPS) 1 mol L⁻¹; 2-morfolinoetanosulfônico (MES) 1 mol L⁻¹; Uréia 2 mol L⁻¹; DMSO concentrado, ácido nítrico 3 mol L⁻¹ ; ácido nítrico concentrado; ácido clorídrico 3 mol L⁻¹; ácido clorídrico concentrado; ácido fosfórico 3 mol L⁻¹; ácido fosfórico concentrado; ácido acético 3 mol L⁻¹ e ácido acético concentrado. Após 30 min a solução e/ou suspensão obtida foi avaliada a olho nu e ao microscópio óptico.

4.2.1.6.4 Preparo da FI para Eletroforese

A FI solubilizada com ácido acético concentrado foi dialisada contra água com trocas freqüentes em intervalos médios de 1 h durante o dia. A amostra foi liofilizada, re-suspendida em 50 µL de água contendo 0,06% de Tween, adicionado 20 µL de tampão de amostra, fervida por 5 min e posteriormente aplicada ao sistema de eletroforese, e analisada conforme descrito no item 4.2.1.2.

4.2.2 Caracterização enzimática da esterase B da FI

4.2.2.1 Efeitos do pH na atividade da esterase B

O efeito do pH sobre a atividade esterásica contra pNPP foi determinado no intervalo de pH entre 4,0 a 8,0 utilizando os tampões citrato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH 4,0 e 5,0; e fosfato de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH de 6,0 a 8,0. A atividade enzimática foi determinada utilizando o pNPP como substrato conforme descrito no item 4.2.1.4.13.

4.2.2.2 Efeito da temperatura na estabilidade da esterase B

Primeiramente o efeito da temperatura na atividade foi testado incubando alíquotas de 100 µL da FI em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, pH 7,0 por 30 minutos em

temperaturas variando de 30 °C a 80 °C. Em seguida os testes de estabilidade foram conduzidos nas temperaturas em que se observou melhor desempenho da enzima, com incubação por até 120 min, seguida por medida de atividade remanescente. Alíquotas foram retiradas em intervalos regulares de de tempo, e a atividade remanescente determinada usando pNPP como substrato (item 4.2.1.4.13).

4.2.2.3 Efeito de solventes orgânicos e sais na atividade enzimática

O efeito de cada solvente orgânico sobre a atividade da FI foi determinado por incubação da enzima por 30 min, a temperatura ambiente em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 contendo 50% (v/v) dos solventes orgânicos: etanol, metanol, isopropanol, butanol, diclorometano, acetona e dimetilsufóxido. A atividade frente aos sais foi determinada por incubação da FI por 30 min, a temperatura ambiente, em soluções contendo 5 mmol L⁻¹ dos sais MnSO₄, CuSO₄, EDTA, FeCl₃, MgSO₄, CaCl₂, ZnCl₂, SnCl₂ respectivamente. Após tratamentos com solventes orgânicos ou sais, a atividade esterásica foi determinada usando pNPP, conforme item 4.2.1.4.13.

4.2.2.4 Especificidade enzimática (K_m)

A constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima foram determinadas variando a concentração do pNPP de 0,5 a 7,9 mmol L⁻¹. A atividade enzimática foi testada como descrito no item 4.2.1.4.13. Os valores de K_m e V_{máx} da esterase foram calculados utilizando o programa Microcal Origin Professional 8.0. O gráfico Lineweaver-Burk foi construído utilizando a razão inversa das concentrações e das atividades enzimáticas (1/concentração e 1/atividade (UE)), respectivamente, com auxílio do programa Microcal Oringin Professional 8.0.

4.2.3 Estudo da degradação do Opera[®]

A capacidade das enzimas de modificar o fungicida foi avaliada por meio de análise espectrofotométrica dos padrões epoxiconazol e piraclostrobin, bem como da formulação do fungicida Opera[®] (0,03%). A análise espectrofotométrica foi realizada nos comprimentos de onda entre 200 a 440 nm.

4.2.3.1 Caracterização espectrofotométrica do fungicida Opera[®] e seus componentes ativos

O meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] foi filtrado em membrana de diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm. Após filtragem foi realizada varredura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda variando de 200 a 440 nm para visualização das bandas características dos grupos químicos presentes na formulação. O mesmo procedimento foi realizado com as soluções padrões de epoxiconazol 45,5 µmol L⁻¹ e piraclostrobin 103 µmol L⁻¹. Os padrões foram inicialmente dissolvidos em 200 µL de acetona e o volume final da solução completado com água.

4.2.3.2 Ação do microrganismo na degradação do fungicida

A capacidade de biotransformação do Opera[®] pelo microrganismo foi avaliada após 120 horas de inoculação do microrganismo selecionado em meio de cultura seletivo J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®]. Após filtragem do meio em membrana com diâmetro de 47 mm e poros de 0,45 µm, alíquotas foram submetidas à varredura espectrofotométrica nos comprimentos de onda variando de 200 a 440 nm. Como referência as bandas obtidas foram comparadas com as

produzidas pelo meio seletivo J. E. - suplementado com Opera[®] sem inóculo do microrganismo, filtrado em membranas como descrito anteriormente. A diminuição da concentração de componentes na amostra foi analisada pela diminuição da absorvância nos comprimentos de onda analisados (Lambert-Beer – MANSON; HENRY, 1974).

4.2.3.3 Ação das oxirredutases e esterase B da FI e FS na degradação do epoxiconazol e piraclostrobin

4.2.3.3.1 Ação das enzimas da FS e FI sobre o epoxiconazol

A degradação enzimática foi avaliada adicionando-se 100 µL da suspensão de enzimas (obtidas no item 4.2.1.3) a 2,5 mL de meio J. E. líquido - suplementado com epoxiconazol 45,5 µmol L⁻¹, deixado a temperatura ambiente por 10 min. As absorvâncias foram verificadas nos comprimentos 200, 260 e 280 nm. Provas em branco foram feitas com meio J. E. líquido - suplementado com epoxiconazol e meio J. E. líquido contendo enzima.

4.2.3.3.2 Ação das enzimas da FS e FI sobre o piraclostrobin

A degradação enzimática foi avaliada adicionando-se 100 µL da suspensão de enzimas (obtidas no item 4.2.1.3) a 2,5 mL de meio J. E. líquido - suplementado com piraclostrobin 103 µmol L⁻¹, deixado à temperatura ambiente por 10 min. As absorvâncias foram verificadas nos comprimentos 200, 260 e 280 nm. Provas em branco foram feitas com meio J. E. líquido - suplementado com epoxiconazol e meio J. E. líquido contendo enzima.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA ÁREA DE COLETA

5.1.1 Localização

A área de estudo está localizada no Estado de Goiás, no município de São Miguel do Passa Quatro. As coletas de solo realizaram-se na coordenada central 48° 40' 30" Oeste e 16° 56' 00" Sul. A carta-imagem, apresentada na **Figura 4**, ilustra a exata localização dos pontos de coleta desta pesquisa, assim como o entorno próximo.

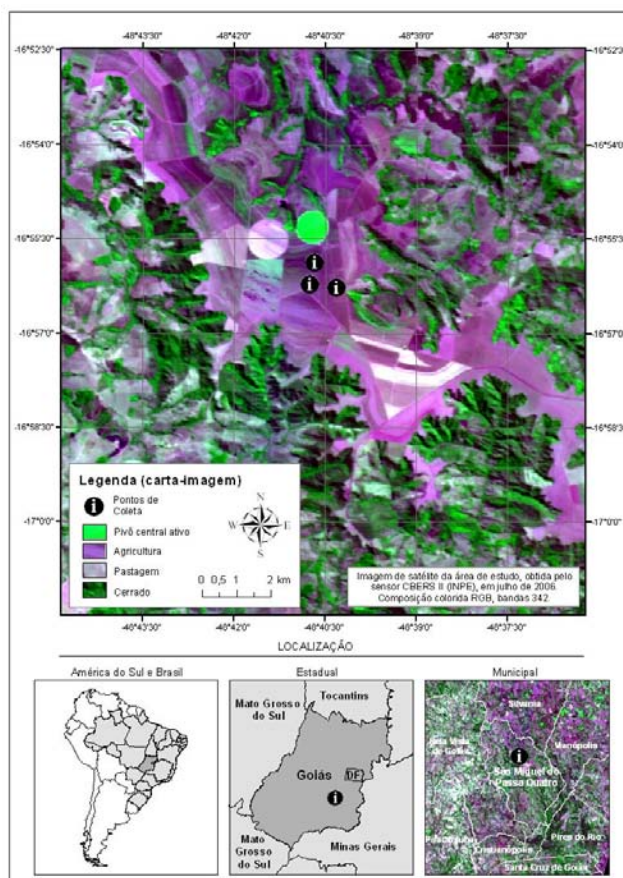


Figura 4. Carta-imagem da área de estudo e entorno próximo. Imagem do satélite CBERS II, disponibilizada pelo INPE, referente ao mês de julho/2006 (órbita 158, ponto 119).

5.1.2 Cobertura vegetal e uso do solo

As informações sobre a cobertura vegetal e uso do solo se baseiam, principalmente, na interpretação visual de imagem obtida pelo satélite CBERS II (Satélite Sino-Brasileiro de Recursos Terrestres), disponibilizada gratuitamente pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, www.inpe.br), referente ao mês de julho/2006 (**Figura 4**). A imagem obtida pela órbita 158, ponto 119 apresenta uma resolução espacial de 20 metros, permitindo a identificação de alvos naturais e antrópicos da área em questão. Informações complementares utilizadas nesta caracterização referem-se aos dados digitais analisados pelo projeto “Identificação de Áreas Prioritárias para a Conservação da Biodiversidade no Estado de Goiás”, na escala original 1:250.000 (SANO et al., 2006).

De uma forma geral, a região apresenta uma elevada fragmentação da paisagem, em virtude do estágio avançado de ocupação do bioma Cerrado em Goiás (RATTER et al. 1996). Especificamente, a área de estudo se destaca pela presença de atividades agropecuárias, representadas pelas classes de agricultura mecanizada e pastagem nativa extensiva. Quanto aos remanescentes de cerrado, em geral classes de cerrado denso e matas de galerias com vegetação ripária, estes ocupam cerca de 20% da área do referido município.

A agricultura mecanizada observada no ponto de coleta e arredores é destinada ao plantio de soja para obtenção de sementes com qualidades comerciais. Para isto a área plantada passou por procedimentos necessários para o desenvolvimento de uma lavoura de qualidade. Neste local o Opera[®] foi o principal fungicida utilizado por 2 anos consecutivos antes da coleta, garantindo um ponto adequado para obtenção de amostras de solo com teores consideráveis do fungicida.

5.1.3 Relevo

A compreensão do relevo de uma dada região é possível pela análise de determinados aspectos morfométricos da paisagem, tais como a hipsometria e a declividade do terreno, variáveis que descrevem a forma da superfície terrestre e muitos dos fenômenos físicos relacionados. Dentro deste contexto, avaliamos as duas variáveis mencionadas, com vistas a uma melhor descrição física da área de estudo.

A primeira variável, hipsometria, diz respeito às medidas de altitudes ou cotas altimétricas da superfície terrestre, com relação a um determinado referencial. De acordo com o mapa hipsométrico apresentado na **Figura 5A**, a área de coleta está situada em cotas a partir de 1.000 metros, até a altitude de 1600 metros, ou seja, uma das regiões mais elevadas do estado de Goiás, com relação ao nível do mar.

Por outro lado, e sendo esta área ocupada em larga escala pela agricultura com culturas anuais, conforme ilustrado na **Figura 4**, a região em destaque apresenta um relevo bastante plano, e de grande altitude, normalmente identificado por chapada. Estas formações de chapada são cercadas por zonas de erosão recuante, isto é, por processos erosivos em rochas calcárias e/ou silicosas que apresentam maior porosidade e menor resistência, onde os agentes intempéricos tais como o vento, escoamento da água da chuva e sol atuam com maior intensidade.

A segunda variável, a declividade (**Figura 5B**) ilustra a condição natural de erosão, a qual se estende por esta área de estudo. Neste mapa, assim como no mapa hipsométrico, as informações são transmitidas por meio de um gradiente de cores, destacando as áreas mais planas daquelas mais declivosas ou íngremes. Nas

áreas mais íngremes incide-se um maior risco de erosão e, conseqüentemente, uma menor aptidão para a agricultura, sobretudo a mecanizada. Como observado na **Figura 5B**, nesta região a classe de declividade predominante fica entre 0 e 10°, chegando a uma declividade mais acentuada entre 30° e 45° nos trechos próximos às vertentes de rios, nascentes e encostas de morros.

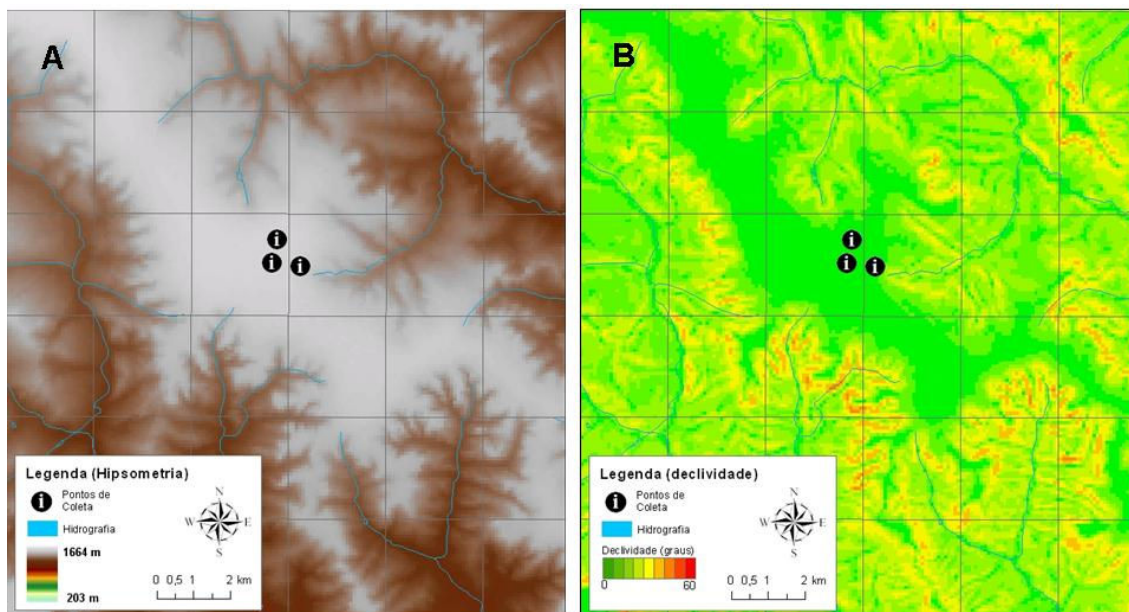


Figura 5. Mapas hipsométrico (A) e de declividade (B) para a área de estudo (município de São Miguel do Passa Quatro).

Os dados observados na caracterização do relevo mostram que os pontos de coleta estão próximos a nascentes, vertentes de rios e encostas de morros, fatores que levam a uma maior preocupação na utilização de agrotóxicos, uma vez que os componentes do fungicida utilizado apresentam alta toxicidade para peixes e microrganismos aquáticos. Os agrotóxicos podem chegar com grande facilidade aos leitos dos rios e lençóis freáticos, visto que o solo apresenta alta porosidade e bom escoamento da água da chuva, o que potencializa os riscos de contaminação.

5.1.4 Solos

De acordo com uma classificação baseada na textura, os tipos de solos encontrados nesta região são basicamente três: Latossolos, Cambissolos e Argissolos. Especificamente para a área onde foram coletadas as amostras de solos, verifica-se o predomínio de Latossolos e Cambissolos (**Figura 6**).

Esta nomenclatura distingue, em termos gerais, o desenvolvimento do solo, ou seja, o quão longo foi o processo de intemperismo sobre as rochas em decomposição, resultando nas camadas ou horizontes encontrados em cada tipo de solo.

