

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

**Crescimento e sobrevivência do recombinante *Rhodococcus* sp isolado RHA1
(*fcb*) em turfa comercial e solo contaminado com PCB**

Miriam Gonçalves de Chaves

**Dissertação apresentada para obtenção do título
de Mestre em Ecologia de Agroecossistemas**

**Piracicaba
2005**

**Miriam Gonçalves de Chaves
Bióloga**

Crescimento e sobrevivência do recombinante *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*fc*b) em turfa comercial e solo contaminado com PCB

**Orientadora:
Profa. Dra. SIU MUI TSAI**

**Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre em
Ecologia de Agroecossistemas**

**Piracicaba
2005**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - ESALQ/USP**

Chaves, Miriam Gonçalves de

Crescimento e sobrevivência do recombinante *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (fcb) em turfa comercial e solo contaminado com PCB / Miriam Gonçalves de Chaves. - - Piracicaba, 2005.

63 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2005.

1. Bactéria recombinante 2. Bifenil policlorado 3. Biodegradação 4. Sedimento
5. Seqüenciamento genético 6. Toxicologia ambiental 7. Turfa I. Título

CDD 589.9

“Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor”

"A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana"

Louis Pasteur

Agradecimentos

Agradeço inicialmente a minha orientadora Profa. Dra. Siu Mui Tsai pela oportunidade de trabalhar no laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Agradeço muito ao Dr. Jorge Luiz Mazza Rodrigues do Department of Microbiology and Molecular Genetics, Michigan State University (EUA), por toda orientação na pesquisa com *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*fc*b), pelo apoio e pela amizade.

Sou grata também a Profa. Dra. Regina Teresa Rosim Monteiro do laboratório de Ecotoxicologia do CENA, pelas sugestões e críticas nos experimentos.

A Profa. Dra. Vivian Helena Pellizari do laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela concessão da amostra da Cosipa e pelas sugestões na elaboração dos ensaios.

A Turfal Ltda - Indústria e Comércio de Produtos Biológicos e Agrônômicos, pela concessão das amostras de turfa.

A Profa. Marli Fiore e a Dra. Claudia Bellato pelas sugestões e dicas no uso das técnicas moleculares.

Aos funcionários do laboratório de Biologia Celular e Molecular do CENA: Elias, Fábio, Wagner, Francisco Montrasi, Simone, Ludmila e Fabiana Cannavan pelo apoio técnico.

Aos colegas de laboratório Edenilson Rabello, Adriane Souza, Adriana Sturion Lorenzi, Marina Dellias, Jeanedy Pazinato, Carlos Garcia e Camila Patreze, pelas sugestões, incentivo e amizade.

A secretária do curso Interunidades em Ecologia de Agroecossistemas Regina Telles de Freitas, por todo apoio e dedicação com os alunos.

Sou grata as minhas amigas e companheiras de casa Claudia Irene, Milena Lisita, Gisele Melendez, Mariana Pardi, Giovana, Gladys Batista, Elizabete, Marise Suzuki e Ana pelo incentivo e amizade.

A minha família e ao meu namorado Luiz Alexandre Simões de Castro, pelo apoio, incentivo e carinho.

A CAPES pela concessão da bolsa de mestrado durante um ano.

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 DESENVOLVIMENTO.....	11
2.1 Revisão de Literatura.....	11
2.1.1 Toxicologia Ambiental.....	11
2.1.2 Compostos Xenobióticos.....	11
2.1.3 Agentes Tóxicos e os Seres Vivos.....	12
2.1.4 Compostos Organoclorados.....	13
2.1.5 Bifenilas Policloradas (PCBs).....	14
2.1.6 Biodegradação de PCBs.....	18
2.1.7 <i>Rhodococcus</i> sp isolado RHA1 (<i>pcb</i>).....	19
2.1.8 Substrato turfoso como veículo para inoculação no ambiente.....	21
2.1.9 O Estuário de Santos e a contaminação por PCBs.....	22
2.2 Material e Métodos.....	23
2.2.1 Curva de Crescimento de <i>Rhodococcus</i> sp. isolado RHA1 (<i>pcb</i>).....	23
2.2.2 Crescimento e sobrevivência do isolado RHA1 (<i>pcb</i>) na turfa irradiada.....	23
2.2.2.1 Irradiação da turfa.....	23
2.2.2.2 Inoculação do recombinante na turfa.....	24
2.2.2.3 Plaqueamento e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC).....	25
2.2.2.4 Detecção do operon <i>pcb</i> em colônias isoladas da turfa.....	26
2.2.2.5 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	27
2.2.3 Teste de sobrevivência de <i>Rhodococcus</i> sp. isolado RHA1 (<i>pcb</i>), <i>Escherichia coli</i> e <i>Arthrobacter</i> sp. em amostra ambiental irradiada.....	29
2.2.3.1 Amostra ambiental: características, preparo e irradiação.....	29
2.2.3.2 Tratamentos.....	30
2.2.3.3 Inoculação de <i>Rhodococcus</i> sp. isolado RHA1 (<i>pcb</i>) no sedimento.....	31
2.2.3.4 Inoculação de <i>Arthrobacter</i> sp. e <i>Escherichia coli</i> no sedimento.....	31
2.2.3.5 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)	32
2.2.3.6 Detecção do operon <i>pcb</i> em colônias isoladas.....	33

2.2.3.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA das colônias isoladas.....	33
2.3. Resultados e Discussão.....	35
2.3.1 Curva de crescimento de <i>Rhodococcus</i> sp isolado RHA1 (<i>pcb</i>).....	35
2.3.2 Crescimento e sobrevivência do isolado RHA1 (<i>pcb</i>) na turfa irradiada.....	36
2.3.2.1 Avaliação do crescimento através de contagem de UFCs.....	36
2.3.2.2 Detecção do operon <i>pcb</i> nas colônias isoladas dos tratamentos.....	38
2.3.2.3 Sequenciamento do gene 16S ribossomal	41
2.3.3 Teste de sobrevivência de <i>Rhodococcus</i> sp isolado RHA1 (<i>pcb</i>), <i>Escherichia coli</i> e <i>Arthrobacter</i> sp. em amostra ambiental irradiada	41
2.2.3.1 Avaliação do Crescimento através de contagem de UFCs.....	41
2.2.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA e dos genes <i>pcbA</i> e <i>pcbB</i> por PCR.....	46
2.2.3.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA.....	48
2.2.3.4 Detecção de bactéria nativa com potencial biodegradador de PCB.....	51
3 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

RESUMO

Crescimento e sobrevivência do recombinante *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) em turfa comercial e solo contaminado com PCB

O grupo de organoclorados, Bifenilas Policloradas (PCBs) é de difícil degradação e persistente no meio ambiente, tendo sido associado a diversos problemas nos organismos devido ao potencial toxicológico. Biodegradação constitui uma ferramenta eficaz e barata para remoção destes contaminantes do ambiente. O isolado RHA1 (*fcB*) de *Rhodococcus* sp. foi geneticamente construído com a introdução do operon de degradação hidrolítica de 4-clorobenzoato (*fcB*) para evitar a formação de produtos tóxicos durante a degradação de ácidos clorobenzóicos. Com o intuito de se obter informações sobre o processo adaptativo do recombinante *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) em substratos contendo PCBs, foram feitos dois ensaios avaliando-se a sobrevivência e o crescimento deste isolado. *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) foi inoculado (10^4 células.g⁻¹) em substrato turfoso previamente irradiado a 50 KGy, contendo ou não 200 mg.Kg⁻¹ de bifenilo. Em outro ensaio, além do recombinante, as bactérias *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. foram inoculados em sedimento coletado na região do Estuário de Santos, contendo PHAs e PCBs, também irradiado (50 KGy). O crescimento das bactérias em ambos os substratos foi monitorado através de contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Algumas colônias eram selecionadas aleatoriamente para extração de DNA, detecção do operon *fcB* através de amplificação por PCR e sequenciamento do gene 16S rRNA. Aumento no número de UFCs nos tratamentos inoculados com o recombinante foi observado até 150 dias no ensaio com substrato turfoso e 70 dias na amostra ambiental. Entretanto, houve queda no número de UFCs após os 10 dias nos tratamentos inoculados com *E. coli* e *Arthrobacter* sp. Os genes *fcBA* e *fcBB* do operon *fcB* foram detectados nas colônias isoladas dos tratamentos inoculados com o isolado RHA1 (*fcB*) em ambos os substratos. A análise das seqüências pertencentes às colônias isoladas do tratamento inoculado com o isolado RHA1 (*fcB*) feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project, apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene ribossomal 16S de *Rhodococcus* sp. isolado ZC-3 (AM076672.1). Somente as seqüências referentes ao tratamento inoculado com *E. coli* foram analisadas, as quais apresentaram 99% de identidade com a seqüência do gene ribossomal 16S de *E. coli* isolado K-12 MG 1655 (U00096.2). Estes resultados sugerem que *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) cresce na turfa irradiada (até 150 dias) na presença e ausência de PCB e nesta amostra de sedimento irradiada (até 70 dias), com aparente estabilidade do operon *fcB* durante este período e nestas condições. A possível presença dos genes *fcBB* e *fcBA* em bactérias nativas crescidas em meio K1 com ácido 4-clorobenzóico isoladas do sedimento antes da irradiação, sugere a presença de bactérias do local com potencial biodegradador deste composto.

Palavras-chave: Biodegradação; Bifenilas Policloradas; sedimento; turfa; recombinante, *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*)

ABSTRACT

Growth and survival of recombinant *Rhodococcus* sp. isolate RHA1 (*fcb*) in commercial peat and in PCB contaminated soil**

The group of organochlorates Biphenyl Polychlorates (PCBs) is of difficult degradation and persistent in the environment, being associated to several problems in the organisms due to its toxicological potential. The isolate RHA1 (*fc**b*) from *Rhodococcus* sp. was genetically built with the introduction of the operon of hydrolytic degradation 4-chlorobenzoate (*fc**b*) to avoid the formation of toxic products during the degradation of chlorobenzoic acids. In order to obtain information about the adaptative process of the recombinant *Rhodococcus* sp. isolate RHA1 (*fc**b*) in substrates containing PCBs, two essays were made evaluating the survival and growth of this isolate. *Rhodococcus* sp. isolate RHA1 (*fc**b*) was inoculated (10^4 cells.g⁻¹) in peat substrate previously irradiated with 50 kGy, with and without 200 mg.kg⁻¹ of biphenyl. In another essay, besides of the recombinant, the bacteria *Escherichia coli* and *Arthrobacter* sp. were inoculated in soil, also irradiated (50 kGy), from the Estuário de Santos region containing PHAs and PCBs. The growth of the bacteria in both substrates was monitored counting the Colony Forming Units (CFUs). Some colonies were selected randomly for DNA extraction, *fc**b* operon detection through PCR, and sequencing of the 16S rRNA gene. Rising in the number of CFUs in the recombinant inoculated treatments was observed until 150 days in the essay with peat substrate, and until 70 days in the environmental sample. Nonetheless, there was a reduction in the number of CFUs after 10 days in the treatment inoculated with *E. coli* and *Arthrobacter* sp. The genes *fc**b**A* and *fc**b**B* from the operon *fc**b* were detected in the isolated colonies of the treatments inoculated with the isolate RHA1 (*fc**b*) in both substrates. The analysis of the sequences belonging to the colonies isolated from the treatment inoculated with the isolate RHA1 (*fc**b*) through BLAST in the NCBI and Ribosomal Database Project sites showed 99% identity with the sequence of the gene 16S ribosomal from *Rhodococcus* sp. isolate ZC-3 (AM076672.1). Only the sequences referring to the treatment inoculated with *E. coli* were analyzed, which showed 99% identity with the sequence of the 16S ribosomal gene from *E. coli* isolate K-12 MG 1655 (U00096.2). These results suggest that *Rhodococcus* sp. isolate RHA1 (*fc**b*) grows in the peat irradiated (until 150 days), in the presence and absence of PCB and in this irradiated sediment sample (until 70 days), with apparent stability of the *fc**b* operon during this period and in these conditions. The possible presence of the *fc**b**A* and *fc**b**B* genes in native bacteria grown in K1 medium with 4-chlorobenzoate acid isolated from sediment before irradiation suggests the presence of native bacteria with biodegradation potential of this compound.

