

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o
herbicida terbutilazina com base na bioadição de
Pseudomonas sp. ADP**

Janete Simão Gonçalves

Dissertação

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

2013

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Biologia Vegetal



**Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o
herbicida terbutilazina com base na bioadição de
Pseudomonas sp. ADP**

Janete Simão Gonçalves

Dissertação

MESTRADO EM MICROBIOLOGIA APLICADA

Dissertação orientada por Prof. Dr.^a Cristina Anjinho Viegas (IST) e
Prof. Dr.^a Manuela Carolino (FCUL)

2013



TÉCNICO LISBOA

**Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o
herbicida terbutilazina com base na bioadição de
Pseudomonas sp. ADP**

Janete Simão Gonçalves

2013

A dissertação foi desenvolvida no Instituto Superior Técnico sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cristina Anjinho Viegas. A Prof^a. Dr^a. Manuela Carolino foi designada a supervisora interna no âmbito do Mestrado em Microbiologia Aplicada da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado por FEDER e FCT_Fundação para a Ciência e Tecnologia (contrato PTDC/AAC-AMB/111317/2009-projecto TerbAzoneBiorem, e contrato PEst-OE/EQB/LA0023/2011-IBB).

Gostaria de agradecer à Prof.^a Doutora Cristina Anjinho Viegas, orientadora desta tese de mestrado pela oportunidade que me proporcionou na integração do seu grupo e desenvolvimento deste trabalho. Pela experiência enriquecedora, orientação e motivação constante.

À Prof.^a Doutora Manuela Carolino, orientadora interna, pelo entusiasmo, motivação e preocupação.

Às colegas de trabalho que se tornaram grandes amigas, Vera Silva pelo conhecimento, amizade e cumplicidade, Fátima Gil pela motivação, apoio incondicional, Viviane Varela pela amizade e companheirismo, Mónica Rato pela amizade e carinho. A todos os intervenientes que fazem parte do grupo BSRG, um muito obrigada por tornarem esta etapa uma oportunidade enriquecedora a todos os níveis.

Aos meus amigos pelo apoio, motivação e apoio constante, à Cláudia pela amizade de todos estes anos, e por acreditar mesmo nos momentos mais difíceis, obrigada pelo apoio.

Aos meus pais e irmãos pelo amor e por acreditarem em mim.

RESUMO

Ao longo dos últimos 50 anos, a utilização excessiva de herbicidas tem sido uma grande preocupação devido ao impacto ecotoxicológico sobre o meio Ambiente e Saúde Pública. Em particular, os herbicidas s-triazina têm sido amplamente utilizados para o controle de gramíneas anuais e plantas daninhas de folhas largas e são frequentemente detectados em águas superficiais e subterrâneas em concentrações acima dos valores estabelecidos pelas entidades reguladoras. Neste contexto, a comunidade científica tem direccionado os seus esforços visando o desenvolvimento de estratégias de biorremediação eficientes, a fim de reduzir a contaminação a níveis não considerados perigosos para os ecossistemas e a saúde humana.

Este trabalho abordou a questão da adição da bactéria *Pseudomonas* sp. ADP, com capacidade de mineralizar herbicidas da família das s-triazinas, atrazina e terbutilazina, de modo a ser utilizada em estratégias de bioaumento em solos contaminados com o herbicida terbutilazina. Teve como objectivos principais optimizar o meio de crescimento e estudar formas de formulação e conservação desta bactéria de modo a melhorar o rendimento na preparação de inóculos para bioaumento, assim como estudar formas de estimular a taxa e extensão da biodegradação da terbutilazina pela bactéria. Foram realizados ensaios com “resting cells” da bactéria onde se observou a degradação dos herbicidas em meio líquido fosfatado, e acompanhou-se a mineralização da terbutilazina em solo agrícola inoculado com suspensões da bactéria, sob determinadas condições. Os resultados obtidos mostraram a eficiência da mineralização do herbicida terbutilazina (60% do inicial, em 6 dias) pela bactéria adicionada com concentração de $2 \times 10^8 \text{UFC.g}^{-1}$ de solo, não sendo contudo possível obter 100% de biodegradação nas condições ensaiadas. Por isso, abordou-se a questão da suplementação adicional do solo com citrato de sódio ou lecitina de soja, que não teve contudo o efeito pretendido. Por último, foram estudados três métodos de formulação e conservação de células de *Pseudomonas* sp. ADP, nomeadamente o armazenamento do sedimento bacteriano a 4°C, a adsorção do sedimento bacteriano a um suporte mineral, a vermiculite, e a liofilização do sedimento bacteriano, ambos com armazenamento a 4°C. Com este estudo pretendia-se verificar se estes métodos de formulação e o seu posterior armazenamento a 4°C, ao longo de 1 mês, permitia manter a viabilidade celular e a capacidade degradativa das culturas.

Os três métodos de formulação conduziram a uma perda considerável de células viáveis, que se intensificou significativamente após 14 dias de armazenamento a 4°C (em média, entre 2 a 22% de sobrevivência). No entanto, a taxa específica de degradação da terbutilazina ou de atrazina pelas células viáveis recuperadas não parece ser significativamente afectada.

PALAVRAS-CHAVE: *Pseudomonas* sp. ADP, terbutilazina, biodegradação, formulação.

ABSTRACT

Over the past 50 years, the overuse of herbicides has been of major ecotoxicological concern regarding the impact on the environment and public health. In particular, s-triazine herbicides have been extensively used for the control of annual grass and broad-leaved weeds and frequently detected in surface and groundwaters at concentrations above the values established by the regulatory authorities. In this context, the scientific community has directed its efforts aiming the development of efficient bioremediation strategies in order to reduce contamination to levels no longer considered hazardous to ecosystems and human health. *Pseudomonas* sp. ADP has been widely used in bioremediation strategies due to its degradative potencial of s-triazine herbicides, particularly of atrazine and terbuthylazine.

The present study aims to develop a bioremediation strategy of terbuthylazine with *Pseudomonas* sp. ADP. For this, we intended to optimize the growth medium of the bacteria and formulation and conservation forms in order to improve yield of bioaugmentation inoculums. We performed bacteria resting cells assay, in which the degradation of atrazine and terbuthylazine were observed. Mineralization assays were performed to obtain the rate of mineralization of the bacteria under ascertain conditions. The results emphasized the effectiveness of the herbicide terbuthylazine mineralization (60% of inicial herbicide in 6 days) by *Pseudomonas* sp. ADP added at a concentration of $2 \times 10^8 \text{CFU.g}^{-1}$ soil alone. In this assay, it wasn't possible to achieve 100% degradation. In order to obtain 100% of mineralization we used sodium citrate or soy lecithin as carbon source for biostimulation of soil, despite having no effect.

To make this strategy effective and applicable in the field; and in order to improve the maintenance of cell viability and its ability to herbicides degradation, we studied three methods of conservation of bacterial pellet. This study involved the bacterial pellet storage at 4° C, after collection, the bacterial pellet adsorption to the mineral vermiculite (used as support) and finally the freeze-drying of the bacterial pellet, both with storage at 4° C. The three methods of formulation led to a significant loss of viable cells, which intensified significantly after 14 days of storage at 4 ° C (on average, between 2 and 22% survival). However, the specific rate of degradation of atrazine or terbuthylazine viable cells recovered by not appear to be significantly affected.

KEY-WORDS: *Pseudomonas* sp. ADP, terbuthylazine, biodegradation, formulation.

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS.....	i
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Herbicidas da família das s-triazinas.....	1
1.1.1 O herbicida terbutilazina.....	1
1.1.2 Destino e efeito toxicológico dos herbicidas s-triazinas no Ambiente	2
1.1.3 Destino e efeito toxicológico dos herbicidas s-triazinas na Saúde Pública	3
1.2 Degradação microbiana de herbicidas s-triazinas no solo	4
1.2.1 Biodegradação intrínseca no solo.....	4
1.2.2 Mineralização pela <i>Pseudomonas sp. ADP1</i>	4
1.2.3 Biotransformação pela <i>Arthrobacter aurescensTC1</i>	6
1.3 Estratégias de biorremediação.....	7
1.3.1 Bioaumento	7
1.3.2 Bioestimulação	7
1.3.2.1 Citrato de Sódio.....	8
1.3.2.2 Biosurfactante : Lecitina de soja	8
1.4 Métodos de conservação de inóculos de microrganismos	9
1.4.1 Adsorção a um suporte mineral	9
1.4.2 Liofilização.....	9
1.5 Objectivos do presente trabalho.....	11
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
2.1 Estirpes bacterianas	12
2.2 Compostos utilizados	12
2.3 Características do solo.....	12
2.4 Meio e condições de crescimento das culturas bacterianas.....	13
2.5 Ensaio de biodegradação de atrazina e de terbutilazina por “ <i>resting cells</i> ” de <i>Pseudomonas sp. ADP rif^R</i>	16
2.6 Mineralização no solo da terbutilazina marcada no anel [¹⁴ C-UL-terbutilazina]	16
2.7 Formulação e conservação dos inóculos de <i>Pseudomonas sp. ADP Rif^R</i>	18

2.7.1	<i>Conservação do sedimento bacteriano a 4°C</i>	18
2.7.2	<i>Adsorção a vermiculite</i>	18
2.7.3	<i>Liofilização</i>	19
2.7.4	<i>Análise da viabilidade celular e capacidade de degradação de atrazina e terbutilazina.</i>	19
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
3.1	Optimização do crescimento do inóculo de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP Rif ^R	20
3.1.1	<i>Influência da concentração de ácido cianúrico como fonte única de azoto</i>	21
3.1.2	<i>Influência da concentração de citrato como fonte de carbono e energia</i>	22
3.2	Comparação da biodegradação de terbutilazina e atrazina por <i>Pseudomonas</i> sp. ADP Rif ^R cultivada com ác. cianúrico como fonte de N	24
3.3	Mineralização da terbutilazina pela <i>Pseudomonas</i> sp. ADP Rif ^R em solo agrícola contaminado com terbutilazina comercial (SAPEC)	26
3.3.1	<i>Influência de diferentes concentrações de Pseudomonas sp. ADP Rif^R.</i>	27
3.3.2	<i>Efeito da suplementação de citrato de sódio ao solo</i>	28
3.3.3	<i>Efeito da suplementação de lecitina de soja</i>	30
3.4	Efeito da adição simultânea de <i>Arthrobacter aurecens</i> TC1 e <i>Pseudomonas</i> sp. ADP Rif ^R	31
3.5	Influência de diferentes métodos de conservação de inóculo de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP Rif ^R , na sobrevivência das células e na taxa de degradação dos herbicidas.	34
3.5.1	<i>Células frescas: Taxa inicial de degradação dos herbicidas</i>	34
3.5.2	<i>Efeito da refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano</i>	35
3.5.3	<i>Efeito da adsorção a vermiculite (40% de humidade) e conservação a 4°C.</i>	37
3.5.4	<i>Efeito da liofilização</i>	39
4.	CONCLUSÕES	42
5.	BIBLIOGRAFIA	44
6.	ANEXOS	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Constituição física do plasmídeo pADP-1 que contem os genes *atz*, responsáveis pela degradação da atrazina e da terbutilazina. (Martinez *et al.*, 2001).

Figura 1.2: Via Catabólica de degradação completa da atrazina pela *Pseudomonas* sp. ADP (Martinez *et al.*, 2001).

Figura 1.3: Via da catabólica da atrazina pela *Arthrobacter aurescens* TC1 (Sajjaphan *et al.*, 2004).

Figura 2.1: Placa de “petri” com meio PADP suplementado com 350mg/ml de atrazina e inoculado com *Pseudomonas* sp. ADP. Em redor da cultura observa-se o halo de degradação da atrazina (Mandelbaum *et al.*, 1995).

Figura 3.1.1: Curvas de crescimento da *P.sp.ADP Rif^R* em meio base PADP suplementado com (◇) 179mg/L de ácido cianúrico, (□) 500mg/L de ácido cianúrico, (△) 1g/L de ácido cianúrico, (×) 2,7 g/L de ácido cianúrico como fonte de N.

Figura 3.1.2: Representação da (Barras) D.O. final e da (▲) Taxa específica de crescimento estimados para o crescimento da estirpe *P.sp.ADP Rif^R* na presença de 179mg/L, 500mg/L, 1000mg/L e 2700mg/L de ácido cianúrico como fonte de N.

Figura 3.1.3: Curvas de crescimento da *P.sp.ADP Rif^R* com (□) 1000mg/L de ácido cianúrico e (◇) 500mg/L de ácido cianúrico com (A) 10g/L de citrato de sódio e (B) 20g/L de citrato de Sódio como fonte de carbono.

Figura 3.2.1: Curvas de degradação dos herbicidas s-triazinas por “resting cells” de *P.sp.ADP Rif^R* crescidas em 500mg/L de ácido cianúrico, como fonte de azoto e 10g/L de Citrato de Sódio, como fonte de carbono. O ensaio foi iniciado com $\approx 2 \times 10^7$ UFC/mL de *P.sp.ADP Rif^R* (A) Representa a percentagem de degradação de (△) - Atrazina; ou (□) - Terbutilazina ao longo do tempo. (B) Representa o valor de Abs._{223nm} dos sobrenadantes nos ensaios de degradação com (▲) - Atrazina; (■) – Terbutilazina, ao longo do tempo. Em (A) e (B), estão também representados os controlos abióticos das misturas reaccionais com (◆,◇) atrazina, ou (●,○) terbutilazina.

Figura 3.3.1: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total $\approx 10\mu\text{g}$ terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (○) 3×10^6 UFC.g⁻¹solo; (◇) 3×10^7 UFC. g⁻¹solo; (□) 3×10^8 UFC. g⁻¹solo. Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (×) sem adição de bactérias. (B) Número de UFC de *P. sp. ADP* ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Figura 3.3.2: Evolução da concentração de ufc de *P. sp. ADP Rif^R* com (●) adição da formulação comercial da terbutilazina (SAPEC) ao solo; (○) sem adição de herbicida ao solo.

Figura 3.3.3: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total $\approx 10\mu\text{g}$ terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (◇) $1,2 \times 10^8$ UFC.g⁻¹solo; (◆) $1,2 \times 10^8$ UFC. g⁻¹solo com adição de 2,4mg/g solo de citrato de sódio. Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (×) com adição de 4,8mg/g solo de citrato de sódio sem adição de bactéria. (B) Número de UFC de *P. sp. ADP* ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Figura 3.3.4: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total $\approx 10\mu\text{g}$ terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (◇) 2×10^7 UFC.g⁻¹ solo; (▲) 2×10^7 UFC.g⁻¹solo com 10 μg /g solo de lecitina de soja (em H₂O); (△) 2×10^7 UFC.g⁻¹solo com 5 μg /g solo de lecitina de soja (em H₂O); (◆) 2×10^7 UFC.g⁻¹solo com 10 μg /g solo de lecitina de soja [em etanol (1,28%)];

(◆) 2×10^7 UFC.g⁻¹ solo com 80 µl etanol (1,28%). Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (×) sem adição de bactéria com lecitina de soja [em etanol (1,28%)] 10 µg /g solo]. (B) Número de UFC de *P. sp.* ADP ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Figura 3.3.5: Mineralização pela *P. sp.* ADP Rif^R em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total ≈ 10µg terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (◻) 5×10^7 UFC (AaTC1). g⁻¹ solo adicionada no primeiro dia e com 6×10^7 UFC (*P.sp.*ADP Rif^R). g⁻¹ solo no segundo dia; (◼) 5×10^7 UFC (AaTC1) .g⁻¹ solo e + 5×10^7 UFC (*P.sp.*ADP Rif^R) .g⁻¹ solo adicionadas simultaneamente ; (◻) 1×10^8 UFC (*P.sp.*ADP Rif^R) .g⁻¹ solo e com (*) 1×10^8 UFC (AaTC1) .g⁻¹ solo.

Figura 3.3.6: (A) Número de UFC de *P.sp.*ADP Rif^R e (B) número total de UFC, no solo, durante os ensaios de mineralização cujos resultados são apresentados na figura 3.3.5 (◻) 1×10^8 UFC.g⁻¹ solo; (◼) 6×10^7 UFC .g⁻¹ solo adicionada no segundo dia; (◼) 5×10^7 UFC .g⁻¹ solo adicionada simultaneamente com AaTC1 e com (*) 1×10^8 UFC (AaTC1) .g⁻¹ solo.

Figura 3.4.1: Variação da concentração de células viáveis de *P.sp.*ADP Rif^R durante a refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. (A) Concentração no tempo zero foi avaliada imediatamente antes do armazenamento ($1,1 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis ao longo do período de ensaio, 1, 7, 14 e 28 dias. (B) Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes do armazenamento a 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subseqüentes ao inicial.

Figura 3.4.2: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (◻) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.*ADP Rif^R; (A) cultura fresca, e armazenada a 4°C durante (B) 1 dia; (C) 7 dias; (D) 14 dias e (E) 28 dias de refrigeração a 4°C. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura de células em tampão U contendo Atrazina (40 µM) ou terbutilazina (40 µM).

Figura 3.4.3: Variação da concentração de células viáveis da *P.sp.*ADP Rif^R após a adsorção a vermiculite e refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. (A) Concentração no tempo zero foi avaliada imediatamente antes do armazenamento ($1,0 \times 10^{10}$ UFC ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis ao longo do período de ensaio, 1, 7, 14 e 28 dias. (B) Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes do armazenamento a 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subseqüentes ao inicial.

Figura 3.4.4: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (◻) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.*ADP Rif^R da cultura adsorvida a vermiculite, e armazenada a 4°C durante, (A) 7 dias; (D) 14 dias e (E) 28 dias. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura células em tampão U contendo Atrazina (40 µM) ou terbutilazina (40 µM).

Figura 3.4.5: Variação da concentração de células viáveis da *P.sp.*ADP Rif^R após a liofilização e refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. (A) Concentração da cultura fresca foi avaliada imediatamente antes da liofilização ($1,0 \times 10^{10}$ UFC ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis após a liofilização 0 dias e ao longo do período de ensaio, 14 e 28 dias. (B) Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes da liofilização 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subseqüentes ao inicial.

Figura 3.4.6: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (◻) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.*ADP Rif^R liofilizada (A) 0 dias, e armazenada a 4°C durante; (B) 14 dias e (C) 28 dias. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura de células em tampão U contendo Atrazina (40 µM) ou terbutilazina (40 µM).

Figura 6.1: Curvas de calibração da atrazina em água realizadas por Vera Silva.

Figura 6.2: Curvas de calibração da terbutilazina em água realizadas por Vera Silva.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1: Características dos herbicidas *s*-triazina, atrazina e terbutilazina (PPBD, 2013)

Tabela 2.1: Características do solo ESAC

Tabela 2.2: Condições testadas nos diferentes ensaios de mineralização.

Tabela 3.1: Relação da densidade óptica obtida no final da fase exponencial com o custo de 1L de meio de cultura PADP com base na alteração das concentrações de fonte de carbono e de fonte de azoto

Tabela 3.4.1: Taxa específica de degradação inicial de atrazina e de terbutilazina por células frescas de *P.sp.ADP* Rif^R, com base no declive obtido na figura 3.2.1-A a dividir pela concentração de UFC/mL adicionadas ao tampão U .

Tabela 3.4.2: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP* Rif^R conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.3 nas primeiras duas horas a dividir pela concentração de células UFC/mL adicionadas ao tampão U com herbicida.

Tabela 3.4.3: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP* Rif^R adsorvidas a vermiculite e conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.5 nas primeiras 2 horas a dividir pela concentração de células (UFC/mL) adicionadas ao tampão U com herbicida.

Tabela 3.4.4: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP* Rif^R liofilizadas e conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.7 nas primeiras 2 horas a dividir pela concentração de células (UFC/mL) adicionadas ao tampão U com herbicida.

Tabela 6.1: Preço relativo a alteração da fonte de N e fonte de C, por cada mole de composto usado no meio de crescimento da *P.sp.ADP*.

LISTA DE ABREVIATURAS

Aa TC1	<i>Arthrobacter aureescens</i> TC1
Abs.	Absorvância
ATZ	Atrazina
C	Carbono
DO	Densidade Óptica
DR	Dose Recomendada
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
g	Gramas
h	Horas
LB	Lennox Broth
N	Azoto
nm	nanómetros
p/p	peso/peso
<i>P.sp.ADP</i>	<i>Pseudomonas</i> sp. ADP
rpm	Rotações por minuto
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
TBZ	Terbutilazina
%	Porcentagem

1. INTRODUÇÃO

1.1 Herbicidas da família das s-triazinas

Os herbicidas da família s-triazinas são mundialmente utilizados na agricultura. Esta classe foi desenvolvida em 1950 (Wackett *et al.*, 2002; Shapir *et al.*, 2007) para o controlo de plantas infestantes de diversas culturas, como o milho, sorgo, cana-de-açúcar (Silva *et al.*, 2005), assim como para propósitos não agrícolas, como a esterilização de solos e em manutenção de estradas (Papadopoulos *et al.*, 2007). Esta família actua ao nível do fotossistema II através da interacção directa com a proteína cloroplástica D1, no local de ligação da plastoquinona B, inibindo a transferência de electrões e assim a fotossíntese (Hess 2000), levando a clorose (amarelecimento das folhas) e conseqüente necrose dos tecidos das plantas sensíveis (Hess 2000). Fazem parte desta família os herbicidas, atrazina, terbutilazina, simazina, propazina, entre outros (Sahid e Teoh 1994).