A classe de solos mais desenvolvida é a dos Latossolos, muito comum no bioma Cerrado (RIBEIRO; WALTER, 1998). Embora bastante lixiviados, isto é, com baixa fertilidade, estes apresentam boa taxa de infiltração e armazenamento de água em solos profundos, sendo facilmente corrigidos com uso de fertilizantes, como fósforo e nitrogênio. Sua maior vantagem consiste no fato de estar associado às áreas de chapadas, com superfícies planas, adequadas para a agricultura mecanizada. Tais características naturais, aliadas ao avanço tecnológico da agricultura, fizeram do Cerrado um bioma ameaçado de extinção, considerado hoje como o celeiro agrícola do país (ANACLETO; MIZIARA, 2006; FERREIRA et al. 2007).

Os Cambissolos caracterizam-se por serem pouco profundos, com ausência de argila acumulada. São moderadamente drenados, e em geral associados aos terrenos com maior declividade, sujeitos a erosão (ANACLETO; MIZIARA, 2006; FERREIRA et al. 2007).

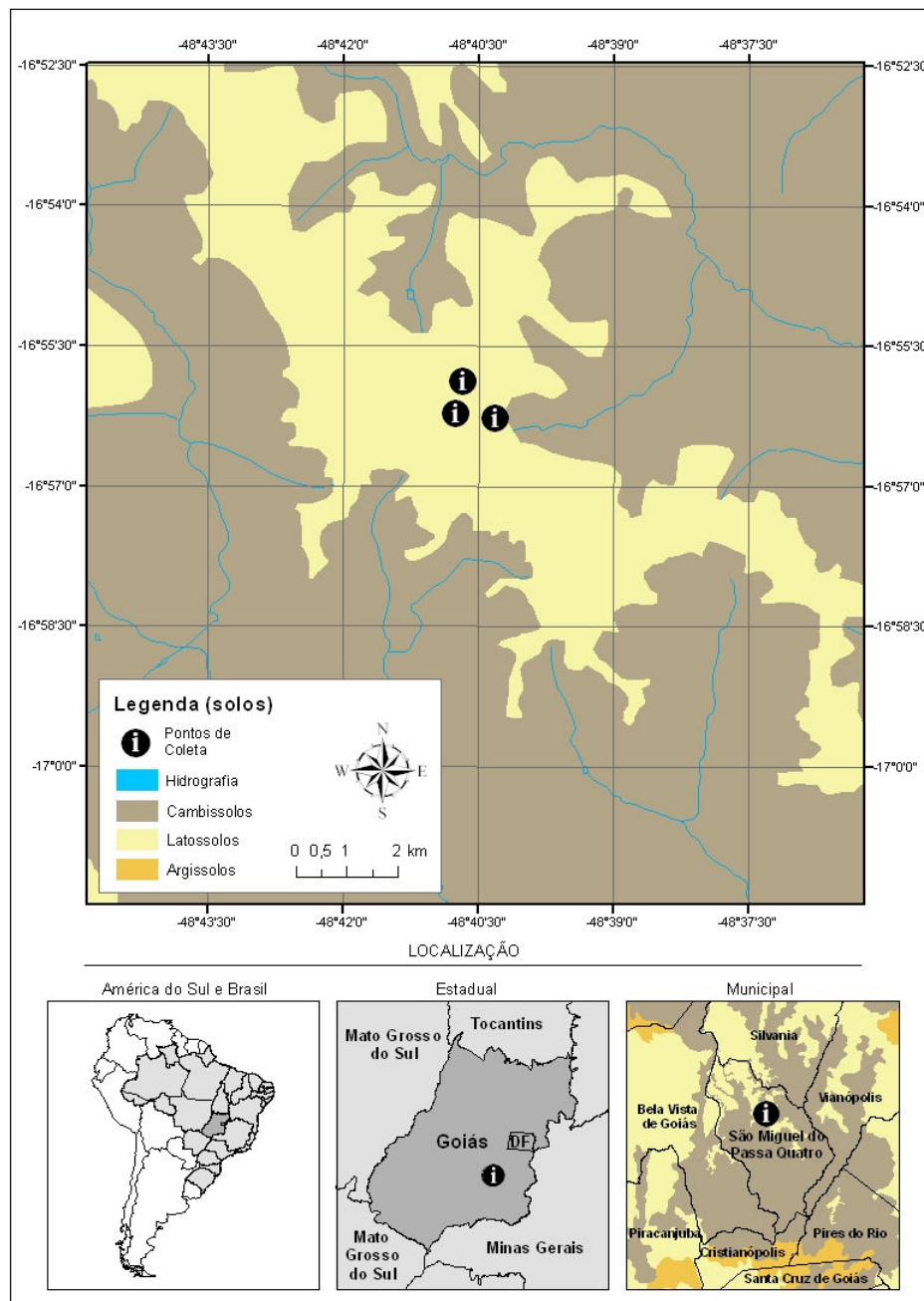


Figura 6. Mapa de solos para a área de estudo.

A presença de Latossolos na área de coleta é um fator importante para análise, pois o uso contínuo dos fungicidas componentes do Opera[®] pode ao longo do tempo ser carregado pelas chuvas e águas de irrigação para o lençol freático em função da permeabilidade do terreno. Por outro lado, a presença de

Cambissolos, devido à tendência à erosão constitui também fator de risco ambiental, uma vez que a área de estudo encontra-se próxima a nascentes e riachos.

5.2 SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

5.2.1 Isolamento e contagem de colônias

A análise do crescimento dos microrganismos em meio de cultura seletivo J.E. suplementado com Opera[®] em concentrações crescentes mostrou que nas amostras de solo coletados a 20 cm de profundidade o crescimento foi maior do que nas coletadas a 80 cm para as concentrações de 0,01%, 0,02% e 0,03% de fungicida (**Tabela 3A**). Entretanto, quando a concentração do Opera[®] foi de 0,1%, apenas as alíquotas coletadas a 80 cm apresentaram crescimento de microrganismos, como pode ser observado na **Tabela 3B**.

Tabela 3A. Isolamento dos microrganismos resistentes ao Opera[®] à profundidade de 0 a 20 cm.

Ponto de coleta	Concentração de Opera [®]	10 ⁶ UFC g ⁻¹
1	Controle	427 ± 10
	0,01%	349 ± 3
	0,02%	257 ± 4
	0,03%	218 ± 2
	0,1%	-
2	Controle	220 ± 5
	0,01%	185 ± 2
	0,02%	159 ± 3
	0,03%	118 ± 3

	0,1%	-
	Controle	440 ± 1
	0,01%	209 ± 2
3	0,02%	182 ± 1
	0,03%	143 ± 1
	0,1%	-

Tabela 3B. Isolamento dos microrganismos resistentes ao Opera[®] à profundidade de 80 cm a 1 m.

Ponto de coleta	Concentração de Opera [®]	10 ⁶ UFC g ⁻¹
	Controle	165 ± 2
	0,01%	41 ± 3
1	0,02%	25 ± 4
	0,03%	17 ± 2
	0,1%	03
	Controle	222 ± 1
	0,01%	127 ± 2
2	0,02%	27 ± 2
	0,03%	25 ± 2
	0,1%	03
	Controle	218 ± 1
	0,01%	160 ± 2
3	0,02%	32 ± 1
	0,03%	23 ± 1
	0,1%	03

Além da ação do fungicida, o efeito bactericida do Opera[®] pode ser comprovado pelos resultados apresentados, uma vez que a quantidade de

microrganismos decaí à medida que se aumenta a concentração de Opera[®], confirmando a atuação de amplo espectro descrita pelo fabricante (BASF, 2007c).

É interessante observar que isolados que apresentaram resistência ao Opera[®] em concentração de 0,1% foram encontrados em solo coletado a uma profundidade de 0,8 a 1,0 m. Os microrganismos encontrados nesta profundidade do solo provavelmente apresentam menores exigências de oxigênio por serem anaeróbios facultativos, utilizando uma via alternativa na ausência ou em baixa disponibilidade de oxigênio para a obtenção de energia. Este mecanismo pode ser a justificativa pela qual estes microrganismos cresceram na presença do Opera[®], visto que um dos componentes do fungicida apresenta ação inibitória da cadeia transportadora de elétrons (KARADIMOS et al., 2007).

5.2.2 Seleção de microrganismos resistentes ao Opera[®]

A seleção dos microrganismos baseou-se em observações macroscópicas de crescimento em meio de cultura seletivo J. E. sólido - suplementado com Opera[®]. As nove colônias selecionadas foram repicadas em caldo nutriente e posteriormente inoculadas em meio de cultura seletivo J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®]. Deste processo obteve-se o crescimento de três microrganismos como observado na **Tabela 4**.

Tabela 4. Crescimento de colônias em Meio de Cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®].

Colônia selecionada	Crescimento
1801	-
1803	-

1805	+
2801	+
2803	-
2805	-
3801	-
3803	+
3805	-

Legenda: (+) crescimento; (-) ausência de crescimento.

Os microrganismos 1805, 2801 e 3803 tiveram curva de crescimento analisada quando inoculados em meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®]. Esta etapa foi decisiva para a seleção do microrganismo que melhor se adaptou ao meio suplementado com fungicida. Como pode ser observado na **Figura 7**, o microrganismo 1805 apresentou melhor crescimento neste meio, com pico de densidade óptica em 48 horas após a inoculação.

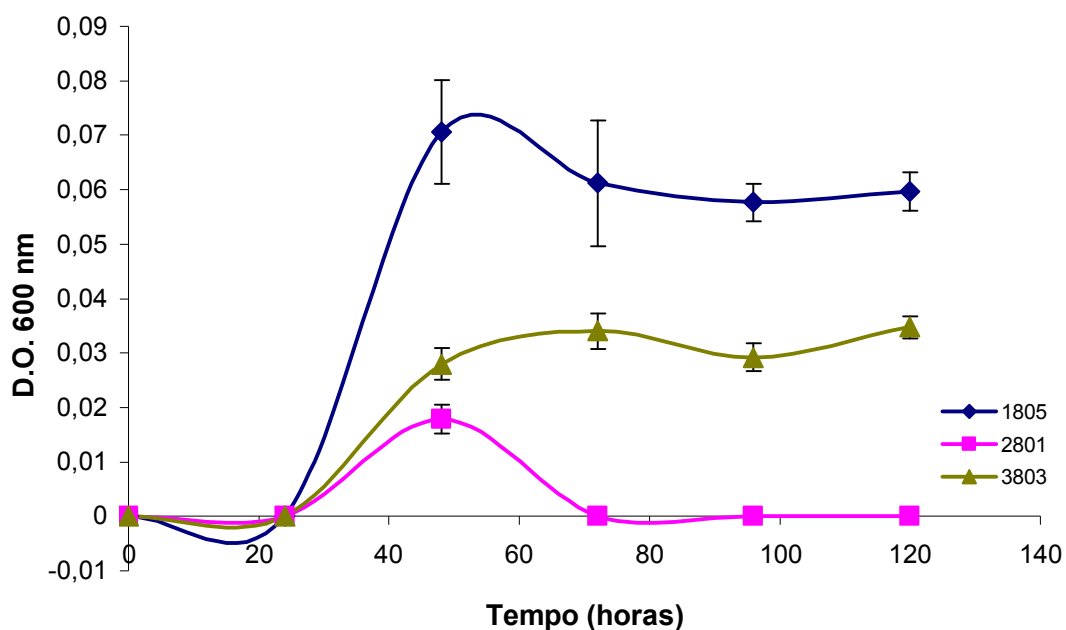


Figura 7. Crescimento dos microrganismos selecionados em meio de cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] como única fonte de carbono.

Os demais isolados apresentaram crescimento inferior, o que indica que o 1805 possui uma melhor adaptabilidade ao meio. Os microrganismos 1805 e 3803 apresentaram uma DO estabilizada após 48 horas, enquanto o microrganismo 2801 apresentou um leve aumento na densidade óptica em 48 horas, mas após este período observou-se uma diminuição acentuada na DO. É possível que a diminuição da DO seja resultante da fragilidade e rompimento da membrana celular do microrganismo, uma vez que o epoxiconazol atua inibindo a síntese de lipídeos da membrana, componente fundamental na manutenção e integridade osmótica da membrana celular bacteriana.

Diante do crescimento mais acentuado do microrganismo 1805, este foi submetido a teste de viabilidade celular. Como pode ser visto na **Figura 8** tanto a DO quanto as UFCs apresentaram um considerável aumento no período de 48 horas, após o inóculo em meio de cultura J. E. líquido suplementado com Opera[®], com pico de células viáveis há 72 horas, diminuindo após este período. Esta queda no número de células viáveis é característica da cinética de crescimento de microrganismos, possivelmente pela diminuição de fonte de carbono. Os estágios de crescimento são facilmente visualizados na **Figura 8**, dentre eles o estágio de latência, exponencial e fase estacionária.

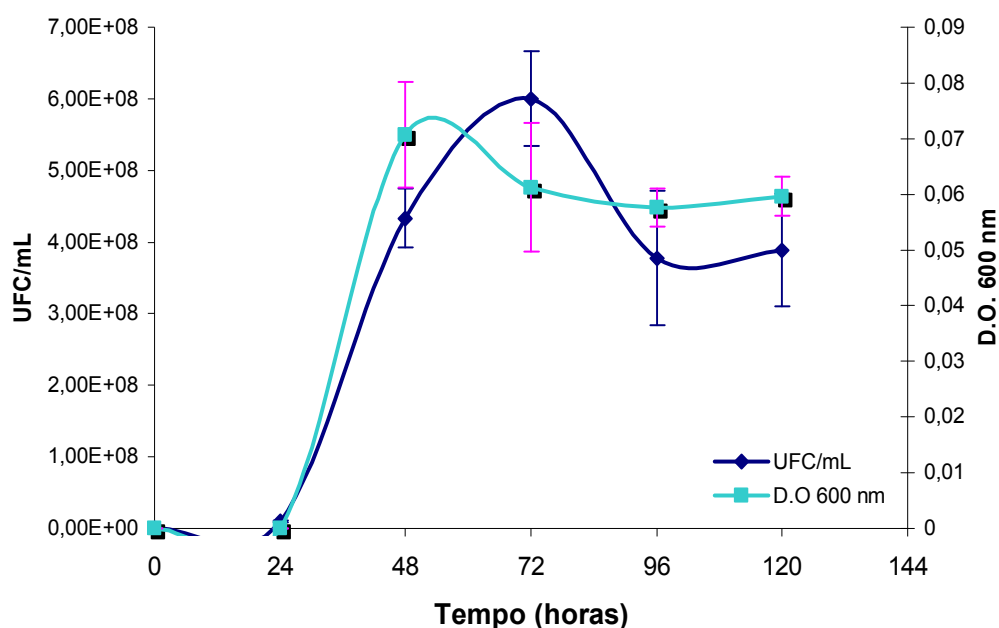


Figura 8. Crescimento do microrganismo 1805 em meio de cultura J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] como única fonte de carbono.

Diante da adaptabilidade do microrganismo 1805 ao meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®], este foi considerado como o microrganismo mais promissor e utilizado no restante deste trabalho.

5.2.3 Caracterização morfológica do microrganismo selecionado

A caracterização morfológica do microrganismo selecionado 1805 foi conduzida por meio da análise macroscópica e microscópica.

As colônias foram caracterizadas de acordo com Fonseca et al. (2000), como circulares, com diâmetros médios de 1 cm, com características opacas, de bordas lisas e com coloração variando entre o creme e o branco, heterogêneas com centro mais escuro que a região periférica. Observou-se também presença de elevação da colônia e grande quantidade de muco, apresentando aspecto viscoso e grande capacidade elástica.

A microscopia óptica do microrganismo apresentada na **Figura 9** evidencia que o isolado pertence à classe dos bacilococcos Gram-negativos. A análise das lâminas permitiu a observação de alterações morfológicas nos diferentes meios, o que indica que o microrganismo apresenta características polimórficas.

A capacidade de alterar sua morfologia para se adaptar ao meio representa uma característica evolutiva interessante, uma vez que possibilita uma maior resistência às alterações do ambiente (TORTORA et al., 2005).