Keywords: Biodegradation, Biphenyl Polychlorates, sediment, peat, recombinant, *Rhodococcus* sp. isolate RHA1 (*fc**b*)

1 INTRODUÇÃO

Os bifenilas policlorados (PCBs) pertencem ao grupo de substâncias químicas dos organoclorados, produzidos pela cloração direta da molécula de bifenil. Existem 209 congêneres possíveis (moléculas variáveis em número e posição dos átomos de cloro), mas somente metade foi produzida comercialmente. Devido às suas propriedades como estabilidade térmica, resistência ao ataque de ácidos, bases e produtos corrosivos, esses compostos foram largamente utilizados na indústria e no setor agrícola nas décadas de 30 e 40 como matéria prima para diversos materiais (WAID, 1986). Os PCBs foram empregados como fluídos isolantes de capacitores e transformadores, isolantes de fios elétricos, transferentes de calor, lubrificantes, tintas do tipo epóxi, resinas, adesivos sintéticos, tintas têxteis, em papel cópia sem carbono, entre outros (LARA, 1976). Porém, devido à estabilidade química, estes compostos são de difícil destruição, persistindo no ambiente e penetrando na cadeia alimentar. Estas substâncias acumulam-se no tecido adiposo, tendo sido associados a diversas alterações prejudiciais ao organismo, como o câncer (SILBERHORN et al., 1990). No Brasil não há registros da produção de PCBs, tendo sido todo importado dos Estados Unidos, onde a partir de 1988, devido os problemas ambientais causados, seu uso foi proibido e a substituição por outros materiais foi iniciada (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA/USA, 1983).

Algumas alternativas na busca de uma degradação eficiente destes compostos foram propostas, tais como a incineração e a reciclagem de transformadores. No entanto, tais propostas apresentam um custo muito elevado (COELHO, 1999). O processo de biorremediação tem figurado como a maneira mais barata e viável de degradação de PCBs. Por biorremediação entende-se o uso de organismos vivos (microrganismos, plantas) indígenas ou não, para a degradação de compostos orgânicos (FERNANDES, 1998). Certos microrganismos utilizados na biorremediação possuem vias metabólicas adaptadas para usar estes compostos como alimento.

Uma vez comprovada a capacidade oxidativa de uma determinada cepa, ou ainda da combinação de várias cepas, o modelo de estudo de microcosmo (bioensaio no qual procura-se manter as mesmas características do substrato no ambiente, só que em pequena proporção) é adotado para verificação do potencial de adaptação e competição com a microbiota nativa (UMBUZEIRO et al., 2004). Este modelo de estudo também pode ser utilizado como estratégia para caracterização do substrato (verificar quais contaminantes estão presentes, por exemplo) no qual será feita a biorremediação (UMBUZEIRO et al., 2004).

Rhodococcus sp. isolado RHA1 foi encontrado pela primeira vez pelo grupo do Prof. Fukuda, em solo contaminado com diversos produtos tóxicos como etilbenzeno, tolueno, benzeno, propilbenzeno e PCB (HATTA et al., 1998). É uma bactéria aeróbica, Gram positiva, resistente a adversidades, possuindo múltiplos operons catabólicos (RODRIGUES et al., 2001). Embora com essas vantagens, o isolado RHA1 possui o mesmo problema que outros microrganismos durante a degradação de PCBs. Este microrganismo produz produtos intermediários tóxicos a si próprio. A degradação de ácidos clorobenzóicos induz a formação de produtos tóxicos. O isolado RHA1 foi geneticamente construído com a introdução do operon de degradação hidrolítica de 4-clorobenzoato (*pcb*) (RODRIGUES, 2000), que remove o átomo de cloro na posição *para*, produzindo 4-clorohidroxibenzoato (4-HBA) (ZAITSEV et al., 1991).

Devido à carência de estudos avaliando o potencial de adaptação de microrganismos recombinantes ao ambiente, a viabilidade dos mesmos têm sido questionada. São necessários estudos que avaliem alguns parâmetros nos níveis: molecular (estabilidade do plasmídeo e a expressão dos genes clonados), celular (variação da atividade metabólica) e populacional (poder competitivo e interações metabólicas entre os recombinantes e os microrganismos nativos) (POPOVA et al., 1999).

Com o intuito de buscar algumas informações sobre o potencial de adaptação de *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*pcb*) no meio ambiente e na turfa para fins comerciais, este projeto teve como objetivo avaliar a sobrevivência e o crescimento deste recombinante em dois substratos irradiados, contendo PCBs: turfa e amostra ambiental (sedimento) coletada na região industrializada da Baixada Santista.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 REVISÃO DE LITERATURA

2.1.1 Toxicologia Ambiental

A toxicologia ambiental é uma ciência que estuda o efeito causado pelas interações tóxicas de substâncias químicas nos ecossistemas e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos (BRILHANTE, 1999).

As substâncias químicas as quais não foram produzidas pela biota, tais como os produtos industriais, drogas terapêuticas, aditivos de alimentos, compostos inorgânicos, são chamadas de xenobióticos (PEÑA et al., 2001).

2.1.2 Compostos Xenobióticos

O crescimento desordenado da população mundial observado neste século tem estimulado a alta produção de alimentos e o aumento da atividade industrial de um modo geral. Esta política vigente, baseada na intensificação da produção de insumos acima dos limites ecologicamente justificáveis, traz como consequência o impacto ambiental negativo, que na maioria dos casos não é avaliado de forma abrangente. Este resulta na contaminação por resíduos agroindustriais dos compartimentos do ecossistema (ar/água/solo).

Com o advento dos agroquímicos sintéticos no começo deste século e com sua utilização maciça entre as décadas de 50 a 70, a humanidade se deparou com as consequências da "Revolução Verde". No Brasil, esta consistia no aumento da produção agropecuária através da aquisição de insumos agrícolas modernos e benefícios fiscais, que impelia aos produtores à utilização cada vez mais constante dos xenobióticos, o que induziu o acúmulo destes no meio ambiente. Estes compostos altamente persistentes chegaram ao homem de forma direta (contato com a pele, por ingestão ou inalação) ou indiretamente (através de alimentos contaminados).

Entre os impactos negativos dos xenobióticos, existe uma estimativa mundial de cerca de um milhão de casos de envenenamentos e de vinte mil mortes anuais, além dos problemas crônicos de saúde associados, como a esterilidade e o câncer (DELGADO, 2002; PORTA, 2002).

Um fato histórico muito importante correlacionado com o uso desses produtos foi a Guerra do Vietnã, ocorrida entre os anos de 1954 e 1975. O país se dividiu em duas metades: o Vietnã do Norte, apoiado pelos soviéticos e chineses e o Vietnã do Sul, fortemente armado pelos

norte-americanos que para lá enviaram milhares de soldados. Dentre todas armas de guerra presentes, destacaram-se os herbicidas desfolhantes (o mais famoso ficou conhecido como "agente laranja"), que foram utilizados pelos norte-americanos pela seguinte razão: como a resistência vietnamita era composta por bandos de guerrilheiros que se escondiam nas florestas, formando tocaias e armadilhas para os soldados americanos, a aspersão de nuvens de herbicidas por aviões fazia com que as árvores perdessem suas folhagens, dificultando a formação de esconderijos. Contudo, essa operação militar aparentemente bem sucedida trouxe conseqüências ambientais e de saúde catastróficas para a população local, tais como a contaminação das águas dos rios e do mar, de todos os seres vivos presentes nesses ambientes, inclusive dos seres humanos pelo consumo desta água. Os herbicidas que compõem o agente-laranja (o 2,4-D e o 2,4,5-T) também são tóxicos a pequenos animais terrestres e aquáticos, assim como a muitos insetos benéficos para as plantas. O herbicida 2,4,5-T é sempre acompanhado da dioxina, que é um ativo composto causador de deformações em recém-nascidos (tetranogênico), permanecendo no solo e na água por um período superior a um ano.

2.1.3 Agentes Tóxicos e os Seres vivos

A intensidade dos efeitos causados pelo agente tóxico pode variar de acordo com a quantidade e forma de aquisição. Assim, a exposição à ação combinada de diferentes agentes tóxicos pode ser substancialmente pior do que quando apenas um contaminante excede a quantidade tolerada pelo organismo.

Só se considera que o agente tóxico penetrou no organismo quando este alcança a corrente sanguínea, sendo transportado até diversos órgãos do corpo, onde pode causar um dano permanente, a exemplo da atividade dos carcinogênicos (causadores de câncer) ou temporário, poluentes sistêmicos (causadores de efeitos tóxicos tais como vômito e dor de cabeça).

Dentro do organismo, os tóxicos podem sofrer modificações (podem ser biotransformados por reações enzimáticas) as quais podem gerar substâncias mais ou menos tóxicas do que a original. Porém, existem ainda defesas nos organismos, as quais podem diminuir a exposição a essas substâncias, a difusibilidade através das membranas celulares ou facilitar sua excreção (PEÑA et al, 2001).

Os danos causados pelos agentes tóxicos aos seres vivos variam de acordo com o risco potencial, o qual pode ser definido como o estudo das probabilidades de fontes perigosas para a saúde e o meio ambiente ocasionar doenças ou morte, quando em concentrações superiores aquelas não assimiláveis por eles (BRILHANTE, 1999).

A percepção de risco pela população, tem sido manifestada pelas organizações não-governamentais contra os danos ecológicos – como a contaminação por dioxina em Seveso (Itália), por mercúrio na baía de Minamata (Japão), por metais pesados (mercúrio, cádmio e chumbo) nos rios amazônicos (Brasil), por bifenilas poli-halogenadas em Michigan (EUA) e em diversos locais do mundo – têm alertado o interesse público para a proteção das comunidades (BRILHANTE, 1999).

2.1.4 Compostos Organoclorados

Os compostos organoclorados caracterizam-se por apresentarem um ou mais átomos de cloro em sua estrutura química orgânica. O hexaclorobenzeno (HCB) pode ser preparado por meio da cloração do benzeno (ZUIN, 1997). O pentaclorofenol (PCP) é produzido em escala industrial, pela cloração de fenol ou pela hidrólise de HCB, e é utilizado como preservativo para madeiras e como agente antimicrobiano; como preservativo para controlar o crescimento de cupins e fungos; (na indústria de construção) para controlar mofo e bolor em superfícies como telhas e blocos de concreto; na indústria de couro, para fornecer proteção contra bolor em sapatos; na indústria de tintas, para proteção das mesmas e do látex (KIRK; OTHMER, 1979). PCP também pode ser usado como fungicida, bactericida, herbicida, molusquicida, algicida e inseticida. É corrosivo, tóxico e degradado pela luz solar e por microrganismos. Em pH 2,7 o PCP encontra-se apenas 1% ionizado, enquanto em pH 6,7 (pH de muitas águas naturais) pode estar 99% ionizado (KIRK; OTHMER, 1979).