Apesar da sua utilização ter aumentado a produção agrícola, teve também um grande impacto a nível ambiental, na contaminação de sistemas aquáticos e terrestres (Caracciolo *et al.*, 2001), assim como a nível da saúde pública no que diz respeito à poluição de água para consumo humano (Vanderheyben *et al.*, 1997; Funari *et al.*, 1998).

Apesar dos compostos s-triazinas serem vistos apenas como produtos químicos industriais, estes estão relacionados com as diazinas (ex: as pirimidinas) (Wackett *et al.*, 2002). As pirimidinas encontram-se em material genético (DNA e RNA), a nível de energia da célula (ATP) e transportadores redox (NADH) (Stryer 1995).

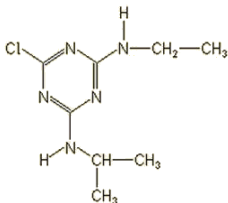
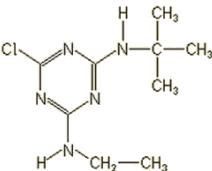
Os herbicidas s-triazinas são caracterizados por apresentarem um anel aromático constituído por três átomos de carbono e três de azoto em posições alternadas, dividindo-se em três grupos: clorotriazinas, metiltiotriazinas e metoxitriazinas (Silva *et al.*, 2005). Na molécula da atrazina o grupo substituinte é um Cloro, o que leva à inclusão deste herbicida no grupo das clorotriazinas. (Silva *et al.*, 2005). A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6- isopropilamino-s-triazina) é um dos principais herbicidas utilizados em todo o mundo, (Silva *et al.*, 2005), tendo sido substituído pela terbutilazina em diversos países da Europa, apesar de ainda ser usada nos EUA, Canada e Austrália (Viegas *et al.*, 2012).

1.1.1 *O herbicida terbutilazina*

O herbicida terbutilazina do grupo clorotriazinas (N²-terbutile-6-cloro-N⁴-etile-1,3,5-triazina-2,4-diamina) pertence a família das s-triazinas assim como a atrazina, simazina entre outros (Sanlaville *et al.*, 1996). É um herbicida não-selectivo desenvolvido pela empresa CIBA-GEIGY (Sahid e Teoh 1994), tendo sido introduzido no mercado na Malásia em 1980 com o nome de Gardporin (Sahid e Teoh 1994). Recentemente a terbutilazina é utilizada como ingrediente activo de diversos produtos agrícolas como Gardo Gold, Calaris, Primextra Gold TZ entre outros (PPDB, 2013).

A terbutilazina é um herbicida de largo espectro utilizado para o controlo da maioria das plantas infestantes em terrenos agrícolas e não agrícolas (Fiori *et al.*, 2013). Nos países onde a atrazina foi erradicada, tem sido gradualmente substituída pela terbutilazina (Caracciolo *et al.*, 2005), pois apresenta uma menor capacidade de contaminação de compartimentos aquáticos uma vez que o seu coeficiente de adsorção ao solo é superior ao da atrazina (tabela 1.1), ficando adsorvida às partículas do solo, apresentando, assim, um menor impacto na poluição das águas subterrâneas, apesar dos metabolitos provenientes da sua degradação apresentarem uma grande mobilidade e conseqüentemente contaminarem as águas subterrâneas (Caracciolo *et al.*, 2005). O efeito dos metabolitos provenientes da sua degradação ao contrário da atrazina, não é bem conhecido. No entanto, a terbutilazina tem sido frequentemente detectada em compartimentos aquáticos em concentrações mais elevadas que as legalmente permitidas, assim como o seu principal metabolito desentilterbutilazina (Dolaptoglou *et al.*, 2007) sendo por isso importante minimizar as suas concentrações presentes no meio ambiente, pois o facto do seu coeficiente de adsorção (tabela 1.1) não permitir que a lixiviação destes compostos ocorra tão facilmente como no caso da atrazina, não é suficiente para impedir uma potencial acção nefasta da terbutilazina sobre ecossistemas aquáticos e terrestres.

Tabela 1.1: Características dos herbicidas *s*-triazina, atrazina e terbutilazina (PPBD, 2013)

Características	Atrazina	Terbutilazina
Estrutura molecular		
Fórmula química	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	C ₉ H ₁₆ ClN ₅
Coefficiente de sorção (K _{oc})	100 L/kg	231 L/kg
Solubilidade	35 mg/L	6.6 mg/L
Índice GUS (potencial de lixiviação)	3.3 (elevada lixiviação)	3.07 (elevada lixiviação)

1.1.2 Destino e efeito toxicológico dos herbicidas *s*-triazinas no Ambiente

Os pesticidas são compostos que, apesar dos seus benefícios, podem produzir efeitos tóxicos potencialmente perigosos para o meio ambiente (Kolpin *et al.*, 1998). O uso intensivo de herbicidas *s*-triazinas e a sua mobilidade nos solos tem contribuído para que seja dos pesticidas mais frequentemente detectados em águas de superfície e subterrâneas quer na Europa (van Maanen *et al.*, 2001; Cerejeira *et al.*, 2003), quer nos Estados Unidos (Boyd,

2000). Estudos realizados por Hildebrandt *et al.*, (2008) apresentam valores distintos para a distribuição de herbicidas em águas subterrâneas e em águas de superfície, diferença esta que influencia o seu destino e impacto. Em águas de superfície os pesticidas são foto-degradados ou metabolizados contrariamente ao que acontece em águas subterrâneas, onde são lixiviados e permanecem estáveis por um longo período de tempo em condições de anóxia e baixas temperaturas, sendo, por isso, um compartimento mais vulnerável (Hildebrandt *et al.*, 2008). Vários estudos realizados destacam o efeito tóxico da atrazina sobre o fitoplâncton (Solomon *et al.*, 1996; Graymore *et al.*, 2001), assim como no zooplâncton (Chelinho *et al.*, 2010). O efeito da atrazina parece não afectar de forma tão significativa os organismos terrestres quando comparado com os sistemas aquáticos (Solomon *et al.*, 1996), no entanto, estudos realizados por Salminen *et al.*, (1996) demonstram que os herbicidas podem ter um efeito tóxico directo sobre a fauna do solo, alterando o comportamento específico de procura de recursos de cada espécie, podendo variar as vias de exposição ao herbicida, assim como a taxa de exposição, consideravelmente de espécie para espécie, sendo umas mais sensíveis que outras.

1.1.3 Destino e efeito toxicológico dos herbicidas s-triazinas na Saúde Pública

A atrazina é um composto regulamentado desde os anos 90. O limite máximo estabelecido para a detecção de pesticidas em águas de consumo, é de 3 µg/L nos Estados Unidos (United States Environmental Protection Agency, USEPA) e 0,1 µg/L na União Europeia (Conselho da União Europeia) (Silva *et al.*, 2005). Esta preocupação deve-se à sua potencial capacidade de contaminação de águas subterrâneas, através da lixiviação dos solos, podendo afectar cursos de água destinados ao abastecimento das populações. Este composto tem um efeito nefasto ao nível da saúde pública, sendo classificado como um agente tóxico (WHO, 2013). Estudos de Friedmann *et al.*, (2002) referem a atrazina como um desregulador hormonal, uma vez que reduz em 50% a produção de testosterona em ratinhos de laboratório. Assim como um agente carcinogénico da classe C (Biradar *et al.*, 1995), na qual estão incluídos compostos potencialmente cancerígenos para o homem (Biradar *et al.*, 1995). A nível de saúde pública o efeito da terbutilazina não é bem conhecido, como referido no ponto 1.1.1., no entanto pode ser tóxico se inalado, ingerido ou absorvido através da pele (PPDB, 2013).

1.2 Degradação microbiana de herbicidas s-triazinas no solo

1.2.1 *Biodegradação intrínseca no solo*

A contaminação de sistemas terrestres e aquáticos com herbicidas s-triazinas tem sido uma questão debatida ao longo dos tempos, na qual têm sido desenvolvidas estratégias de modo a minimizar o seu impacto nos ecossistemas e na população. Algumas estratégias apontam para a adição de microrganismos capazes de degradar herbicidas, nas quais é necessário ter em consideração a população microbiana indígena do local. Alguns estudos abordaram a questão da bioestimulação, i.e., adição de fonte de azoto e fonte de carbono, em solo contaminado com o herbicida terbutilazina de forma a estimular a mineralização do herbicida através da população microbiana indígena do local, chamada de mineralização intrínseca (Ostrofsky, *et al.*, 2001), uma vez que solos com histórico de aplicação de herbicida apresentam uma percentagem de mineralização mais significativa do que solos sem histórico de adição de herbicida (Ostrofsky, *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004). Apesar do potencial intrínseco de mineralização de solos com histórico de aplicação de herbicida, a taxa de mineralização da terbutilazina no solo é reduzida e necessita de um grande intervalo de tempo, não sendo um meio atractivo de biorremediação uma vez que quanto maior o espaço de tempo, maior a possibilidade de lixiviação dos solos contaminados e consequente contaminação dos aquíferos (Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009). Desta forma, vários estudos (Mandelbaum *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995; Strong *et al.*, 2002; Sapir *et al.*, 2007) têm-se focado no isolamento de bactérias com capacidade degradativa.

1.2.2 *Mineralização pela Pseudomonas sp. ADP1*

A bactéria *Pseudomonas sp. ADP* (*Atrazine Degrading Pseudomonas*) descrita por Mandelbaum *et al.* (1995) foi isolada a partir de um local contaminado com herbicidas, apresentando características importantes no processo degradativo (Mandelbaum *et al.* 1995).

Esta bactéria gram-negativa não patogénica, tem forma de bastonete contendo um único flagelo polar. As suas colónias quando crescidas em meio sólido com atrazina apresentam-se geralmente em forma circular, com uma borda irregular, e uma coloração opaca mais escura no centro (Mandelbaum *et al.* 1995).

A *Pseudomonas sp. ADP* degrada a atrazina, uma vez que a usa como fonte de azoto. Esta capacidade de mineralização da atrazina advém da presença do plasmídeo pADP1 (figura 1.1) que contém os genes *atzA*, *atzB* e *atzC* de natureza constitutiva (Katz *et al.*, 2000; Devers *et al.*, 2004), conferindo à bactéria a capacidade de degradar a atrazina até ao ácido cianúrico (Wackett *et al.*, 2002) e o operão de degradação do ácido cianúrico *atzDEF*, sujeito a uma dupla regulação, na qual estão envolvidos dois sinais distintos, os níveis de azoto na

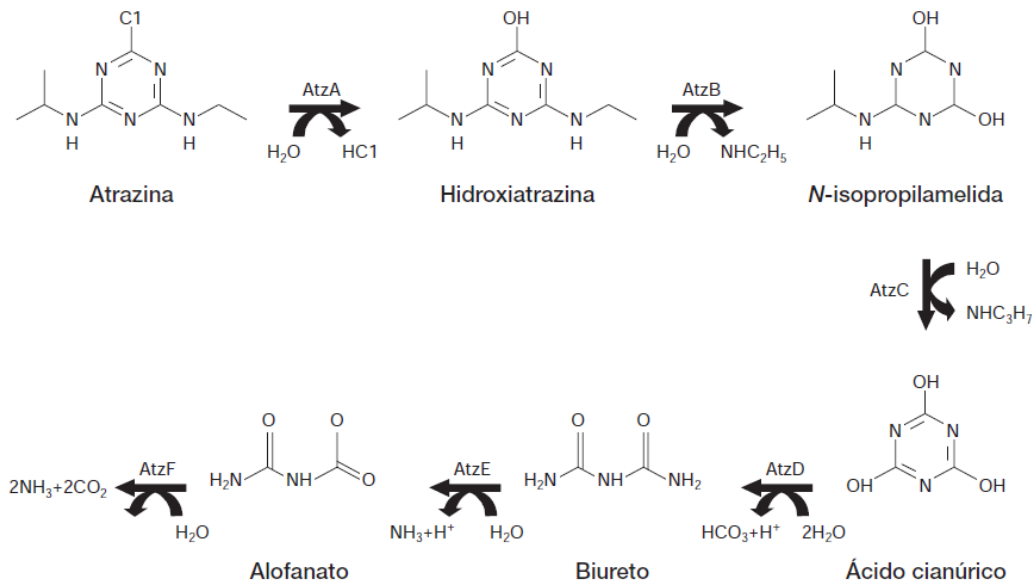


Figura 1.2: Via Catabólica de degradação completa da atrazina pela *Pseudomonas* sp. ADP (Martinez *et al.*, 2001).

1.2.3 Biotransformação pela *Arthrobacter aurescens* TC1

A bactéria *Arthrobacter aurescens* TC1 foi isolada por Strong *et al.*, (2002) de um local com elevada quantidade de atrazina proveniente de um derrame acidental. Esta bactéria utiliza vários compostos de s-triazina como fonte de carbono e de azoto (Shapir *et al.*, 2007), destacando se por esta capacidade catabólica (Strong *et al.*, 2002).

O catabolismo da atrazina em ácido cianúrico deve-se a presença dos genes *trzN*, *atzB* e *atzC* no plasmídeo TC1, não apresentando capacidade de metabolizar o ácido cianúrico em CO₂ e amónia, acumulando-o (figura 1.3).

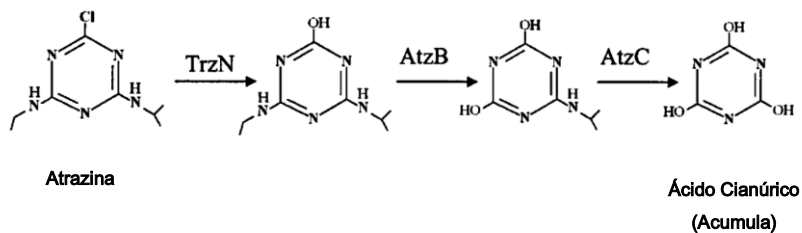


Figura 1.3: Via da catabólica da atrazina pela *Arthrobacter aurescens* TC1 (Sajjaphan *et al.*, 2004).

A proteína TrzN da *Arthrobacter aurescens* TC1 codificada pelo gene *trzN* cataliza a desalogenação do anel de s-triazina (Sajjaphan *et al.*, 2004) que apresenta 26% de semelhança com a sequência de aminoácidos da proteína AtzA da *Pseudomonas* sp. ADP (Shapir *et al.*, 2006).

1.3 Estratégias de biorremediação

Biorremediação foi definida por Mueller *et al.* (1996) como “o processo pelo qual os resíduos orgânicos são biologicamente degradados sob condições controladas a um estado inócuo, ou para níveis abaixo dos limites de concentração estabelecida pelas autoridades reguladoras”.

Os processos biológicos oferecem diversas vantagens, pode ser feito no local, tem ampla aplicabilidade, de baixo custo, a perturbação local é mínima, elimina desperdícios de forma permanente, pode ser acoplado com outros métodos de tratamento físico ou químico, e tem uma maior aceitação da sociedade, vantagens relativamente as tecnologias convencionais, uma vez que são mais amigos do ambiente, económicos e versáteis assim como podem reduzir a concentração e anular a toxicidade de contaminantes (Vidali 2001; Jain *et al.*, 2005) usando a actividade biológica (Shinde 2013) de bactérias, fungos ou plantas. Algumas técnicas de biorremediação como de bioaumentação e bioestimulação, serão descritas de seguida.

1.3.1 **Bioaumentação**

Bioaumentação é um processo de biodegradação que envolve a adição de microrganismos indígenas ou exógenos a um lugar contaminado onde vão promover a degradação dos compostos poluentes (Shinde 2013). Este método é aplicado quando, por um lado, as taxas de degradação de atenuação natural (degradação intrínseca) são lentas devido à ausência ou baixa população microbiana indígena ou, por outro lado, quando as populações microbianas não apresentam capacidades metabólicas para a degradação dos contaminantes presentes (Juhász *et al.*, 2000). Muitos estudos (Mandelbaum *et al.*, 1993; Mandelbaum *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1995; Strong *et al.*, 2002; Shapir *et al.*, 2007; Chelinho *et al.*, 2010) têm apresentado este processo como sendo eficaz na degradação de compostos poluentes.

A aplicação bem sucedida desta técnica requer a sobrevivência e manutenção da actividade biológica dos organismos após a sua libertação no local a descontaminar. Este processo pode ser influenciado pela forma como os organismos são adicionados (por exemplo, liofilizados) ao local (Juhász *et al.*, 2000), assim como pelas condições ambientais, características do solo, entre outras.

1.3.2 **Bioestimulação**

A bioestimulação requer a adição de nutrientes ao solo, importante para melhorar a capacidade degradativa de microrganismos capazes de metabolizar o composto poluente presente no local (Wackett *et al.*, 2002).

1.3.2.1 Citrato de Sódio

O citrato de sódio é amplamente usado como suplemento ao solo de modo a aumentar a degradação do herbicida estimulando a capacidade degradativa das bactérias presentes (bioestimulação). Em estudos de laboratório, o citrato de sódio tem sido uma excelente fonte de carbono para apoiar o metabolismo da atrazina, e esse conhecimento tem sido aplicado de forma eficaz para remover atrazina do solo (Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009; Chelinho *et al.*, 2010).

1.3.2.2 Biosurfactante : Lecitina de soja

Os processos de biorremediação podem ser condicionados pela baixa solubilidade dos contaminantes em água, limitando a sua disponibilidade aos microorganismos (Bollag e Bollag, 1995; Volkering *et al.*, 1998).

A biodisponibilidade de um poluente é maioritariamente controlada pela sua hidrofobicidade e facilidade de desorção da fase sólida do solo para a solução aquosa (Semple *et al.*, 2003), limitada pela sua estrutura molecular, concentração, características físico-químicas (Volkering *et al.*, 1998; Alexander, 2000) e pelo envelhecimento do poluente no solo (Alexander, 1995; Semple *et al.*, 2003). Neste contexto, várias pesquisas demonstraram que a adição de um surfactante a um solo contaminado aumenta a desorção de um poluente (Aronstein *et al.*, 1991; Bustamante 2012), uma vez que diminui a tensão superficial deste ao solo (Mulligan *et al.*, 2001; Gao *et al.*, 2007; Franzetti *et al.*, 2008).

Os surfactantes são moléculas orgânicas com uma parte hidrofóbica e uma parte hidrofílica. A parte hidrofílica torna o surfactante solúvel em água enquanto a parte hidrofóbica faz com que se ligue às interfaces (Volkering *et al.*, 1998). Os surfactantes podem ser naturais (também chamados biosurfactantes) ou sintéticos, conforme são produzidos por microrganismos ou a partir de químicos, respectivamente (Bustamante *et al.* 2012)

A lecitina de soja é um biosurfactante fitogénico libertado pelas raízes da planta que pode ser encontrado em grandes quantidades na rizosfera. Esta consiste numa mistura de fosfolípidos (Dormaar, 1969) capaz de suportar o crescimento de microrganismos (Soeder *et al.*, 1996) uma vez que funciona como fonte de carbono (Fava e Di Gioia 2000). É um agente biodegradável e não tóxico (Soeder *et al.*, 1996) capaz de aumentar a biodisponibilidade e a degradação aeróbica de compostos aromáticos em cultura líquidas de bactérias especializadas, suportando o crescimento das culturas (Soeder *et al.*, 1996).

1.4 Métodos de conservação de inóculos de microrganismos

Actualmente a necessidade de armazenar amostras biológicas é essencial para pesquisa, diagnóstico e aplicação tanto em laboratório como no campo. Contudo, não existe um método universal para a formulação e conservação de amostras biológicas, devido a variabilidade de características dos microrganismos. Desta forma, a escolha de um método de manutenção deve basear-se nas características do microrganismo a conservar e do fim a que se destina. Neste caso pretende-se desenvolver um método de armazenamento e transporte dos inóculos para biorremediação dos solos.

1.4.1 Adsorção a um suporte mineral

A utilização de culturas bacterianas na biorremediação de solos contaminados requer o transporte dos inóculos preparados em laboratório para o local a biorremediar. Para tal, por vezes são usados transportadores minerais de forma a contrariar a alteração da viabilidade das culturas celulares (Juhász *et al.*, 2005). As características físico-químicas dos suportes minerais têm influência na sobrevivência dos inóculos, como a área de superfície em matéria orgânica, a capacidade de retenção de água, o pH entre outras (Arangarasan *et al.*, 1998). As culturas bacterianas têm também que competir com a microflora nativa e resistir a predação por parte dos protozoários, portanto uma das regras essenciais da formulação de inóculos é providenciar um microambiente, mesmo que temporário, de forma a prevenir o rápido declínio das bactérias introduzidas no solo (Bashan 1998).