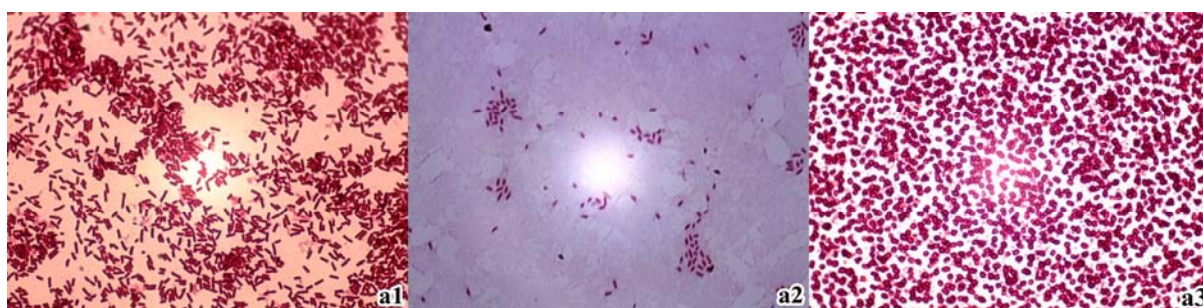


Figura 9. Microscopia óptica do microrganismo 1805 em (a1) caldo nutriente, (a2) meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] como única fonte de carbono, e (a3) meio nutriente. Aumento de 1000x.

5.2.4 Identificação e caracterização bioquímica

Os resultados dos testes bioquímicos estão mostrados na **Tabela 5**. Os métodos bioquímicos de identificação usando o kit comercial Bactray[®] e analisados em sistema Bactray (versão 2.1) identificaram o microrganismo como *Klebsiella* sp. pelo código numérico 5405673. Comparando as provas bioquímicas (**Tabela 5**) com os obtidos por Grimont e Grimont (2005) para identificação das espécies de *Klebsiella*, observou-se uma porcentagem de correlação de 83,3% com *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, 77,8% com *K. Planticola*, 72,2% com *K. terrigena* e 61,11% com *K. Pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

A diferença do isolado 1805 com *K. pneumoniae* foi verificada nos testes de capacidade de fermentação butanodióxica (Vokes Proskauer) que foi positiva para

o microrganismo 1805. Este teste constitui uma das características principais do grupo *Klebsiella*, não sendo positivo apenas nas subespécies *azaenae* e *rhinoscleromatis*. Já a produção de malonato que foi observada em todas espécies de *Klebsiella*, exceto na subespécie *azaenae*, foi negativo para o 1805. A fermentação da lactose que constitui outro teste positivo para praticamente todas *Klebsiellas*, exceto nas *K. pneumoniae* subespécies *azaenae* e *rhinoscleromatis*, para o microrganismo 1805 foi negativo (Grimont; Grimont, 2005; Drancourt et al., 2001).

O Sistema Bactray permite que a espécie seja identificada quando se obtém uma confiabilidade superior a 90%. Neste caso os testes realizados não foram suficientes para a determinação da espécie, permitindo, no entanto, uma correlação de 99% com o gênero *Klebsiella* sp.

Tabela 5. Comparação entre as características bioquímicas do isolado 1805 com *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *Klebsiella oxycota* e *Klebsiella planticola*

Provas Bioquímicas	Isolado 1805	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> *	<i>Klebsiella planticola</i> *	<i>Klebsiella terrigena</i> *	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>
Galactopiranosidase	+	+	+	+	+
Lisina descarboxilase	+	+	+	+	-
Ornitina descarboxilase	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-
Urease	+	+	+	+	-
Vokes Proskauer	-	+	+	+	-
Indol	-	-	-	-	-
Citrato	+	+	+	+	+
Malonato	-	+	+	+	-
Rhamnose	+	+	+	+	-
Adonitol	-	-	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-
Sacarose	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+
Rafinose	+	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	-
Fixação de nitrogênio	+	+	+	-	+
Correlação dos testes (%)		83,3%	77,8%	72,2%	61,11%

(+) teste positivo; (-) teste negativo

* resultados publicados por Grimont e Grimont (2005).

5.2.5 Testes de susceptibilidade a antibióticos

Os testes de susceptibilidade a antibióticos devem ser feitos rotineiramente para verificar a ação de antibióticos sobre microrganismos, a fim de determinar a virulência, caracterizar a susceptibilidade a grupos específicos de drogas e determinar um tratamento no caso de infecção ou controle de infecções por estes microrganismos (BAR et al, 2007) Os testes do microrganismo selecionado mostraram alta sensibilidade às drogas representativas dos principais grupos (Tabela 6), que foram penicilinas de amplo espectro, penicilina de amplo espectro associado a beta-lactâmicos, cefalosporinas de primeira e terceira geração, aminoglicosídeos da família das canamicinas e gentamicinas, quinolonas de segunda geração, tetraciclina de ação rápida e sulfonamidas.

Tabela 6. Sensibilidade do isolado 1805 aos antibióticos testados.

Antibióticos	Concentração do disco	Tamanho do Halo (mm)	Resultados
Ampicilina	10 µg	> 17	Sensível
Amoxicilina/Ac. Clavulônico	20/10 µg	> 18	Sensível
Cefalotina	30 µg	> 18	Sensível
Ceftriaxona	30 µg	> 21	Sensível
Amicacina	30 µg	> 17	Sensível
Gentamicina	10 µg	> 15	Sensível
Ciprofloxacina	5 µg	> 21	Sensível
Tetraciclina	30 µg	> 19	Sensível
Sulfazotrim	25 µg	> 18	Sensível

A alta sensibilidade do microrganismo 1805 aos antibióticos testados, desde as sulfas até os compostos de largo espectro de ação como aminoglicosídeos, beta-lactâmicos e quinolonas indica que o isolado provavelmente não esteve em contato direto com tais drogas, sugerindo que microrganismo seja uma cepa selvagem, uma vez que a resistência aos antibióticos é uma característica que pode

ser desenvolvida após contato direto, por mecanismos tais como mutação genética e alterações bioquímicas (SILVA, 2006).

5.2.6 Identificação molecular

O DNA cromossomal foi extraído do microrganismo 1805 e a fração referente ao gene 16S rDNA foi amplificada.

A **Figura 10** mostra na raia 2 o DNA total, com aproximadamente 12 mil pares de base e na raia 3, a fração amplificada do gene 16S rDNA, com aproximadamente 500 pb.

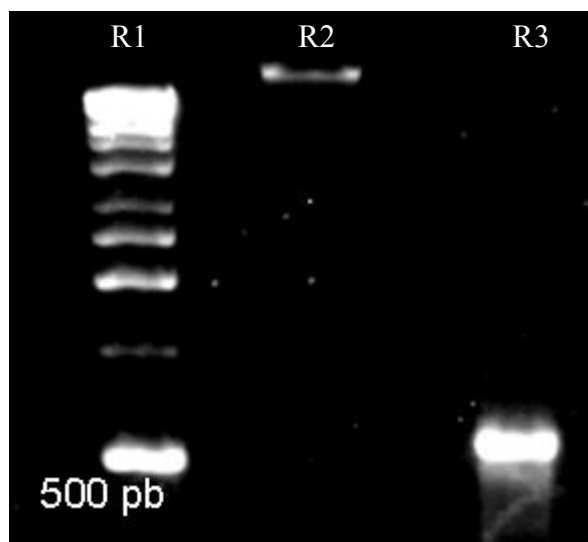


Figura 10. Eletroforese em gel de agarose do DNA cromossomal e fração amplificada gene 16S rDNA. Raia 1 – marcador de DNA (500 pb à 10.000 pb); Raia 2 – DNA cromossomal; Raia 3 – fração amplificada

A seqüência de nucleotídeos da fração amplificada utilizando os “primers” R16A e R16B está apresentada na **Figura 11**.

A seqüência obtida, com 488 pb, apresenta-se com alta qualidade, visto que todos os nucleotídeos foram identificados. Dentre os nucleotídeos encontramos 25,2% de adeninas (123 nucleotídeos); 23,4% de citosinas (114 nucleotídeos); 33,6% de timinas (165 nucleotídeos) e 17,83% de guanina (87 nucleotídeos). A

depositadas no banco de dados do GenBank, usando o programa BLASTn, disponível no banco de dados do NCBI.

Para construção do filograma (**Figura 12**) também foram utilizadas seqüências de subespécies de *Klebsiella* que não apresentaram correlação com o gene 16S rDNA do microrganismo 1805 com aquelas depositadas no banco de dados do GenBank, entre elas as seqüências dos microrganismos *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, foram utilizadas com controle negativo de alinhamento (“out group”).

```

10          20          30          40          50
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1805
Klebsiella sp. (FM164637.1)  TGAACGC--T GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGCACAG
K.pneumoniae (AM992199.2)  TGAACGC--T GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGCACAG
K.oxytoca (EU231629.1)    TGAACGC--T GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGCACAG
K.terrigena (Y17670.1)   TGAACGC--T GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGCACAG
K.planticola (Y17659.1)   TGAACGC--T GCGGGCAGGC CTAACACATG CAAGTCGAGC GGTAGCACAG
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) TGAAGA--- GTTCTTTGGT TCCAGCCAGC TGTCTCAGTT TATGGACCAG
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1)  TGAAGAAGC GGTGCGCGGC GTCACTAAAG AGATCCGTAT TCCGACGCTG

60          70          80          90          100
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1805
Klebsiella sp. (FM164637.1)  AG-AGCTTGC T--CTCGGGT GACG----AG CGGCGGACGG GTGAGTAATG
K.pneumoniae (AM992199.2)  AG-AGCTTGC T--CTCGGGT GACG----AG CGGCGGACGG GTGAGTAATG
K.oxytoca (EU231629.1)    AG-AGCTTGC T--CTCGGGT GACG----AG CGGCGGACGG GTGAGTAATG
K.terrigena (Y17670.1)   AG-AGCTTGC T--CTCGGGT GACG----AG CGGCGGACGG GTGAGTAATG
K.planticola (Y17659.1)   AG-AGCTTGC T--CTCGGGT GACG----AG CGGCGGACGG GTGAGTAATG
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) AACCAACC GC TGTCTGAGAT CACGCACAAA CGTCGTATCT CCGCACTCGG
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1)  GA-AGAGTGC GA-CGTCTGC CACGGT--AG CGGCGCCAAG GCCCGCAGCA

110         120         130         140         150
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1805
Klebsiella sp. (FM164637.1)  T-CTGGGAAA CTGCCTGATG GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA
K.pneumoniae (AM992199.2)  T-CTGGGAAA CTGCCTGATG GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA
K.oxytoca (EU231629.1)    T-CTGGGAAA CTGCCTGATG GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA
K.terrigena (Y17670.1)   T-CTGGGAAA CTGCCTGATG GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA
K.planticola (Y17659.1)   T-CTGGGAAA CTGCCTGATG GAGGGGGATA ACTACTGGAA ACGGTAGCTA
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) CCCAGGCGGT CTGTCGCAAG AGCGCGCAGG CTTTCGAAGTT CGAGACGTAC
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1)  AACCGCAGAC CTGTCCGACC TGTCA TGGCCG CAGGCCAGGT GCAGATGCCG

160         170         180         190         200
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1805
Klebsiella sp. (FM164637.1)  ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGTGG GGGACCTTCG GGCCTCATGC
K.pneumoniae (AM992199.2)  ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGTGG GGGACCTTCG GGCCTCATGC
K.oxytoca (EU231629.1)    ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGTGG GGGACCTTCG GGCCTCATGC
K.terrigena (Y17670.1)   ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGTGG GGGACCTTCG GGCCTCATGC
K.planticola (Y17659.1)   ATACCGCATA ACGTCGCAAG ACCAAAGTGG GGGACCTTCG GGCCTCATGC
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) ACCCGACTCA CTACGGTCGC GTATGTCCAA TCGAAACGCC TGAA--GGTC
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1)  CAGGGCTTTT TTGCGGTACA GCAGACCTGT CCGCACTGCC AGGG--ACGC

210         220         230         240         250
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
1805
Klebsiella sp. (FM164637.1)  CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTGG TAGGTGGGGT AACGGCTCAC
K.pneumoniae (AM992199.2)  CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTGG TAGGTGGGGT AACGGCTCAC

```

```

K.oxytoca (EU231629.1) CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTAG TAGGTGGGGT AACGGCTCAC
K.terrigena (Y17670.1) CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTAG TAGGTGAGGT AATGGCTCAC
K.planticola (Y17659.1) CATCAGATGT GCCCAGATGG GATTAGCTAG TAGGTGGGGT AATGGCTCAC
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) CGAACATCGG TCTGATCAAC TCCCTGTCCG TGTACGCCA GACCAA-CGA
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) GGTACGCTGA TTAAGATCC GTGCAATAAA T-GTCATGGC CATGGC-CGC

                260           270           280           290           300
1805          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Klebsiella sp. (FM164637.1) CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
K.pneumoniae (AM992199.2) CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
K.oxytoca (EU231629.1) CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
K.terrigena (Y17670.1) CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
K.planticola (Y17659.1) CTAGGCGACG ATCCCTAGCT GGCTGAGAG GATGACCAGC CACACTGGAA
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) ATATGGCTTC CTTGAGACGC CGTATCGTAA AGTGACCGAC GGTGTGGTTA
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) GTAGA-AAAG ACCAAAACCC TGTCCGTTAA AATTCGGCGC GCGTGGATA

                310           320           330           340           350
1805          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Klebsiella sp. (FM164637.1) CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACG----G GAGGCAGCAG TGGGGAATAT
K.pneumoniae (AM992199.2) CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACG----G GAGGCAGCAG TGGGGAATAT
K.oxytoca (EU231629.1) CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACG----G GAGGCAGCAG TGGGGAATAT
K.terrigena (Y17670.1) CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACG----G GAGGCAGCAG TGGGGAATAT
K.planticola (Y17659.1) CTGAGACACG GTCCAGACTC CTACG----G GAGGCAGCAG TGGGGAATAT
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) CTGACGAAAT TCACTACCTG TCTGCTATCG AAGAAGGCAA CTACGTTATC
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) CCGGTGACCG GATCCGTCTG GCGGGC---G AAGGCGAGGC CCGCGAACAT

                360           370           380           390           400
1805          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Klebsiella sp. (FM164637.1) TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCCGTGT GTGAAGAAGG
K.pneumoniae (AM992199.2) TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCCGTGT GTGAAGAAGG
K.oxytoca (EU231629.1) TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCCGTGT GTGAAGAAGG
K.terrigena (Y17670.1) TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCCGTGT ATGAAGAAGG
K.planticola (Y17659.1) TGCACAATGG GCGCAAGCCT GATGCAGCCA TGCCCGTGT ATGAAGAAGG
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) GCTCAGGCGA ACTCCAACCT G-GATGAAAA CGGCCACTTC GTAGAAGACC
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) GCGCGCCGG CAGGCGATCT G-TACGTTCA GGTTCAG--- GTGAAGCAGC

                410           420           430           440           450
1805          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
Klebsiella sp. (FM164637.1) CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGCGGGG AGGAAGGCCG TGAGGTTAAT
K.pneumoniae (AM992199.2) CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGCGGGG AGGAAGGCCG TGAGGTTAAT
K.oxytoca (EU231629.1) CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGCGGGG AGGAAGGCCG TGAGGTTAAT
K.terrigena (Y17670.1) CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGCGGGG AGGAAGGCCG TGAGGTTAAT
K.planticola (Y17659.1) CCTTCGGGTT GTAAAGCACT TTCAGCGGGG AGGAAGGCCG TGAGGTTAAT
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) TGGTGAACCTG CCGTAGCAAA GGCG--AATC CAGCTTGTTT AGCCGTGACC
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) ACGCTATCTT TGAGCGTGAA GGCAATAACC TGTACTGCGA AGTTCGATC

                460           470           480           490
1805          ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ..
Klebsiella sp. (FM164637.1) AACCTCATCG ATTGACGTAC CACGCAGAAG AAGCACCAGG TA
K.pneumoniae (AM992199.2) AACCTCATCG ATTGACGTTA CCCGCAGAAG AAGCACCAGG TA
K.oxytoca (EU231629.1) AACCTCATCG ATTGACGTTA CCCGCAGAAG AAGCACCAGG TA
K.terrigena (Y17670.1) AACCTTNTCG ATTGACGTTA CTCGCAGAAG AAGCACCAGG TA
K.planticola (Y17659.1) AACNTTNGTG ATTGACGTTA CTCGCAGAAG AAGCACCAGG TA
K.pneumoniae subsp.pneumoniae (EU693237.1) AGGTTGACTA CATGGACGTA TCCACCCAGC AGGTGGTATC CG
K.pneumoniae subsp.ozaenae (AB272655.1) AACTTACCCA --TGGCCGGC CTGGGCGGTG AGATCGAGGT CC

```

Figura 12. Alinhamento entre as sequências de nucleotídeos do gene 16S rDNA do isolado 1805 com *Klebsiella* sp., *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K.planticola*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* e *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

Após alinhamento no programa ClustalX, foi possível desenhar um filograma demonstrativo da distância genética entre as seqüências de nucleotídeos encontrados no gene 16S rDNA de Klebsiellas e isolado 1805 (**Figura 13**).