O HCB é um fungicida seletivo usado para o tratamento de sementes, estável tanto em meio ácido como em alcalino, é praticamente insolúvel em água e solúvel em benzeno, clorofórmio, éter dietílico e hexano. Aparentemente não sofre reações fotoquímicas na atmosfera e nem hidrólise. Já foi evidenciado que o HCB pode representar risco carcinogênico ao homem (ZUIN, 1997). Os pesticidas organoclorados são relativamente inertes quando comparados a outras classes de pesticidas, pois apresentam alta estabilidade devido às ligações carbono-cloro.

Entretanto, são conhecidos por sofrerem desidrocloração, oxidação, descloração, rearranjo, hidrólise e reações fotoquímicas. As bifenilas policloradas (PCBs) possuem o grupo bifenila como unidade estrutural básica (REZENDE et al., 2003).

2.1.5 Bifenilas Policloradas (PCBs)

Os PCBs são conhecidos como bifenilas policloradas, bifenis policlorados ou ainda bifenilos policlorados. Foram conhecidos no século XIX na Europa, mas somente produzidos em grande escala a partir de 1922. Devido as suas propriedades como estabilidade térmica, resistência ao ataque de ácidos, bases e produtos corrosivos esses produtos foram largamente utilizados nas décadas de 30 a 70. Foram empregados como fluídos isolantes de capacitores e transformadores, isolantes de fios elétricos, transferentes de calor, lubrificantes, tintas do tipo epóxi, resinas, adesivos sintéticos, tintas têxteis, papel cópia sem carbono, entre outros (LARA, 1976). Entretanto, estas propriedades tornaram os PCBs grandes poluentes ambientais. Em 1966, um artigo em um jornal americano sobre a descoberta de uma contaminação por PCBs em um arquipélago sueco, causou interesse em relação ao estudo da persistência dos novos compostos no ambiente. E em 1967 e 1969 muitos relatos da ocorrência de PCBs podiam ser encontrados em diversas partes do mundo (HOLDEN; MARSDEN, 1967; HOLMES et al., 1967). Rapidamente, a bibliografia sobre os PCBs cresceu muito e novos métodos analíticos foram desenvolvidos (BACHE et al., 1972).

Existem hoje 209 diferentes congêneres, sendo que a maioria pode ser produzida em laboratório. Esses congêneres são classificados de acordo com o número de átomos de cloro e a disposição destes nos anéis bifenílicos (WOLF-RAINER et al., 2003). Os PCBs possuem a fórmula molecular geral $C_{12}H_xCl_y$, com $n = 0...10$ e $y = 10 - n$, tendo o número de identificação de cada congêneresido criado por BALLSCHMITER & ZELL (1980), e mais tarde adotado pela IUPAC (Internacional Union of Pure and Applied Chemistry) (Tabela 1). Outra maneira de se referir a cada composto é indicando a posição do átomo de cloro no anel, de acordo com a Figura 1, seguida pelo termo CB (ex. 2,2', 3-CB).

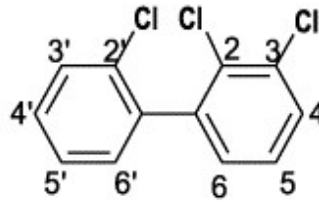


Figura 1- Esquema da molécula 2,2', 3-CB.

Tabela 1 - Sistema de identificação dos congêneres de PCBs

Número de Cloros	Usual	IUPAC
3	PCB 28	2, 4, 4' - triclorobifenil
4	PCB 77	3,3',4,4' - tetraclorobifenil
5	PCB 126	3,3',4,4',5 - pentaclorobifenil
7	PCB 180	2,2',3,4,4',5,5' - heptaclorobifenil
10	PCB 209	2,2',3,3',4,4',5,5',6,6' - decaclorobifenil

Fonte: PENTEADO et al., (2001)

Na Tabela 2 pode-se observar o grau de cloração na molécula de PCB em função do número de átomos de cloro presentes no congênere.

Tabela 2 - Congêneres de PCBs possíveis, número de isômeros, massa molecular e porcentagem de cloro para vários isômeros de PCBs

Bifenil	Número de Isômeros	Massa Molecular	% Cloro
Monocloro	3	188.7	18.8
Dicloro	12	223.1	21.8
Tricloro	24	257.5	41.3
Tetracloro	42	292.0	48.6
Pentacloro	46	326.4	54.3
Hexacloro	42	360.9	58.9
Heptacloro	24	395.3	62.8
Octacloro	12	429.8	66.0
Nonacloro	3	464.2	68.7
Decacloro	1	498.7	71.2
Total	209		

Fonte: PENTEADO et al., (2001)

Diversos estudos evidenciam que dos 209 congêneres possíveis de PCBs somente 130 podem estar presentes nas misturas comerciais (WHO, 1990). Estas foram produzidas em diferentes países com diferentes denominações, tais como: Phenoclor (na França), Kaneclor (no Japão), Clophen (na Alemanha), Aroclor (nos Estados Unidos pela Monsanto), Ascarel (Brasil) (ABNT, 1997).

Muitos desses congêneres não afetam e não produzem efeitos colaterais aos seres vivos e ao ecossistema. Outros, devido principalmente à suas propriedades físico-químicas, ou a diferentes campos de aplicação, podem afetar ou serem afetados pelo ecossistema, produzindo um desequilíbrio ambiental.

A ocorrência acidental dos PCBs no ambiente pode ocorrer devido a combustão e volatilização de material organoclorado (entrada na atmosfera) e através do lançamento nos corpos d'água como descarga industrial e urbana (rios, lagos, costa marítima). Na atmosfera os poluentes estão distribuídos entre a fase gasosa e o material particulado, possibilitando seu transporte mesmo para áreas remotas como o continente Antártico e Ártico (OEHME, 1991).

A contaminação da biota também ocorre devido ao contato com os “reservatórios” naturais (solo, sedimentos), os quais receberam atividade antrópica. Os PCBs acumulam-se no tecido adiposo dos seres vivos e a concentração do contaminante na cadeia alimentar aumenta de acordo com o nível trófico. Espécies predadoras apresentam tendência a altos fatores de bioacumulação de PCBs em relação a suas presas (LETCHER et al., 1998). O homem, por ocupar o topo da cadeia trófica, está sujeito a um maior risco de exposição (PENTEADO; VAZ, 2001). Pode-se dizer que a alimentação esteja entre os principais meios de exposição de PCBs para o homem, embora existam outras rotas de exposição (JACOBS et al., 1998).

Na Figura 2, há uma proposição para as possíveis rotas de acumulação de compostos xenobióticos pelos peixes através da água ou por seus hábitos alimentares.



Figura 2 - Possível rota de acumulação de compostos xenobióticos pelos peixes através da água ou por seus hábitos alimentares proposta (PENTEADO; VAZ, 2001)

Somente a partir de 1966 os PCBs foram considerados como poluentes do meio ambiente. A partir daí, os efeitos toxicológicos e bioquímicos das misturas de congêneres individuais têm sido estudados principalmente em peixes, células de mamíferos e até mesmo no homem (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USA, 1983). Estudos toxicológicos realizados com cobaias tem demonstrado que a contaminação por PCBs pode alterar principalmente as funções reprodutivas dos organismos. Foram observados distúrbios na maturação sexual e efeitos teratogênicos (desenvolvimento fetal anômalo) (ERICKSON, 1992). No ambiente, estes efeitos se propagam ao longo de toda a cadeia trófica, através da bioacumulação, afetando todas as espécies. No homem, os principais sintomas observados devido a exposição aos PCBs foram: cloroacne, hiperpigmentação, problemas oculares, câncer de fígado e vesícula biliar (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA/USA, 1983).

Em 1978 surgiram as primeiras leis americanas restringindo o uso dos PCBs somente para sistemas fechados como trocadores de calor (ALBAIGES, 1980). Em 1983 foi publicada lei federal (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA/ USA, 1983) proibindo o uso de PCBs em todo território americano a partir de 1988.

No Brasil não há registros da produção de PCBs, sendo todo importado dos Estados Unidos e da Alemanha. As restrições no seu uso foram implementadas através da Portaria Interministerial 19, de 2 de janeiro de 1981, a Instrução Normativa 001 SEMA/STC/CRC de 10

de junho de 1983 e a norma ABNT/NBR 3871. A Portaria estabelece, entre outras coisas, a proibição da fabricação, comercialização e uso de PCBs em todo território nacional. Porém, os aparelhos em funcionamento continuariam até a sua total substituição ou troca de produto dielétrico isento de PCBs. Além disso, a Portaria, a Instrução Normativa e a norma ABNT/NBR 3871 proibiram o descarte, armazenamento e manipulação inadequados de PCBs.

A produção mundial acumulada de PCBs foi estimada em 1.200.000 toneladas. Pela estabilidade química e amplitude de difusão de produtos contendo PCBs, cerca de 40% desta produção total entrou no ambiente (PEARSON, 1982). Grande parte ainda continua em uso, principalmente em equipamentos eletro-eletrônicos antigos, além disto, consideráveis quantidades de PCBs podem estar armazenadas em áreas de depósitos de resíduos.

Em estudos feitos com leite materno no Rio de Janeiro (PAUMGARTTEN et al., 2000), PCBs foram detectados, embora em menor concentração em relação a amostras de países industrializados. As concentrações séricas de PCBs nas amostras desta cidade, eram menores que $2 \mu\text{g.L}^{-1}$, enquanto a concentração nas amostras de leite materno em países industrializados eram 3 a 20 vezes maiores. Acredita-se que a população carioca tenha sido primeiramente exposta aos PCBs pelo consumo de peixes contaminados (FERREIRA DA SILVA, 2000), e em menor escala, via outros produtos alimentares de origem animal como carne, leite, queijo e ovos (WHO, 1996).

Além do Rio de Janeiro, outros locais no Brasil como o estuário de Santos, também possuem registros de contaminação por PCBs (CAMPANILI, 2001). A Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental de São Paulo (Cetesb), faz levantamentos periódicos sobre os níveis de contaminação da região estuarina de Santos e São Vicente – SP. Em 2001 e 2002 foram detectadas quantidades relevantes de substâncias como metais pesados e PCBs nos sedimentos, embora em menores concentrações que em 1989.

2.1.6 Biodegradação de PCBs

A alta estabilidade química dos PCBs, tornam estes compostos difíceis de serem destruídos. Existem processos químicos, físicos e bioquímicos específicos, os quais devem ser feitos cuidadosamente para se evitar a formação de compostos ainda mais tóxicos.

A degradação dos PCBs pode ser classificada em intencional, onde são empregados processos catalíticos ou alta temperatura (incineração), e natural, que é limitada a um número

restrito de congêneres. Processos intencionais como, a reciclagem de transformadores e a incineração podem gerar compostos secundários muito tóxicos e possuem um custo muito elevado, o que restringe sua prática principalmente em países em desenvolvimento (COELHO, 1999).