A vermiculite é um transportador mineral amplamente utilizado no desenvolvimento de formulações de culturas microbianas para uso em larga-escala (Nakkeeran *et al.*, 2005; Sangeetha *et al.*, 2012). Este composto mineral é um silicato de alumínio e magnésio hidratado, esfoliado a temperaturas elevadas (Graham-Weiss *et al.*, 1987), que possui uma densidade muito baixa e uma elevada capacidade de absorção. Estudo realizado por Sangeetha *et al.* (2012), refere a vermiculite como um transportador mineral que oferece protecção ao inóculo em condições de stress e de competição, podendo ser utilizado com sucesso na preparação de inóculos comerciais.

1.4.2 Liofilização

A liofilização é um dos processos mais comuns de armazenamento de culturas bacterianas (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008). Este método caracteriza-se pela conservação de microrganismos através da desidratação de culturas congeladas por sublimação, sob vácuo, ou seja, ocorre a remoção da água intracelular de amostras biológicas congeladas evitando a formação de cristais de gelo, capazes de provocar danos nas estruturas celulares (Costa e Ferreira, 1991; Morgan *et al.*, 2006).

Apesar da liofilização ser amplamente utilizada na manutenção de diferentes microrganismos e ser considerada uma técnica de conservação a longo prazo, as etapas que

compõem o processo são capazes de causar danos celulares como alterações na permeabilidade da membrana celular, o que leva ao aumento da sensibilidade, aumento da fase de multiplicação celular e a necessidade de aumento nutricional (Morgan *et al.*, 2006). Na tentativa de contornar os danos celulares, são adicionadas substâncias protectoras durante o desenvolvimento de microrganismos, antes do congelamento ou da secagem. O armazenamento e acondicionamento influenciam significativamente as amostras biológicas liofilizadas. Desta forma, estes produtos devem ser acondicionados em ambientes com baixa humidade, baixas temperaturas, na ausência de oxigénio, luz e contaminantes (Day e Mclellan., 1995; Morgan *et al.*, 2006).

Considerando a manutenção de bactérias, verifica-se que a viabilidade relativa após a liofilização decresce entre as bactérias formadoras de esporos, gram-positivas e gram-negativas, algas e alguns protozoários, facto explicado pelas diferenças na morfologia. As taxas de sobrevivência variam após e durante o armazenamento (Lapage *et al.*, 1970), reflectindo a habilidade da célula de resistir ao processo de congelamento e liofilização (Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008).

A liofilização é um processo amplamente usado na preservação de culturas bacterianas uma vez que mantém a viabilidade celular por um período de tempo mais longo (Leslie *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1999; Juhasz *et al.*, 2005; Miyamoto-Shinohara *et al.*, 2008).

1.5 Objectivos do presente trabalho

O presente trabalho pretendeu destacar o papel da *Pseudomonas* sp. ADP na biorremediação de solos contaminados com doses altas do herbicida terbutilazina, simulando situações de contaminação acidental (por exemplo, 10x a dose recomendada do herbicida no solo). Prevê-se que o estímulo da biodegradação do herbicida no solo em processos de bioadição com esta bactéria contribua para que o seu impacto no ambiente, e em particular no solo e compartimentos aquáticos, seja minimizado. Assim, o principal objectivo focou-se no estudo da eficiência de biodegradação do herbicida terbutilazina pela bactéria *Pseudomonas* sp. ADP, com base nas seguintes abordagens:

- Optimização do meio de crescimento da *Pseudomonas* sp. ADP de forma a melhorar o processo de preparação de inóculos da bactéria para efeito de bioadição ao solo.
- Planeamento de uma estratégia, em pequena escala (ensaios de mineralização), com o fim de estimular a taxa de mineralização do herbicida terbutilazina no solo, tendo em vista a transposição futura para uma situação real de contaminação do solo;
- Estudo de métodos de formulação e conservação do sedimento bacteriano da bactéria *Pseudomonas* sp. ADP durante períodos prolongados (por exemplo, até 1 mês após a preparação do inóculo), que permitam manter a viabilidade celular e capacidade degradativa.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Estirpes bacterianas

No trabalho desenvolvido foram utilizadas duas bactérias: a estirpe *Pseudomonas* sp. ADP, isolada inicialmente por Mandelbaum *et al.*, (1995), tendo sido usado o mutante espontâneo resistente à rifampicina de *Pseudomonas* sp. ADP (*P.* sp. ADP Rif^R) (García-González *et al.*, 2003), e a bactéria *Arthrobacter aurecens* TC1 (*Aa* TC1) isolada por Strong *et al.*, (2002).

2.2 Compostos utilizados

Nos ensaios realizados foram usadas, atrazina (Fluka analytical, 98.8% de pureza) cuja solubilidade é de 35mg/L em H₂O a 20°C; terbutilazina (Fluka analytical, 98.8% de pureza) cuja solubilidade é de 6,6mg/L em H₂O a 20°C e ácido cianúrico (Fluka analytical, 98.8% de pureza) cuja solubilidade é de 2,7g/L em H₂O a 25°C, compostos comprados a SIGMA-ALDRICH, Alemanha; terbutilazina com marcação radioactiva [¹⁴C-*UL*-terbutilazina (IZOTOP, Hungria)] e formulação comercial de terbutilazina (SAPEC). A Vermiculite foi comprada a Scharlab S. L., Espanha.

2.3 Características do solo

O solo utilizado nos ensaios de mineralização foi colhido num terreno de produção de milho no Centro de Portugal (Escola Superior Agrária de Coimbra, Coimbra, Portugal) indicado como solo ESAC, e não possui historial de aplicação de herbicidas. Para a realização dos ensaios este solo foi peneirado (5mm) e armazenado em sacos de plástico a 4°C. Antes da sua utilização o solo foi analisado pela Direcção Regional de Agricultura de Entre-Douro e Minho, Portugal, características sumarizadas na tabela 2.1. O azoto total e o conteúdo de matéria orgânica foram analisados pela Agência Portuguesa do Ambiente (APA).

A análise do pH, humidade do solo e capacidade de retenção de água foi realizada durante o presente trabalho. Para a análise do pH, foi colocada uma porção de solo numa tina e deixou-se a secar, ao ar, durante 1 dia. Da porção seca foi pesada 5 g de solo para um copo (3 réplicas). A cada copo foi adicionado 25mL de KCL 1M. Para a leitura do pH, colocou-se no agitador durante 5 minutos e seguidamente procedia-se a leitura, este processo foi realizado várias vezes ao longo de 24 horas. Para a capacidade de retenção de água, foram colocados três funis com lã de vidro, com 15-20gramas de solo. Tapou-se o solo com água destilada e, foi colocado um copo por baixo do funil para permitir a escorrência da água, durante a noite. Para analisar a humidade do solo, foram pesados 3 copos de vidro, nos quais foi adicionado ~5gramas de solo, obtido no processo anterior (capacidade de retenção de água), e registado o peso. Os copos com o solo foram deixados a 105°C até o peso permanecer constante. Durante

as pesagens os copos com solo foram transportados num exsiccador, de modo a não absorver a humidade do ar, as pesagens foram realizadas ao longo do tempo (± 24 h).

$$\text{Humidade do solo} = \frac{\text{peso (copo com solo húmido)} - \text{peso (copo com solo seco)}}{\text{peso (copo com solo seco)} - \text{peso do copo}}$$

Tabela 2.1: Características do solo ESAC

Tipo de solo :	Solo arenoso (Lima <i>et al.</i> 2009)
Composição do solo :	Areia 62,4%, silte 21,1%; argila 16,4% (Lima <i>et al.</i> 2009)
Capacidade de troca iónica :	0,0123cmol/g (Lima <i>et al.</i> 2009)
Azoto (N) Total :	0,83mg/g (Lima <i>et al.</i> 2009)
Matéria orgânica :	3.1% (Lima <i>et al.</i> 2009)
Carbono Solúvel (Cs) :	23.5 \pm 5.2 g/g (Lima <i>et al.</i> 2009)
pH :	7,11 (presente trabalho)
Capacidade de retenção de água :	0,326 g H ₂ O/g solo (presente trabalho)
Teor de humidade :	0,142g H ₂ O/g solo (presente trabalho)

2.4 Meio e condições de crescimento das culturas bacterianas

O crescimento em descontínuo de culturas das referidas estirpes bacterianas teve como objectivo estudar a influência de diferentes concentrações de fonte de N (ác.cianúrico) e fonte de C (citrato) no crescimento da bactéria *P. sp.* ADP Rif^R, e a obtenção de inóculos bacterianos para a realização dos ensaios de degradação de atrazina e terbutilazina em meio líquido por “resting cells” das bactérias (2.5) e de mineralização de terbutilazina marcada, pela estirpe *P. sp.* ADP Rif^R, no solo (2.6).

O meio mínimo basal da *P. sp.* ADP Rif^R foi descrito previamente por Silva *et al.* (2004), referido como meio PADP. O meio PADP era composto por 1.6g de K₂HPO₄, 0.4g de KH₂PO₄, 0.1g de NaCl, 0.2g de MgSO₄.7H₂O, 0.02g de CaCl₂, 20ml da solução stock de vitaminas, 20ml de solução stock de sais, 10g de citrato de sódio (como fonte de carbono), 0.1M de MOPS para tamponizar ligeiramente o meio (pH 6.2), para um litro de meio. A solução stock de vitaminas continha (por litro de água desionizada) 5mg de tiamine-HCl, 2mg de biotina, 2mg de ácido fólico, 10mg de niacinamida e 10mg de pyridoxine-HCl. A solução stock de sais continha (por litro de água desionizada) 2.5g de EDTA, 11.1g de ZnSO₄, 5g de FeSO₄, 1.54g de MnSO₄.H₂O, 0.4g de CuSO₄.5H₂O, 0.25g de CoSO₄.7H₂O, 0.18g de Na₂B₄O₇.10H₂O e 5ml de H₂SO₄ concentrado de modo a retardar a precipitação dos sais.

A bactéria *P. sp. ADP Rif^R* foi mantida em placas de “petri” contendo meio sólido PADP suplementado com 350mg/L de atrazina como fonte de azoto. A atrazina adicionada ao meio de crescimento foi preparada a partir de uma solução stock de metanol (16.2 mg/ml). A concentração final de metanol no meio PADP, não causava efeitos tóxicos na bactéria uma vez que se encontrava com uma concentração abaixo dos 2% (V. Silva & C. A. Viegas resultados não publicados).

Para cada ensaio realizado, foram usadas culturas puras de *P. sp. ADP Rif^R* ($\pm 72h$). Estas culturas foram obtidas através da repicagem de colónias que apresentavam um halo de degradação (figura 2.1) (indicativo da degradação da atrazina), para placas com meio sólido PADP fresco suplementado com atrazina, e incubadas a 30°C, durante 3 dias. Estas culturas eram armazenadas posteriormente a 4°C durante o período máximo de 1 semana.



Figura 2.1: Placa de “petri” com meio PADP suplementado com 350mg/ml de atrazina e inoculado com *Pseudomonas sp. ADP*. Em redor da cultura observa-se o halo de degradação da atrazina (Mandelbaum *et al.*, 1995).

Para os ensaios de crescimento, a bactéria *P. sp. ADP Rif^R* foi crescida em meio líquido com a mesma composição do meio base PADP, ao qual foram adicionadas diferentes concentrações da fonte de azoto a testar, neste caso, ácido cianúrico. O pré-inóculo foi preparado em meio líquido PADP suplementado com a fonte de azoto, e colocado a 30°C em agitação (250rpm) durante cerca de 10h. De forma a preparar o inóculo, um volume adequado desta cultura foi transferido para meio líquido PADP fresco com a concentração de fonte de azoto em estudo, e a suspensão obtida colocada a 30°C com agitação orbital constante (250rpm), com densidade óptica de 0,02 ($DO_{640nm} = 0,02$), de modo a que ao fim de 14h as células fossem recolhidas no final da fase exponencial. Após as 14h, as células do inóculo foram recolhidas no volume apropriado, centrifugadas durante 5 minutos na Centrifuge 5804 R, lavadas em solução salina estéril (NaCl a 0,9%), ressuspensas e centrifugadas, este (processo foi repetido 2 vezes) e, finalmente, ressuspensas num volume adequado de tampão U ou de solução salina estéril, de modo a serem usadas como inóculo nos ensaios de biodegradação (2.5) ou de mineralização (2.6), respectivamente.

Para testar o efeito de variar a concentração de ác. cianúrico (179-2700mg/L) e/ou de citrato de sódio (10 ou 20g/L) no crescimento de *P. sp. ADP Rif^R*, os ensaios de crescimento foram conduzidos como descrito atrás, e a curva de crescimento destas culturas bacterianas foi

acompanhada com base na medição da densidade óptica (DO_{640nm}), no espectrofotómetro HITACHI U-200, de amostras colhidas ao longo do tempo. Para algumas destas amostras, foi também determinada a concentração de UFC (UFC/mL), por plaqueamento de diluições sucessivas na superfície de meio LB sólido contido em placa de “petri”.

A concentração de células viáveis é calculada a partir de:

- 1) U.F.C/mL da amostra original = nº de colónias x (1/0,1mL) x factor de diluição

A taxa específica de crescimento (μ) foi calculada com base no declive obtido a partir do gráfico entre o ln (DO) e do tempo (h), utilizando os pontos experimentais correspondentes à fase exponencial de crescimento.

2)
$$\mu = \frac{\ln 2}{g}$$

O meio líquido base da bactéria *Arthrobacter aurescens* TC1, descrito previamente por Shapir *et al.* (2005) e adaptado por Viegas, CA & Silva, V. (Mateus, 2012) era composto (em 1 litro de água desionizada) por 0,4 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 ml de uma solução de stock de vitaminas, 20 mL de uma solução de stock de sais, 1,8 g de glucose e 1,99 g de citrato sódico (usados como fontes de carbono), 5mM de sulfato de amónia, 0,07M de KH_2PO_4 (pH = 6,8). A solução de vitaminas continha (por litro de água desionizada) 5 mg de tiamina-HCl, 2 mg de biotina, 2 mg de ácido fólico, 10 mg de nicotinamida e 10 mg de piridoxina-HCl. A solução de sais continha (por litro de água desionizada) 2,5 g de EDTA, 19,8 g de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 9,1 g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 1,54 g de $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0,4 g de $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0,25 g de $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, 0,18 g de $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ e 5 mL de H_2SO_4 concentrado para retardar a precipitação de sais. A bactéria *Arthrobacter aurescens* TC1 foi mantida em placas de “petri” contendo meio sólido TC1 suplementado com 300mg/L de atrazina como fonte de azoto. Para cada ensaio realizado, foram usadas culturas puras de *Arthrobacter aurescens* TC1 (\pm 72h). Estas culturas eram obtidas através da repicagem de colónias que apresentavam um halo de degradação (indicativo da degradação da atrazina), para placas com meio sólido TC1 fresco suplementado com atrazina, e incubadas a 30°C, durante 3 dias. Estas culturas eram armazenadas posteriormente a 4°C durante o período máximo de 1 semana.

Para a obtenção de culturas de *Arthrobacter aurescens* TC1 no final da fase exponencial do crescimento, preparou-se uma cultura de pré-inóculo por inoculação de meio líquido TC1, a partir das colónias mantidas em meio sólido, e incubação a 30°C com agitação orbital constante (250 rpm) durante \pm 24h. As células foram então colhidas por centrifugação durante 10 minutos na Centrifuge 5804 R, lavadas em solução salina estéril (0,9% de NaCl), e usadas para re-inocular meio líquido fresco TC1. Esta suspensão de células foi incubada a 30°C até ao final ($DO_{640nm}=1.8$), e as células foram colhidas por centrifugação, lavadas, e ressuspensas

num volume adequado de solução salina estéril, de modo a serem usadas para suplementar o solo em ensaios de mineralização (2.6).

2.5 Ensaios de biodegradação de atrazina e de terbutilazina por “resting cells” de

Pseudomonas sp. ADP Rif^R

Os ensaios de biodegradação foram realizados de modo a avaliar a capacidade de degradação da atrazina e da terbutilazina pela *P. sp. ADP Rif^R*. Este ensaio foi adaptado do protocolo experimental de García-González *et al.* (2003); neste ensaio procedeu-se à monitorização da concentração do herbicida determinada pela absorvância a 223 nm (Abs.₂₂₃) no espectrofotómetro SHIMADZU UV-1700. Para a realização do ensaio procedeu-se ao crescimento do pré-inóculo durante cerca de 10 horas em agitação (250rpm) a 30°C, em 40 mL de meio PADP com 500mg/L de ácido cianúrico como fonte de azoto e 10g/L de citrato de sódio como fonte de carbono. As células foram recolhidas, de modo a obter uma concentração de células equivalente a 0,02 de densidade óptica (DO_{640nm}=0,02) (medida no espectrofotómetro HITACHI U-2000). Recolheu-se o volume referente à D.O. pretendida, tendo sido centrifugado (Centrifuge 5804 R), recolhido o sobrenadante, lavado uma vez em solução salina estéril (0,9% de NaCl), centrifugado, recolhido o sobrenadante e ressuscitado novamente em meio PADP fresco com a mesma composição. O inóculo foi em seguida incubado durante cerca de 14h em agitação a 30°C de modo a chegar ao fim da fase exponencial (DO_{640nm}=1,86). As células foram recolhidas por centrifugação (Centrifuge 5804 R), e o “*pellet*” lavado uma vez em solução salina estéril (0,9% de NaCl), centrifugado, recolhido o sobrenadante e ressuscitado em 40 mL de tampão U (10mM NaH₂PO₄.H₂O, 10mM Na₂HPO₄.12H₂O [pH 7], 0.1mM MgSO₄, 0.05mM ZnSO₄) contendo 40µM de atrazina ou terbutilazina, com uma D.O._{640nm} de 0,10. As suspensões celulares obtidas foram colocadas em agitação (250rpm) a 30°C durante cerca de 24h. Recolheu-se imediatamente 0,9 mL de modo a determinar a concentração de células viáveis (como referido no ponto 2.4.-1)) no início do ensaio, tendo sido feitas diluições sucessivas e plaqueadas em meio LB (Lennox Broth) sólido. Ao longo do ensaio de biodegradação, foram recolhidas amostras (3 mL), centrifugadas (SIGMA 204) durante 10 minutos, e a absorvância a 223nm do sobrenadante lida no espectrofotómetro (SHIMADZU UV-1700), de modo a determinar a concentração de atrazina e terbutilazina degradada ao longo do tempo.

As curvas de calibração que relacionam a concentração de atrazina ou de terbutilazina com o valor de Abs._{223nm}, foram preparadas em água por Vera Silva com concentrações de atrazina ou terbutilazina, até 20 ou 10mg/L, respectivamente (anexo, figura 6.1 e 6.2).

2.6 Mineralização no solo da terbutilazina marcada no anel [¹⁴C-UL-terbutilazina]

Os ensaios de mineralização permitem recolher dados sobre a quantidade de CO₂ libertado, no processo de oxidação completa do composto marcado com o radioisótopo ¹⁴C no

anel s-triazina. O valor estimado tendo em conta a quantidade total de composto adicionado, permite-nos obter informação sobre a percentagem de herbicida degradado num determinado intervalo de tempo.

Para a realização dos ensaios de mineralização de terbutilazina foram utilizados frascos de vidro (40 mL, herméticos TFE / septos de silicone, Sigma-Aldrich Co. Ltd.) contendo cinco gramas de solo (equivalente a solo seco) agrícola designado de solo ESAC descrito no ponto 2.3. A cada frasco foi adicionado uma mistura de ^{14}C -UL-terbutilazina (solução de trabalho em acetonitrilo com 250KBq/ml contendo 49,9 μg de terbutilazina marcada /mL), e de formulação comercial de terbutilazina (SAPEC), não marcada e preparada em H_2O desionizada (solução de 500mg/mL), de modo a incorporar no solo 1.25KBq/vial e uma concentração total de 10 μg terbutilazina/g de solo (equivalente a aproximadamente 10x a dose recomendada de aplicação da formulação comercial terbutilazina, SAPEC, no solo no cultivo do milho). Pretende-se assim simular um cenário de “*worst-case*” (p.ex. derrame acidental).