O filograma apresenta uma alta similaridade do microrganismo 1805 com o gênero *Klebsiella*, dados que em conjunto aos testes bioquímicos confirmam que o microrganismo seja um representante deste gênero. O filograma mostra ainda uma alta similaridade do microrganismo 1805 com *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*, segundo análise no GenBank, no acesso número 945PCYCF01R, onde os mesmos apresentam similaridade de 99%.



Figura 13. Árvore filogenética baseada na análise da seqüência de nucleotídeos do gene 16S rDNA do microrganismo 1805. Os números de depósito das seqüências no GenBank encontram-se entre parentes. A escala Bar denota uma substituição de 10 nucleotídeos a cada 100 nucleotídeos.

Os dados de identificação bioquímica e molecular permitem afirmar que o isolado 1805 é um microrganismo do gênero *Klebsiella*, com 99% de probabilidade.

5.3 ESTUDO DAS ENZIMAS SECRETADAS PELO ISOLADO 1805 - *Klebsiella*

5.3.1 Teor de proteínas secretadas

Segundo Gianfreda e Rao (2004), a primeira etapa para a transformação de substâncias contaminantes, consiste de reações catalisadas por enzimas extracelulares, que são liberadas pelos microrganismos no meio. Estas enzimas secretadas incluem grande diversidade de oxidoredutases e hidrolases. A ação degradativa combina a capacidade de transformar polímeros em fragmentos menores por hidrólise ou modificação química por oxidação, até a completa mineralização. A velocidade de degradação é bastante variável e determinada pela composição química do contaminante, podendo ocorrer de forma rápida (horas) ou lentamente (dias).

O teor de proteínas secretadas pelo microrganismo 1805 (*Klebsiella*) em meio contendo o Opera[®] como única fonte de carbono está apresentado na **Tabela 7**. Após precipitação com acetona, o material obtido foi tratado com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0 resultando em duas frações, onde 72,5 % das proteínas apresentou solubilidade em tampão e 27,4% permaneceu na forma insolúvel.

A presença de proteínas no meio é indício de que o microrganismo pode ter secretado enzimas que atuem na estrutura dos componentes do Opera[®] para utilizá-los como fonte de carbono. Segundo Gianfreda e Rao (2004), a presença de

proteínas secretadas para o meio pode ser indicativo do mecanismo pelo qual o microrganismo promove a degradação dos componentes, sendo um dos fatores utilizados para a escolha de microrganismos com capacidade de realizar biorremediação.

Tabela 7. Teor de proteínas secretadas no meio seletivo J.E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®].

	Teor de proteínas em 100 mL de meio seletivo J.E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera [®] (mg)	Teor de proteínas (%)
Proteínas Totais	5,1± 0,1	100
Proteínas Solúveis	3,7 ± 0,1	72,5
Proteínas Insolúveis	1,4 ± 0,2	27,5

Numa estratégia de purificação, as frações obtidas por precipitação com acetona designadas fração solúvel (FS) e uma fração insolúvel (FI) foram separadas e analisadas.

5.3.2 Avaliação enzimática das frações

5.3.2.1 Avaliação da Fração Solúvel (FS)

Durante os processos metabólicos normais ou em consequência de diversas perturbações ambientais, tais como seca, presença de metais pesados, altas concentrações de sais, extremos de temperatura, radiação UV, poluição, além da baixa disponibilidade de nutriente e alto teor de xenobióticos, pode-se observar a formação de espécies reativas de oxigênio, que incluem o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical hidroxila (OH^{\cdot}) e oxigênio singlete (O_2^1) (MALLICK; MOHN, 2000; SCADALIOS, 2005).

Altas concentrações de espécies ativas de oxigênio conduzem a danos nas macromoléculas como quebras na cadeia de DNA e RNA, oxidação de proteínas, peroxidação de lipídios de membrana celular e distúrbios na homeostase intracelular de íons cálcio livres (CABISCOL et al., 2000; GEORGIEVA, 2005).

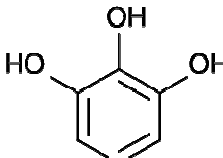
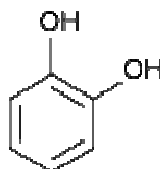
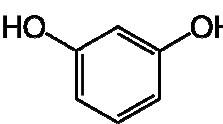
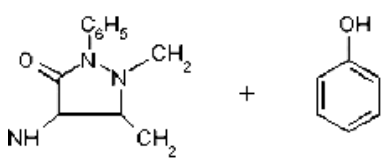
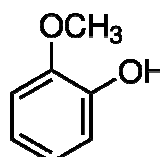
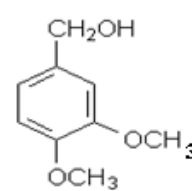
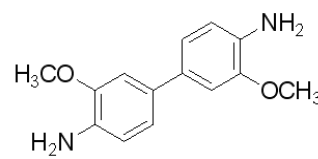
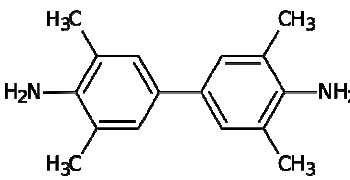
Há enzimas que produzem e outras que consomem as espécies reativas de oxigênio (radicais livres). As enzimas que consomem estes radicais são normalmente endógenas e possuem um importante papel na defesa das estruturas celulares. As que produzem são normalmente extracelulares e o fazem para oxidar compostos para posterior utilização pela célula, ou simplesmente para biotransformar estes compostos.

A classe das oxirredutases está dividida em 21 famílias, de acordo com o mecanismo de ação, bem como os grupos aceptores e doadores de elétrons envolvidos na reação. Destas, as enzimas da subclasse peroxidases são comumente encontradas em microrganismos que promovem biorremediação, como é o caso do *Phanerochaete chrysosporium*, que produz manganês peroxidase e lignina peroxidase; *Aspergillus oryzae*, que produz peroxidase; *Lentinus edodes* que produz lacase e manganês peroxidase; e *Candida oleophila* que produz manganês peroxidase (HATVANI; MÉCS, 2001; LUCAS et al., 2006; DING et al., 2008).

As peroxidases são definidas como as enzimas que oxidam substratos orgânicos tendo peróxidos como aceptores de elétrons. Estas por sua vez são reclassificadas em 16 subfamílias, de acordo com o mecanismo de ação frente a um determinado substrato (IUBMB).

Os testes conduzidos na FS mostraram a presença de uma oxirredutase da família das peroxidases capaz de utilizar o peróxido de hidrogênio como agente oxidante e diversos compostos como agentes redutores (**Tabela 8**).

Tabela 8. Atividade enzimática da fração solúvel frente a variados substratos.

Substrato	Classe	Fórmula	Atividade Enzimática (Absorvância)
Pirogalol (13 mmol L ⁻¹)	Fenol		0,750 ± 0,005
Catecol (50 mmol L ⁻¹)	Fenol		0,210 ± 0,002
Resorcinol (100 mmol L ⁻¹)	Fenol		0,180 ± 0,001
Aminoantipirina + Fenol (82 mmol L ⁻¹)	Amida + Fenol		0,130 ± 0,002
Guaiacol (80 mmol L ⁻¹)	Metoxi- fenol		0,170 ± 0,002
Alcool Veratrílico (10 mmol L ⁻¹)	Metoxi- alcool		0,080 ± 0,003
o-dianisidina 2,2 mmol L ⁻¹	Dimetoxi- amina aromática		0,290 ± 0,005
TMB	Amina aromática		0,450 ± 0,04

Das atividades testadas, foram negativos os testes para as enzimas que utilizam oxigênio molecular como agente oxidante, como é o caso das polifenoloxidasas, lacases e lipoxigenase, assim como para catalase que consome H₂O₂.

A baixa atividade no teste contra o álcool veratrílico quando comparado com os demais substratos, permite excluir a presença de lignina e manganês peroxidase, uma vez que este substrato é específico para estas enzimas (TANG et al., 2006; SILVA et al., 2008; ALAN et al., 2008).

Os testes positivos mostraram que a enzima possui atividade diferenciada dependendo da classe dos substratos. Ao relacionar as estruturas dos compostos testados e a atividade observada podemos concluir que a distribuição espacial dos grupos substituintes e a presença de grupos aminos e metoxi-amino são fatores importantes para a atividade da peroxidase presente na FS, sendo relativamente mais alta para aminas aromáticas substituídas em orto por grupo metil ou metoxi.

Com base nos resultados a enzima presente na FS pertence à classe das enzimas oxirredutases, da subclasse peroxidases, família peroxidase. Segundo estas informações e o manual do Comitê de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), esta enzima pode ser classificada pelo código internacional EC. 1.11.1.7.

A presença de hidrolases com atividade contra os substratos caseína, BApNA e pNPP também foi testada nesta fração, mas não se observou nesta fração presença de atividade hidrolítica contra estes substratos.

Com objetivo de caracterizar parcialmente a peroxidase secretada pela *Klebsiella*, esta foi submetida à cromatografia de exclusão molecular em Sephadex – G100, sendo o perfil cromatográfico apresentado na **Figura 14**.

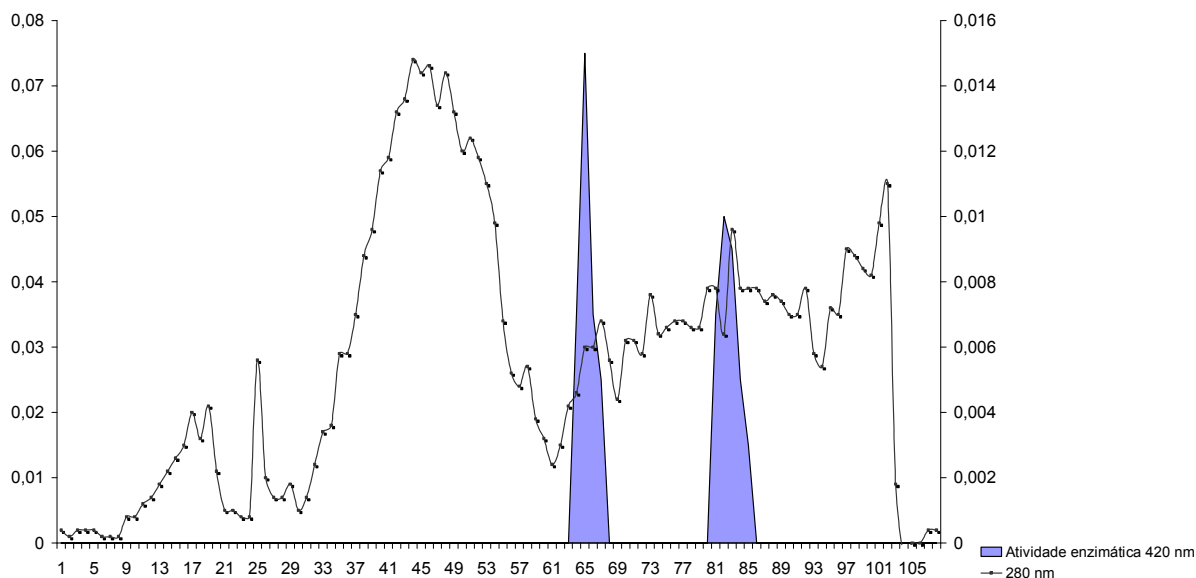


Figura 14. Cromatografia de exclusão molecular – Sephadex-G100. Teste de atividade com pirogalol e peróxido de hidrogênio. Eluição: tampão fosfato de sódio 50 mmol L⁻¹; vazão: 500 µL min⁻¹; volume por tubo: 1 mL.

O cromatograma apresenta a distribuição protéica em três faixas. A primeira entre o volume vazio até aproximadamente o tubo 31, a segunda entre os tubos 32 e 61 e a terceira faixa após o tubo 61.

Os testes feitos nos picos de proteínas mostraram duas frações com atividade peroxidásica, ambas situadas na terceira faixa do cromatograma (após tubo 61), indicando que estas proteínas apresentam baixa massa molecular.

Os tubos correspondentes ao primeiro pico de atividade - PI (63 a 69), foram reunidos e concentrados por liofilização e posteriormente submetidos à eletroforese SDS-PAGE, apresentada na **Figura 15**.

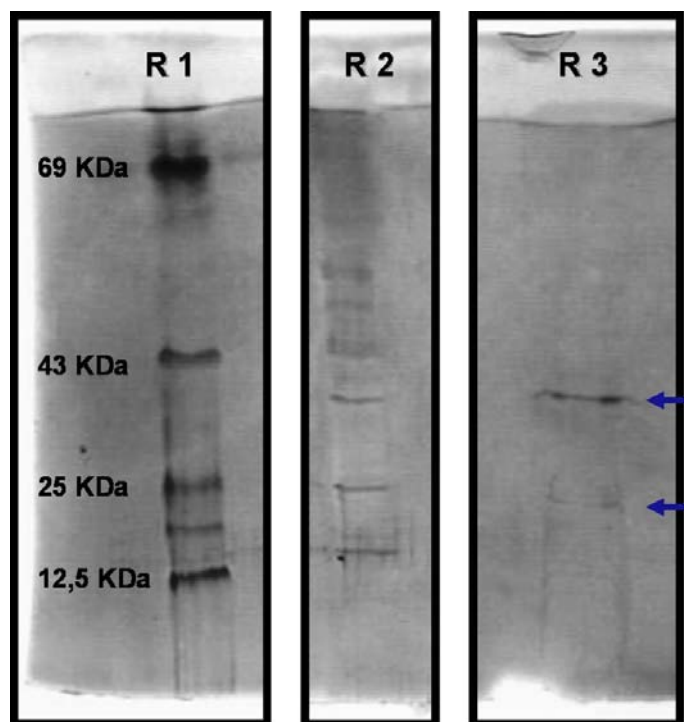


Figura 15. Eletroforese (SDS-PAGE), de proteínas produzidas pela *Klebsiella* em meio seletivo. Amostras: Raia R 1 – marcadores moleculares; R 2 – proteínas totais; R 3 – fração correspondente ao PI.

Como pode ser visto na raia 3, em um etapa de purificação foi possível chegar a uma banda mais intensa de proteína, e uma mais fraca, que apresentaram massa molecular de aproximadamente 39,2 kDa para a banda superior e 24,6 kDa para a banda inferior.

5.3.2.2 Avaliação da Fração Insolúvel (FI)

Contrário ao observado na FS, esta fração não apresentou atividade de oxirredutases. No entanto apresentou atividade hidrolítica contra os substratos caseína, BA_pNA e pNPP, como apresentado na **Tabela 9**.

Tabela 9. Atividade da esterase frente a diferentes substratos

Substrato	Absorvâncias	UE mL ⁻¹
BA _p NA	0,278 ± 0,00	1,31 ± 0,00
pNPP	0,810 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Caseína	0,930 ± 0,01	9,30 ± 0,03

Considerando a alta atividade hidrolítica contra caseína, a FI foi incubada com diferentes inibidores de proteases, na tentativa de identificar a enzima presente. Como pode ser visto na **Tabela 10** a maior inibição (7,5%) foi observada utilizando TLCK, um inibidor de serino proteases, seguido por 6,5% de inibição frente ao coquetel de inibidores e 5,4% com E₆₄, um inibidor de proteases cisteínicas.

Tabela 10. Ação dos inibidores enzimáticos frente à ação das enzimas da fração insolúvel.