A degradação biológica é um importante método natural de remoção dos PCBs do ambiente, podendo ocorrer tanto por processos aeróbicos como anaeróbicos. Alguns compostos xenobióticos são muito semelhantes a compostos naturais, estando sujeitos ao metabolismo microbiano. O metabolismo dos microrganismos presentes nos locais contaminados é adaptado (desenvolve vias metabólicas complexas com enzimas especializadas e outras características celulares) para degradar os compostos presentes no local. Em ambos os processos (anaeróbico e aeróbico), a remoção do substituinte é a chave principal para sua biodegradação, já que este processo de desalogenação reduz a toxicidade dos PCBs. Esses processos de degradação ocorrem amplamente na natureza, no entanto estão limitados ao número de átomos de cloro e sua posição na molécula. Estudos de degradação aeróbica de PCBs em amostras de sedimento contaminado evidenciam a especificidade de alguns microrganismos para mono, di e tricloro bifenilas (ERICKSON, 1992). Já a biodegradação anaeróbica por bactérias têm sido um importante artifício aplicado em sedimentos contaminados de vários rios. Essa biodegradação aplica-se no processo de substituição do átomo de cloro pelo hidrogênio nas posições *meta* e *para*, com rendimento entre 10 e 90% (PENTEADO; VAZ, 2001).

Na degradação aeróbica dos PCBs por bactérias, os genes envolvidos são similares entre os diferentes isolados e ambientes, o que sugere a ocorrência de transferência genética entre os isolados. Diversos isolados recombinantes têm sido construídos buscando uma maior eficiência no processo degradativo dos compostos. A exemplo do uso da via 2,3 – dioxygenase em *Burkholderia xenovorans*. Para tanto, o gene correspondente, *bphC*, tem sido seqüenciado (GORIS et al., 2004).

2.1.7 *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*)

O gênero *Rhodococcus* inclui a ampla variedade de diversidade morfológica de microrganismos com habilidade de formar hifas, fragmentando-se em bastonetes e cocos (GOODFELLOW, 1989). Este gênero define um grupo de actinomicetos que possuem: a)

peptidoglicano formado por N-acetilglucosamina, ácido N-glucorilmurâmico, D-e L-alanina, e ácido D-glutâmico; b) parede celular com grandes quantidades de arabinose e galactose; c) combinação fosfolipídica de difosfaditilglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol e fosfatidilinositol manoses; d) cadeias de ácidos graxos contendo ácidos insaturados e tuberculoesteáricos e ácidos micólicos, e e) menaquinonas dehidrogenadas com 8 ou 9 unidades isoprenos. Todas estas características fazem este gênero bastante resistente às condições ambientais de estresse, como desidratação extrema (WARHUST; FEWSON, 1994).

Rhodococcus sp. isolado RHA1 foi encontrado pela primeira vez pelo grupo do Prof. Fukuda, em solo contaminado com diversos produtos tóxicos como etilbenzeno, tolueno, benzeno, propilbenzeno e PCB (HATTA et al., 1998). É uma bactéria aeróbica, Gram positiva, resistente a adversidades, possuindo múltiplos operons catabólicos e resistência ao antibiótico Rifampicina (rif +) (RODRIGUES et al., 2001).

Embora com essas vantagens, o isolado RHA1 possui o mesmo problema que outros microrganismos durante a degradação de PCBs. Este microrganismo produz produtos intermediários tóxicos a si próprio. A formação de produtos da degradação de 2- e 3-clorocatecol causam desativação de oxigenases. A produção destes mesmos produtos tóxicos de ácidos clorobenzóicos podem ser evitados com a remoção dos átomos de cloro antes da abertura do anel fenílico. O estabelecimento da dealogenização como primeiro passo da degradação é atrativo para o desenvolvimento de vias metabólicas recombinantes. O isolado RHA1 foi geneticamente construído com a introdução do operon de degradação hidrolítica de 4-clorobenzoato (*pcb*) (RODRIGUES, 2000), que remove o átomo de cloro na posição *para*, produzindo 4-clorohidroxibenzoato (4-HBA) (ZAITSEV et al., 1991). O replicon de *Rhodococcus* – RS (2.7 Kb) foi retirado do vetor pRC1 e clonado no sítio *Pst*I – *Xba*I dando origem ao plasmídio pRT1. O operon *pcb* ABC de *Arthrobacter globiformis* strain KZT1, presente no plasmídio pCH1 foi clonado no vetor pRT1, junto com o promotor lac (P_{lac}) e com o RS (origem de replicação), produzindo pRHD34. Após isolamento e purificação do plasmídio pRHD34, este foi introduzido em *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 por eletroporação (RODRIGUES et al., 2001). A Figura 3 ilustra este processo de montagem do plasmídio recombinante *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*pcb*).

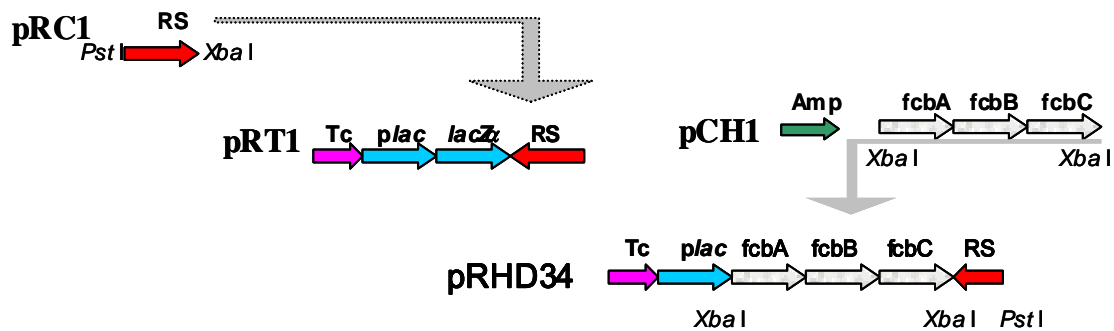


Figura 3 - Esquema para construção do plasmídeo pRHD34, vetor do operon *fcb*, clonado na bactéria *Rhodococcus* sp isolado RHA1

2.1.8 Substrato turfoso como veículo para inoculação no ambiente

A turfa é originada da decomposição de restos vegetais, encontrada em áreas alagadiças como várzeas de rios, planícies costeiras e regiões lacustres. Trata-se de um biólito, isto é, um depósito sedimentar desenvolvido a partir de processos biológicos. Além de apresentar uma grande porcentagem de matéria orgânica e nutrientes, a turfa apresenta as vantagens de baixa possibilidade de presença de patógenos e metais pesados, baixo custo e alta disponibilidade no Brasil (FRANCHI, 2003). É muito utilizada para todos os tipos de cultivos e é excelente como base para inoculantes (DIDONET, 2000).

Atualmente, com o uso das técnicas nucleares na agricultura, a irradiação de turfas para a produção de veículos de transporte de microrganismos para o ambiente têm sido amplamente utilizada. No exemplo da produção de inoculantes contendo *Rhizobium*, a turfa devidamente tratada é misturada com bactérias selecionadas para posterior aplicação às sementes das leguminosas. A turfa é esterilizada para manter a estabilidade e prolongar a sobrevivência da bactéria de interesse. A esterilização deste substrato em autoclave, por calor, poderia modificar a composição da terra e degradar o material orgânico (STEPHENS, 2000).

Muitos estudos têm sido feitos e aplicados utilizando-se substratos líquidos como veículos de inoculação de microrganismos biorremediadores em ambiente aquoso (SCHERER et al., 2004). No entanto, há uma carência de estudos buscando o desenvolvimento de substratos sólidos, necessários para o transporte dos microrganismos para o solo e sedimentos. Uma vez que a elaboração deste substrato pode afetar a habilidade do recombinante sobreviver no solo.

Para avaliar o potencial de substratos sólidos como veículos, é necessário observar a estabilidade da bactéria de interesse diante de fatores interferentes tais como: presença de outras bactérias no substrato (competitividade) e condições de armazenamento, os quais podem influenciar na capacidade biodegradadora do microrganismo.

2.1.9 O Estuário de Santos e a contaminação por PCBs

A região Estuarina de Santos e São Vicente (Baixada Santista, Estado de São Paulo), que inclui o Porto de Santos, passou por um processo acelerado de desenvolvimento urbano e industrial a partir do início do século XX. Como consequência, a área foi submetida à contaminação intensa e contínua por diversos tipos de compostos recalcitrantes, incluindo hidrocarbonetos de petróleo, bifenilos policlorados (PCBs), pesticidas, solventes orgânicos, dioxinas, furanos, metais pesados e compostos organoclorados. Apesar das medidas de redução de lançamento de poluentes adotadas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb) a partir de 1984, a contaminação ainda persiste na região. Dessa forma, a pesquisa na área é de grande importância para que se possam aprimorar as estratégias de monitoramento e criar tecnologias que visem a descontaminação do estuário. Além disso, o Sistema Estuarino Santos e São Vicente é, pelo seu próprio histórico, um ambiente interessante para a obtenção e o estudo da fisiologia e da ecologia de culturas degradadoras de compostos xenobióticos, tais como os PCBs.

A Cosipa (Compania Siderúrgica Paulista) é uma das maiores indústrias da região e está localizada em um dos locais com maiores índices de contaminação por PCBs (NAKAIAMA, 2005), daí o interesse em utilizar amostra coletada nesta região.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Curva de Crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b)

O isolado RHA1 (*fc*b) de *Rhodococcus* sp. foi cedido gentilmente pelo Dr. James M. Tiedje do National Science Foundation - Center for Microbial Ecology, Michigan State University, East Lansing, MI, USA. As bactérias foram crescidas em meio líquido sintético K1 (pH 6,8) com ácido 4-clorobenzóico (2 mM). Solução de K1 contém (g.L⁻¹): 31,8 g de K₂HPO₄, 3,54 g de NaH₂.PO₄.H₂O, 5 g de (NH₄)₂SO₄ e 0,1 g de Ca(NO₃)₂. À solução de K1 foi adicionada, uma solução de vitaminas (10 mL.L⁻¹, filtrada a 0,22 µm) contendo (mg.L⁻¹): 0,02 mg de biotina, 1 mg de ácido nicotínico, 0,5 mg de tiamina, 0,5 mg de riboflavina e 0,5 mg de inositol (ZAITSEV et al., 1991). A solução de minerais adicionada ao meio K1 (20 mL.L⁻¹, previamente autoclavada) contém (g.L⁻¹): 10 g de C₆H₉NO₆ (dissolvido e neutralizado em KOH), 14,45 g de MgSO₄.7H₂O, 3,33 g de CaCl₂.2H₂O, 0,925 g de (NH₄)₆Mo₄O₂₄.24H₂O, 0,099 g de FeSO₄.7H₂O, 250 g de EDTA, 1,095 g de ZnSO₄.7H₂O, 0,154 g de MnSO₄.H₂O, 0,0392 g de CuSO₄.5H₂O, 0,0248 g de Co(NO₃)₂. 6H₂O, e 0,0177 g de Na₂B₄O₇.10H₂O. A cultura de bactérias foi mantida em incubadora a 28°C, sob 160 rpm de agitação, sem iluminação. A densidade ótica (O.D._{600nm}) foi medida a cada 3 horas (durante as primeiras 33 horas), em um total de 66 horas, para a construção da curva de crescimento. A cada ponto obtido da curva foi coletada amostra para diluição em série (1/10) em tampão PBS (Phosphate buffer saline) (3X: 5 M NaCl e 0,5 M NaPO₄, pH 8) e plaqueamento das 4 últimas diluições (método da gota) em meio K1 sólido contendo bifenilo na tampa, de acordo com SOMASEGARAN & HOBEN (1994). Após crescimento das colônias foi feito contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para a elaboração da curva padrão foi utilizado o programa Sigma Plot versão 4.