Procedeu-se à realização de vários ensaios de mineralização, de forma a estudar diferentes variáveis (tabela 2.2). No entanto, em todos os ensaios o volume total de líquido adicionado ao solo (inóculo, mistura de herbicida, soluções suplementares) foi calculado de forma a obter 60% do máximo de capacidade de retenção de água. Após a adição de cada componente os frascos foram agitados, no agitador vórtex, de modo a obter uma homogeneização do solo. Cada condição foi realizada em triplicado. Em cada frasco colocou-se um pequeno tubo de vidro contendo uma solução de NaOH (1mL, 1M) com o objectivo de capturar o $^{14}\text{CO}_2$ libertado. Em cada intervalo de tempo, esta solução era retirada e adicionada a frascos de plástico com 3 mL de líquido de cintilação “Ultima Gold” (Packard Biosciences, Groningen, The Netherlands) (numa razão de 1:4). Posteriormente a amostra era quantificada no contador de cintilações Beckman LS 5000TD. Cada amostra retirada de NaOH era rapidamente substituída por solução fresca de modo a não ocorrer perdas de CO_2 no processo de recolha de amostras. Os frascos de vidros com as amostras durante o ensaio permaneciam incubados a $25^\circ\text{C}\pm 5^\circ\text{C}$ (incubador WTC BINDER), e os restantes procedimentos realizados numa hotte (Walder MC6), no interior do laboratório de radioisótopos do DBE, do IST.

Todos os ensaios de mineralização foram acompanhados por ensaios em paralelo que correspondem a duplicação do ensaio de mineralização no qual a terbutilazina marcada é substituída por uma solução de terbutilazina preparada em metanol designada de terbutilazina fria; este ensaio permitiu acompanhar a concentração de células viáveis cultiváveis dos microrganismos adicionados no solo. Para tal, cada frasco foi sacrificado, sendo adicionado 10mL de NaCl a 0,9% estéril. Em seguida, a amostra é bem homogeneizada, e plaqueada em diluições sucessivas em meio sólido LB (Lennox Broth) suplementado com 100mg/L de ciclohexamida, para quantificar o número total de UFC no solo, e em meio LB (Lennox Broth) suplementado com 50mg/L de rifampicina e 100mg/L de ciclohexamida de modo a seleccionar a bactéria *P. sp.* ADP Rif^R. As placas de “*petri*” foram incubadas a 30°C e as colónias contadas ao fim de 72h.

Tabela 2.2: Condições testadas nos diferentes ensaios de mineralização.

Ensaio	Variáveis	<i>Pseudomonas sp.ADP-1</i> (<i>P.sp.ADP1</i>)	<i>Arthrobacter aurecens</i> TC1 (<i>Aa</i> TC1)	Citrato de sódio	Lecitina de soja
Diferentes concentrações de <i>P.sp.ADP Rif^R</i>		3 x 10 ⁶ UFC.g ⁻¹ solo; 3 x 10 ⁷ UFC.g ⁻¹ solo; 3 x 10 ⁸ UFC.g ⁻¹ solo.			
Suplementação do solo com citrato de sódio		1,2 x 10 ⁸ UFC.g ⁻¹ solo		2,4mg/g solo; 4,8mg/g solo.	
Suplementação do solo com lecitina de soja		2 x 10 ⁷ UFC.g ⁻¹ solo			10µg/g solo 5µg/g solo
Adição simultânea de <i>Aa</i> TC1 e <i>P.sp.ADP1</i>		5 x 10 ⁷ UFC.g ⁻¹ solo; 6 x 10 ⁷ UFC.g ⁻¹ solo; 1 x 10 ⁸ UFC.g ⁻¹ solo.	5 x 10 ⁷ UFC.g ⁻¹ solo; 1 x 10 ⁸ UFC.g ⁻¹ solo.		

2.7 Formulação e conservação dos inóculos de *Pseudomonas sp.ADP Rif^R*

2.7.1 *Conservação do sedimento bacteriano a 4°C*

O estudo da conservação do sedimento bacteriano a 4°C iniciou-se com o crescimento da cultura bacteriana até ao final da fase exponencial ($DO_{640nm} = 1,86$ com $3,30 \times 10^8$ UFC/mL) como descrito no ponto 2.4. O sedimento de células foi recolhido por centrifugação, lavado e ressuspenso em 50mL de solução salina estéril (0,9% NaCl) de modo a apresentar uma concentração aproximada de 5×10^9 UFC.mL⁻¹. A suspensão celular foi distribuída por cinco tubos Falcon (10mL em cada), centrifugada e o sobrenadante descartado. Os tubos Falcon contendo o sedimento bacteriano foram armazenados a 4°C dentro de uma caixa com gel de sílica.

2.7.2 *Adsorção a vermiculite*

O procedimento experimental foi adaptado por Varela (2013), a partir dos trabalhos descritos por Graham-Weiss *et al.*, (1987), Bazilah *et al.*, (2011) e Sangeetha *et al.*, (2012). O mineral de vermiculite utilizado neste trabalho apresentava uma densidade de 120 - 140 kg m⁻³, o tamanho do grão variava de 0,2 a 1 mm, um ponto de fusão aproximado de 1300°C, o calor específico de 0,2 e pH = 7, conforme descrito pelo fornecedor (Scharlab S. L., Espanha).

O principal objectivo deste ensaio centra-se na optimização de um método que permita o armazenamento de forma viável da cultura bacteriana de *P. sp. ADP Rif^R*. Para isto, foi necessário ter em conta características consideradas essenciais na conservação da cultura. O teor de água é um parâmetro importante para garantir a viabilidade celular ao longo do tempo,

devendo encontrar-se entre os 35 e 50% (Sangeetha *et al.*, 2012). Desta forma, com base nos ensaios adaptados por Varela (2013), o teor de água final usado para o produto preparado (vermiculite + sedimento de células) foi de 40% (p/p). A vermiculite, antes de ser usada foi peneirada, e autoclavada antes do início do ensaio, como descrito em Varela (2013). A cultura bacteriana foi preparada do mesmo modo do descrito no ponto 2.7.1, tendo, após a lavagem e recolha do sedimento bacteriano, sido preparada uma mistura de 1g de vermiculite, e 3mL de meio de cultura PADP suplementado com 0,1% CaCl₂, e 5x10¹⁰ UFC (para atingir a concentração 5x10⁹ UFC.mL⁻¹ aquando da ressuspensão das células). Os tubos Falcon contendo o sedimento bacteriano misturado com a vermiculite foram armazenados a 4°C, dentro de uma caixa com gel de sílica.

2.7.3 Liofilização

O procedimento experimental do processo de liofilização foi adaptado por Varela (2013), com base nos trabalhos descritos por Leslie *et al.*, (1995); Kang *et al.*, (1999); Juhasz *et al.*, (2007); Miyamoto-Shinohara *et al.*, (2008).

A cultura bacteriana foi crescida como descrita no ponto 2.4., e colhida no final da fase exponencial. O sedimento de células foi recolhido por centrifugação, lavado em solução salina estéril (0,9% NaCl), e ressuspendido em 50mL de meio de estabilização (100mM de sucrose, 1% de glicerol e 0,1% cloreto de cálcio) de modo a apresentar uma concentração de 5x10⁹ UFC.mL⁻¹. Antes de liofilizar as amostras, foram plaqueadas alíquotas de 0,1mL em meio LB sólido de forma a verificar a concentração bacteriana e analisar o efeito do processo de liofilização sobre a viabilidade celular. A suspensão bacteriana no meio de estabilização foi distribuída por 5 tubos Falcon (contendo 10mL) e congelada em 3 passos: 2h a 4°C; 4h a 20°C e 18h a -80°C (Kang *et al.*, 1999). Posteriormente as amostras congeladas foram liofilizadas a -80° durante 48h a 0,025mbar na B. Braun Biotech International Christ Alpha 2-4 freeze-dryer. Após a liofilização, as células foram armazenadas a 4°C, numa caixa com gel de sílica.

2.7.4 Análise da viabilidade celular e capacidade de degradação de atrazina e terbutilazina.

Cada tubo Falcon foi sacrificado para a monitorização da viabilidade celular durante o armazenamento em 5 períodos de tempo diferentes ($t_0 = 0$, $t_1 = 1$, $t_2 = 7$, $t_3 = 14$ e $t_4 = 28$ dias). Em cada período, as células foram ressuspendidas em solução salina estéril (0,9% de NaCl), de modo a perfazer-se um volume de 10mL. Foram realizadas diluições sucessivas (amostras em triplicado) e plaqueadas em meio LB (Lennox Broth) sólido de modo a avaliar a viabilidade celular a cada tempo. Para cada intervalo de tempo, foi também avaliada a capacidade das células ressuspendidas para degradar atrazina e terbutilazina, com base em ensaios de biodegradação (ponto 2.5).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Optimização do crescimento do inóculo de *Pseudomonas* sp. ADP Rif^R

A estirpe *P. sp. ADP Rif^R* é considerada um microrganismo de referência no processo degradativo da atrazina (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Jacobsen *et al.*, 2001; Wackett *et al.*, 2002; Ralebitso *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004; García-González *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2009). Por isso, foi seleccionada para o desenvolvimento deste trabalho de forma a otimizar o seu crescimento, com a finalidade de preparar inóculos, para utilizar na biorremediação de solos contaminados com o herbicida terbutilazina, com base na estratégia de bioaumento.

García-González *et al.*, (2003) estudou a influência de diferentes fontes de azoto na degradação da atrazina pela *P. sp. ADP Rif^R*. Estes autores verificaram que as várias fontes de azoto, amónia, ureia, nitrato e prolina, suportavam um rápido crescimento da *P. sp. ADP Rif^R*, mas o crescimento da bactéria nessas condições conduzia à repressão na degradação da atrazina por biodegradação com “*resting cells*” da bactéria ou da sua mineralização no solo. Pelo contrário, na presença de fontes de azoto que apresentam crescimento mais lento como o biureto, serina e ácido cianúrico não se verificava repressão na degradação da atrazina (García-González *et al.*, 2003). Estes dados indicaram que não é necessário a presença de atrazina no meio de crescimento para estimular a degradação da atrazina, e que a sua presença não estimula o catabolismo da atrazina na presença de fontes de azoto que reprimem a sua degradação (García-González *et al.*, 2003).

No seguimento do estudo referido atrás (García-González *et al.*, 2003), Mateus (2012), estudou a influência das diferentes fontes de azoto, ác. cianúrico, serina, atrazina, no crescimento de *P. sp. ADP Rif^R* a fim de estudar a sua influência na degradação dos herbicidas s-triazinas, atrazina e terbutilazina. Os seus resultados indicaram o ácido cianúrico como a fonte de azoto preferencial, permitindo obter um maior número de células viáveis num menor espaço de tempo, e com uma capacidade elevada para degradar atrazina e terbutilazina. Desta forma, seleccionou-se esta fonte de azoto em comparação ao uso de atrazina. O uso de ác. cianúrico em substituição da atrazina, no crescimento dos pré-inóculos e inóculos para efeitos de biorremediação, apresenta diversas vantagens a nível do custo (Tabela 6.1 do anexo), assim como na ausência de toxicidade para o meio ambiente, uma vez que é um composto facilmente degradado pelos microrganismos do solo, e mantém a capacidade degradativa da bactéria. Sendo importante salientar que a utilização do herbicida atrazina apresentaria um contra-censo, uma vez que o objectivo do trabalho consiste em reduzir a quantidade de compostos s-triazinas no meio ambiente e a sua utilização no laboratório para o desenvolvimento das experiências iria aumentar os resíduos produzidos.

3.1.1 Influência da concentração de ácido cianúrico como fonte única de azoto

Para avaliar a influência da concentração do ác. cianúrico como fonte única de azoto foram testadas várias concentrações de ácido cianúrico (179mg/L; 500mg/L; 1g/L; 2,7 g/L) no meio líquido de crescimento da *P. sp. ADP Rif^R*, de forma a tentar otimizar o crescimento da bactéria. Desta forma, pretendeu-se verificar se o aumento da quantidade de fonte de N disponível no meio alteraria o número de células viáveis obtidas no mesmo espaço de tempo. As curvas de crescimento obtidas são apresentadas na figura 3.1.1.

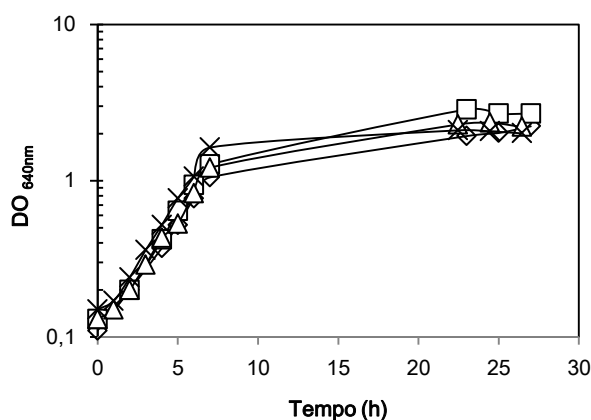


Figura 3.1.1: Curvas de crescimento da *P.sp.ADP Rif^R* em meio base PADP suplementado com (◇) 179mg/L de ácido cianúrico, (□) 500mg/L de ácido cianúrico, (△) 1g/L de ácido cianúrico, (×) 2,7 g/L de ácido cianúrico como fonte de N.

Como se verifica na figura 3.1.1, não parece haver uma diferença muito significativa entre as 4 curvas de crescimento obtidas. Embora a densidade óptica obtida com a maior concentração de ácido cianúrico (2,7g/L), apresente um aumento mais rápido nas primeiras ±8 horas, essa alteração não é significativa, assim como quando comparamos a densidade celular atingida na fase estacionária (Fig. 3.1.1).

Na figura 3.1.2. são resumidos os valores de 179mg/L; 500mg/L; 1g/L; 2,7 g/L dos parâmetros de crescimento, taxa específica de crescimento e densidade celular final (fase estacionária), estimados para as curvas de crescimento de figura 3.1.1.

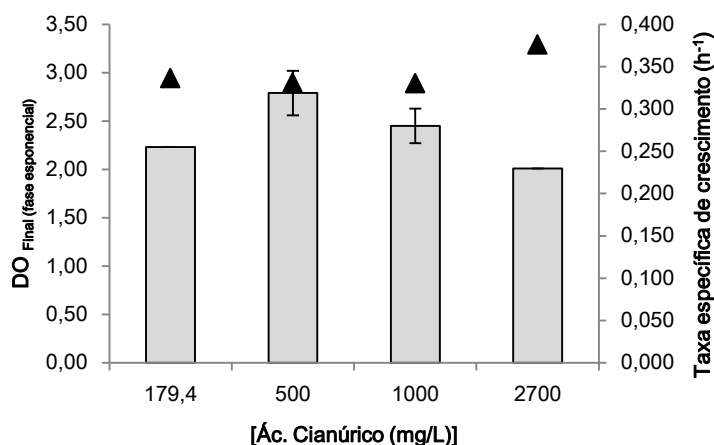


Figura 3.1.2: Representação da (Barras) DO final e da (▲) Taxa específica de crescimento estimado para o crescimento da estirpe *P.sp.ADP Rif^R* na presença de 179mg/L, 500mg/L, 1000mg/L e 2700mg/L de ácido cianúrico como fonte de N.

A figura 3.1.2 mostra um ligeiro aumento na taxa específica de crescimento para a concentração de ácido cianúrico de 2,7g/L, mas pouco significativo. Por outro lado, a densidade óptica no final da fase exponencial parece ser máxima no caso dos crescimentos conduzidos com 500mg/L e 1000g/L, assim como, o parâmetro das células viáveis no final da fase exponencial.

Em conjunto estes resultados sugerem que a concentração mais baixa de ác. cianúrico testada (179mg/L) já possa ser saturante para o crescimento de *P. sp. ADP Rif^R* no meio base PADP, e restantes condições ambientais testadas, e destacam as concentrações de 500mg/L e de 1000mg/L como sendo as mais indicadas na optimização do crescimento da bactéria, apesar de ter sido a única variável alterada. Contudo, considerou-se como plausível que outro componente do meio pudesse estar a actuar como factor limitante do crescimento, como por exemplo a fonte de carbono (C).

3.1.2 *Influência da concentração de citrato como fonte de carbono e energia*

Para verificar a influência da concentração de fonte de carbono foram testadas as concentrações 10g/L e 20g/L de citrato de sódio em meios de cultura suplementados com 500mg/L ou 1000mg/L de ácido cianúrico, uma vez que foram as que conduziram ao maior número de células no final da fase exponencial, e uma taxa específica de crescimento semelhante (figuras. 3.1.1.e 3.1.2).

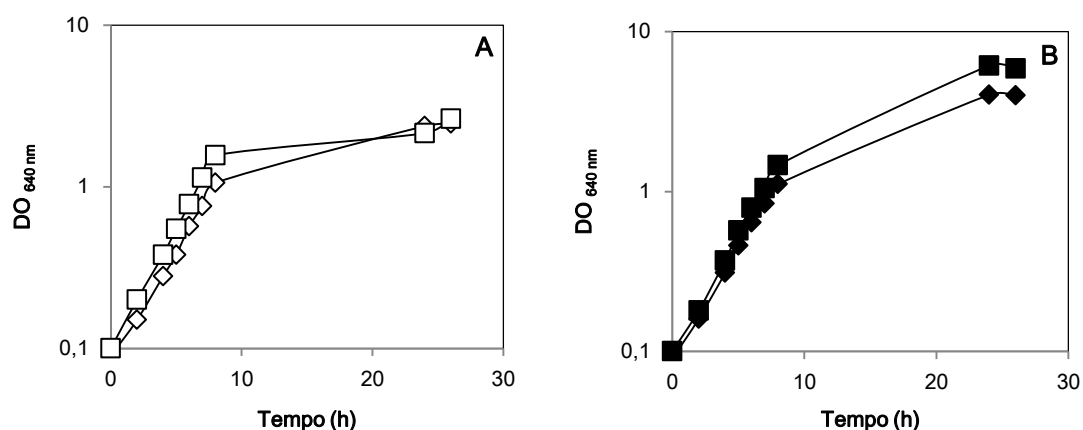


Figura 3.1.3: Curvas de crescimento da *P.sp.ADP Rif^R* com (□) 1000mg/L de ácido cianúrico e (◇) 500mg/L de ácido cianúrico com (A) 10g/L de citrato de sódio e (B) 20g/L de citrato de Sódio como fonte de carbono.

Os resultados obtidos sobre a influência da concentração de citrato no meio de crescimento da *P. sp. ADP Rif^R* indicam que a taxa de específica de crescimento da bactéria não aumentou quando se duplicou a concentração de citrato (figura 3.1.3), contudo, a densidade celular total atingida na fase estacionária foi significativamente mais alta com 20g/L de citrato face ao crescimento com 10g/L. Como tal, ponderou-se que a utilização de 1g/L de ácido cianúrico com 20g/L de citrato de sódio seria mais favorável para a obtenção de inóculos da bactéria para aplicar em processos de biodegradação. Mas, tendo em consideração o custo monetário do meio de cultura com a alteração da fonte de carbono e a fonte de azoto referidas, a biomassa obtida não compensa o custo acrescido (tabela 3.1).

Tabela 3.1: Relação da densidade óptica obtida no final da fase exponencial com o custo de 1L de meio de cultura PADP com base na alteração das concentrações de fonte de carbono e de fonte de azoto.

Concentração (g/L)	DO _{final}	Taxa específica de crescimento (h ⁻¹)	Preço (relativo a fonte de N e C) (€)	DO _{final} / €
0,5g/L Ác. Cianúrico com 10 g/L de Citrato de Sódio	2,79	0,328	4,873	0,57
0,5g/L Ác. Cianúrico com 20 g/L de Citrato de Sódio	3,99	0,327	7,066	0,56
1g/L Ác. Cianúrico com 10 g/L de Citrato de Sódio	2,45	0,348	7,553	0,32
1g/L Ác. Cianúrico com 20 g/L de Citrato de Sódio	5,87	0,350	9,746	0,60

3.2 Comparação da biodegradação de terbutilazina e atrazina por *Pseudomonas* sp.

ADP Rif^R cultivada com ác. cianúrico como fonte de N

Para verificar o efeito da fonte de azoto seleccionada, na capacidade da *P. sp.* ADP Rif^R para degradar os herbicidas, atrazina e terbutilazina, foram realizados ensaios de biodegradação por “resting cells” da bactéria. Nestes ensaios (descritos no ponto 2.5) a curva de biodegradação do herbicida é obtida com base na monitorização, ao longo do ensaio, da concentração de herbicida existente no sobrenadante a partir do valor de absorvância medida a $\pm 223\text{nm}$. Para estes ensaios foram utilizadas atrazina e terbutilazina na forma pura (concentração inicial aproximadamente igual a $40\mu\text{M}$). Estes ensaios tiveram como objectivo verificar se a substituição da atrazina como fonte de N no meio (Lima *et al.*, 2009; Wackett *et al.*, 2002) por ác. cianúrico afectava de forma negativa o comportamento da bactéria *P. sp.* ADP Rif^R na degradação dos herbicidas em estudo, devido a instabilidade do plasmídeo pADP-1, como refere Changey *et al.*, (2011). O trabalho de Changey *et al.*, (2011) indica que o subcultivo da bactéria *P. sp.* ADP Rif^R em meio suplementado com ác. cianúrico como fonte de azoto, durante várias gerações (120 gerações), leva à perda dos genes responsáveis pela degradação da atrazina até ao ác. cianúrico (*atzA*, *atzB* e *atzC*), com consequências negativas na taxa e extensão da degradação da atrazina (Changey *et al.*, 2011).