INIBIDOR	Unidade de Enzimas	% de inibição
Controle	9,3 ± 0,03	-
E-64	8,8 ± 0,26	5,4
TLCK	8,6 ± 0,22	7,5
Coquetel	8,7 ± 0,13	6,5

A baixa inibição observada contra a FI descarta a possibilidade da presença de proteases. No entanto vários relatos na literatura informam que lipases são fracamente susceptíveis à inibição por inibidores de serino-proteases, como é o caso do TLCK e do 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil fluorídrico (AEBSF) presente no coquetel de inibidores (VALLIKIVI et al., 2003). Por outro lado a atividade contra caseína e BApNA também pode ser atribuída a presença de uma lipase que apresente atividade amidásica, em mecanismo já descrito por vários autores (WAGEGG et al., 1998; DUARTE et al., 2000; TORRES-GAVILÁN et al., 2006).

Com base nos resultados encontrados podemos sugerir que a atividade observada na FI pertence à classe das hidrolases, subclasse das enzimas que hidrolisam ligações éster, família carboxilesterase, conhecida também como esterase B, ou seja, lipases com atividade amidásica (DUARTE et al., 2000).

Segundo o manual do Comitê de Nomenclaturas da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a enzima que apresenta esta atividade será classificada pelo código internacional EC. 3.1.1.1.

A caracterização da enzima foi feita utilizando o pNPP, por ser um substrato mais comumente utilizado na caracterização de lipases.

5.3.2.2.1 Eletroforese da fração insolúvel

A FI apresentou alta solubilidade em ácido acético glacial e solubilidade parcial em ácido acético 3 mol L⁻¹ e ácido fosfórico, nos quais foi possível verificar a ausência de partículas em microscópio óptico. A fração solubilizada em ácido acético apresentou duas bandas de proteína quando analisada em SDS-PAGE (**Figura 16**) com massa molecular de aproximadamente 61,7 kDa para a banda superior e 60,7 kDa para a banda inferior.

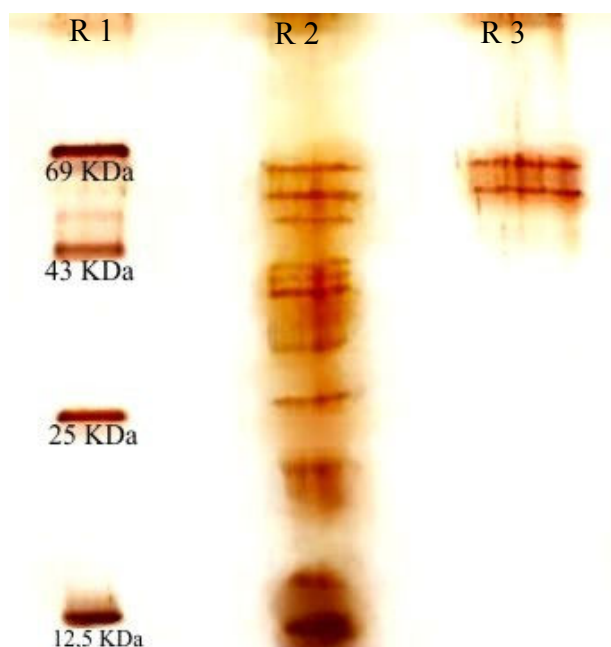


Figura 16. Análise de purificação da esterase da *Klebsiella* em SDS-PAGE 12%. Raia 1 – Marcador molecular; Raia 2 – perfil protéico; Raia 3 – proteína parcialmente purificada.

5.4 CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ESTERASE B DA FI

5.4.1 Efeito do pH na atividade da esterase B da FI

Na **Figura 17** estão mostradas as atividades obtidas da lipase incubada em diferentes pH. É possível que na FI estejam presentes duas frações, uma com alta atividade em pH 5,0, característica de uma lipase ácida, e outra fração com atividade ótima em pH 7,0.

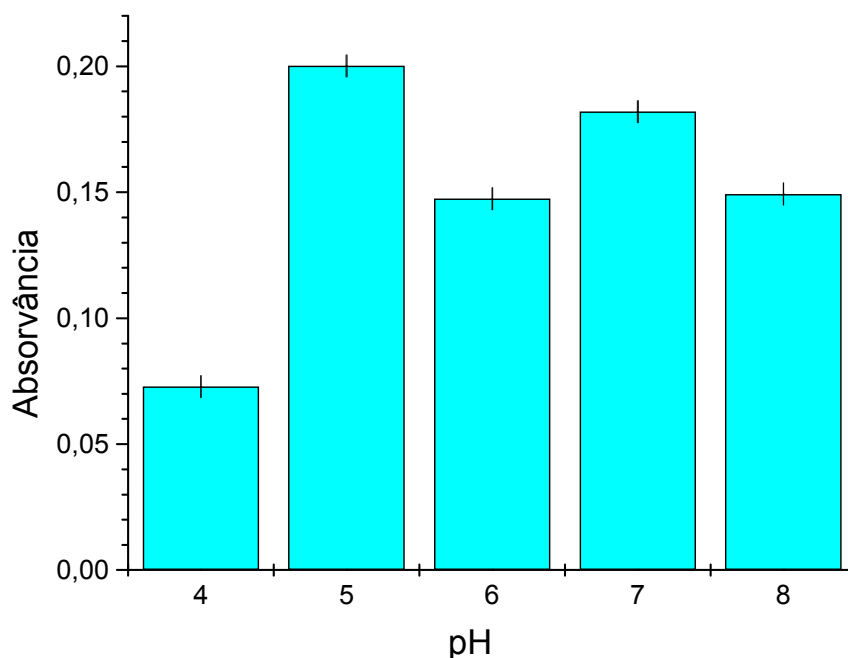


Figura 17. Efeito do pH na atividade da enzima.

A possibilidade da presença de duas enzimas com massa molecular próximas é reforçada pela presença de duas bandas visualizadas na eletroforese. Por outro lado, trabalhos semelhantes apontam que as lipases caracterizadas como esterases apresentam boa atividade numa ampla faixa de pH, podendo variar de pH 5,0 a 9,0 (ATESLIER; METIN, 2006; SHIN; CHEN, 2006).

5.4.2 Efeito da temperatura na estabilidade da esterase B

Na **Figura 18** está apresentada a atividade da esterase quando incubada por 30 min nas temperaturas entre 40 °C e 80 °C. Verifica-se que a enzima apresenta um aumento na atividade de até 46% a 60 °C em comparação com a atividade da enzima à temperatura ambiente.

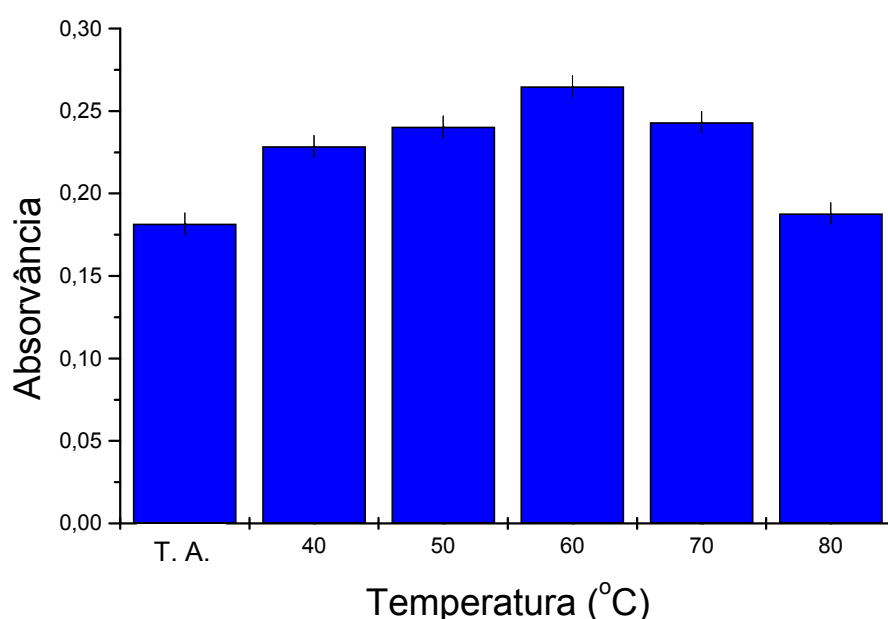


Figura 18. Efeito da temperatura na estabilidade da enzima após 30 min de incubação.

Com base nestes dados, os testes de estabilidade térmica foram conduzidos nas temperaturas entre 60 °C a 80 °C e estes comparados com o comportamento da esterase na temperatura de ensaio (40 °C) (**Figura 19**).

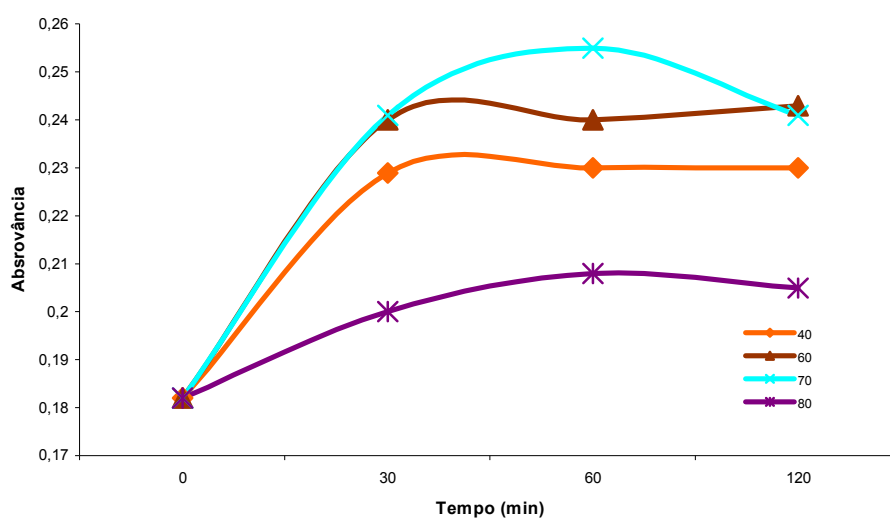


Figura 19. Termoebilidade da esterase B presente na FI.

Como pode ser visto, a esterase apresenta alta estabilidade térmica, sendo capaz de manter 100% da atividade após 120 min de incubação a 60 °C. Vários autores relatam diferentes temperaturas para a atividade ótima de esterases, sendo as mais comuns nas temperaturas entre 35 °C a 55 °C (KARADZIC et al., 2006; SHIN; CHEN, 2006). Por outro lado Ateslier e Metin (2006) classificaram a esterase de *Bacillus sp*, cuja temperatura ideal foi de 65 °C, como enzima termofílica. Já Karadzic et al. (2006) trabalhando com *Pseudomonas aeruginosa* e Zheng-Yu et al. (2007) trabalhando com *Aspergillus niger* reportam testes de termoebilidade onde as enzimas retém 50% de suas atividades por um período máximo de 30 min. Comparada a estes relatos, a esterase produzida por *Klebsiella* pode ser classificada como enzima termofílica de alta estabilidade térmica.

Este resultado, somado ao fato desta enzima apresentar alta atividade amidásica, representa um achado bastante promissor se considerarmos as aplicações industriais para esta enzima. O uso de lipases termoeáveis comparadas

àquelas com termoestabilidade reduzida resulta em várias vantagens nos processos industriais: alta taxa de difusão, aumento na solubilidade de lipídios e substâncias hidrofóbicas em meio aquoso, redução da viscosidade de substratos, aumento na velocidade das reações em função de altas temperaturas e, acima de tudo, o risco reduzido de contaminação por microrganismos (HASAN et al., 2006). Dentre as aplicações industriais de lipases termoestáveis incluem-se a síntese de biopolímeros, produção de biodiesel, de produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos e flavorizantes (KARADZIC et al., 2006).

5.4.3 Efeito dos sais e solventes orgânicos sobre a esterase B da FI

A influência de alguns sais na atividade da esterase B está apresentada na **Figura 20**. Na presença de $ZnCl_2$ a atividade da enzima aumentou 14,2%, enquanto que $FeCl_3$ e $MnSO_4$ não tiveram efeito significativo sobre a atividade. Por outro lado, os demais sais ($CaCl_2$, EDTA, $MgSO_4$ e $CuSO_4$) apresentaram um efeito inibitório de 16%, 16%, 23,2% e 40,8 % respectivamente, na atividade da enzima.

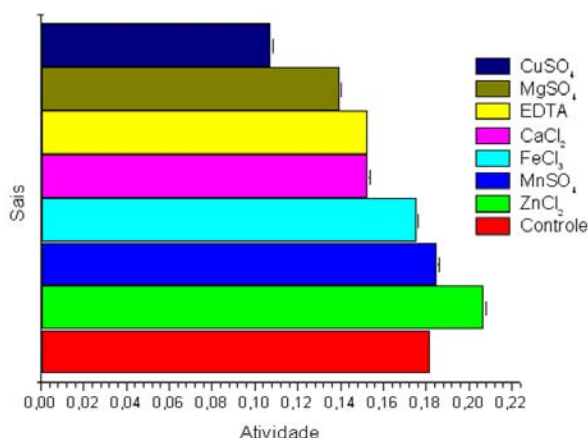


Figura 20. Efeito dos sais sobre a atividade da esterase da FI. Sais na concentração de 5 mmol L^{-1} e incubação por 30 min a temperatura ambiente.

O efeito inibidor dos sais de Cu^{+2} , Mg^{+2} , EDTA, Ca^{+2} , Fe^{+3} sobre a esterase B é similar aos efeitos reportados na literatura para atividade de várias lipases (KARADZIC et al, 2006; SHENG-YU et al., 2007), embora estes autores relatem um efeito inibitório dos íons Zn^{+2} que não foi observado neste trabalho. Por outro lado, Srinivas et al. (2006) relatam o efeito ativador do íon Zn^{+2} sobre esterase utilizada na degradação organoclorados lipase de que bicho de lagarta *Helicoverpa armigera*.

De modo geral, os efeitos reportados na literatura envolvendo a ação de íons sobre lipases são muito contraditórios, sendo necessários estudos mais aprofundados para a interpretação da ação destes sobre estas enzimas (STAUBMANN et al, 1999).

Na **Figura 21** estão apresentados os resultados da ação dos solventes orgânicos na atividade da esterase. De modo geral, a esterase apresentou atividade ligeiramente mais alta frente aos solventes de maior polaridade, como é o caso do DMSO e acetona. À medida que a polaridade do solvente foi decrescendo, o mesmo se deu com a atividade chegando a uma redução de até 87% frente ao isopropanol comparado ao controle.

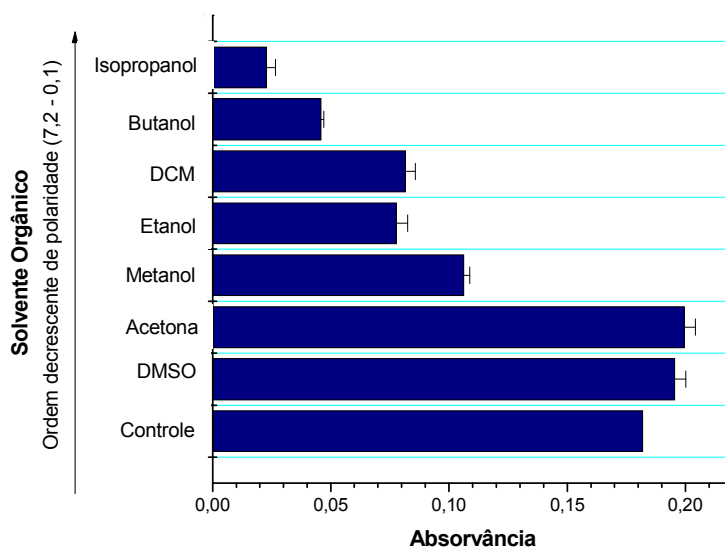


Figura 21. Atividade da esterase da FI frente a diferentes solventes orgânicos em concentração de 50% (v/v). Incubação por 30 min a temperatura ambiente.

A estabilidade e a atividade das enzimas em solventes orgânicos dependem não somente da concentração dos solventes no meio de reação, mas igualmente da natureza da enzima. De um lado, esterases, obtidas de microrganismos que crescem em meios que contêm solventes orgânicos tais como óleos, gorduras ou surfactantes, devem exibir maior estabilidade em ambientes com teores mais elevados de solventes. Este é o caso observado para as lipases produzidas por *Pseudomonas pseudomalei*, *P. aeruginosa*, *P. mendoncina* e *P. fluorescens* (KARADZIC et al., 2006).