2.2.2 Crescimento e sobrevivência do isolado RHA1 (*fc*b) na turfa irradiada

2.2.2.1 Irradiação da turfa

A turfa foi gentilmente cedida pela empresa Turfal Ltda - Indústria e Comércio de Produtos Biológicos e Agronômicos, com procedência de Balneário Arroio da Silva (SC) e pH

3,59, sendo a acidez neutralizada com carbonato de cálcio e pH próximo de 6. Alíquotas de 30 g foram colocadas em frascos de vidro (50 mL), com papel alumínio protegendo a parte interna da tampa (batoque). O material foi esterilizado por irradiação a 100 U de gammacell, dose 50 KGy e taxa de dose 0,865 por 57 horas no irradiador do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

2.2.2.2 Inoculação do recombinante na turfa

Imediatamente após a irradiação foi coletada amostra de turfa de três frascos escolhidos aleatoriamente para diluição em série (1/10). Posteriormente foi feito plaqueamento em meio NA (Agar Nutriente) e contagem de UFC, com o intuito de avaliar a presença de bactérias contaminantes antes da inoculação de *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*fc*b). A diluição em série e o plaqueamento em meio Agar Nutriente (NA) com o fungicida Micostatin (1mL.L⁻¹) foram feitos como no item 2.2.1. O meio NA contém (g.L⁻¹): extrato de carne 3 g; K₂HPO 42 g; peptona 5 g; KH₂PO₄ 0,5 g; Agar 15 g; água destilada q.s.p. 1 L, cuja composição é encontrada em DHINGRA & SINCLAIR (1985).

No tratamento 1 (isolado + bifenilo), foram adicionados 200 mg.Kg⁻¹ de bifenilo (Backer), antes da inoculação da bactéria, sendo misturado com a turfa por agitação em vórtex. Todos os procedimentos de manipulação dos tratamentos na turfa foram feitos em câmara de fluxo laminar, previamente esterilizada com luz ultravioleta, e com uso de material estéril para evitar contaminação externa.

A bactéria foi crescida primeiramente em meio seletivo K1 (50 mL) com ácido 4-clorobenzóico (2 mM) de acordo com o item 2.2.1, durante 4 dias. Um volume de 1mL dessa cultura foi inoculado em uma nova cultura (50mL) e crescida até 10⁶ células.mL⁻¹. A cultura foi precipitada por centrifugação a 2500 rpm, por 10 minutos e posteriormente lavada em 2 mL de tampão fostato (50 mM, pH 7) por duas vezes para separação das células (RODRIGUES et al., 2001). As bactérias foram ressuspendidas em K1 líquido (sem 4-CBA) e inoculadas (12 mL, o equivalente a 40% do volume do substrato no frasco) nos tratamentos 1 (isolado RHA1 (*fc*b) + 200 mg.Kg⁻¹ de bifenilo) e 2 (isolado RHA1 (*fc*b)), resultando em uma densidade final de 10⁴ células.g⁻¹.

Os seguintes tratamentos foram feitos em triplicata:

Tratamento 1: 200 mg.kg⁻¹ de bifenilo e 10⁴ células.g⁻¹.

Tratamento 2: somente 10⁴ células.g⁻¹ de turfa.

2.2.2.3 Plaqueamento e contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Após a inoculação das células nos tratamentos descritos acima, os tubos foram homogeneizados em vórtex e o ensaio foi armazenado durante três dias em incubadora a 28°C e posteriormente em câmara fria, sem iluminação. Amostras foram retiradas dos tratamentos nos seguintes tempos 0, 15, 30, 50, 75, 100 e 150 dias para avaliação do crescimento do isolado. A diluição em série (1/10) foi feita em tampão PBS 1X, o plaqueamento no meio K1 (contendo Micostatin a 1mL.L⁻¹ e antibiótico rifampicina a 50 µg.mL⁻¹) e a contagem de UFC foram feitos, utilizando-se o método da gota de acordo com SOMASEGARAN & HOBEN (1994) (Figura 4).

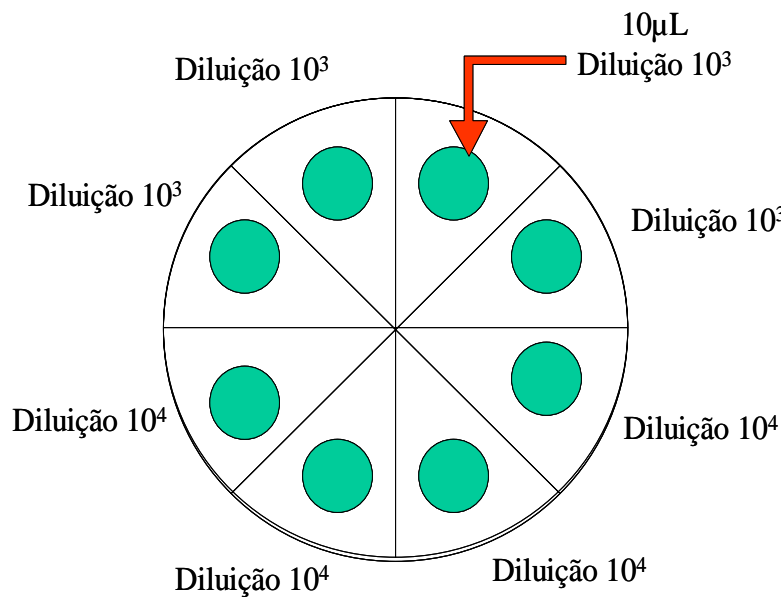


Figura 4 - Esquema de plaqueamento das diluições da amostra dos tratamentos em placa de petri (90 x 15 mm) com meio sólido contendo gotas (10 µL) para contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) (SOMASEGARAN; HOBEN, 1994)

As placas foram mantidas em incubadora a 28°C, sem iluminação durante aproximadamente 3 a 4 dias. Após este período, eram retiradas para contagem de UFC em lupa (Carl ZEISS – West/Germany, aumento de 40 X).

A curva de crescimento do isolado de RHA1 (*fcB*) de *Rhodococcus* sp nos tratamentos foi elaborada utilizando-se o programa Microsoft Excel (versão 2000).

2.2.2.4 Detecção do operon *fcB* em colônias isoladas da turfa

Colônias crescidas em ambos os meios (NA e K1) foram isoladas aleatoriamente de algumas placas para detecção dos genes *fcBA* e *fcBB* do operon *fcB* por amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As colônias foram transferidas para meio líquido e crescidas durante 4 dias. O DNA foi isolado de algumas culturas através de uso de Kit Ultraclean Mo Bio (São Paulo) e de outras de acordo com DOYLE & DOYLE (1990). Brevemente: 700 µl do tampão de extração (NaCl 1.4 M, Tris-HCl 100 mM pH 8.0, EDTA 20 mM pH 8.0, PVP - 40 1%, CTAB 2%, Proteinase K 100 µg.mL⁻¹, β - mercaptoetanol 0.2%) foi adicionado às células, seguido de agitação e mantidos a 65°C por 30 min. Após procedeu-se a extração com clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) por 3 vezes e precipitada com isopropanol, seca ao ar e ressuspendida em TE pH 8,0 (Tris - HCl 10 mM e EDTA 1 mM). O DNA total foi quantificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e as bandas comparadas com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen).

Os genes *fcBA* e *fcBB* do operon *fcB* foram amplificados por PCR com os seguintes primers para os genes *fcBA* (forward 5' AACTGATCCGCCGAGACAACATCC 3' e reverse 5' AGGCATTTTTTCGAGACGCTTCA 3') e *fcBB* (forward 5' GGTCCAGCGCGAAATCCAGTC 3' e reverse 5' CCCCCGCACACCCGCATCAAG 3'). Amplificações foram feitas em volume de 25 µL, contendo 5 pmol de primers, 200 µM de dNTPs, 400 ng.mL⁻¹ de albumina bovina, 1X *Taq* tampão, 1.5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Inc., São Paulo, SP) e 100 ng de DNA. A PCR foi iniciada com 3 min de denaturação a 94°C; seguido de 30 ciclos com denaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 60°C para *fcBA* e 55°C para *fcBB* por 30 s, extensão a 72°C por 2 min, e extensão final por 5 min (RODRIGUES et al., 2001). Cinco µl do produto de PCR foram analisados em gel de agarose 1% para análise dos produtos de PCR.

2.2.2.5 Sequenciamento do gene 16S rRNA

O gene 16S rRNA das colônias selecionadas foi amplificado por PCR com os seguintes primers para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al.,1991). Amplificações do gene 16S rRNA por PCR foram feitas em volume de 25 µL contendo 5 pmol de cada primer, 200 µM de dNTPs, 1 X *Taq* tampão, 1.5 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen Inc., São Paulo, SP) e 100 ng de DNA. A PCR foi iniciada com 3 min de denaturação a 94°C; seguido de 30 ciclos com denaturação a 94°C por 1min, anelamento a 55°C por 30 s, extensão a 72°C por 30 s e extensão final por 5 min. Cinco µL do produto de PCR foram submetidos à corrida eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,3 µg.mL⁻¹ de gel) com tampão TBE 0,5 X (Tris-Boro-EDTA) para confirmação da presença do fragmento (1500 pb).

Uma alíquota (20 µl) do produto de PCR foi corrida em gel de agarose 1% (como anteriormente descrito) a 30 volts. A banda de interesse no gel foi separada com auxílio de bisturi estéril e colocada em tubo eppendorf de 1,5 mL (previamente pesado). A purificação do fragmento foi feita com uso do kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (Amersham Biosciences).

O DNA purificado foi clonado em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* DH5α, com uso do Kit de clonagem pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega). As bactérias transformadas foram crescidas (12-14 h, 37°C e 150 rpm) em meio LB líquido (Luria Broth Base, Gibco) com ampicilina (100 µg.mL⁻¹). A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com o protocolo de BIRNBOIM & DOLY (1979) como se segue: 3 mL da cultura de *E. coli* foi precipitada por centrifugação a 5000 rpm (3 min) e o sobrenadante descartado. As células foram ressuspensas com 100 µL da solução 1 (para 100 mL: Tris - pH 8,0; 1 M 2,5 mL; EDTA 0,5 M 2,0 mL e glicose 0,9 g; H₂O q.s.p.) e posteriormente misturadas a 200 µL da solução 2 (50% NaOH 0,4 N e 50% SDS 2%) por inversão e incubadas em gelo (10 min). Posteriormente foi adicionado 150 µL da solução 3 (acetato de potássio 5 M-60 mL, ácido acético glacial -11,5 mL e água milli-Q-28,5 mL), seguido de homogeneização por conversão e conservação em gelo. Após centrifugação a 14000 rpm (20 min à 4°C), o sobrenadante foi coletado e adicionado 1,5 µL de RNase. A amostra foi então deixada a 37°C (20 min.) e adicionado 1 mL de etanol 100% (gelado), seguido de centrifugação a 14000 rpm (15 min. á temperatura de 4°C). O precipitado foi

lavado com 750 μL de etanol 70%, secado em um bloco aquecedor a 40°C e ressuspensionado em 30 μL de água milli-Q autoclavada. A quantidade e qualidade do DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 1%.