As curvas de biodegradação dos herbicidas, obtidas com base na monitorização ao longo do ensaio, da concentração de herbicida existente no sobrenadante a partir do valor de absorvância medida a $\pm 223\text{nm}$, assim como a percentagem de degradação do herbicida inicial, estão representadas na figura 3.2.1.

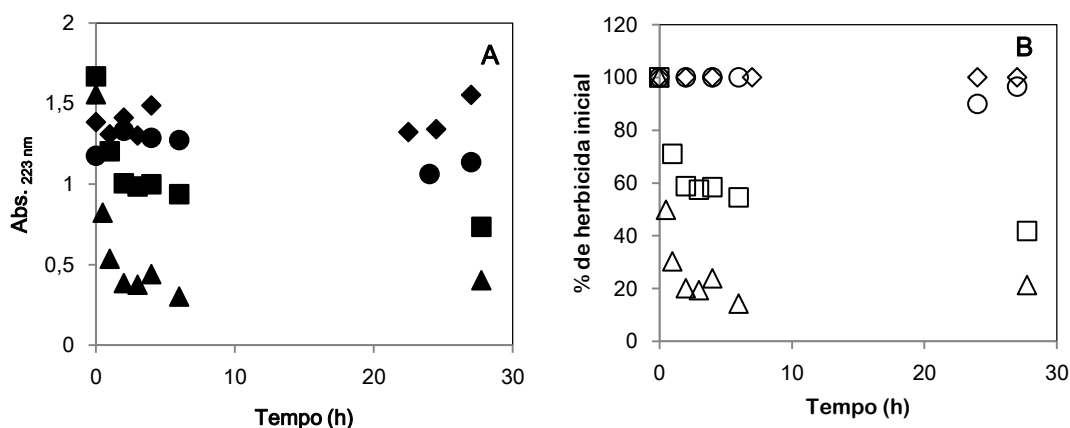


Figura 3.2.1: Curvas de degradação dos herbicidas *s*-triazinas por “resting cells” de *P.sp.*ADP Rif^R crescidas em 500mg/L de ácido cianúrico, como fonte de azoto e 10g/L de Citrato de Sódio, como fonte de carbono. O ensaio foi iniciado com $\approx 2 \times 10^7$ UFC/mL de *P.sp.*ADP Rif^R (A) Representa a percentagem de degradação de (Δ) - Atrazina; ou (\square) - Terbutilazina ao longo do tempo. (B) Representa o valor de Abs._{223nm} dos sobrenadantes nos ensaios de degradação com (\blacktriangle) - Atrazina; (\blacksquare) – Terbutilazina, ao longo do tempo. Em (A) e (B), estão também representados os controlos abióticos das misturas reaccionais com ($\blacklozenge, \blacklozenge$) atrazina, ou (\bullet, \circ) terbutilazina.

Os resultados obtidos, representados na figura 3.2.1, mostram que ocorreu uma degradação relevante da atrazina (cerca de 80% da atrazina inicial, após 6h) e mais moderada da terbutilazina (cerca de 50% da terbutilazina inicial, em 6h e 60% após 24h) por “*resting cells*” de *P. sp. ADP Rif^R* obtida a partir de 500mg/L de ácido cianúrico e 10g/L de citrato de sódio. Esta variação de degradação da atrazina e da terbutilazina tem que ver com o coeficiente de sorção dos dois herbicidas (tabela 1.1), que torna a atrazina mais biodisponível que a terbutilazina (Bowman 1989; Dousset *et al.*, 1997; Jacobsen *et al.*, 2001). Enquanto a atrazina e terbutilazina na condição do controlo abiótico, ou seja, sem adição de *P. sp. ADP Rif^R*, não sofre alteração significativa. Estes resultados destacam a capacidade de *P. sp. ADP Rif^R* na degradação da atrazina e terbutilazina, assim como a manutenção da capacidade degradativa utilizando o ácido cianúrico como fonte de azoto.

3.3 Mineralização da terbutilazina pela *Pseudomonas* sp. ADP Rif^R em solo agrícola contaminado com terbutilazina comercial (SAPEC)

A mineralização dos herbicidas s-triazinas traduz se na libertação dos átomos do anel s-triazina (tabela 1.1) sob a forma de CO₂. De um modo geral, solos agrícolas com histórico de aplicação de herbicidas apresentam uma capacidade intrínseca de mineralizar estes compostos comparativamente a solos sem histórico de adição de herbicida (Ostrofsky, *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004). Esta capacidade de mineralização pode estar associada a existência de um microrganismo ou um conjunto de microrganismos, ou aos factores abióticos que possam influenciar a estabilidade do herbicida.

O principal objectivo deste trabalho, foca-se no desenvolvimento de estratégias de biodegradação do herbicida terbutilazina no solo, de forma a não influenciar de forma negativa os sistemas aquáticos, terrestres e a sua biosfera. A avaliação da degradação e sua optimização foram abordadas recorrendo a ensaios laboratoriais que visaram acompanhar o processo de mineralização. De forma a desenvolver o estudo da mineralização da terbutilazina, foi adoptada a metodologia de Silva *et al.*, (2004).

O solo em estudo não possui histórico de aplicação de herbicida e é proveniente de um terreno de produção de milho (solo ESAC). Este solo foi contaminado com 10 vezes a dose recomendada (10x DR) da formulação comercial de terbutilazina (SAPEC), com o objectivo de simular um cenário de derrame accidental. Recorreu-se à utilização da formulação comercial de terbutilazina (SAPEC) de forma a simular uma situação o mais realista possível, na medida em que a substância activa não é adicionada 100% pura ao solo, apresentando a formulação comercial impurezas e componentes não identificados que podem afectar a fisiologia, e capacidade degradativa dos microrganismos.

Estudos anteriores (Silva *et al.*, 2004) apresentam um tempo de adaptação de um modo geral prolongado dos microrganismos indígenas ao desenvolvimento do processo de degradação, facto que assume um grande significado, tendo em conta que esse espaço de tempo pode permitir que ocorra a lixiviação do solo, assim como a ocorrência de escorrências superficiais (*runoff*), transportando os contaminantes para sistemas aquáticos, contaminado águas subterrâneas e superficiais. Uma vez que o processo de mineralização intrínseca não parece ser o processo de biorremediação mais viável recorreremos ao bioaumento do solo com a bactéria *P. sp. ADP*.

A *P. sp. ADP* isolada por Mandelbaum *et al.*, (1995) a partir de um local sujeito a um derrame de herbicida é caracterizada como um microrganismo de referência para este processo degradativo. Em trabalhos anteriores do nosso grupo (Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009) e outros (Wackett *et al.*, 2002), recorreu-se a culturas de *P. sp. ADP*, crescidas com atrazina como fonte de N única, como inóculo para o bioaumento de solos contaminados com a atrazina. No presente trabalho, pretendemos simular uma situação mais próxima possível do real, de biorremediação de um local contaminado com formulação comercial de terbutilazina

(SAPEC), a $\pm 25^{\circ}\text{C}$, recorrendo à bioadição de inóculo da bactéria *P. sp. ADP Rif^R* obtido por crescimento desta bactéria em meio PADP com ác. cianúrico (500mg/L) como fonte de N única.

3.3.1 Influência de diferentes concentrações de *Pseudomonas sp. ADP Rif^R*.

O recurso à inoculação de solos com a bactéria *P. sp. ADP* constitui uma ferramenta muito eficiente na degradação do herbicida atrazina devido a sua capacidade degradativa no processo de descontaminação de solos poluídos (Chelinho *et al.*, 2010). O uso de três concentrações de *P. sp. ADP Rif^R* permitiu observar a sua influência na mineralização do herbicida terbutilazina.

Na figura 3.3.1 são apresentadas as percentagens de $^{14}\text{CO}_2$ acumulado ao longo do ensaio, resultante da inoculação de diferentes concentrações de *P. sp. ADP Rif^R* no solo, contaminado com mistura de ^{14}C -UL-terbutilazina e formulação comercial de terbutilazina (SAPEC) (total de $\sim 10\mu\text{g}$ terbutilazina/g solo).

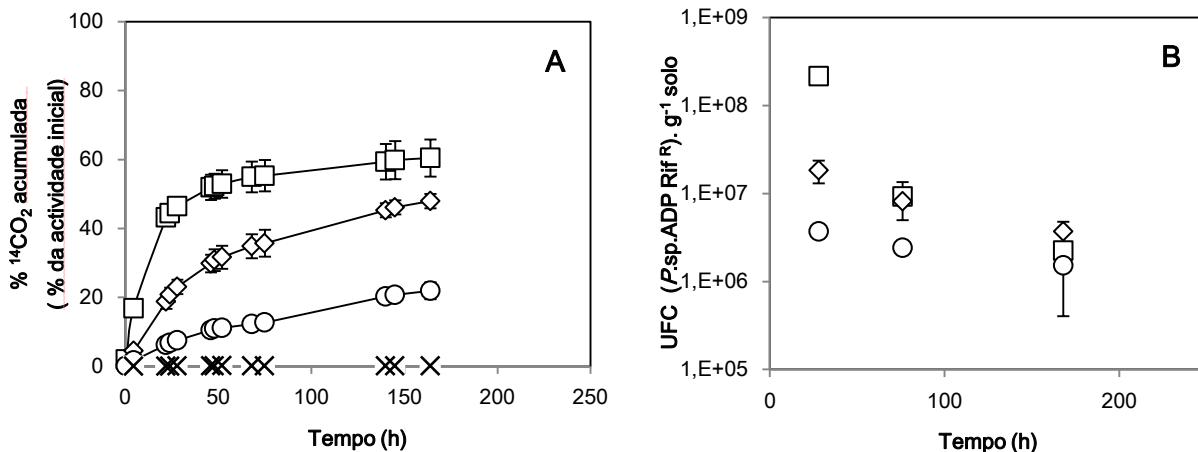


Figura 3.3.1: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ^{14}C -UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total $\approx 10\mu\text{g}$ terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (○) 3×10^6 UFC.g⁻¹ solo; (◇) 3×10^7 UFC.g⁻¹ solo; (□) 3×10^8 UFC.g⁻¹ solo. Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (×) sem adição de bactérias. (B) Número de UFC de *P. sp. ADP Rif^R* ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Com base na figura 3.3.1, verificou-se um aumento da taxa de mineralização da terbutilazina com o aumento da concentração de *P. sp. ADP Rif^R*, tal como descrito anteriormente (Jacobsen *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009) relativamente à atrazina. Verificou-se, com 3×10^6 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*).g⁻¹ de solo, a obtenção de cerca de 20% de mineralização ao fim de sete dias; 40% de mineralização, com 3×10^7 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*).g⁻¹ solo, e cerca de 60% com 3×10^8 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*).g⁻¹ solo (figura 3.3.1-A). Durante o ensaio de mineralização foi realizado o ensaio em paralelo de modo a analisar a evolução das células viáveis de *P.sp.ADP Rif^R*. Como se observa na figura 3.3.1-B ao longo do ensaio ocorre um declínio nas células viáveis. Tendo em conta que os ensaios são realizados

em sistemas fechados, não ocorre adição de nutrientes, nem água, o declínio pode dever-se à falta de renovação do meio, da humidade, ou a limitações nutricionais como por exemplo de fonte de carbono como referido por Silva *et al.*, (2004). É menos provável que este decréscimo se deva a efeitos tóxicos do herbicida para a bactéria. Para verificar esta situação, analisou-se a tendência da *P.sp.ADP Rif^R* na presença e na ausência do herbicida, apresentado na figura 3.3.2.

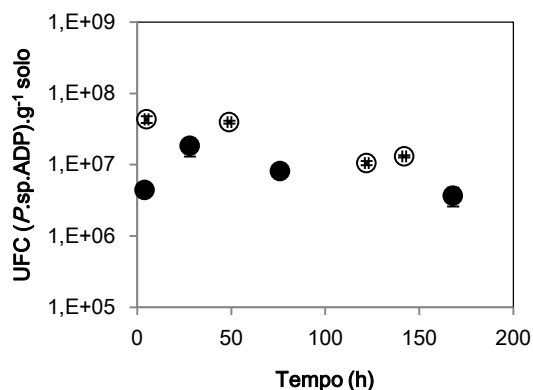


Figura 3.3.2: Evolução da concentração de UFC de *P. sp. ADP Rif^R* com (●) adição da formulação comercial da terbutilazina (SAPEC) ao solo; (○) sem adição de herbicida ao solo.

Como se verifica na figura 3.3.2, apesar do início do ensaio apresentar concentrações diferentes de *P.sp.ADP Rif^R*, verifica-se na presença do herbicida um ligeiro aumento de células viáveis nas primeiras 24 horas, e estabilização durante as 24h seguintes, enquanto na condição em que não se adicionou o herbicida a *P.sp.ADP Rif^R* apenas perde células viáveis, não ocorrendo nenhum aumento inicial de *P.sp.ADP Rif^R*.

3.3.2 Efeito da suplementação de citrato de sódio ao solo

Após os resultados obtidos no ensaio em que se testou a influência das várias concentrações de *P.sp.ADP Rif^R*, procedeu-se ao estudo da influência da suplementação de citrato de sódio no solo na mineralização da terbutilazina por esta bactéria, em sequência do trabalho realizado por Silva *et al.*, (2004) e Lima *et al.* (2009). Estes autores, verificaram que a biodegradação do herbicida atrazina em forma pura (Silva *et al.* 2004) ou em formulação comercial (Lima *et al.* 2009), quando adicionada em quantidades muito elevadas (por exemplo, cerca de 100µg/g solo ou 200xDR), era fortemente melhorada após a suplementação de citrato de sódio ao solo (sugerindo que a limitação da biodegradação pela bactéria resultava essencialmente de limitações da fonte de carbono disponível). Com base nas informações desses estudos, analisámos o efeito do mesmo tipo de parâmetro, isto é, o da suplementação do solo com citrato de sódio, na eficiência da mineralização da terbutilazina pela *P.sp.ADP*, apresentado na figura 3.3.3.

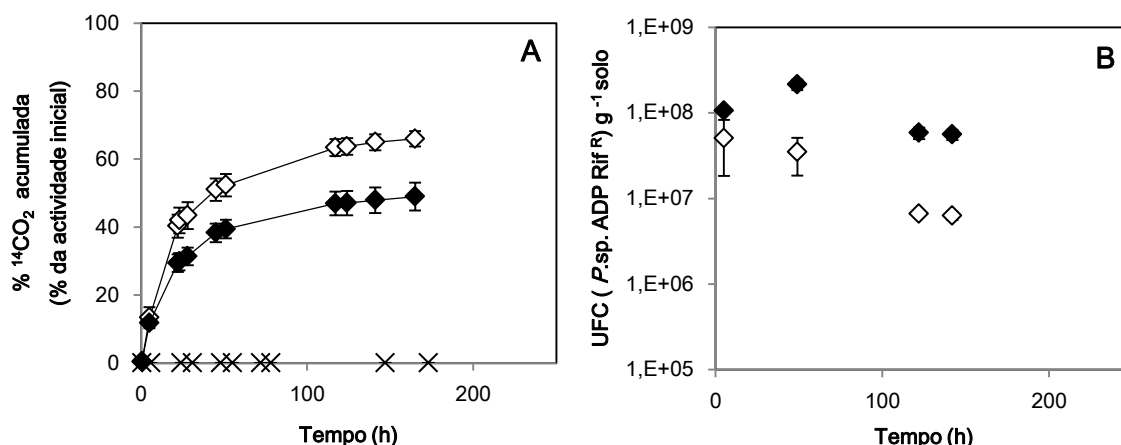


Figura 3.3.3: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total ≈ 10μg terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (◇) 1,2 x 10⁸ UFC.g⁻¹solo; (♦) 1,2 x 10⁸ UFC. g⁻¹solo com adição de 2,4mg/g solo de citrato de sódio. Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (x) com adição de 4,8mg/g solo de citrato de sódio sem adição de bactéria. (B) Número de UFC de *P. sp. ADP* ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Contrariamente ao reportado para a biodegradação da atrazina (Lima *et al.*, 2009), a suplementação do solo com 2,4mg citrato de sódio/g de solo, de modo a obter uma razão C/N_{tbz}~40 (Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009) não estimulou a mineralização do herbicida terbutilazina (figura 3.3.3-A). Verificou-se, pelo contrário, uma maior taxa e rendimento de mineralização na condição em que apenas é adicionada a bactéria ao solo (figura 3.3.3-A). Apesar disto, o ensaio em paralelo com terbutilazina fria (figura 3.3.3-B), mostra um aumento no número de células viáveis na condição em que adicionámos citrato de sódio ao solo, indicando-nos que o crescimento da bactéria é até estimulado pela suplementação da fonte de carbono ao solo, como descrito anteriormente no caso dos solos contaminados com atrazina (Silva *et al.*, 2004; Lima *et al.*, 2009). Lima *et al.*, (2009) salienta o facto de que a adição de citrato de sódio parecer ser pouco relevante quando a atrazina é adicionada em doses relativamente baixas (até 20x DR), mas contribui para estimular significativamente a biodegradação de doses elevadas de atrazina (200x DR) pela *P. sp. ADP*.

A questão que se coloca é se a adição do citrato de sódio não influencia a mineralização da terbutilazina, devido ao elevado coeficiente de adsorção deste herbicida à matéria orgânica do solo. Apesar de Lima *et al.*, (2009) referir que ocorre uma maior mineralização da atrazina com a adição de citrato de sódio, há que ter em conta que uma das principais diferenças entre a atrazina e a terbutilazina é a constante de adsorção ao solo, K_d atrazina = 0,350 e K_d terbutilazina = 0,844 (Bowman 1989). Trabalhos futuros devem incluir a análise do solo após mineralização de modo a obter a percentagem de herbicida adsorvida ao solo, de forma a verificar se esta característica do herbicida influencia de alguma forma a degradação por parte da *P.sp.ADP Rif^R*.

3.3.3 Efeito da suplementação de lecitina de soja

A lecitina de soja, como descrito no ponto 1.3.2.2, é um biosurfactante que tem sido utilizado para estimular a biorremediação de compostos aromáticos e hidrocarbonetos clorados (Soeder *et al.*, 1996; Liang *et al.*, 2012). Apesar de os compostos em causa serem quimicamente distintos, colocou-se a hipótese de testar este biosurfactante de modo a observar a sua influência na degradação da terbutilazina. Optou-se pela utilização da lecitina de soja, por ser um surfactante natural (Dormaar 1969; Bustamante *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2012), o que vai de encontro ao objectivo do trabalho, usando compostos naturais e que possam ser facilmente biodegradados. Com isto, pretende-se verificar se a adição da lecitina de soja promove o aumento da biodisponibilidade da terbutilazina, e conseqüentemente se este herbicida é mais rapidamente degradado pela *P. sp. ADP*. A lecitina de soja, para além de biosurfactante possui uma vantagem adicional, que consiste na capacidade de estimular o crescimento bacteriano, uma vez que é usada como fonte de carbono (Liang *et al.*, 2012).

Nestas experiências foram testadas três soluções de lecitina de soja, de forma a obter no final, no solo, 10 µg /g solo e 5 µg /g de lecitina de soja. As soluções stock de lecitina de soja a adicionar ao solo, foram preparadas em H₂O, ou em etanol. As soluções stock de lecitina de soja preparadas em água apresentavam-se turvas, devido à baixa solubilidade da lecitina de soja em água. Por esta razão, testou-se também a possibilidade de preparar a solução stock de lecitina de soja em etanol, de modo a obter uma solução límpida. Contudo, neste caso, o solo ficaria com 1,28% de etanol, e pretendemos verificar se isso acarretaria efeitos tóxicos para a bactéria.

O resultado das condições descritas está apresentado na figura 3.3.4.