Por outro lado, lipases hidrolisam substratos insolúveis em água, de modo que sua ação catalítica se dá numa interface. Misturas de água e solventes orgânicos podem melhorar ou não as propriedades da interface e, por conseguinte, a ação da lipase (KARADZIC et al., 2006). No caso da esterase de *Klebsiella*, a presença de solventes de alta polaridade, como o DMSO e a acetona, tiveram uma ação favorável sobre a atividade observada, enquanto aqueles de polaridade mais baixa resultaram em redução da atividade da esterase.

Outro aspecto interessante da catálise em meio orgânico é que diferentes enzimas suportam concentrações variadas de solventes no meio de reação. Este comportamento diferenciado é consequência das necessidades de interação das cadeias laterais dos aminoácidos da superfície com a água que envolve a enzima, constituindo o micro-ambiente favorável ao arranjo tridimensional. Algumas enzimas necessitam de uma quantidade mínima de água, no que Zaks e Klibanov (1988) intitularam de monocamada de solvatação. A substituição da água por solventes capazes de manter com a molécula de enzima interações polares similares pode levar a uma estabilização da estrutura tridimensional em ambientes considerados extremos. A alta atividade e estabilidade observada nos ensaios na presença de

acetona e DMSO em proporções de até 50% (v/v) pode ser reflexo deste tipo de interação. Além disto, a esterase mostrou alta estabilidade na presença de acetona, mantendo 100% de sua atividade após armazenamento por 60 dias na presença deste solvente, a -5 °C.

Sob o ponto de vista das aplicações biotecnológicas, a atividade enzimática frente a solventes orgânicos amplia as possibilidades de aplicações desta enzima, uma vez que a presença de solventes melhora a solubilidade dos substratos e possibilita a remoção de produtos, com um conseqüente aumento no rendimento da reação (FERNANDES, 2004).

5.4.4 Especificidade Enzimática (K_m)

Os valores de K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram calculados utilizando o programa Microcal Origin Professional versão 8.0. Os valores obtidos para K_m e $V_{m\acute{a}x}$ foram iguais a 3,4 mmol L⁻¹ e 0,019 UE, respectivamente (**Figura 22**).

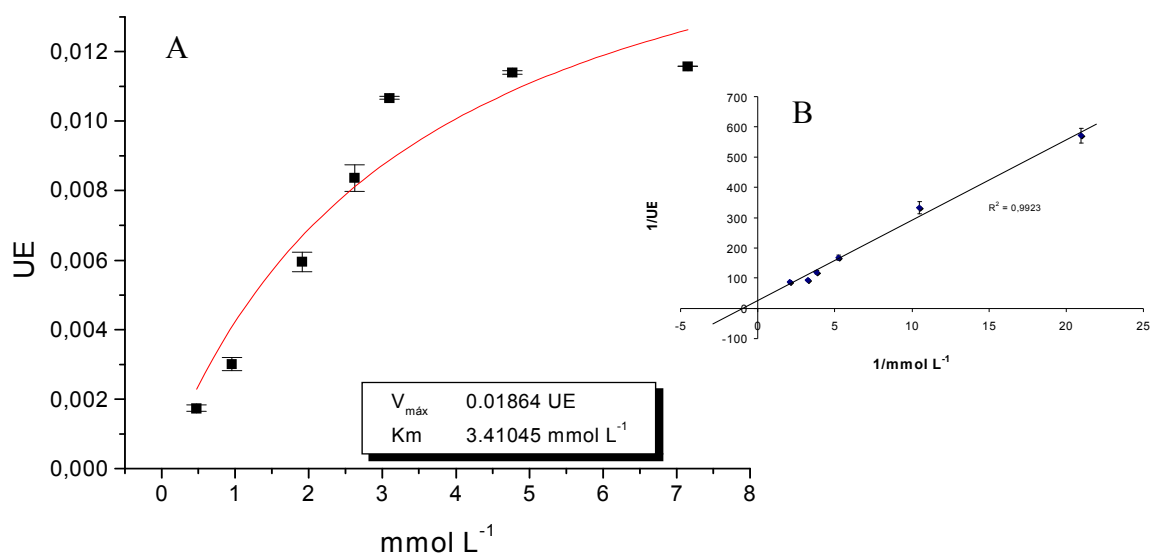


Figura 22. Relação entre concentração do pNPP e a velocidade de reação. (A) Determinação estimada do K_m e $V_{m\acute{a}x}$. (B) Lineweaver-Burk.

Os valores de K_m para lipases e esterases reportados na literatura apresentam uma variação muito grande, reflexo da alta variação da especificidade destas enzimas pelos substratos utilizados em suas caracterizações. Mayordomo et al. (2000) isolaram e caracterizaram uma lipase de *Aspergillus nidulans*, e utilizando pNPP obtiveram valor de K_m de $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$; valor igual foi obtido por Kambourova et al. (2003) com uma lipase termoestável de *Bacillus stearothermophilus* ($K_m = 0,33 \text{ mmol L}^{-1}$). Por outro lado, enzimas com valores mais altos de K_m são encontrados na literatura, como é o caso da lipase de *Aspergillus niger*, cujo K_m foi de $7,37 \text{ mmol L}^{-1}$ (ZHENG-YU et al., 2007) e de *Pseudomonas cepacia* com K_m de 12 mmol L^{-1} (SHARMA et al., 2001). Para a esterase produzida por *Klebsiella* o K_m obtido apresenta-se em uma faixa intermediária entre os encontrados na literatura. Considerando a natureza desta enzima e sua capacidade de atuar sobre outros substratos, é possível que o pNPP não seja o melhor substrato para esta enzima, embora seja válido para efeito de comparação na literatura.

5.5 ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO OPERA[®]

5.5.1 Caracterização espectrofotométrica do fungicida Opera[®] e seus componentes ativos

Muitas substâncias orgânicas incolores ao olho nu, possuem curvas de absorção características na região ultravioleta (UV) permitindo sua determinação direta. Grupos químicos específicos absorvem luz em determinados comprimentos de onda, gerando um espectro de absorção do composto em estudo que pode ser comparando com soluções padrões conhecidas. Esta comparação permite a

identificação da substância e, via de regra, sua quantificação (MASON; HENRY, 1974).

Em misturas, os espectros de absorção assumem caráter mais complexo, sendo necessário para sua análise o uso de padrões correspondentes aos picos de absorção observados. Assim, a análise dos espectros de absorção por meio dos picos característicos em determinados comprimentos de onda pode ser usada para a avaliação da degradação dos componentes da mistura frente a um mecanismo de decomposição ou biodegradação (MASON; HENRY, 1974; ELIZALDE-GONZÁLEZ et al., 2008)

Os espectros de absorção do fungicida Opera[®] diluído em meio J.E. líquido e dos padrões epoxiconazol e piraclostrobin, nas mesmas concentrações em que estes aparecem na composição do Opera[®], foram feitos no intervalo de 200 a 440 nm, apresentando picos de absorção apenas na faixa entre 200 a 340 nm (**Figura 23**). Os picos mais importantes aparecem nos comprimentos de onda, 200, 220 e 260 nm para o epoxiconazol e 200 e 260 nm para o piraclostrobin. Estes picos são utilizados como referência para a análise qualitativa dos compostos (EPA, 2006; WHO/FAO, 2005).

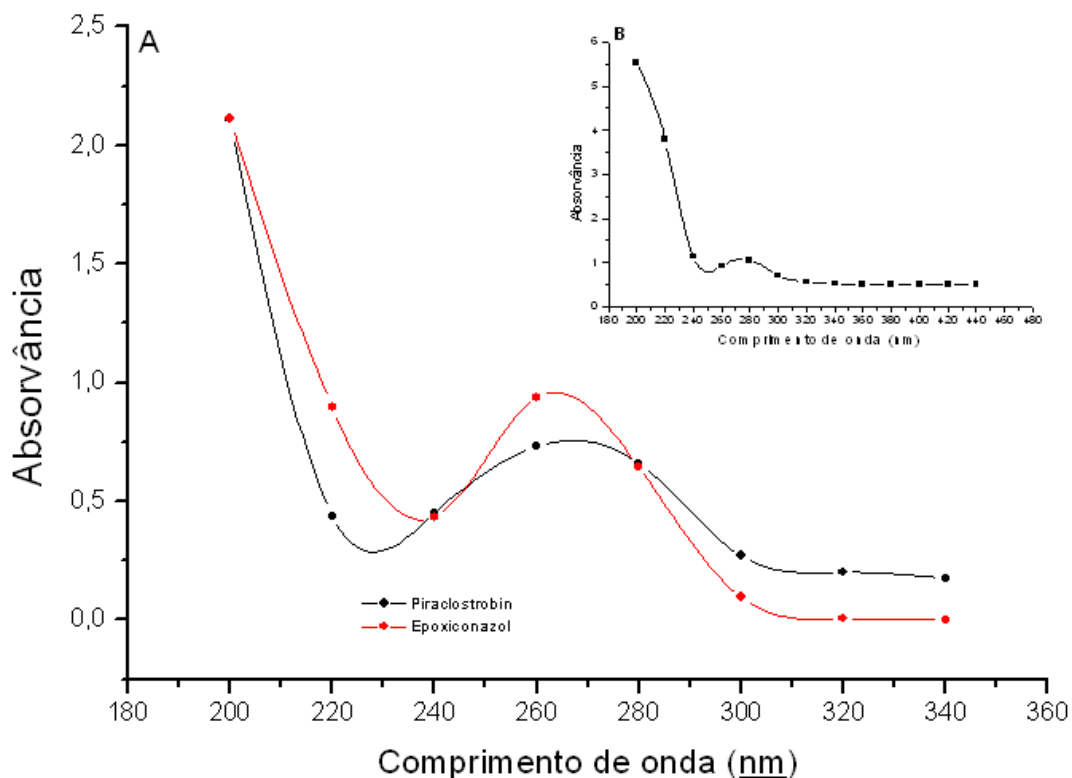


Figura 23. A - Espectro de absorvância dos padrões epoxiconazol $45,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e piraclostrobin $103 \mu\text{mol L}^{-1}$. **B** – Espectro de Absorvância do fungicida Opera[®].

Os comprimentos de onda com maior absorvância em 200, 220 e 260 nm, relacionam-se aos grupos aromáticos polinucleares e heterocíclicos (200 nm), às aminas não conjugadas e éteres (220 nm) e às amidas e compostos que apresentam as ligações C=N e N=N (260 nm) (SOLOMONS; FRYHLE, 2005), que podem ser observados na estrutura molecular dos ativos presentes no Opera[®] (Figura 24).

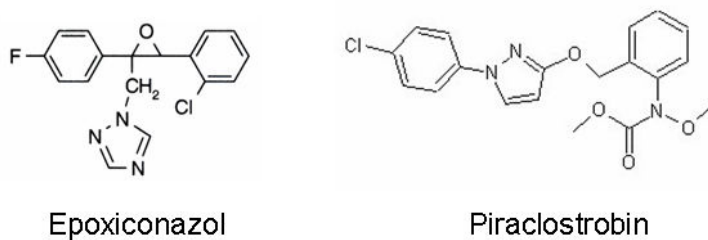


Figura 24. Estrutura molecular dos padrões epoxiconazol e piraclostrobin.

5.5.2 Ação do microrganismo na degradação do fungicida

A varredura realizada no meio seletivo após 120 horas de incubação da *Klebsiella* mostrou uma redução na absorvância em todo o espectro, exceto a 280 nm. Nos comprimentos de onda de 200nm (grupos aromáticos polinucleares e heterocíclicos), 220nm (aminas não conjugadas e éteres) e 260nm (amidas e compostos com ligações C=N e N=N), a redução da absorvância observada foi de 43,7%, 55,7% e 28,7%, respectivamente (**Figura 25**).

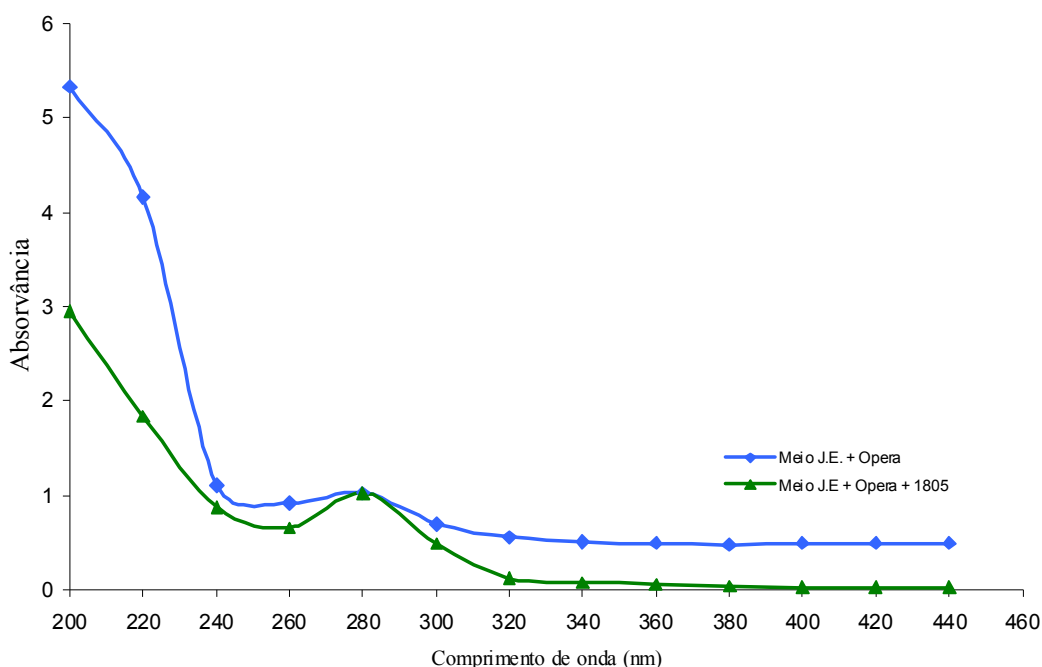


Figura 25. Espectro de absorção do meio J. E. suplementado com Opera[®] após 120 horas. Ação da *Klebsiella* frente ao — meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] e — meio J. E. líquido - suplementado com 0,03% de Opera[®] sem microrganismo.

A diminuição da intensidade dos picos de absorção é consequência da diminuição da concentração dos compostos presentes no meio ou ainda do desaparecimento dos grupos químicos responsáveis pela absorção de luz nestes comprimentos de onda. É possível que as enzimas secretadas pelo microrganismo tenham atuado sobre os componentes durante as 120 h de incubação, modificando-

os de modo a reduzir sua absorção de luz. Para comprovar esta ação foram feitos testes com as enzimas produzidas pela *Klebsiella*.

5.5.3 Ação das enzimas secretadas pela *Klebsiella* na degradação do epoxiconazol e piraclostrobin

A incubação de uma solução de epoxiconazol 45,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com as enzimas presentes na FS e FI, obtidas após 120 h de crescimento, resultou em redução de 95,7% na absorvância a 220 nm e 99,5% a 260 nm. Em ensaio similar com uma solução de piraclostrobin 103 $\mu\text{mol L}^{-1}$, a redução observada foi de 95,5% no pico a 200 nm e 80,2% a 260 nm (**Tabela 11**).

Tabela 11. Degradação do epoxiconazol e piraclostrobin por ação das enzimas secretadas pela *Klebsiella*

Comprimento de onda (nm)	Absorvância Inicial	Absorvância Final	Degradação (%)
Epoxiconazol			
200	2,575 \pm 0,007	0,007 \pm 0,003	99,7
220	0,765 \pm 0,011	0,033 \pm 0,007	95,7
260	0,843 \pm 0,003	0,004 \pm 0,002	99,5
Piraclostrobin			
200	2,930 \pm 0,009	0,130 \pm 0,005	95,5
260	0,779 \pm 0,021	0,154 \pm 0,015	80,2

Estes resultados comprovam que as enzimas secretadas pela *Klebsiella* em meio contendo Opera[®] atuam sobre os componentes ativos, modificando a sua composição.