As amostras foram seqüenciadas com o ABI Prism Big Dye™ Terminator Cycle, preparadas com o Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems). A reação de sequenciamento do gene 16S rRNA foi feita em volume de 10 μL , sendo utilizado 100 ng de DNA, 5 pmol de cada iniciador (primer T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3' e primer SP6 5'-ATTTAGGTGACACTATAGAA-3', Invitrogen) 0,4 μL de "Big Dye", 4,1 μL de tampão 2,5 X (Tris-HCl 200 mM, pH 9 e MgCl_2 5 mM) e água milli-Q 3,5 μL . As amostras seqüenciadas foram lidas no "ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer" (Applied Biosystems), no laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/ USP). A análise do gene ribossômico 16S obtida das amostras foi feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project (ALTSCHUL et al., 1990).

A Figura 5 representa um esquema da elaboração e obtenção dos dados referentes a este teste.

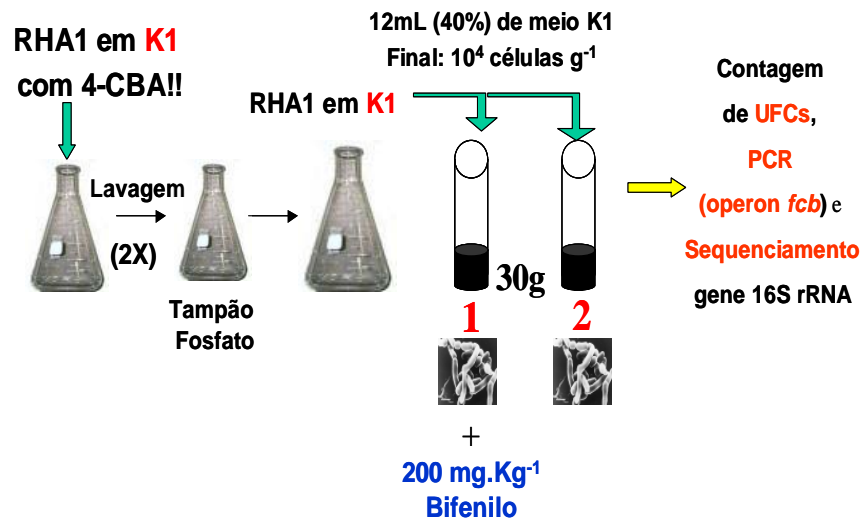


Figura 5 - Esquematização do Teste de Sobrevivência e Crescimento do isolado RHA1 (*fcb*) na turfa

2.2.3 Teste de sobrevivência de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*), *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. em amostra ambiental irradiada

2.2.3.1 Amostra ambiental: características, preparo e irradiação

A amostra ambiental foi cedida pela Profa. Dra. Vivian Pellizari, do laboratório de Microbiologia Ambiental do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. A coleta do sedimento foi realizada em conjunto com a Cetesb em uma área (ponto 4) localizada no Estuário de Santos (Estado de São Paulo), selecionado em função de suas características de contaminação e da disponibilidade operacional da Cetesb.

O sedimento do ponto 4 (Figura 6) foi coletado em frente ao terminal portuário da Companhia Siderúrgica Paulista (Cosipa) em outubro de 2000 (NAKAIAMA, 2005; PELLIZARI, 2005), com uso de um amostrador tipo corer, fornecido pela Cetesb e semelhante ao descrito por PEDERSEN et al. (1985). A amostra foi transportada para o laboratório em isopor com gelo e foi mantida em freezer -20°C .

A classificação granulométrica da amostra foi caracterizada como Silte Médio, contendo 2,4% de matéria orgânica. A concentração de PAHs totais medido na época foi de $407560,00 \text{ ng.g}^{-1}$ e $253,74 \text{ ng.g}^{-1}$ de PCBs totais.

Três dias antes da montagem do ensaio a amostra foi retirada do freezer e deixada sobre a bancada a temperatura ambiente. Após adquirir a temperatura ambiente e antes de submeter o sedimento ao processo de irradiação, ele foi homogeneizado e retirado três amostras para diluição em série e plaqueamento no meio K1 (com bifenilo na tampa). A intenção é verificar se existem bactérias nativas no sedimento com potencial biodegradador de PCBs.

Em câmara de fluxo laminar, a amostra de sedimento foi dividida em alíquotas de 5 g e colocada em 12 frascos de vidro (50 mL) previamente esterilizados em autoclave por 30 min. a 120°C e 1 atm, com a parte interna na tampa encapada com papel alumínio.

Os frascos de vidro contendo o sedimento foram irradiados por irradiação gama, dose 50 Kgy e taxa de dose 0,865 por 57 horas no irradiador do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP).

Amostras foram retiradas imediatamente após o processo de esterilização de três frascos escolhidos aleatoriamente para diluição em série (1/10, até 10^3), plaqueamento em meio NA

(com Micostatin) e contagem de UFC de acordo com o item 2.2.2.3, com o intuito de se avaliar a quantidade de bactérias nativas da amostra que resistiram ao processo de irradiação.

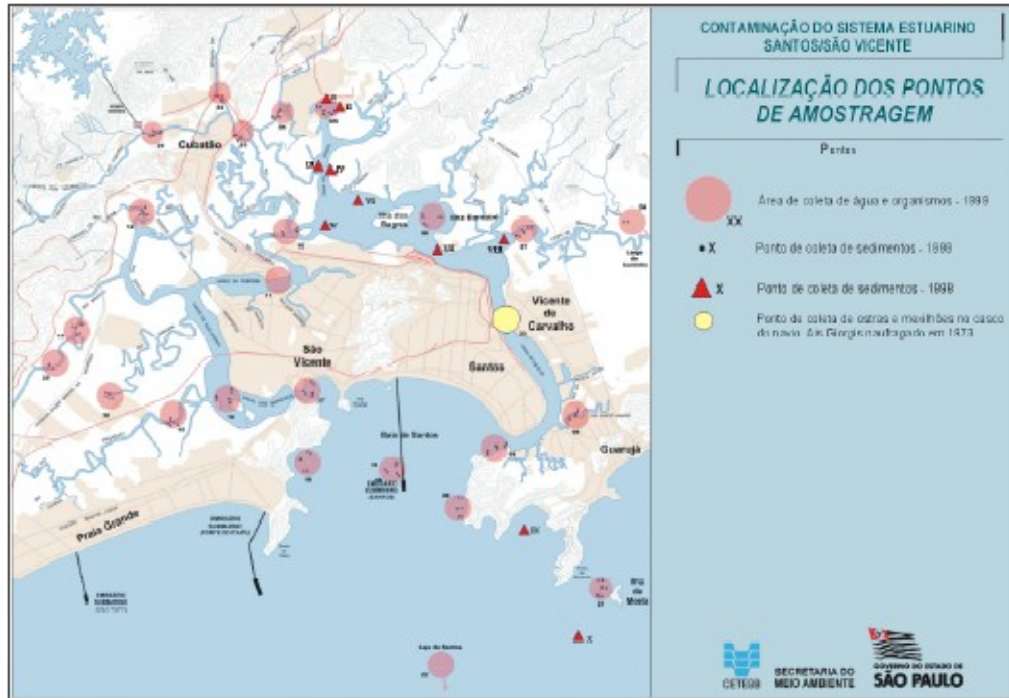


Figura 6 - Localização dos pontos amostrados pela Cetesb nas campanhas de monitoramento de 1998, 1999 e 2001 (CETESB, 2001)

2.2.3.2 Tratamentos

Os isolados foram inoculados nos seguintes tratamentos em triplicata:

- ⇒ Tratamento com *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*): meio K1 + células
- ⇒ Tratamento com *Arthrobacter* sp.: meio NA + células
- ⇒ Tratamento com *Escherichia coli*: meio LB + células
- ⇒ Tratamento Controle: somente 500 µL de meio NA.

Todos os procedimentos que envolveram a manipulação dos frascos contendo o substrato e após a inoculação dos isolados nos tratamentos tais como: pesagem de amostra para plaqueamento, foram feitos dentro de câmara de fluxo laminar previamente esterilizada com álcool etílico 100% e por luz ultravioleta (20 min.) e utilizando-se material (ex: espátula para pesagem, ponteiras) esterilizado por autoclave a 120°C.

Após a inoculação dos isolados nos tratamentos, todos os frascos foram tampados, homogeneizados em vórtex e armazenados em incubadora a 28°C sem iluminação.

2.2.3.3 Inoculação de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) no sedimento

As bactérias recombinantes foram crescidas em meio seletivo K1 (contendo 4-CBA 2 mM) sob 160 rpm de agitação e 28 °C, por 4 dias e posteriormente inoculadas (1 mL) em nova cultura (50 mL) nas mesmas condições. As células foram crescidas até atingir 10^7 células.mL⁻¹ (O.D. 0,3 nm) e precipitadas por centrifugação (10000 x g, 10 min). O pelete foi lavado duas vezes com tampão fosfato e ressuspenso em 50 mL de meio K1. Após esta etapa foi feita ainda nova diluição (1/20) em meio K1, resultando em uma densidade de aproximadamente 10^5 células.mL⁻¹. Em cada frasco do tratamento (em triplicata) contendo o isolado RHA1 (*fcB*), foram inoculados 500µL da cultura contendo 10^5 células.mL⁻¹, resultando em uma densidade final de aproximadamente 10^4 células.g⁻¹.

No tratamento Controle foram inoculados (em triplicata) apenas 500 µL de meio NA estéril.

2.2.3.4 Inoculação de *Arthrobacter* sp. e *Escherichia coli* no sedimento

A bactéria *Arthrobacter* sp. foi isolada de amostra de solo Terra Preta de Índio, um solo da região amazônica (PAZINATO et al., 2005). Previamente a montagem do tratamento contendo este isolado, foi verificada a presença do operon *fcB* através de amplificação por PCR dos genes *fcBA* e *fcBB*, de acordo com o item 2.2.2.4. O isolado foi crescido em cultura (meio líquido NA) sob 160 rpm de agitação e 28°C, sem iluminação, por 4 dias e posteriormente precipitado por centrifugação (10000 x g, 10 min). O pelete foi lavado duas vezes com tampão fosfato e ressuspenso em 50 mL de meio NA. Após esta etapa foi feita diluição (1/10) em meio NA e inoculado 500 µL da cultura em cada frasco (três) do tratamento contendo este isolado.

A bactéria *E. coli* utilizada neste ensaio foi escolhida aleatoriamente, atendendo apenas a necessidade de que fosse transformada. As bactérias foram crescidas em 50 mL de meio LB (Luria Broth Base, Gibco BRL) com ampicilina ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$) por 16h. Após este período as células foram transferidas para tubo falcon (50 mL) e precipitadas por centrifugação (10000 x g,

por 10 min.). O pelete foi ressuspensionado em 50 mL de meio LB líquido, feito uma diluição (1/20) da cultura e inoculado 500 µL em cada frasco do tratamento contendo a *E. coli* (Figura 7).