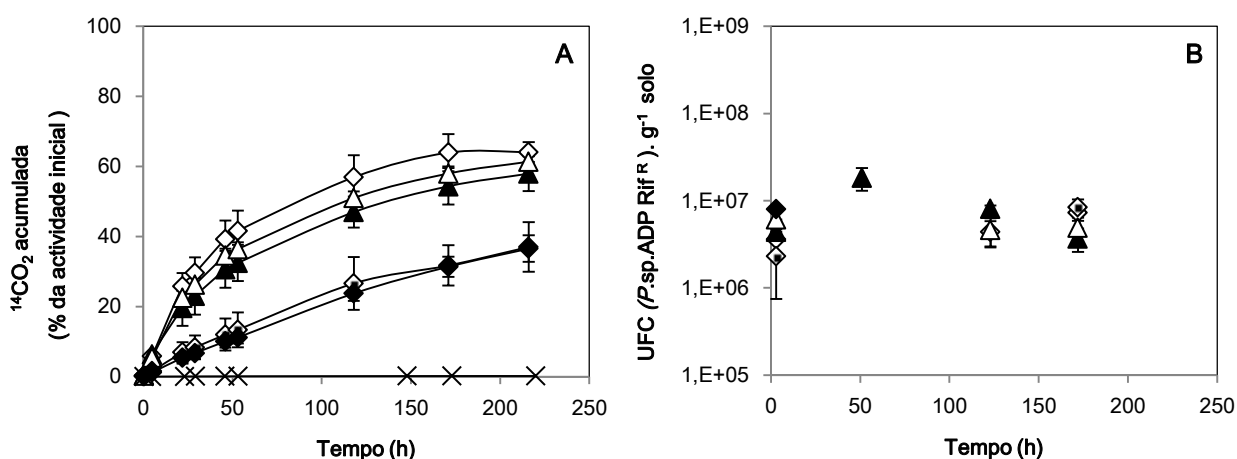


Figura 3.3.4: (A) Mineralização pela *P. sp. ADP* Rif^R em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total ≈ 10µg terbutil/g solo. O solo foi inoculado com (◇) 2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ solo; (▲) 2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ solo com 10 µg /g solo de lecitina de soja (em H₂O); (△) 2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ solo com 5 µg /g solo de lecitina de soja (em H₂O); (◇) 2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ solo com 10 µg /g solo de lecitina de soja [em etanol (1,28%)]; (◆) 2 x 10⁷ UFC.g⁻¹ solo com 80 µl etanol (1,28%). Como controlo, usou-se solo tratado de forma idêntica, mas (×) sem adição de bactéria com lecitina de soja [em etanol (1,28%)]] 10 µg /g solo). (B) Número de UFC de *P. sp. ADP* ao longo dos ensaios de mineralização representados em (A).

Em relação as condições em que se adicionou a lecitina de soja em água, verificou-se a mineralização da terbutilazina nessas condições, mas esta foi menor em relação à condição em que apenas se adicionou a bactéria (figura 3.3.4.-A). O ensaio em paralelo indicou um aumento no número de células viáveis nessas condições, relativamente à condição em que apenas se adicionou a bactéria (figura 3.3.4.-B). Relativamente a condição teste em que foi utilizada a solução de lecitina de soja preparada em etanol, a taxa de mineralização por parte da *P.sp.ADP Rif^R* é relativamente baixa comparando com as restantes condições. Para verificar se o efeito seria do etanol, foi testada uma condição em que foi adicionada a *P.sp.ADP Rif^R* e a quantidade de etanol (80µl) usada na condição em que o etanol foi utilizado para dissolver a lecitina de soja, apresentando ambas as condições uma taxa de mineralização semelhante (figura 3.3.4.-A), podendo o etanol ter um efeito negativo na mineralização da terbutilazina por parte da *P.sp.ADP Rif^R*.

Apesar de não ocorrer um estímulo na taxa de mineralização nas condições em que foi adicionada lecitina de soja ao solo contaminado, verifica-se na figura 3.3.4.-B um aumento das células viáveis nessas condições, podendo reflectir como descrito por Liang *et al.* (2012) a lecitina de soja como boa fonte de carbono.

Com base nestes resultados não foi possível concluir se a ausência de estimulação se deve à ineficácia da lecitina de soja, ou se as características de sorção da terbutilazina ao solo não são compatíveis com este tipo de abordagens para estimular a sua biodegradação sendo importante em estudos futuros testar outro surfactante natural ou sintético.

3.4 Efeito da adição simultânea de *Arthrobacter aurecens* TC1 e *Pseudomonas sp.*

ADP Rif^R

A degradação da terbutilazina no solo no mais curto espaço de tempo possível é um dos aspectos mais importantes na descontaminação de solos contaminados com altas concentrações de herbicidas (Chelinho *et al.*, 2010). Alguns autores Radosevich *et al.*, (1997), Shapir e Mandelbaum (1997), referem que a inoculação do solo com várias bactérias capazes de degradar atrazina, que possam actuar em consórcio pode acelerar a degradação dos compostos. Visto isto, uma das estratégias em estudo envolveu a adição conjunta de duas bactérias com historial degradativo, *Pseudomonas sp. ADP* e a *Arthrobacter aurecens* TC1. Esta estratégia visava a obtenção de uma taxa de degradação mais elevada, tendo em conta as características das duas bactérias, a rápida degradação da terbutilazina até ao ácido cianúrico, devido a presença das enzimas codificadas pelos genes *TrzN*, *AtzB* e *AtzC* (Shapir *et al.*, 2007), por parte da *Aa* TC1, e a elevada capacidade de degradação do ácido cianúrico por parte da *P. sp. ADP* devido a presença dos genes *AtzD*, *AtzE* e *AtzF* (Shapir *et al.*, 2005).

Na figura 3.3.5. é apresentada taxa de mineralização obtida resultante da inoculação da *AaTC1* e *P.sp.ADP Rif^R* no solo contaminado com a mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e formulação comercial de terbutilazina (SAPEC) (total de ~10µg terbutilazina/g solo).

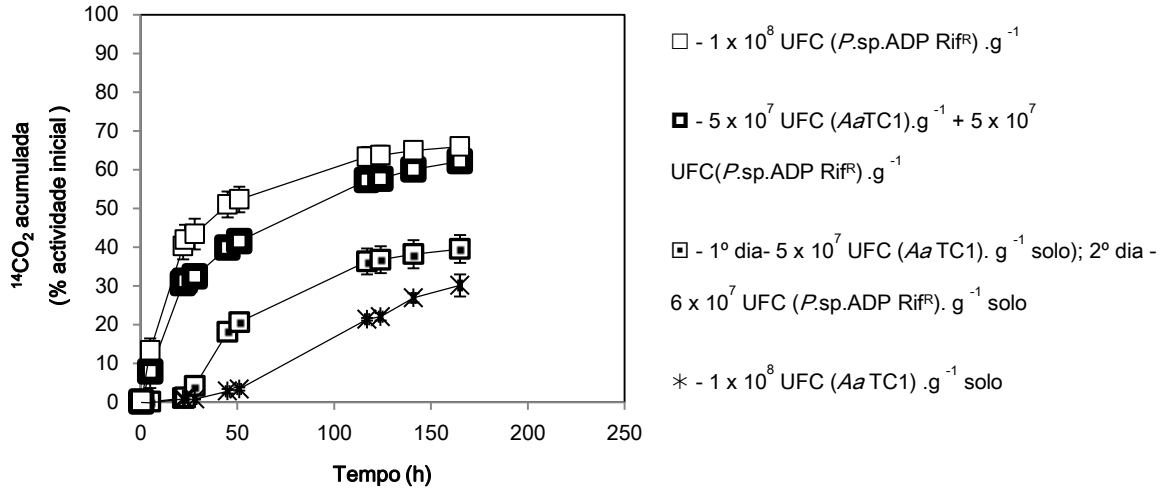


Figura 3.3.5: Mineralização pela *P. sp. ADP Rif^R* em solo ESAC não autoclavado e contaminado com mistura de ¹⁴C-UL-terbutilazina e terbutilazina comercial, SAPEC (total ≈ 10µg terbutil/g solo). O solo foi inoculado com (□) 5×10^7 UFC (*AaTC1*). g⁻¹ solo adicionada no primeiro dia e com 6×10^7 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*). g⁻¹ solo no segundo dia; (■) 5×10^7 UFC (*AaTC1*) .g⁻¹ solo e + 5×10^7 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*).g⁻¹ solo adicionadas simultaneamente ; (□) 1×10^8 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*) .g⁻¹ solo e com (*) 1×10^8 UFC (*AaTC1*) .g⁻¹ solo.

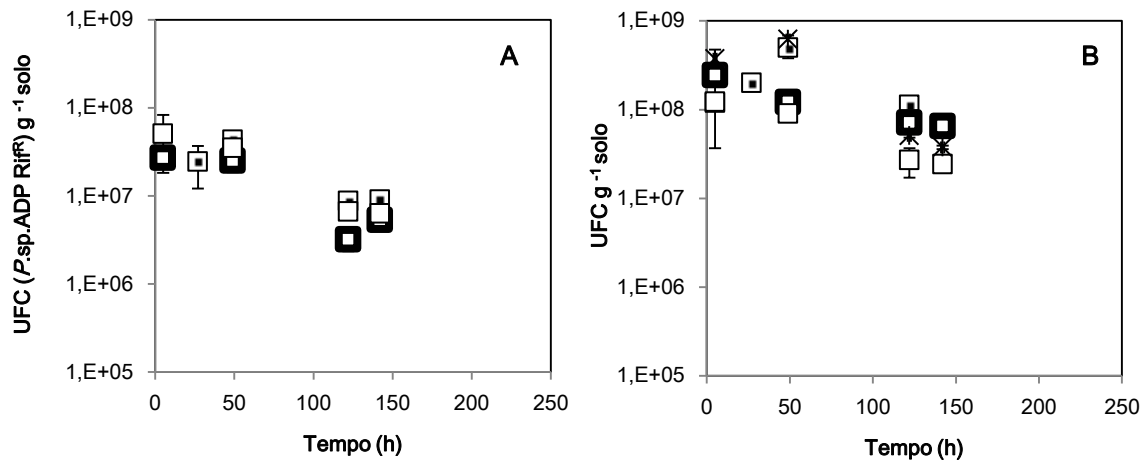


Figura 3.3.6: (A) Número de UFC de *P.sp.ADP Rif^R* e (B) número total de UFC, no solo, durante os ensaios de mineralização cujos resultados são apresentados na figura 3.3.5 (□) 1×10^8 UFC.g⁻¹ solo; (□) 6×10^7 UFC .g⁻¹ solo adicionada no segundo dia; (■) 5×10^7 UFC .g⁻¹ solo adicionada simultaneamente com *AaTC1* e com (*) 1×10^8 UFC (*AaTC1*) .g⁻¹ solo.

A curva de libertação de $^{14}\text{CO}_2$ correspondente à adição da Aa TC1 sozinha (figura 3.3.5) não é representativa da degradação realizada por esta bactéria uma vez que a sua via degradativa termina na síntese de ácido cianúrico (figura 1.3), não levando por isso, a libertação de CO_2 (Strong *et al.*, 2002) a partir da terbutilazina marcada com ^{14}C no anel s-triazina, que usámos nos nossos ensaios de mineralização. É contudo, de notar a taxa de mineralização ocorrida, a partir das 50h, na condição em que a Aa TC1 foi adicionada isoladamente ao solo não autoclavado (figura 3.3.5.). Este resultado sugere que microrganismos autóctones do solo serão capazes de metabolizar o ácido cianúrico produzido pela Aa TC1, até NH_4^+ e CO_2 . Na condição em que é adicionada Aa TC1 no primeiro dia e *P.sp.ADP Rif^R* no segundo, a mineralização da terbutilazina é mais rápida do que na condição anteriormente descrita, demonstrando que a *P.sp.ADP Rif^R* degrada mais rapidamente o ácido cianúrico metabolizado pela Aa TC1 que os presumíveis microrganismos já existentes no solo. Na condição em que são adicionadas as duas bactérias simultaneamente, a curva de mineralização acompanha, ao longo do tempo, a curva de mineralização em que apenas é adicionada a *P.sp.ADP Rif^R* ao solo, com uma concentração equivalente à soma da concentração das duas bactérias em conjunto (figura 3.3.5).

Como estratégia de biorremediação, a adição das duas bactérias não parece ser a mais favorável do que a adição da *P.sp.ADP Rif^R* sozinha, apesar do papel da Aa TC1 na degradação da terbutilazina.

3.5 Influência de diferentes métodos de conservação de inóculo de *Pseudomonas sp.*

ADP Rif^R, na sobrevivência das células e na taxa de degradação dos herbicidas.

O objectivo desta parte do trabalho após a optimização do crescimento do inóculo de *P.sp.ADP Rif^R* e consequente estudo da mineralização da terbutilazina pela mesma, teve como objectivo estudar formas de preparar os inóculos, de forma a serem conservados e transportados, mantendo as características da cultura fresca, viabilidade celular e capacidade degradativa, tendo em vista a sua aplicação no campo, em larga escala. Neste contexto, foram testados três métodos de conservação do inóculo de *P.sp.ADP Rif^R* que envolveram três formas diferentes de formulação e o armazenamento a 4°C. As características das células formuladas e conservadas ao longo de 1 mês foram comparadas com as características do inóculo em cultura fresca, para verificar se a cultura ao longo do processo perdia viabilidade celular ou a capacidade de degradar os herbicidas s-triazina.

3.5.1 *Células frescas: Taxa inicial de degradação dos herbicidas*

O estudo da eficiência dos métodos de conservação da cultura, tiveram como termo de comparação as características da cultura fresca. Para quantificar a capacidade degradativa do inóculo fresco foi estimada a taxa inicial de degradação dos herbicidas atrazina e terbutilazina (tabela 3.4.1) com base nas curvas de degradação por “*resting cells*” de *P.sp.ADP Rif^R* apresentadas na figura 3.2.1.-A.

Tabela 3.4.1: Taxa específica de degradação inicial de atrazina e de terbutilazina por células frescas de *P.sp.ADP Rif^R*, com base no declive obtido na figura 3.2.1-A a dividir pela concentração de UFC/mL adicionadas ao tampão U.

Taxa específica de degradação (%.mL/h.ufc)	Cultura fresca
Atrazina	3,89E-08 (69,69/1,79E+09)
Terbutilazina	1,15E-08 (20,62/1,79E+09)

Os resultados apresentados na tabela 3.4.1, como verificado anteriormente indicam uma maior degradação por parte da *P.sp.ADP Rif^R* da atrazina do que da terbutilazina. Esta diferença de degradação da atrazina e da terbutilazina está relacionado com o coeficiente de adsorção referido na tabela 1.1.

3.5.2 Efeito da refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano

Para analisar o efeito de refrigeração do sedimento bacteriano, procedeu-se ao crescimento da cultura bacteriana com 500mg/L de ác. cianúrico como fonte de N (descrito no ponto 2.4), seguido de armazenamento a 4°C (descrito no ponto 2.7.1.). Imediatamente antes do armazenamento, e a intervalos de tempo fixos (1, 7, 14 e 28 dias), o sedimento de células mantido a 4°C foi ressuspensionado de forma a perfazer 10mL em solução salina estéril. Procedeu-se, de seguida, à quantificação da concentração de células viáveis da bactéria (figura 3.4.1.), e à obtenção das respectivas curvas de degradação de terbutilazina e de atrazina em tampão U, com base na medição do valor de Abs._{223nm} do sobrenadante (figuras 3.4.2.-A, B, C, D, E)

Viabilidade Celular

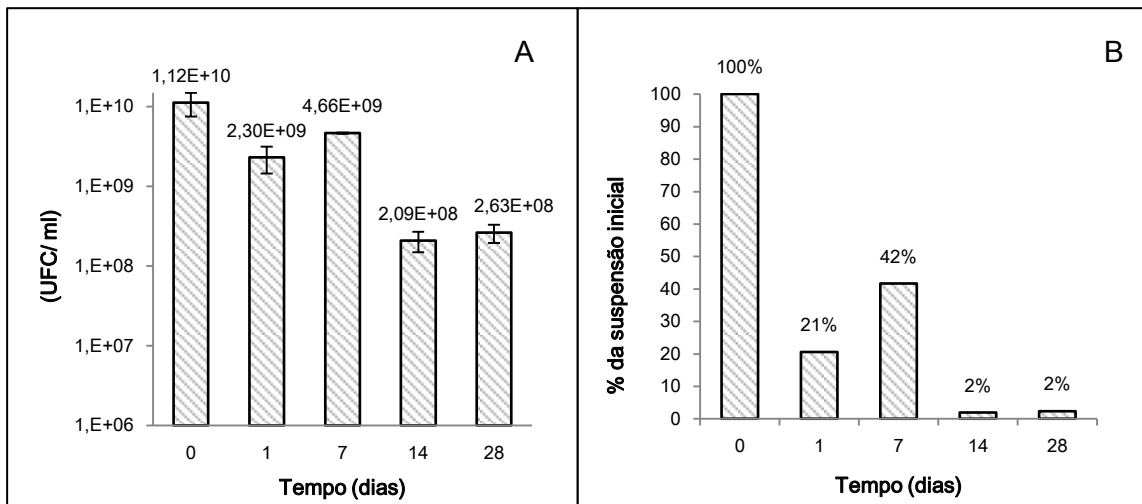


Figura 3.4.1: Variação da concentração de células viáveis de *P.sp.ADP Rif^R* durante a refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. **(A)** Concentração no tempo zero foi avaliada imediatamente antes do armazenamento ($1,1 \times 10^{10}$ UFC.ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis ao longo do período de ensaio, 1, 7, 14 e 28 dias. **(B)** Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes do armazenamento a 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subsequentes ao inicial.

Taxa de degradação dos herbicidas

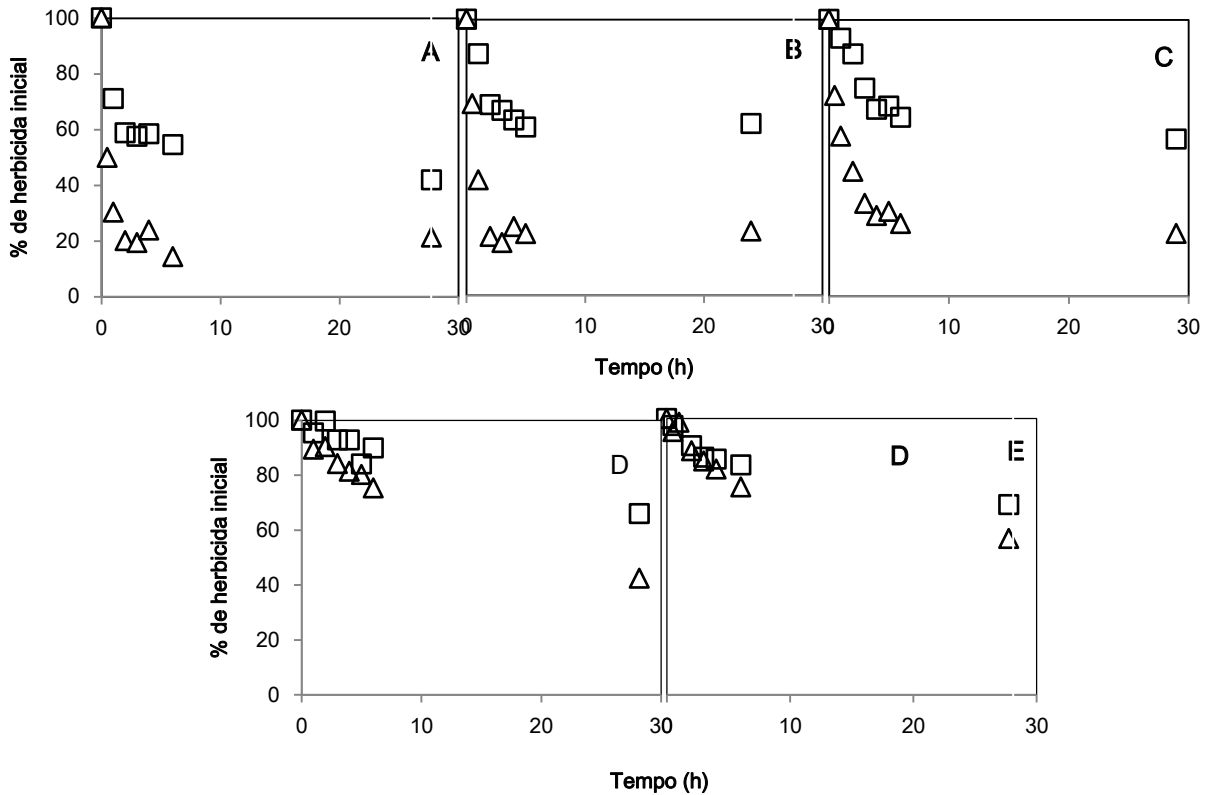


Figura 3.4.2: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (\square) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.ADP Rif^R*; (A) cultura fresca, e armazenada a 4°C durante (B) 1 dia; (C) 7 dias; (D) 14 dias e (E) 28 dias de refrigeração a 4°C. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura de células em tampão U contendo Atrazina (40 μ M) ou terbutilazina (40 μ M).

Tabela 3.4.2: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP Rif^R* conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.3 nas primeiras duas horas a dividir pela concentração de células UFC/mL adicionadas ao tampão U com herbicida.

Taxa específica de degradação (%.mL/h.ufc)	t0dias	t1dia	t7dias	t14dias	t28dias
Atrazina	2,04E-08 (36,49/1,79E+09)	1,05E-07 (38,65/3,68E+08)	3,48E-08 (25,97/7,46E+08)	1,73E-07 (5,77/3,34+07)	1,26E-07 (5,32/4,21+07)
Terbutilazina	1,15E-08 (20,62/1,79E+09)	4,20E-08 (15,47/3,68E+08)	8,38E-09 (6,25/7,46E+08)	1,36E-08 (4,56/3,34+07)	1,08E-07 (4,53/4,21+07)

Com base nos resultados obtidos (figura 3.4.1.) verifica-se um decréscimo significativo no número de células viáveis ao longo do tempo de armazenamento do inóculo a 4°C. Por outro lado, a taxa inicial de degradação dos herbicidas diminui (figura 3.4.2.), embora essa diminuição seja essencialmente proporcional a diminuição no início dos ensaios de biodegradação (tabela 3.4.2). Este decréscimo não implica pois perda de capacidade de degradação, uma vez que acompanha a tendência da viabilidade do inóculo. Contudo, a elevada perda de células viáveis de *P. sp. ADP* durante o armazenamento directo do inóculo a 4°C põe em causa a sua utilidade.