A ação amidásica da esterase presente na FI, provavelmente é a responsável pela modificação química do piraclostrobin, visto que este composto apresenta grupos amidas que podem ser atacados pela enzima (**Figura 26**). Estas modificações químicas tiveram como resultado a redução de absorvância observada nos comprimentos de onda de 200 e 260 nm. É possível que os produtos gerados pela ação da esterase passem a figurar como substratos para a peroxidase, em função da presença de grupos amina ligados a anéis aromáticos.

Embora menos óbvia, no epoxiconazol, a ação combinada da peroxidase sobre o grupo epóxi, responsável pela redução na absorvância a 220 nm, e a posterior ação da esterase sobre o produto formado, podem ser responsáveis pela modificação do grupo heterocíclico contendo nitrogênio, e, portanto pela redução na absorvância deste composto a 260 nm.

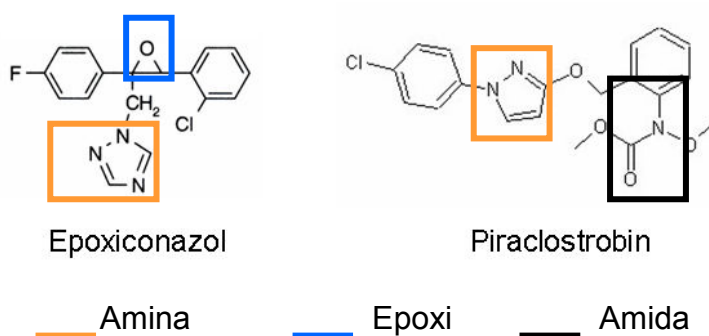


Figura 26. Principais grupos químicos do epoxiconazol e piraclostrobin.

A extensão do ataque das enzimas sobre os grupos citados e os produtos gerados poderá levar a um maior ou menor grau de modificação química dos componentes ativos. Outras vias de modificação podem estar ocorrendo, levando ao aparecimento de grupos passíveis de serem alvos das enzimas estudadas. No

manal do fabricante, algumas rotas de metabolização estudadas incluem metoxilação, glicosilação, hidroxilação, entre outras (WHO/FAO, 2005).

Vários trabalhos relatam o uso de *Klebsiella* na degradação de compostos com alta persistência no solo. Dentre eles podem ser citados os de Nawaz et al. (1992) utilizando *Klebsiella pneumoniae* para tratamento de benzonitrila e butironitrila, de Bellinaso et al. (2003) para biodegradação do herbicida trifluralin, de Kao et al. (2004) contra tetracianoniquelato (TCN), de Wang et al. (2005) para triazofos, de Kwon et al. (2005) contra endosulfan e sulfato de endosulfan e de Harada et al. (2006) na degradação do herbicida mefenacet. Neste trabalho a ação combinada das enzimas presentes na FS e FI foram capazes de modificar quimicamente os componentes ativos do fungicida Opera, neste caso um carbamato (estrobilurina) – piraclostrobin e um triazol – epoxiconazol.

Os dados reunidos neste trabalho permitem apontar este microrganismo como um agente promissor para testes de biorremediação. Testes complementares precisam ser feitos para determinar a natureza dos produtos formados e, sobretudo, a sua toxicidade. Entretanto, a capacidade de sobreviver utilizando o Opera[®] como fonte de carbono e nitrogênio, a produção e secreção de enzimas capazes de produzir modificação química nos componentes ativos da formulação são resultados suficientes para despertar o interesse na continuação deste trabalho de pesquisa.

Além disto, a enzima presente na FI tem várias características interessantes. A fácil separação por precipitação com acetona, resultando em alto grau de purificação, a termofilicidade e a alta estabilidade térmica e a estabilidade na presença de acetona são características extremamente interessantes quando se avalia uma enzima com vistas a aplicações industriais.

Neste caso, a caracterização mais aprofundada desta enzima, principalmente no que se refere aos substratos sobre os quais ele pode atuar e as reações que ela pode catalisar são pontos importantes a serem observados em estudos posteriores.

Por fim, a capacidade desta *Klebsiella* sobreviver em meio contendo Opera[®] deve ser devida à presença de outras enzimas por ela secretada no meio de cultura, que devem compor o arsenal de bioconversão deste microrganismo. Neste trabalho apenas uma pequena fração deste arsenal foi parcialmente identificado, restando ainda muito a ser estudado.

6 CONCLUSÃO

✓ CARACTERIZAÇÃO DO PONTO DE COLETA

O ponto de coleta caracteriza-se como um local de risco para acidente ecológico por apresentar uma área com atividade agrícola extensiva, com uso intenso de defensivos agrícolas, com relevo que contribui para o escoamento da água da chuva para áreas vizinhas, fazendo com que os agrodefensivos contaminem os leitos de água próximos. Além disto, o tipo de solo contribui para uma possível contaminação, visto que apresenta boa taxa de infiltração e armazenamento de água.

✓ SELEÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MICRORGANISMO

Foram isolados 9 microrganismos resistentes ao fungicida em meio J.E. sólido - suplementado com 0,1% de Opera®, dos quais 3 apresentaram crescimento em meio seletivo suplementado com 0,03% de Opera. O microrganismo 1805 apresentou melhor taxa de crescimento em meio seletivo. Por ser considerado o mais promissor este foi selecionado para a realização deste trabalho.

O microrganismo 1805 foi caracterizado como pertencente à classe dos bacilococcus gram-negativos, com características polimórficas quando analisado em diferentes meios de crescimento.

Foi possível identificar o microrganismo 1805 através de testes bioquímicos contidos no sistema Bactray®, chegando-se ao gênero *Klebsiella sp* com 99% de correlação. Os testes realizados não foram suficientes para a determinação da espécie, sendo possível, no entanto, chegar a uma porcentagem de correlação

de 83,3% com *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, 77,8% com *K. planticola*, 72,2% com i e 61,11% com *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*.

A identificação molecular conduzida através do sequenciamento do gene 16S rDNA e alinhamento com sequencias depositadas no GenBank levou à correlação de 99% do microrganismo 1805 com *K. pneumoniae* e *K. oxytoca*.

✓ ESTUDO DAS ENZIMAS SECRETADAS PELO ISOLADO 1805 - *Klebsiella*

A precipitação das proteínas secretadas pela *Klebsiella* em meio contendo Opera[®], realizada após 120 horas de incubação, por adição de acetona, levando a duas frações protéicas, uma solúvel (FS) e outra insolúvel (FI) em tampão fosfato de sódio 0,1 mol L, pH 6,0.

Na FS foi encontrada uma oxirredutase da família das peroxidases cujo mecanismo de catálise inclui o peróxido de hidrogênio como agente oxidante e compostos da classe dos fenóis, metoxi-fenóis, metoxi-álcoois e aminas aromáticas como agentes redutores. A purificação parcial da peroxidase presente na FS foi realizada em uma etapa de filtração molecular em Sephadex G-100, de onde se obteve duas bandas de proteína, uma com massa molecular de aproximadamente 39,2 kDa e outra de 24,6 kDa.

Na FI foi encontrada atividade hidrolítica contra os substratos caseína, BApNA e pNPP. A enzima presente na FI foi considerada como pertencente à classe das hidrolases, subclasse das enzimas que hidrolisam ligações éster, família carboxilesterase, conhecida também como esterase B, ou seja, lipases com atividade amidásica.

A purificação parcial da esterase B presente na FI foi obtida por precipitação com acetona, e a eletroforese deste material mostrou duas bandas de

proteína com massa molecular de aproximadamente 61,7 kDa e 60,7 kDa

✓ CARACTERIZAÇÃO ENZIMÁTICA DA ESTERASE B PRESENTE NA FI.

A esterase B apresentou atividade mais acentuada em pH 5,0 e em pH 7,0, podendo significar a presença de duas frações correspondentes às bandas encontradas na eletroforese da FI.

A esterase B apresentou alta estabilidade térmica, apresentando 100% de atividade após 120 min de incubação a 60 °C, podendo assim ser classificada como uma esterase termofílica. Esta característica permite que esta enzima seja aplicada a vários processos industriais, dentre eles, síntese de biopolímeros, produção de biodiesel, de produtos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos e flavorizantes.

A atividade da esterase B foi maior na presença de ZnCl₂, manteve-se inalterada quando incubada com FeCl₃ e MnSO₄ e foi inibida na presença de CaCl₂, EDTA, MgSO₄ e CuSO₄. Também foi observada atividade um pouco mais alta na presença dos solventes orgânicos DMSO e acetona e uma queda quando colocada em contato com outros solventes de polaridade menor que a acetona e DMSO. A esterase B também mostrou alta estabilidade quando armazenada em acetona, a -5 °C, mantendo 100% da atividade após 60 dias. A ação observada desta enzima frente a solventes orgânicos amplia as possibilidades de aplicações, uma vez que a presença de solventes melhora a solubilidade dos substratos e possibilita a remoção de produtos, com um conseqüente aumento no rendimento da reação.

A esterase B apresentou uma afinidade intermediária ao substrato pNPP ($K_m = 3,4 \text{ mmol L}^{-1}$) quando comparado com outras lipases reportados na literatura.

✓ ESTUDO DA DEGRADAÇÃO DO OPERA[®]

Os princípios ativos epoxiconazol e piraclostrobin presentes no Opera[®] apresentaram espectros de absorção no UV/Vis característicos e correspondentes aos grupos químicos presentes nas suas composições.

A *Klebsiella* foi capaz de reduzir a absorvância do meio contendo Opera[®] após 120 h de incubação, o que reflete a diminuição da concentração dos componentes do fungicida ou o desaparecimento dos grupos químicos responsáveis pela absorção de luz nos comprimentos de onda específicos.

As enzimas presentes na FS e FI foram capazes de reduzir a absorvância dos princípios ativos constituintes do Opera[®], após 10 min de reação. Para o epoxiconazol a redução na absorvância observada foi de 99,7%, 95,7% e 99,5% nos comprimentos de onda de 200, 220 e 260 nm e para o piraclostrobin a redução observada foi de 95,5 e 80,2% para os comprimentos de onda 200 e 260 nm respectivamente.

7 PERSPECTIVAS

Os estudos desenvolvidos ao longo da execução deste trabalho nos abriram perspectivas para novas aplicações tanto do microrganismo, quanto de suas enzimas, principalmente da esterase B, tendo em vista suas possíveis aplicações industriais. Dentre as possibilidades de expansão futura deste estudo, destacamos as seguintes:

- Caracterizar a esterase B com outros substratos, no intuito de ampliar sua aplicação na biotecnologia, principalmente na produção de biodiesel;
- Determinar a rota de transformação e/ou degradação dos compostos presentes no Opera[®];
- Promover a indução de outras enzimas na *Klebsiella* com finalidades industriais, bem como caracterizá-las;
- Verificar a capacidade da *Klebsiella* agir sobre outros compostos de caráter tóxico.

REFERÊNCIAS

- ADAMI, P. *et al.* Eficiência de fungicidas no controle da antracnose (*Colletotrichum dematium* var. *truncata*) da soja (*Glicine max*). **Synergismus Scyentifica**, v.1, p. 22-28, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Manual de procedimentos para análise toxicológica de produtos defensivos, seus componentes e afins.** Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/manual/anexo_03.htm>. Acesso em: 09 de mar. 2007.
- ALAN, Md.Z. *et al.* Optimization of decolorization of methylene bleu by lignin peroxidase enzyme produced from sewage sludge with *Phanerocheate chrysosporium*. **Journal of Hazardous Materials** – article in press, Corrected Proof, 2008.
- ALENCAR, R. B., *et al.* Alkaline proteases from digestive tract of four tropical fishes. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, p. 279-284, 2003
- ALTSCHUL, S. F *et al.* Basic local alignment search toll. **Journal of Molecular Biology**. v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.
- ANACLETO, T. C.; MIZIARA, F. Expansão de Fronteiras e Impactos Sócio-ambientais no Cerrado Matogrossense. **Revista de Geografia da Unesp**, v. 31, p. 527-538, 2006.
- ARARA, D. S.; PARAMJIT, K. G. Comparison of two assay procedures for lignin peroxidase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 28, p. 602-605, 2001.
- ARNON, R., **Methods in Enzymology**: Papain. Academic Press, New York, v. 19, p. 226-244, 1970.
- ASTELIER, Z. B. B.; METIN K. Production and partial characterization of a novel thermostable esterase from a thermophilic *Bacillus* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 5, p. 628- 635, 2006.
- AZEVEDO, L. A. S. **Fungicidas protetores: Fundamentos para o uso racional.** São Paulo, 319 p, 2003.
- BALARDINI, R. S. *et al.* Controle químico das doenças da parte aérea na cultura de soja. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, p. 420, 2001.
- BALSAN, R. Impactos decorrentes da modernização da agricultura brasileira. **Campo Território: Revista de Geografia Agrária**, v.1, n. 2, p. 123-151, 2006.
- BARROS, G. S. C. PIB do agronegócio: estagnado em 2006 e com expectativa de crescimento em 2007. **Revista Síntese BM & F Brasil**, v. 289, p.1, 2006.

BADISCHE ANILIN-UND SODA-FABRIK THE CHEMICAL COMPANY (BASF). Opera[®]. Disponível em: < <http://agro.basf.com.br/opera/opera.asp?area=2> >. Acesso em 30 de set. 2007a.

_____. **Manual técnico: efeito fisiológico F 500**. Disponível em: <www.agro.basf.com.br/efeito_fisiologico/pdfs/manual_tecnico_efeito_fisiologico.pdf>. Acesso em 29 de ago. 2007b.

_____. Eficiência no controle da ferrugem da soja em mais de 60 milhões de hectares. **Lavoura Hoje**. Disponível em: <<http://agrobASF.com.br-informativo>>. Acesso em 30 de set. 2007c.

BAR, C., et al Characterization of the proteins of bacterial strain isolated from contaminated site involved in heavy metal resistance – A proteomic approach. **Journal of Biotechnology**, v. 128, p. 444-451, 2007.

BEERS R. F. Jr, SIZER I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**, v.195 n.1, p. 133–140, 1952.

BELLINASSO, M. de L., et al., Biodegradation of the herbicide trifluralin by bactéria isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 43, p. 191-194, 2003.

BLUM, H. et al. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. **Electrophoresis**, v. 8, p. 93-99, 1987.

BRADFORD, M., A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein dyes binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **International Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 183-193, 2000.

CAI, J., et al., Characterization and identification of virulent *Klebsiella oxytoca* isolated from abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) post larvae with mass mortality in Fujian, China. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 97, p. 70-75, 2008.

CARDOSO, M. A; MÉLO, J. L. B. Organoclorados em soja e arroz: A relação com o uso da água e a saúde humana. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, n.1, p. 330-333, 2007.

CHAIM, A. Tecnologia de aplicação de agrotóxicos: fatores que afetam a eficiência e o impacto ambiental. In: SILVA, C. M. M. S; FAY, E. F. Agrotóxicos & Ambiente. Brasília: EMBRAPA, p 289-317, 2004.

COCCO, P. On the rumors about the silent spring: review of the scientific evidence linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. **Caderno de Saúde Pública**, vol.18, no.2, p.379-402, 2002.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO (CONAB). **Lavouras**. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em 20 de jun. 2006.

_____. **Acompanhamento da safra brasileira: Grãos: Safra 2007/2008 nono levantamento**. Brasília, 2008.

CONTINI, E. et al. Evolução e tendências do agronegócio. **Revista Política Agrícola**, ano XV, n. 1, 2006.

DING, J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon biodegradation and extracellular enzyme secretion in agitated and stationary cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, n. 1, p. 88-93, 2008.

DÖBEREINER, J. et al. **Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas**. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1995.

DRANCOURT, M., et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithunolytica* comb. Nov., *Raoultella terrigena* comb. Nov. and *Raoultella planticola* comb. Nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 925-932, 2001.

DUARTE, D. R. et al. Capsaicin hidrólisis by *Candida antarctica* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 22, p. 1811-1814, 2000.

ELIZALDE-GONZÁLEZ, M. P. et al. Degradation of immobilized azo dyes by *Klebsiella* sp. UAP-b5 isolated from maize bioadsorbent. **Journal of Hazardous Materials**. Article in press (2008).

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Sistema Brasileiro de Classificação de Solos**. Brasília, DF: Embrapa, 1996. 412 p.