Figura 7 – Foto dos tratamentos contendo o substrato já esterilizado e os isolados de *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. inoculados em triplicata nos frascos de vidro (50mL)

2.2.3.5 Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs)

Amostras dos tratamentos foram retiradas nos tempos 0, 10, 20, 30, 40 e 50 e 70 dias para diluição em série (1/10) em tampão PBS (3X: 5 M NaCl e 0,5 M NaPO₄, pH 8) e plaqueamento em meio sólido de acordo com SOMASEGARAN & HOBEN (1994). A amostra diluída referente ao tratamento contendo o isolado RHA1 (*fc*) de *Rhodococcus* sp foi plaqueada em meio sólido seletivo para este isolado (K1, contendo o antibiótico Rifampicina a 50 µg.mL⁻¹), enquanto as amostras dos tratamentos contendo *Arthrobacter* sp. e Controle foram plaqueadas em meio sólido NA (Agar Nutriente) e para o tratamento contendo *Escherichia coli* foi utilizado o meio LB (com Ampicilina 100 µg.mL⁻¹). Todos os meios continham o fungicida Micostatin (1mL.L⁻¹).

As placas contendo meio NA e K1 referentes aos tratamentos com o isolado RHA1 (*fc*), *Arthrobacter* sp. e Controle, foram armazenadas a 28 °C, sem iluminação durante 3 - 4 dias ou até as colônias adquirissem um tamanho ideal para visualização em lupa. As placas LB contendo as diluições referentes ao tratamento com *E. coli* foram armazenadas a 37 °C, sem iluminação durante 12h.

2.2.3.6 Detecção do operon *fcb* em colônias isoladas

Colônias crescidas nos meios NA, K1 e LB foram isoladas aleatoriamente de algumas placas para detecção do operon *fcb* por amplificação por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). As colônias foram transferidas para meio líquido (o mesmo onde foram isoladas) e crescidas durante cerca de 4 dias. O DNA foi isolado através de uso de Kit Ultraclean (MO Bio; São Paulo). O DNA total foi quantificado em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio e as bandas comparadas com o marcador de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Invitrogen; São Paulo).

A presença do operon *fcb* foi avaliada apenas nas colônias isoladas das placas contendo meio K1. A detecção do operon *fcb* foi feita por amplificação dos genes *fcbA* através de PCR com uso dos seguintes primers para os genes *fcbA* (5' AACTGATCCGCCGAGACAACATCC 3' e 5' AGGCATTTTTTCGAGACGCTTCA 3') e *fcbB* (5' GGTCCAGCGCGAAATCCAGTC 3' e 5' CCCCCGCACACCGCATCAAG 3') (RODRIGUES et al., 2001). Amplificações foram feitas de acordo com o item 2.2.2.4. Cinco µl do produto de PCR foram analisados em gel de agarose 1%.

2.2.3.7 Sequenciamento do gene 16S rRNA das colônias isoladas

O gene 16S rRNA das colônias selecionadas dos tratamentos contendo os isolados foi amplificado por PCR com os seguintes primers para o domínio *Eubacteria* fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e rD1 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3') (WEISBURG et al., 1991). Amplificações do gene 16S rRNA por PCR foram feitas de acordo com o item 2.2.2.5. Cinco µl do produto de PCR foi submetida à corrida eletroforética em gel de agarose 1% contendo brometo de etídio (0,3 µg.mL⁻¹ de gel) com tampão TBE 0,5 X (Tris-Boro-EDTA) para confirmação da presença do fragmento (1500 pb).

Uma alíquota (20 µl) do produto de PCR foi corrido em gel de agarose 1% a 30 volts. A banda de interesse no gel foi separada com auxílio de bisturi estéril e colocada em tubo eppendorf de 1,5 mL (previamente pesado). A purificação do fragmento foi feita com uso do kit "GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification" (Amersham Biosciences).

O DNA purificado foi clonado em células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , com uso do Kit de clonagem pGEM[®]-T and pGEM[®]-T Easy Vector Systems (Promega). As bactérias transformadas foram crescidas (12-14 h, 37°C e 150 rpm) em meio LB líquido (Luria Broth Base, Gibco BRL) com Ampicilina (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A extração do DNA plasmidial foi feita de acordo com o protocolo de BIRNBOIM & DOLY (1979) como anteriormente citado no item 2.2.2.5. A quantidade e qualidade do DNA plasmidial foi analisado em gel de agarose 1%.

O sequenciamento do DNA de interesse foi feito de acordo com o item 2.2.2.5.

A análise do gene 16S ribossômico obtida das amostras foi feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project (ALTSCHUL et al., 1990).

A Figura 8 representa um esquema da elaboração do ensaio e coleta de resultados.

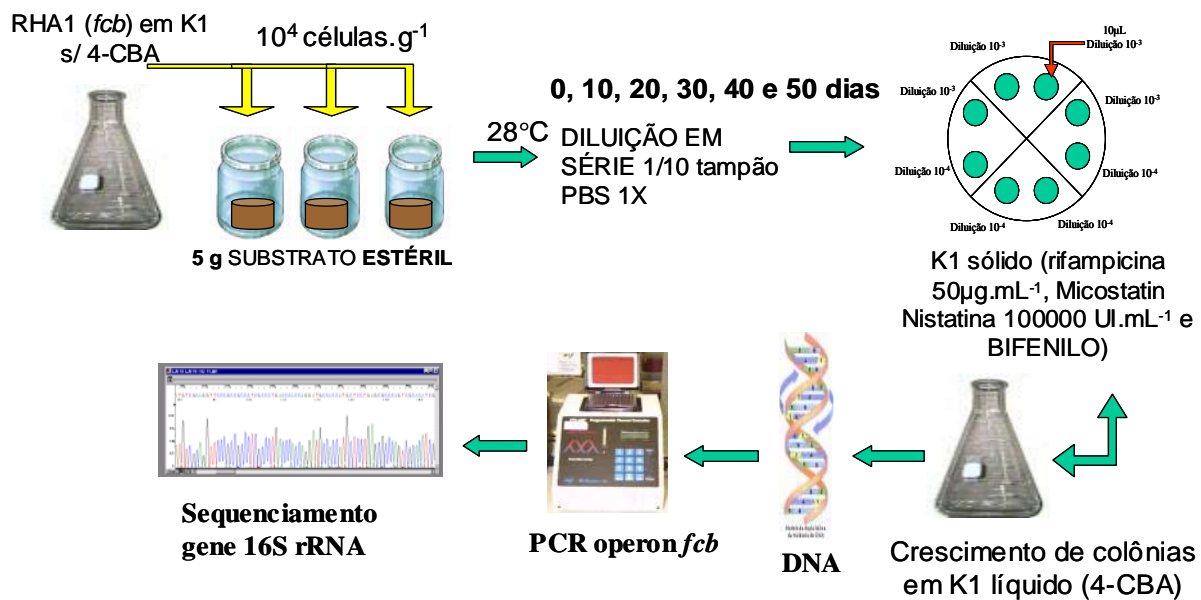


Figura 8 – Esquema representativo do Teste de avaliação do crescimento das bactérias *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*), *E. coli* e *Arthrobacter* sp., elaborado com a amostra da Cosipa

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Curva de crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b)

A fase exponencial (log) iniciou-se quando o número de bactérias atingiu cerca de $1,7 \times 10^6$ células.mL⁻¹, no primeiro dia de cultura, com menos de 30 horas. A fase estacionária foi iniciada no segundo dia, quando a cultura atingiu aproximadamente 10^9 células.mL⁻¹ (Tabela 3 e Figura 9). RODRIGUES et al. (2001) em Michigan (EUA) obtiveram uma curva de crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b) em meio seletivo K1 (4-CBA a 2 mM) com o início da fase log em cerca de 50 horas de cultura.

Tabela 3 – Resultados obtidos (O. D. _{600nm}/tempo) para a elaboração da curva de crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b) em meio seletivo K1 contendo ácido 4-clorobenzoico (2mM)

Tempo (horas)	O.D. _{600nm}
0	0,013 ± 0,001
6	0,023 ± 0,001
12	0,055 ± 0,001
18	0,156 ± 0,015
24	0,336 ± 0,020
30	0,610 ± 0,010
33	0,630 ± 0,010
46	0,780 ± 0,010
54	0,780 ± 0,050
66	0,823 ± 0,095

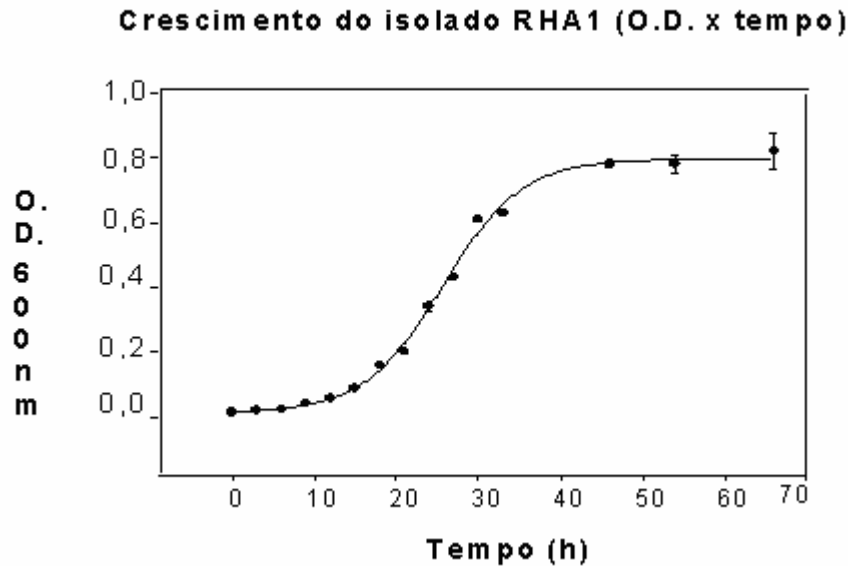


Figura 9 - Curva de crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1(*fc*b) em meio seletivo K1. A bactéria foi mantida a 28°C sob 160 rpm de agitação e sem iluminação, durante 66 horas

2.3.2 Crescimento e sobrevivência do isolado RHA1 (*fc*b) na turfa irradiada

2.3.2.1 Avaliação do crescimento através de contagem de UFCs

Não foi observado colônias isoladas da turfa logo após o processo de irradiação, sugerindo que o processo de irradiação gama (nesta dose recomendada para fins comerciais) teria inibido o crescimento das bactérias nativas neste período. Trabalhos (ANGLE et al.,1995; RODRIGUES et al., 2001) verificaram que a esterilização do solo aumenta a sobrevivência da bactéria alvo e influencia a atividade biodegradadora.