3.5.3 Efeito da adsorção a vermiculite (40% de humidade) e conservação a 4°C.

Para analisar o efeito da adsorção a vermiculite (40% de humidade) e conservação a 4°C, procedeu-se ao crescimento da cultura bacteriana com 500mg/L de ác. cianúrico como fonte de N (descrito no ponto 2.4), seguido da adição da vermiculite autoclavada e de armazenamento a 4°C (descrito no ponto 2.7.2.). Imediatamente antes do armazenamento, e a intervalos de tempo fixos (1, 7, 14 e 28 dias), o sedimento de células mantido a 4°C foi ressuspensionado de forma a perfazer 10mL em solução salina estéril. Procedeu-se, de seguida, à quantificação da concentração de células viáveis da bactéria (figura 3.4.3.), e à obtenção das respectivas curvas de degradação de terbutilazina e de atrazina em tampão U, com base na medição do valor de Abs._{223nm} do sobrenadante (figuras 3.4.4.-A, B, C).

Viabilidade Celular

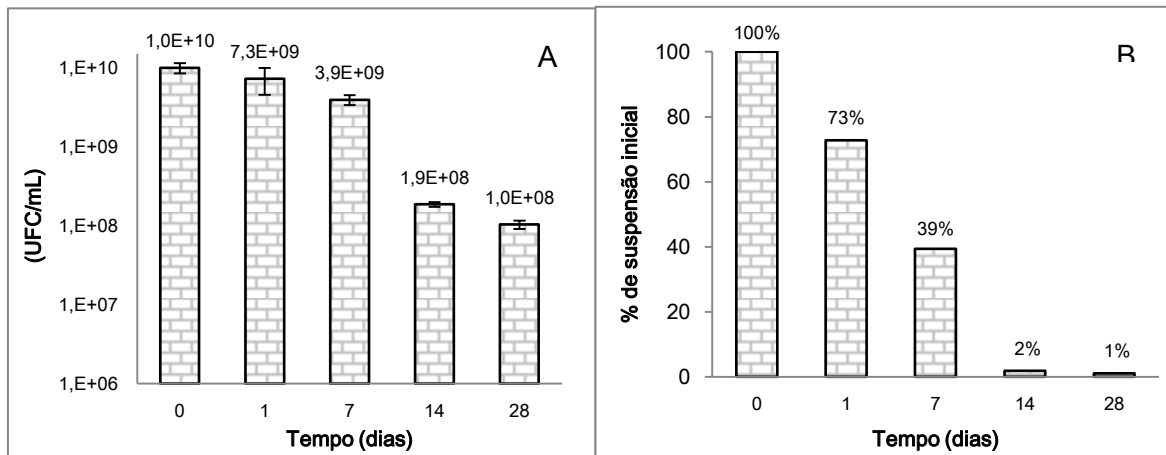


Figura 3.4.3: Variação da concentração de células viáveis da *P.sp.ADP Rif^R* após a adsorção a vermiculite e refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. (A) Concentração no tempo zero foi avaliada imediatamente antes do armazenamento ($1,0 \times 10^{10}$ UFC ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis ao longo do período de ensaio, 1, 7, 14 e 28 dias. (B) Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes do armazenamento a 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subsequentes ao inicial.

Taxa de degradação dos herbicidas

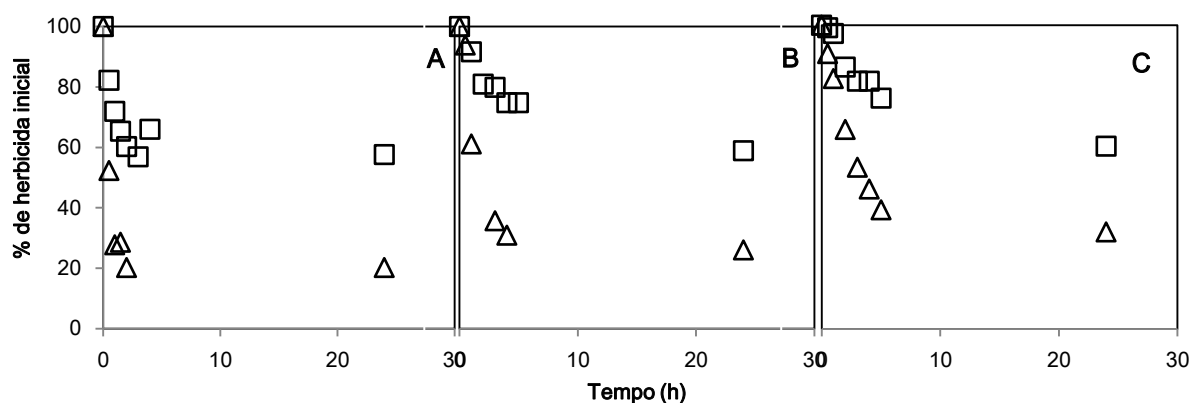


Figura 3.4.4: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (\square) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.ADP Rif^R* da cultura adsorvida a vermiculite, e armazenada a 4°C durante, (A) 7 dias; (D) 14 dias e (E) 28 dias. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura células em tampão U contendo Atrazina (40 μ M) ou terbutilazina (40 μ M).

Tabela 3.4.3: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP Rif^R* adsorvidas a vermiculite e conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.5 nas primeiras 2 horas a dividir pela concentração de células (UFC/mL) adicionadas ao tampão U com herbicida.

Taxa específica de degradação (%.mL/h.ufc)	t ₀ dias	t ₇ dias	t ₁₄ dias	t ₂₈ dias
Atrazina	2,04E-08 (36,49/1,79E+09)	5,83E-08 (36,67/6,29E+08)	1,30E-06 (38,93/2,99E+07)	1,03E-06 (17,11/1,66E+07)
Terbutilazina	1,15E-08 (20,62/1,79E+09)	3,06E-08 (19,28/6,29E+08)	3,71E-07 (11,08/2,99E+07)	4,31E-07 (7,13/1,66E+07)

Os resultados obtidos na figura 3.4.4 e na tabela 3.4.3 apontam para a manutenção da taxa específica de degradação dos herbicidas, atrazina e terbutilazina durante o armazenamento a 4°C das células de *P. sp. ADP Rif^R* adsorvidas a vermiculite. O número de células viáveis logo após o processo de adsorção a vermiculite sofre um decréscimo, embora não tão acentuado como no caso das células directamente armazenadas a 4°C (secção anterior). Este facto pode dever-se ao microambiente criado pela vermiculite, pela incorporação do meio PADP e protecção ao inóculo, como descrito por Sangeetha *et al.* (2012). Contudo, a viabilidade das células também diminui consideravelmente após 14 dias e 1 mês de armazenamento a 4°C (figura 3.4.3.).

3.5.4 Efeito da liofilização

Para analisar o efeito da liofilização e conservação a 4°C, procedeu-se ao crescimento da cultura bacteriana com 500mg/L de ác. cianúrico como fonte de N (descrito no ponto 2.4), seguido do processo de liofilização e de armazenamento a 4°C (descrito no ponto 2.7.3.). Imediatamente antes do armazenamento, e a intervalos de tempo fixos (14 e 28 dias), o sedimento de células mantido a 4°C foi ressuspensionado de forma a perfazer 10mL em solução salina estéril. Procedeu-se, de seguida, à quantificação da concentração de células viáveis da bactéria (figura 3.4.5.), e à obtenção das respectivas curvas de degradação de terbutilazina e de atrazina em tampão U, com base na medição do valor de Abs._{223nm} do sobrenadante (figuras 3.4.6.-A, B, C).

Viabilidade Celular

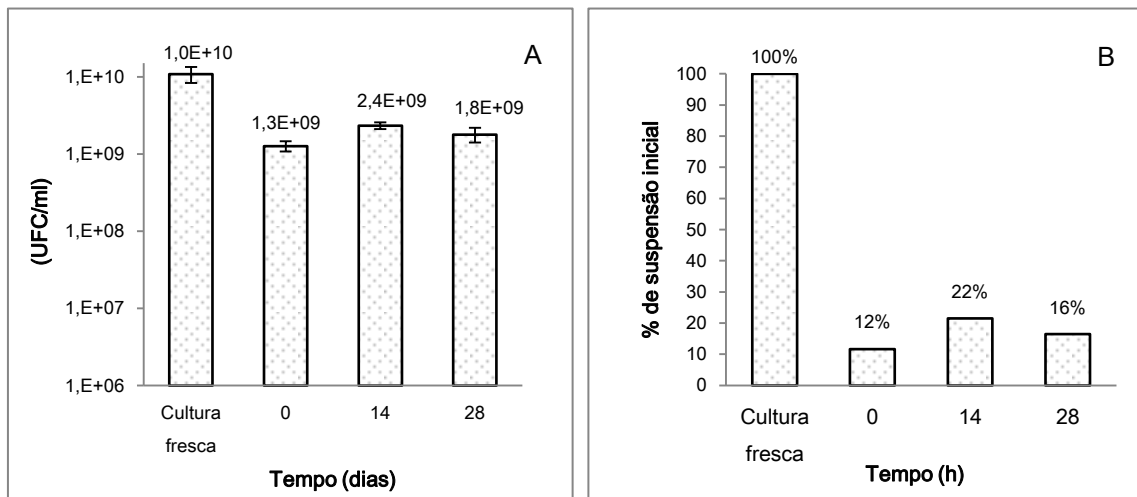


Figura 3.4.5: Variação da concentração de células viáveis da *P.sp.ADP Rif^R* após a liofilização e refrigeração a 4°C do sedimento bacteriano. (A) Concentração da cultura fresca foi avaliada imediatamente antes da liofilização ($1,0 \times 10^{10}$ UFC ml⁻¹) e as restantes concentrações de células viáveis após a liofilização 0 dias e ao longo do período de ensaio, 14 e 28 dias. (B) Os valores percentuais apresentados foram obtidos considerando-se a concentração da suspensão bacteriana, antes da liofilização 100% (tempo zero), sendo os restantes valores obtidos por comparação das concentrações subsequentes ao inicial.

Taxa de degradação do herbicida

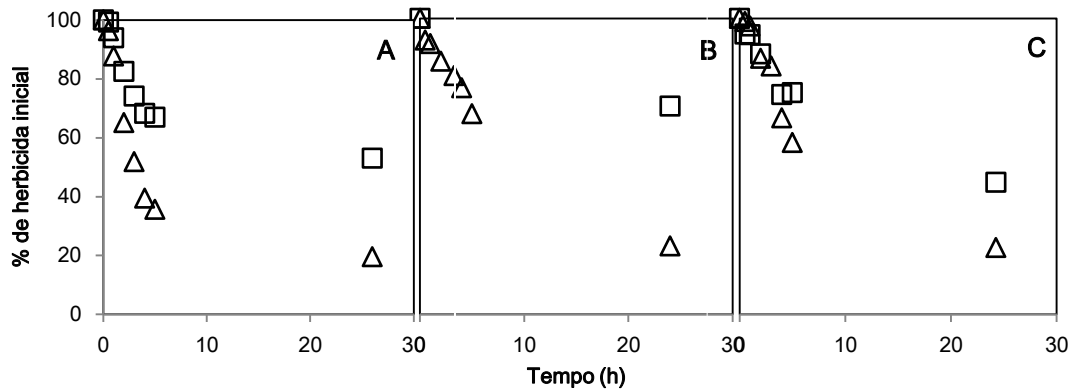


Figura 3.4.6: Curvas de degradação da (Δ) atrazina (ATZ) e da (\square) terbutilazina (TBZ) por “resting cells” de cultura de *P.sp.ADP Rif^R* liofilizada (A) 0 dias, e armazenada a 4°C durante; (B) 14 dias e (C) 28 dias. Os valores apresentados foram obtidos a partir da Abs_{223nm} do sobrenadante da mistura de células em tampão U contendo Atrazina (40 μ M) ou terbutilazina (40 μ M).

Tabela 3.4.4: Cálculo da taxa específica de degradação inicial da atrazina e da terbutilazina pelas células de *P.sp.ADP Rif^R* liofilizadas e conservadas a 4°C, com base no declive obtido a partir da figura 3.4.7 nas primeiras 2 horas a dividir pela concentração de células (UFC/mL) adicionadas ao tampão U com herbicida.

Taxa específica de degradação (%.mL/h.ufc)	Cultura fresca	t ₀ dias	T ₁₄ dias	T ₂₈ dias
Atrazina	2,04E-08 (36,49/1,79E+09)	8,82E-08 (18/2,04E+08)	1,79E-08 (6,71/3,75E+08)	2,42E-08 (6,96/2,87E+08)
Terbutilazina	1,15E-08 (20,62/1,79E+09)	4,52E-08 (9,23/2,04E+08)	-	1,95E-08 (5,6/2,87E+08)

Com base nos resultados obtidos, para a cultura de *P.sp.ADP Rif^R* liofilizada figura 3.4.5 e tabela 3.4.4, verificamos que o processo de liofilização levou a perda de um número considerável de células viáveis, apesar de o processo de refrigeração consequente manter quase constante o número de células viáveis, assim como a capacidade de degradação (figura 3.4.6). O resultado obtido, logo após a liofilização (t₀), pode resultar de um erro do operador, uma vez que o esperado seria ao longo do tempo ocorrer uma perda de células e não uma perda seguida de um aumento, contudo esta questão permite salientar que a liofilização e armazenamento a 4°C não coloca em causa a capacidade degradativa da bactéria, uma vez que na tabela 3.4.4. a taxa de degradação acompanha a variação das células viáveis.

Em conjunto, os resultados indicam que o processo de liofilização parece ser mais agressivo para a cultura (figura 3.4.5.-B). O estudo realizado por Varela (2013) com a *Aa TC1*, gram-positiva, nas mesmas condições apresentadas neste trabalho, apresenta uma taxa de sobrevivência maior. A sensibilidade por parte da *P.sp.ADP Rif^R* ao processo de liofilização

pode estar relacionada com o facto de se tratar de uma gram-negativa, uma vez que Miyamoto-Shinohara (2008) ao avaliar a taxa de sobrevivência das bactérias gram-positivas imediatamente após o processo de liofilização verificou índices mais elevados, quando comparado às gram-negativas, sob as mesmas condições, sugerindo desta forma uma maior resistência à desidratação pelas gram-positivas, provavelmente pela sua estrutura celular diferenciada.

Tendo em consideração o apresentado, este processo não parece ser o mais apropriado para o transporte e armazenamento da *P.sp.ADP Rif^R* uma vez que a perda de células viáveis torna inviável a sua utilização.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objectivo principal a optimização da bactéria *P.sp.ADP Rif^R*, de modo a ser usada na biorremediação de solos contaminados com o herbicida terbutilazina. Para tal o estudo do ác. cianúrico como fonte N única em substituição da atrazina, no crescimento dos pré-inóculos e inóculos, indicou que, para além de apresentar diversas vantagens a nível do custo, ausência de toxicidade para o meio ambiente, mantém a capacidade degradativa da bactéria evitando assim o uso da atrazina.

Os ensaios de mineralização realizados indicaram como estratégia mais favorável, a inoculação do solo com 2×10^8 UFC (*P.sp.ADP Rif^R*) por grama de solo, para uma contaminação do solo equivalente a 10x a dose recomendada da formulação comercial de terbutilazina, SAPEC. Apesar dos resultados não indicarem uma mineralização de 100% do herbicida, é necessário ter em conta o intervalo de tempo em que decorreu o ensaio, relativamente curto (\pm 7 dias), sendo importante em estudos futuros prolongar o tempo de ensaio. Neste trabalho, pretendíamos obter uma degradação mais rápida, uma vez que a questão do tempo nos processos de biorremediação de solos contaminados é muito importante. A questão de a adsorção dos compostos diminuir com a profundidade, uma vez que também diminui a matéria orgânica e os microrganismos capazes de degradar os compostos poluentes (Sahid, I.B. e Teoh, S.S. 1994), é de extrema importância, sendo essencial agir de forma rápida de modo a evitar a lixiviação dos compostos e conseqüente contaminação dos sistemas aquáticos, em particular em casos de contaminação intensa por acidente. Desta forma, como descrito por Lima *et al.*, (2009), em estudos futuros seria importante testar a inoculação da bactéria *P.sp.ADP Rif^R*, repetida várias vezes, em intervalos de 2 dias, de modo a acelerar a biodegradação do herbicida, sem adição de qualquer estimulante, uma vez que neste trabalho, não se obteve qualquer estimulação da degradação da terbutilazina. Jacobsen *et al.*, (2001), referiu que no caso do elevado potencial de degradação, o principal factor limitante da mineralização da terbutilazina é a sua elevada capacidade de adsorção a matéria orgânica do solo, e no caso do baixo potencial de mineralização o factor limitante é o número de microrganismos com capacidade de degradação. Esta situação foi verificada no caso do aumento da % de terbutilazina mineralizada com o aumento da concentração de *P.sp.ADP Rif^R* suplementada no solo.

Por último, foram estudados três métodos de formulação e conservação de células de *Pseudomonas sp. ADP*. Os três métodos de formulação conduziram a uma perda considerável de células viáveis, que se intensificou significativamente após 14 dias de armazenamento a 4°C (em média, entre 2 a 22% de sobrevivência). Contudo, o processo de liofilização, apesar da perda acentuada de células viáveis, permitiu a manutenção, mais ou menos constante, das células viáveis recuperadas, no armazenamento a 4°C ao longo de 1 mês, o que não se verificou no armazenamento a 4°C, nem nas células adsorvidas a vermiculite. No entanto, a taxa específica de degradação da terbutilazina ou de atrazina pelas células viáveis recuperadas não pareceu ser significativamente afectada em todos os métodos. Estes métodos

apesar de manterem a capacidade de degradação, a perda de células é muito significativa, colocando em causa a sua aplicação em estratégias de biorremediação de solos contaminados com terbutilazina.