_____. Centro Nacional de Pesquisa de Soja. **Tecnologias de produção de soja**. Londrina, 2003.

_____. Soja. Disponível em <<http://www.cnpt.embrapa.br/culturas/soja/index.htm>>. Acesso em 26 de set. 2007a.

_____. Ferrugem Asiática da Soja- Informações Gerais. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/ver_alerta.php?cod_pagina_sa=161>. Acesso em 26 de set. 2007b.

EMPRESA ESTADUAL DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DO RIO DE JANEIRO. Informativo PESAGRO-RIO. Disponível em <<http://www.pesagro.rj.gov.br/pesquisas/ambiente.htm>>. Acesso em 02 de maio de 2007.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances: Pesticide Fact Sheet**. Washington, D. C, 2006.

ERTUGRUL, S. et al. Isolation of lipase producing *Bacillus* sp. From olive mill wastewater and improving its enzyme activity. **Journal of Hazardous Materials**, v. 149, n. 3, p. 720-724, 2007.

EUROPEAN COMMISSION. Substances which may not be included as active ingredients in approved pesticide products, Chapter 15, Section 2, subsection one. Appendix 5, 1997.

FERNANDES, K. F. Imobilização de Horseradish Peroxidase em diferentes polianilinas: Aplicações Analíticas. 2000, 240 f., Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2000.

FERNANDES, K.F., et al., Properties of horseradish peroxidase immobilised onto polyaniline. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 957-962, 2004.

FERREIRA, K. C. A importância do agronegócio para Goiás. Disponível em: <www.seplan.go.gov.br/sepin/pub/conj/conj2/07.htm>. Acesso em 23 de set. 2007.

FERREIRA, M. E. *et al.* (2007). Desmatamentos no bioma Cerrado: uma análise temporal (2001-2005) com base nos dados MODIS. In XIII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto (p. 3877-3883). Florianópolis, SC: INPE.

FOLADORI, G. **Limites do desenvolvimento sustentável**. Traduzido por Marise Manoel. Campinas: Unicamp, 2001.

FONSECA, M. C. C. *et al.* Isolamento e caracterização morfológica de *Pseudomonas spp.* Fluorescentes nativas em sistemas de produção agrícola. **Comunicado técnico – EMBRAPA**, n. 43, p. 1-4, 2000.

GALLI, J.A. *et al.* Efeito de *Colletotrichum dematium* var. *truncata* e *Cercospora kikuchii* na germinação de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**. v. 27, n. 2, p.182-187, 2005.

GEORGIEVA, N. V. Oxidative stress as a factor of disrupted ecological oxidative balance in biological systems – a review. **Bulgaria Journal of Veterinary Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-11, 2005.

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soil: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339-354, 2004.

GODOY, C. V.; CANTERI, M. G. Efeitos protetor, curativo e erradicante de fungicidas no controle da ferrugem da soja causada por *Phakopsora pachyrhizi*, em casa de vegetação. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 1, 2004.

GODOY, C. V. et al. **Custo do controle de doenças na cultura da soja 2006/07**. Disponível em: <http://www.cnpso.embrapa.br/alerta/er_alerta.php?od_pagina_sa=172&cultura=1>. Acesso em: 26 de set. 2007.

GRIMONT, P. A.D.; GRIMONT, F. (2005). Genus XVI. *Klebsiella* In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed., vol. 2 (The Proteobacteria), part B (The

Gammaproteobacteria), p. 685. Edited by D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley & G. M. Garrity. New York: Springer

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**, v. 41 p. 95-98, 1999.

HALPIN, B., et al. Purification and Characterization of Peroxidase Isoenzymes from Green Peas (*Pisum sativum*). **Journal of Food Science**, v. 54, p. 644-649, 1989.

HALPIN, B.; LEE, C. Y. Effect of Blanching on Enzyme Activity and Quality Changes in Green Peas. **Journal of Food Science**, v. 52, p. 1002-1005, 1987.

HATVANI, N.; MÉCS, I. Production of laccase and manganese peroxidase by *Lentinus edodes* on malt-containing by-product of the brewing process. **Process Biochemistry**, v. 37, n. 5, p. 491-496, 2001.

HASAN, F., et al., Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 235-251, 2006.

HARADA, N et al. Isolation and characterization of microorganisms capable of hydrolyzing the herbicide mefenacet. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 38, p. 173-179, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA). **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. 2 ed. Brasília, 1990.

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). Catálogo de órbitas. Satélite Sino-Brasileiro de Recursos Terrestres (CBERSII). Disponível em: <<http://www.inpe.br>>. Acesso em 12 de jun. 2007.

IYAMA, J. T.; SILVA, J. G. Impactos da agricultura química sobre a saúde e o ambiente. In: CONGRESSO ACADÊMICO SOBRE MEIO AMBIENTE E DESENVOLVIMENTO DO RIO DE JANEIRO, 1., 2004, Rio de Janeiro.

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

KAMBOUROVA, M. et al. Purification and properties of thermostable lipase from a thermophilic *Bacillus stearothermophilus* MC7. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 22, p. 307-313, 2003.

KAO, C.M., et al., Biodegradation of the metal-cyano complex tetracyanonickelate (II) by *Klebsiella oxytoca*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 405-410, 2004.

KARADIMOS, et al. Biological activity and physical modes of action of the Q₀ inhibitor fungicides trifloxystrobin and pyraclostrobin against *Cercospora beticola*. **Crop Protection**, v. 24, p. 23-29, 2005.

KARADZIC, I., et al., Purification and Characterization of an Alkaline Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Putrid Mineral Cutting Oil as Component of Metalworking Fluid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 102, n. 2, p. 82-89, 2006.

KUO, JEN-MIN, et al. Lipoxygenase from Banana Leaf: Purification and Characterization of an Enzyme That Catalyzes Linoleic Acid Oxygenation at the 9-Position. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 3151-3156, 2006.

KWON, GI-SEOK; et al., Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, -. 845-850, 2005.

LAEMMLI, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LUCAS M.S. et al, Biodegradation of the diazo dye Reactive Black 5 by a wild isolate of *Candida oleophila*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 1, p. 51-55, 2006.

McMAHON, A. M. et al. Biochemical characterization of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. **Enzyme and Microbial Technology**, v 40, p. 1435-1441, 2007.

MALLICK, N.; MOHN, F. H. Reactive oxygen species: response of algal cells. **Journal of Plant Physiology**, v. 38, n. 7, p. 183-193, 2000.

MARAFON, G. J. Industrialização da agricultura e formação do complexo agroindustrial no Brasil. **Geo UERJ Revista do Departamento de Geografia**, n.3, p.7-21, 1998.

MARTINS, A. et al. **Biorremediação**. III Fórum de Estudos Contábeis –Faculdade Integradas Claretianas – Rio Claro– SP, 2003. Disponível em: <<http://www.ceset.unicamp.br/lte/Artigos/3fec2401.pdf>>. Acesso em 20 de jul. 2007.

MARTINS, M. C. **Produtividade da soja sob influência de ocorrência natural de *Septoria glycines Hemmi* e *Cercospora kikuchii* (Matsu. & Tomoyasu) Gardner com e sem controle químico**. 2003. 116 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MASON, W. B.; HENRY, R. J. Photometry and Spectrophotometry. In: _____. **Clinical Chemistry: Principles and Technics**, 2. ed. Hagerstown: Harper & Row, 1976.

MAYORDOMO, I. et al. Isolation, purification and characterization of a cold-active lipase from *Aspergillus nidulans*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 1, p. 105-109, 2000.

MIGNUCCI, J. S. Powdery mildew. In: SINCLAIR, J. B.; BACKMAN, P. A. (Eds.) **Compedium of soybean diseases**. St. Paul, APS. 1993.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Sistema de Legislação Agrícola Federal (SISLEGIS). Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=163>>. Acesso em: 29 de set. 2007.

_____. **Projeções do agronegócio mundial e Brasil 2006/07 a 2017/018**. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília-DF, 2008.

MONTOYA, M. A. O agronegócio no mercosul: dimensão econômica, desenvolvimento industrial e interdependência estrutural na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai. **Revista Brasileira de Economia**, v.56, n.4, p. 605-660, 2002.

MORAGAS, W. M.; SCHNEIDER, M. O. Biocidas: suas propriedades e seu histórico no Brasil. **Caminhos de Geografia**, v.3, n.10, p. 26-40, 2003.

NAVARINI, L. *et al.* Controle químico da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura de soja. **Summa Phytopathologica**, v. 33, n.2, p. 182-186, 2007.

NAWAZ, M.S., et al., Metabolism of Benzonitrile and Butyronitrile by *Klebsiella pneumoniae*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 1, p. 27-31, 1992.

PADIGLIA, A., et al. Purification and Characterization of Opuntia Peroxidase – **Phytochemistry**, v. 38, p. 295-297, 1995.

PARRÉ, J. L.; GUILHOTO J. J. M. A desconcentração regional do agronegócio brasileiro. **Revista Brasileira de Economia**, v. 55, n. 2, p. 223-251, 2001.

PERES, F.; MOREIRA J. C. Saúde e ambiente em sua relação com o consumo de agrotóxicos em um pólo agrícola do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, sup 4, p. 5612-5621, 2007.

PICININI, E. C.; FERNANDES, J. M. **Controle químico de oídio, *Microsphaera diffusa*, em três cultivares de soja na safra 1998/1999**. In: Embrapa Trigo. Soja, Resultados de pesquisa 1998/1999. Passo Fundo: Embrapa Trigo. Documento 4, 1999.

PIGNATI, W. A. *et al.* Acidente rural ampliando: o caso das “chuvas” de agrotóxico sobre a cidade de Lucas do Rio Verde-MT. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12 n.1, p. 105-114, 2007.

PRADO, H. **Manual de classificação de solos do Brasil**. 3. ed. Jaboticabal: FUNEP, 1996, 195 p.

PRADO, L. C.; YORINORI, J. T **Efeito da aplicação de fungicida foliar sobre a produtividade da soja no Estado da Bahia**. Anais, Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR.1999.

RATTER, J. A. *et al.* Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation II: comparison of the woody vegetation of 98 areas. **Edinburgh Journal of Botanics**, v. 53, p. 153-180, 1996.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. p. 89-166. Planaltina-DF: Embrapa-CPAC, 1998.

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

RYAN, B. J.; Ó'FÁGÁIN, C. Effects of single mutations on the stability of horseradish peroxidase to hydrogen peroxide. **Biochimie**, v. 89, p. 1029-1032, 2007.

SAFRA recorde em 2007 melhora o desempenho da agricultura. **Revista Economia & Desenvolvimento**, ano VIII, n.26, p.4-12, 2007

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. 2. ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 1989.

SANO, E. E. *et al.* Padrões de cobertura de solos do Estado de Goiás. In L. G. Ferreira (Ed.). **Conservação da Biodiversidade e Sustentabilidade Ambiental em Goiás: Prioridades, Estratégias e Perspectivas**. Goiânia : Universidade Federal de Goiás/Agência Goiana de Meio Ambiente/Banco Mundial, 2006, p. 76-93.

SANTANA, M. Exportações goianas devem atingir US\$ 5 milhões até 2010. **Revista Economia & Desenvolvimento**, ano VIII, n. 25, p. 27-32, 2007.

SANTOS, P. S. J. Resistência a fungicidas. **Comitê de ação à resistência a fungicidas (FRAC)**. Disponível em: <http://garoupa.cnpso.embrapa.br/download/resist_fung.pdf>. Acesso em 23 de set. 2007.

SCANDALIOS, J. G. Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n.7, p. 995-1014, 2005.

SHARMA, R. *et al.* Production, purification, characterization, and applications of lipase. **Biotechnology Advances**, v.19, p. 627-662, 2001.

SHIN, HYUN-DONG; CHEN, R.R. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3-4, p. 478-485, 2006.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400 p.

SILVA, E. M. *et al.* Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2471-2475, 2008.

SILVA, P. **Farmacologia: Antibióticos**. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2006.

SINGH, R. et al. Biofilms: implications in bioremediation. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 389-397, 2006.

SOARES et al., R. M. Fungicidas no controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi*) e produtividade da soja. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1245-1247, 2004.

SOLOMONS, T. W. G; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. Editora LTC

SRINIVAS, R. et al. Purification and characterization of an esterase isozyme involved in hydrolysis of organophosphorus compounds from an insecticide resistant pest, *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). **Biochimica et Biophysica Acta**, n. 1760 v. 3, p. 310-317, 2006.

STAUBMANN, R., et al., Esterase and lipase activity in *Jatropha curcas* L. Seeds. **Journal of Biotechnology**, v. 75, p. 117-126, 1999.

STEFANELO, E. L. Agronegócio brasileiro: propostas e tendências. **Revista Fae Business**, n. 3, p. 10-13, 2002.

TEIXEIRA, S. M. **Fronteiras para o agronegócio em Goiás: o papel da ciência, tecnologia e inovação**. Disponível em: <www.seplan.go.gov.br/sepin/pub/conj/conj3/04.htm>. Acesso em: 23 de set. 2007.

TANG, L. et al. Simultaneous amperometric determination of lignin peroxidase and manganese peroxidase activities in compost bioremediation using artificial neural networks. **Analytica Chimica Acta**, v. 579, n.1, p. 109-116, 2006.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; PLEWNIAK, F.; JEANMOUGIN, F.; HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies of multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 4876-4882, 1997.

TORRES-GAVILÁN, A. et al. The amidase activity of *Candida antarctica* lipase B is dependent on specific structural features of the substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.41, p. 136-140, 2006.

TORTORA, G. J. et al. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

UETA, J. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microorganismos degradadores do herbicida atrazina. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>>. Acesso em: 12 de mar. 2007.

UGALDE, M. G. **Controle da ferrugem asiática (*Phakopsora pachyrhizi* Sidow) na cultura de soja**. 2005. 66 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

INTERNATIONAL UNION OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY (IUBMB). Recommendations on Biochemical & Organic Nomenclature, Symbols & Terminology. Disponível em: <<http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/>>. Acesso em: 15 de set. 2008.

UZEIKAL, R. et al. Controle de doenças de final de ciclo da soja em Maracaju, MS. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 17., 2004, São Paulo. **Resumos...** Arq. Inst. Biol., v.71, (suplemento), p.1-749. 2004.

VALLIKIVI, I. et al. Lípase action on some non-triglyceride substrates. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v 22 p. 279-298, 2003.

VEIGA, M. M. et al. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v. 22, n. 11, p. 26-40, 2006.

VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência e Saúde Coletiva**, v.12, n. 1, p. 145-152, 2007.

VIDALI, M. Bioremediation: an overview. **Pure and Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1663-1172, 2001.

WADT, P. G. S (ed.) et al. Práticas de conservação do solo e recuperação de áreas degradadas. Rio Branco, AC: Embrapa Acre, 2003. 29 p.

WAGEGG, T. et al. The use of methoxy acetoxo esters significantly enhances reaction rates in the lípase-catalyzed preparation of enantiopure 1-(4-chloro phenyl) ethyl, amines. **Journal of Biotechnology**, v. 61, p. 75-78, 1998.

WANG, L. et al. Isolation of a triazophos-degrading strain Klebsiella sp. E6 effectively utilizing triazophos as sole nitrogen source. **FEMS Microbiology Letters**, v. 253, p. 259-265, 2005.

WEISBURG, W. G. et al. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WENG, Z., et al. Immobilized Peroxidase: A Potential Bioindicator for Evaluation of Thermal Processes. **Journal of Food Science**, v. 56, p. 567-570, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO)/FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Pesticide residues in food 2004: Evaluations**. Rome, 2005.

YEMENICIOGLU, A. et al. Thermal Stabilities of Peroxidases from Fresh Pinto Beans. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 987-990, 1998.

YORINORI, J. T. Sucessos e novos desafios no controle de doenças fúngicas da soja através da resistência genética no Brasil. In: Congresso Brasileiro de Soja, Londrina, PR, 1999.

ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 7, p. 3194-3201, 1988.

ZHENG-YU, S., et al. Purification and Characterization of a Lipase from *Aspergillus niger* F044. **Chinese Journal of Biotechnology**, v. 23, n. 1, p. 96-100, 2007.