A estratégia de biorremediação apresentada passa pela obtenção de uma bactéria com capacidade degradativa para o composto a degradar, e a sua optimização de forma a reduzir a concentração do composto para valores aceitáveis pelas autoridades reguladoras. Este tipo de estratégias lida com diversas questões, como a implementação de bactérias exóticas ao local contaminado, uma vez que a alteração da microbiota indígena é um dos problemas a ter em conta, desta forma, este trabalho envolveu a utilização de uma bactéria obtida a partir de um local contaminado, contudo antes da aplicação da bactéria em campo é necessário averiguar o impacto que esta poderá ter na microflora indígena do local de modo a não alterar o comportamento normal do sistema a biorremediar.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alexander, M.** 2000. Aging, bioavailability, and over stimulation of risk from environmental pollutants. *Environ. Sci. Technol.* 34, 4259-4265.
- Arangarasan, V., Palaniappan, S.P. e Chelliah, S.** 1998. Inoculation effects of diazotrophs and phosphobacteria on rice. *Ind. J. Microbiol.*, 38: 111-112
- Aronstein, B.N., Calvillo, Y.M., Alexander, M.** 1991. Effect of surfactant at low concentrations on the desorption and biodegradation of sorbed aromatic compounds in soil. *Environ. Sci. Technol.* 25: 1728-1731.
- Bashan Y.** 1998. Inoculants of Plant Growth-Promoting Bacteria for Use in Agriculture. *Biotechnology Advances* 16: 729-770.
- Bazilah, A.B., Sariah, M., Abidin, M.A., e Yasmeen, S.** 2011 Effect of Carrier and Temperature on the Viability of *Burkholderia* sp. (UPMB3) and *Pseudomonas* sp. (UPMP3) during Storage. *Int. J. Agric. Biol.*, 13: 198–202
- Biradar, D.P. e Rayburn, A.L.** 1995. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *J. Environ. Qual.* 24:1222-1225
- Bollag, J.M., e Bollag, W.B.** 1995. Soil contamination and the feasibility of biological remediation. *Bioremediation: Science and Applications*, SSSA Special Publication. 43: 1-10.
- Boundy-Mills, K., De Souza, M., Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P., e Sadowsky, M.J.** 1997. The *atzB* Gene of *Pseudomonas* sp. Strain ADP Encodes the Second Enzyme of a Novel Atrazine Degradation Pathway. *Appl. Environ. Microb.* 63: 916–923
- Bowman, B.T.** 1989. Mobility and persistence of the herbicides atrazine, metolachlor and terbutylazine in plainfield sand determined using field lysimeters. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 8: 485-491
- Boyd, R.A.** 2000. Herbicides and herbicide degradates in shallow groundwater and the Cedar River near a municipal well field, Cedar Rapids, Iowa. *Sci. Total Environ.* 248: 241-253.
- Bustamante, M., Durán, N. e Diez, M.C.** 2012 Biosurfactants are useful tools for the bioremediation of contaminated soil: a review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 12: 667-687
- Caracciolo, A.B., Giuliano, G., Di Corcia, A., Crescenzi, C., e Silvestri, C.** 2001. Microbial Degradation of Terbutylazine in Surface Soil and Subsoil at Two Different Temperatures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 67:815–820
- Caracciolo, A.B., Giuliano, G., Grenni, P., Cremisini, C., Ciccoli, R., e Ubaldi, C.** 2005. Effect of urea on degradation of terbutylazine in soil. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 24
- Cerejeira, M.J., Viana, P., Batista, S., Pereira, T., Silva, E., Valerio, M.J., Silva, A., Ferreira, M. e Silva-Fernandes, A.M.** 2003. Pesticides in Portuguese Surface and Ground Waters. *Water Res.* 37:1055–1063
- Changey, F., Devers-Lamrani, M., Rouard, N., e Martin-Laurent, F.** 2011 In vitro evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing the *atzA*, B and C genes. *Gene* 490: 18-25
- Chelinho, S., Moreira-Santos, M., Lima, D., Silva, C., Viana, P., André, S., Lopes, I., Ribeiro, R., Fialho, A.M., Viegas, C.A., e Sousa, J.P.** 2010. Cleanup of atrazine-contaminated soils: ecotoxicological study on the efficacy of a bioremediation tool with *Pseudomonas* sp. ADP. *J. Soils. Sed.* 10: 568-578.
- Costa, C. P., e Ferreira, M. C.** 1991. Preservação de microrganismos: revisão. *Revista de Microbiologia.* 22: 263-268.
- Day, J. G., e Mclellan, M. R.** 1995. Cryopreservation and freeze-drying protocols. New Jersey: Humana Press.
- De Souza, M.L., Sadowsky, M.J., e Wackett, L.P.** 1996. Atrazine Chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: Gene Sequence, Enzyme Purification, and Protein Characterization. *Journal of Bacteriology* 178: 4894-4900

- De Souza, M.L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M.J., e Wackett, L.P.** 1998. The Atrazine Catabolism Genes AtzABC Are Widespread and Highly Conserved. *J. Bacteriol.*, 180: 1951–1954.
- Devers, M., Soulas, G., e Martin-Laurent, F.** 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods* 56: 3 – 15
- Dolaptsoglou, C., Karpouzas, D.G., Spiroudi, U.M., Eleftherohorinos, E., e Voudrias, E.A.** 2007. Influence of Different Organic Amendments on the Degradation, Metabolism, and Adsorption of Terbutylazine. *J. Environ. Qual.* 36:1793 –1802.
- Dormaer, J.F.** 1969. Phospholipids in chernozemic soils of southern Alberta. *Can. Soil. Sci.* 11: 134-137
- Douset, S., Mouvet, C., e Schiavon, M.** 1997. Degradation of [¹⁴C]Terbutylazine and [¹⁴C]Atrazine in Laboratory Soil Microcosms. *Pestic. Sci.* 49, 9-16
- Fava F, Di Gioia D.** 2000. Soya lecithin effects on the aerobic biodegradation of polychlorinated biphenyls in an artificially contaminated soil. *Biotechnol. Bioeng.* 72: 177–184.
- Fiori, E., Mazzotti, M., Guerrini, F., e Pistocchi, R.** 2013. Combined effects of the herbicide terbutylazine and temperature on different flagellates from the Northern Adriatic Sea. *Aquatic Toxicology* 128-129: 79-90
- Franzetti, A., Bestetti, G., Caredda, P., La Colla, P., e Tamburini, E.** 2008. Surface-active compounds and their role in the access to hydrocarbons in *Gordonia* strains. *FEMS Microbiol. Ecol.* 63: 238-248
- Friedmann, A.S.** 2002. Atrazine inhibition of testosterone production in rat males following peripubertal exposure. *Reprod. Toxicol.* 16: 275-279.
- Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M., e Wackett, L.** 2003. Origins of Cyanuric Acid Hydrolase: Purification, Substrates, and Prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Appl. Environ. Microb.* 69: 3653–3657
- Funari, E., Barbieri, L., Bottoni, P., Del Carlo, G., Forti, S., Giuliano, G., Marinelli, A., Santini, G. e Zavatti, A.** 1998. Comparison of the leaching properties of alachlor, metalachlor, triazines and some of their metabolites in a experimental field. *Chemosphere* 36: 1759-1773
- Gao, Y.Z., Ling, W.T., Zhu, L.Z., Zhao, B.W., e Zheng, Q.S.** 2007. Surfactant-enhanced phytoremediation of soil contaminated with hydrophobic organic contaminants: Potential and assessment. *Pedosphere.* 17: 409-41
- García-González, V., Govantes, F., Shaw, L.J., Burns, R.G. e Santero, E.** 2003. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. ADP. *Appl. Environ. Microb.* 69: 6987-6993.
- García-González, V., Govantes, F., Porrúa, O., e Santero, E.** 2005. Regulation of the *Pseudomonas* sp. Strain ADP Cyanuric Acid Degradation Operon. *Journal of Bacteriology.* 187: 155–167
- Graham-Weiss, L., Bennett, M. L., e Paa, A. S.** 1987. Production of Bacterial Inoculants by Direct Fermentation on Nutrient-Supplemented Vermiculite. *Appl. Environ. Microb.* 53: 2138 - 2140.
- Graymore, M., Stagnitti, F., e Alison, G.,** 2001. Impacts os atrazine in aquatic ecosystems. *Environ. Int.* 26: 483-495
- Hess, F.D.** 2000 Light-dependent herbicides: an overview. *Weed Sci.* 48: 160–170.
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., e Barceló, D.** 2008 Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Reserach* 42: 3315-3326.
- Jacobsen, C.S., Shapir, N., Jensen, L.O., Jensen, E.H., Juhler, R.K., Streibig, J.C., Mandelbaum, R.T. e Helweg, A.** 2001. Bioavailability of triazine herbicides in a sandy soil profile. *Biol Fertil Soils.* 33:501–506
- Jain, R.K., Kapur, M., Labana, S., Lal, B., Sarma, P.M., Bhattacharya, D. e Thakur, I.S.** 2005. Microbial diversity: Application of microorganisms for the biodegradation of xenobiotics. *Curr. Sci.* 89, 101-112.
- Juhasz, A.L., Stanley, G. A., e Britz, M.L.** 2000. Degradation of high molecular weight PAHs in contaminated soil by a bacterial consortium: Effects on Microtox and Mutagenicity assays. *Bioremediation*

J. 4:271–283.

Juhász, A. L., Waller, N., Lease, C., Bentham, R., e Stewart, R. 2005. Pilot Scale Bioremediation of Creosote-Contaminated Soil—Efficacy of Enhanced Natural Attenuation and Bioaugmentation Strategies. *Bioremediation Journal* 9: 141-157.

Kang, M. H., Saraswat, V., Lee, J., e Park, Y-H. 1999. Production of Lyophilized Culture of *Lactobacillus acidophilus* with Preserving Cell Viability. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 4: 36-40.

Katz, I., Green, M., Ruskol, Y., e Dosoretz, C.G. 2000. Characterization of atrazine degradation and nitrate reduction by *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Advances in Envir. Research.* 4: 219- 224

Kolpin, D.W., Thurman, E.M., e Linhart, S.M. 1998. The Environmental Occurrence of Herbicides: The Importance of Degradates in Ground Water. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 35: 385-390

Lapage, S.P., Shelton, J.E., Mitchell, T.G., e Mackenzie, A. R. 1970. Culture collections and the preservation of bacteria. In *Methods in Microbiology*, Vol. 3A, ed. by Norris, J. R. and Ribbons, D. M., Academic Press, New York 135–228.

Leslie, S.B., Israeli, E., Lighthart, B., Crowe, J.H., e Crowe, L.M. 1995 Trealose and Sucrose Protect Bothe Membranes and Proteins in Intact Bacteria durind Drying. *Appl. Environ. Microb.* 61: 3592-3597

Liang, S.H., Liu, J.K., Lee, K.H., Kuo, Y.C. e Kao, C.M. 2012. Use of specific gene analysis to assess the efectiveness of surfactante- enhanced trichloroethylene cometabolism. *J. Hazar. Mater.* 198:323-330

Lima, D., Viana, P., André, S., Chelinho, S., Costa, C., Ribeiro, R., Sousa, J.P., Fialho, A.M. e Viegas, C.A. 2009. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. *Chemosphere* 74: 187-192.

Mandelbaum, R.T., Wackett, L.P., e Allan, D.L. 1993. Mineralization of the s-Triazine Ring of Atrazine by Stable Bacterial Mixed Cultures. *Appl. Environ. Microb.* 59: 1695-1701

Mandelbaum, R.T., Allan, D.L. e Wackett, L.P. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microb.* 61: 1451-1457

Mateus, C. 2012. Study of bioremediation strategies for soils contaminated with s-triazine herbicides: The bioaugmentation bacteria *Pseudomonas* sp. ADP and *Arthrobacter aurescens* TC1 compared. Tese de Mestrado em Biotecnologia, IST.

Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P. Wing, R., e Sadowsky, M.J. 2001. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology* 183: 5684-5697

Miyamoto-Shinohara, Y., Sukenobe, J., Imaizumi, T., e Nakahara, T. 2008. Survival of freeze-dried bactéria. *J.Gen. Appl. Microbiol.* 54: 9-24

Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., Vesey, G. 2006. Preservation of microorganisms by drying – a review. *Journal of Microbiol. Methods.* 66: 183-193.

Mulligan, C.N., Yong, R.N., e Gibbs, B.F. 2001. Surfactant- enhanced remediation of contaminated soil: areview. *Eng. Geol.* 60, 371-380.

Mueller, J. G., Cerniglia, C. E., Pritchard., P. H. 1996. Bioremediation of Environments Contaminated by Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In *Bioremediation: Principles and Applications*: 125–194, Cambridge University Press, Cambridge

Nakkeeran, S., Fernando, W.G.D., e Siddiqui, Z.A. 2005. Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*, 257–296.

Ostrofsky, E., Robinson, J., Traina, S. e Touvinen. 2001. Effect os cyanuric acid amendment on atrazine mineralization in surface soils and detection of the s-triazine ring-cleavage gene *trzD*. *Soil Biology & Biochemistry.* 33: 1539-1545.

Papadopoulos, N., Gikas, E., Zalidis, G., e Tsarbopoulos, A. 2007. Simultaneous Determination of Terbutylazine and Its Major Hydroxy and Dealkylated Metabolites in Wetland Water Samples Using Solid-

- Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection. *J. Agric. Food Chem.* 55: 7270-7277
- Radosevich, M., Traina, S.J., Hao, Y., e Tuovinen, O.** 1995. Degradation and Mineralization of Atrazine by a Soil Bacterial Isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 297-302
- Ralebitso, T.K., Senior, E. e Van Verseveld, H.W.** 2002. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation* 13: 11-19.
- Sadowsky, M.J., Tong, Z., De Souza, M. e Wackett, L.P.** 1998. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *J. Bacteriol.* 180: 152-158.
- Sahid, I.B., Teoh, S.S.** 1994. Persistence of Terbutylazine in Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 226-230
- Salminen, J., Eriksson, I., e Haimi, J.** 1996. Effects of Terbutylazine on Soil Fauna and Decomposition Processes. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34: 184-189
- Sangeetha, D., Stella, D.** 2012. Survival of Plant Growth Promoting Bacterial Inoculants in Different Carrier Materials. *Inter. Jour. of Pharm, & Biol. Archives* 3: 170-178
- Sanlaville, Y., Guittonneau, S., Mansour, M., Feicht, E.A., Meallier, P., e Kettrup, A.** 1996. Photosensitized Degradation Of Terbutylazine In Water. *Chemosphere.* 33: 353-362
- Sahid, I.B. e Teoh, S.S.** 1994. Persistence of Terbutylazine in Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 52: 226-230
- Sajjaphan, K., Shapir, N., Wackett, L.P., Palmer, M., Blackmon, B., Tomkins, J., e Sadowsky, M.J.** 2004 Kilobase Region and Are Functional in Escherichia coli. *App. Environ. Microbi.* 70: 4402-4407.
- Semple, K.T., Morris, A.W.J., e Paton, G.I.** 2003. Bioavailability of hydrophobic organic contaminants in soils: fundamental concepts and techniques for analysis. *Eur. J. Soil Sci.* 54: 809-818.
- Shapir, N., e Mandelbaum, R.T.** 1997. Atrazine degradation in subsurface soil by indigenous and introduced microorganisms. *J. Agric. Food Chem.* 45: 4481-4486
- Shapir, N., Mandelbaum, R.T., e Jacobsen, C.** 1998. Rapid Atrazine Mineralization under Denitrifying Conditions by Pseudomonas sp. Strain ADP in Aquifer Sediments. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32: 3789-3792
- Shapir, N., Sadowsky, M.J. e Wackett, L.P.** 2005 Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from Pseudomonas sp. Strain ADP. *J. Bacteriol.* 187: 3731-3738.
- Shapir, N., Pedersen, C., Gil, O., Strong, L., Seffernick, J., Sadowsky, M.J., Wackett, L.P.** 2006. TrzN from Arthrobacter aurescens TC1 Is a Zinc Amidohydrolase. *Journal of Bacteriology*, 188: 5859-5864
- Shapir, N., Mongodin, E. F., Sadowsky, M. J., Daugherty, S. C., Nelson, K. E., e Wackett, L. P.** 2007. Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *Journal of Bacteriology* 189: 674-682
- Shinde, S.** 2013. Bioremediation. An overview. *Recent Research in Science and Technology* 5: 67-72
- Silva, E., Fialho, A.M., Sá-Correia, I., Burns, R.G. e Shaw, L.J.** 2004. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high atrazine concentrations. *Environ. Sci. Technol.* 38: 632-637.
- Silva, E., Sá-Correia, I. e Fialho, A.M.** 2005. Despoluição biológica de ambientes contaminados com o herbicida atrazina. *Boletim da biotecnologia.* 82:13-27
- Soeder, C.J., Papaderos, A., Kleespies, M., Kneifel, H., Haegel, F.-H., Webb, L.** 1996. Influence of phytogetic surfactants (quillaya saponin and soya lecithin) on bio-elimination of phenanthrene and fluoranthene by three bacteria. *Appl. Microbiol Biotechnol* 44: 654-659.
- Solomon, K.R., Baker, D.B., Richards, P., Dixon, K.R., Klaine, C.P., Giddings, J.M., Giesy, J.P., Hall, L.W., Williams, W.M.** 1996. Ecological Risk Assessment of Atrazine in North American Surface Waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 31-76

- Strong, L.C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M.J. e Wackett, L.P.** 2002. *Arthrobacter aureescens* TC1 Metabolizes Diverse s-Triazine Ring Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5973-5980
- Stryer, L.** 1995. Biochemistry. 4d Ed. New York: W. H. Freeman and co. .
- University of Hertfordshire (2013) The Pesticide Properties DataBase (PPDB)** developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, 2006-2013.
- Van maanen, J.M.S., Devaan, M.A.J., Veldstra, A.W.F.Hendrix, W.P.A.M.** 2001. Pesticides and nitrate in groundwater and rainwater in the province of Limburg in the Netherlands. *Environ Monit Asses.* 72: 95-114
- Vanderheyden, V., Debongnie, P., e Pussemier, P.,** 1997. Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. *Pestic. Sci.* 49: 237-242
- Varela, V.** 2013. Studies on s-triazines degrading bacteria: Influence of the three methods of culture formulation on *Arthrobacter aureescens* TC1 ability to biodegrade the herbicides atrazine and terbutylazine. Tese de Mestrado em Eng.^a Biológica, IST.
- Vidali, M.** 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73, 1163-1172
- Viegas, C. A., Chelinho, S., Moreira-Santos, M., Costa, C., Gil, F.N., Silva, C., Lima, D., Ribeiro, R., Sousa, J.P., e Fialho, A.M.** (2012) Bioremediation of Soils Contaminated with Atrazine and Others s-Triazine Herbicides: Current State and Prospects. Pp. 1-49 in *Advances in Environmental Research*. Nova Science Publishers, Inc.
- Volkering, F., Breure, A.M., Rulkens, W.H.** 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8: 401–417.
- Wackett, L.P., Sadowsky, M.J., Martinez, B.** 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzyme to field studies. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58: 39-45.
- WHO/FAO Data sheets on pesticides.** 2013. World Health Organization 82. 1996-2013 (www.inchem.org)

6. ANEXOS

Tabela 6.1: Preço relativo a alteração da fonte de N e fonte de C, por cada mole de composto usado no meio de crescimento da *P.sp.ADP*.

Fonte de azoto	Formula Molecular	[] mg/L (usada em cada meio)	n (moles de N usada em cada meio)	€/n (preço por cada moles de composto usado no meio)
Ácido Cianúrico	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃	500	3,87 x 10 ⁻³	2,68
		1000	7,74 x 10 ⁻³	5,36
Atrazina	C ₆ H ₁₄ CIN	300	1,39 x 10 ⁻³	249,26
Fonte de Carbono	Formula Molecular	[] g/L (usada em cada meio)	n (moles de C usada em cada meio)	€/n (preço por cada moles de composto usado no meio)
Citrato de Sódio	CH ₅ Na ₃ O ₇ .2H ₂ O	10	3,40 x 10 ⁻²	2,193
		20	6,80 x 10 ⁻²	4,386

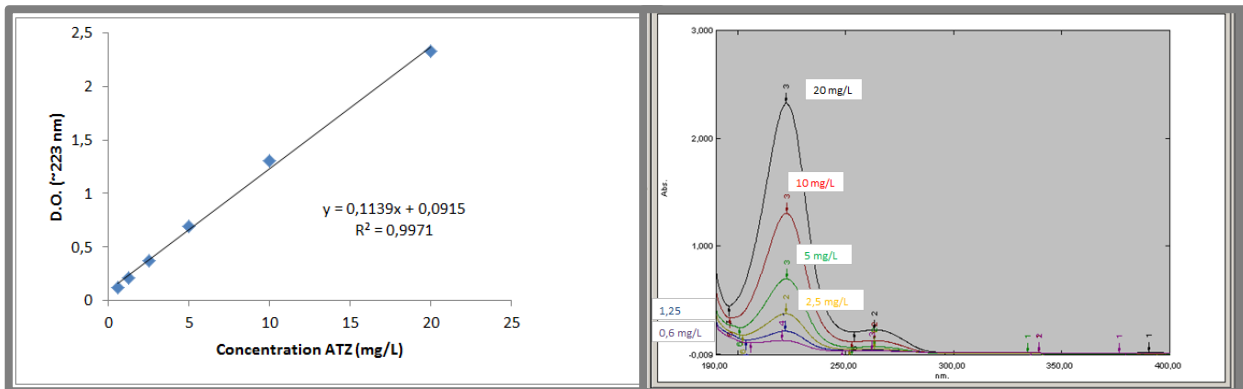


Figura 6.1: Curvas de calibração da atrazina em água realizadas por Vera Silva.

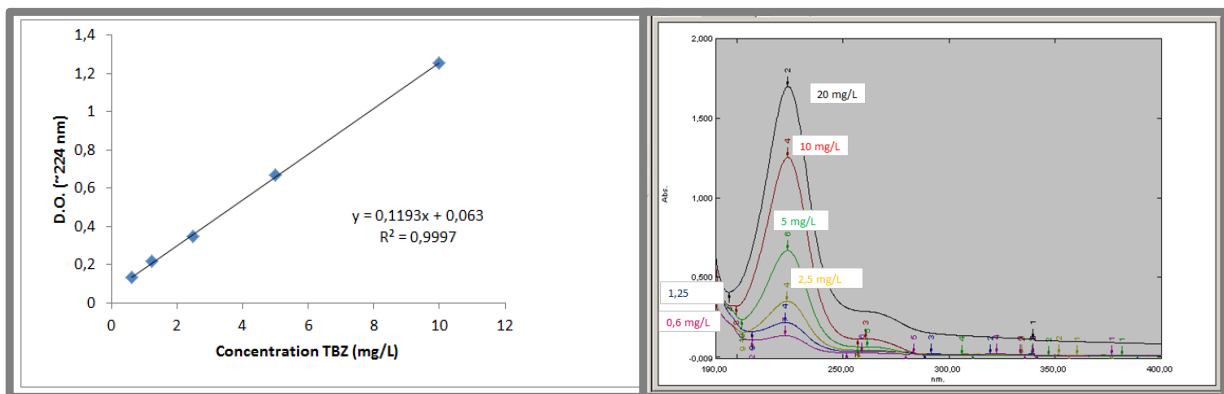


Figura 6.2: Curvas de calibração da terbutilazina em água realizadas por Vera Silva.