Houve crescimento de bactérias isoladas dos tratamentos os quais receberam o recombinante, como pode ser observado na Figura 10. O número de células no último ponto de coleta (150 dias) foi aproximadamente 3×10^8 células.g⁻¹ no tratamento 1 (isolado + 200 mg.Kg⁻¹ de bifênolo) e $2,5 \times 10^8$ células.g⁻¹ no tratamento 2 (somente o isolado) (Figura 10). Estes resultados sugerem que as colônias crescidas nas placas com meio K1 (contendo bifênolo na tampa), o qual é seletivo para este isolado de *Rhodococcus* sp., isoladas dos tratamentos 1 e 2 pertenciam ao recombinante. Entretanto, a presença do bifênolo no substrato (tratamento 1) parece não influenciar na dinâmica de crescimento das bactérias. As curvas de crescimento das

bactérias em ambos os tratamentos são muito parecidas (Figura 10). Estudos com microcosmos avaliando a densidade de bactérias biodegradadoras de PCB (WAGNER – DOBLER et al., 1998) verificaram que nas primeiras semanas de experimento, em ambos os microcosmos (com bifenilo a 60 mg.Kg⁻¹ e sem bifenilo) a densidade de UFC foi muito parecida. A partir da terceira semana, no microcosmo contendo bifenilo foi detectado um maior número de UFCs, estabilizando após 6 meses de experimento com 8 x 10⁹ UFC.mL⁻¹. Neste ensaio, o número de UFCs de ambos os tratamentos (com e sem bifenilo) ainda não havia estabilizado aos 150 dias. Mais pontos de coleta são necessários para avaliar uma possível diferença entre o número de UFCs nos tratamentos. Estes resultados sugerem que 200 mg.Kg⁻¹ de bifenilo no substrato aparentemente não interferiu na dinâmica de crescimento das bactérias do tratamento 1 ou não estava disponível a elas, indicando que o recombinante cresce na turfa até os 150 dias, sem a necessidade de PCB.

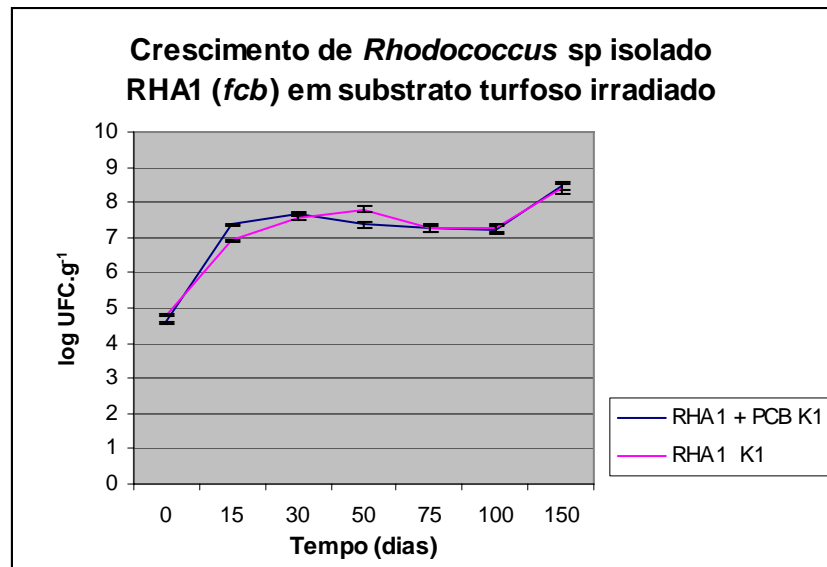


Figura 10 – Crescimento da bactéria *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b) no substrato turfoso contendo ou não 200 mg.K⁻¹ de bifenilo

Tabela 4 – Curva de crescimento de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) na turfa irradiada, usando meio seletivo K1 contendo bifênolo e rifampicina

RHA1 (<i>fcB</i>)		
	PCB/Meio K1	Meio K1
Tempo (dias)	(log UFC.g ⁻¹)	(log UFC.g ⁻¹)
0	4,58 ± 0,03	4,78 ± 0,02
15	7,36 ± 0,04	6,92 ± 0,01
30	7,65 ± 0,05	7,58 ± 0,09
50	7,37 ± 0,09	7,80 ± 0,10
75	7,27 ± 0,11	7,25 ± 0,11
100	7,24 ± 0,11	7,27 ± 0,12
150	8,47 ± 0,13	8,40 ± 0,14

2.3.2.2 Detecção do operon *fcB* nas colônias isoladas dos tratamentos

Foi extraído DNA de colônias isoladas dos tratamentos 1 (com bifênolo e células do isolado) e 2 (somente células do isolado) aos 30 e 75 dias de experimento (Figura 11). A detecção do gene ribossômico 16S por amplificação por PCR (cerca de 1500 pb) foi necessária anteriormente a amplificação dos genes *fcBA* e *fcBB*, devido a possibilidade de fungos estarem presentes nas placas. O gene ribossomal 16S foi detectado no DNA das colônias isoladas (Figura 12). Este resultado confirma a presença de bactérias nas colônias isoladas dos tratamentos e sugere que o fungicida tenha sido específico para os fungos.

Houve amplificação por PCR dos genes *fcBA* (500 pb) e *fcBB* (500 pb) nas amostras de DNA extraídas das colônias isoladas dos tratamentos (Figura 13 e 14) em ambos os tempos de coleta (30 e 70 dias). Estes dados sugerem a presença do operon *fcB* nos isolados presentes nestes tratamentos.

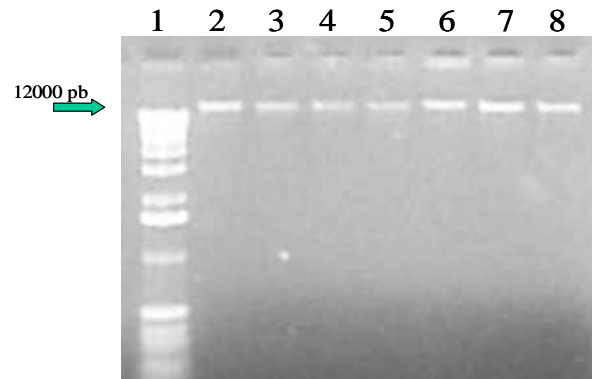


Figura 11 – Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo DNA extraído das colônias isoladas dos tratamentos. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 (células + bifenilo) aos 30 dias; 3: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 30 dias; 4: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 75 dias; 5: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 (só células) aos 30 dias; 6: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 30 dias; 7: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias; 8: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias

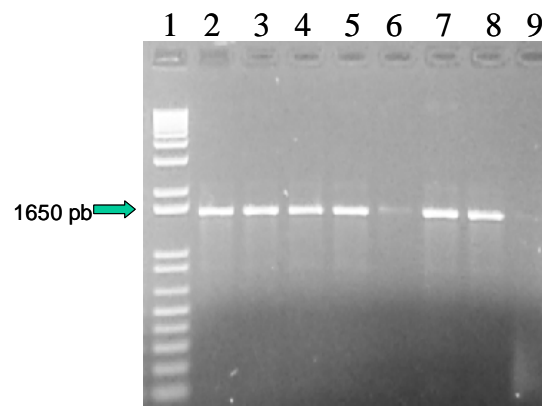


Figura 12 - Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene ribossomal 16S. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 (células + bifenilo) aos 30 dias. 3: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 30 dias. 4: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 75 dias. 5: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 (só células) aos 30 dias. 6 colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 30 dias. 7: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias. 8: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias. 9: controle negativo

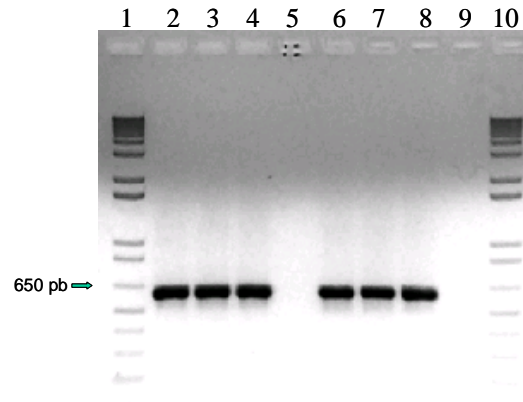


Figura 13 - Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene *fcbA* e *fcbB*. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 (células + bifenilo) aos 30 dias – primer *fcbA*. 3: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 75 dias – primer *fcbA*. 4: controle positivo – isolado RHA1 (*fcb*). 5: controle negativo - *Rhabdoderma cosoide*. 6: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 30 dias – primer *fcbB*. 7: colônia em meio K1 isolada do tratamento 1 aos 75 dias – primer *fcbB*. 8: controle positivo – isolado RHA1 (*fcb*). 9: controle negativo - *Rhabdoderma cosoide*. 10: marcador molecular 1Kb

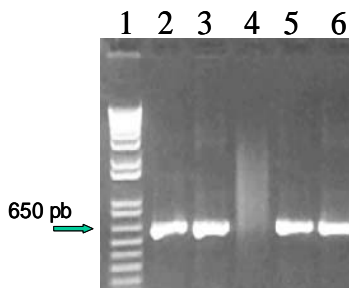


Figura 14 – Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene *fcbA* e *fcbB*. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 (só células) aos 30 dias – primer para *fcbA*. 3: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias - primer para *fcbA*. 4: controle negativo - *Rhabdoderma cosoide*; 5: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 30 dias – primer *fcbB*; 6: colônia em meio K1 isolada do tratamento 2 aos 75 dias - primer *fcbB*

A partir destes resultados é possível inferir que o DNA isolado das colônias dos tratamentos 1 e 2 na turfa possivelmente pertencia a *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*), pois continha os genes *fcbA* e *fcbB*, sugerindo a presença do operon *fcb*. Além disso, estes genes foram detectados 75 dias após a inoculação da bactéria no substrato, sugerindo que o operon *fcb* se mantenha estável no isolado RHA1 (*fcb*) de *Rhodococcus* sp. na turfa dentro deste período e nestas condições.

2.3.2.3 Sequenciamento do gene 16S ribossomal

Os fragmentos do gene 16S rRNA amplificados do DNA das colônias isoladas do tratamento 1 (*Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*fc*b) + bifenilo) e 2 (só o isolado) aos 30 e 75 dias de ensaio foram sequenciados (as duas fitas). A análise das seqüências feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project, apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene ribossomal 16S de *Rhodococcus* sp. 871- Ano 40 (AF420421.1), 98% de identidade com *Rhodococcus fascians* (AB211229.1) e *Rhodococcus wratislaviensis* isolate OUCZ48 (AY785739.1). Estes resultados sugerem que as colônias isoladas da turfa, pertenciam a *Rhodococcus* sp isolado RHA1 (*fc*b).

Estudos sobre a produção e formulação de inoculantes para aplicação comercial, tem demonstrado que para um substrato ser considerado bom para ser comercializado, além do baixo custo, o microrganismo deve sobreviver nele por um longo período de tempo (STEPHENS; RASK, 2000). A partir dos resultados obtidos neste ensaio, é possível inferir que este recombinante foi viável no substrato por cerca de 150 dias, mantendo o operon *fc*b de degradação hidrolítica por pelo menos 75 dias. Devido à capacidade de adaptação que aparentemente o recombinante possui neste substrato e aos baixos custos que a metodologia oferece, pode-se sugerir que a turfa possui um bom potencial como inoculante deste isolado de *Rhodococcus* sp para substratos sólidos.

Existe uma carência de estudos com inoculação de bactérias recombinantes neste substrato com finalidade comercial, tornando difícil à comparação deste estudo com outros.

2.3.3 Teste de sobrevivência de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*b), *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. em amostra ambiental irradiada

2.2.3.1 Avaliação do Crescimento através de contagem de UFCs

Não foram observadas colônias isoladas da amostra ambiental crescendo nas placas contendo os meios NA, K1 e LB logo após o processo de irradiação. Porém após 10 dias decorridos da inoculação dos isolados no sedimento, as UFC isoladas do tratamento controle foram detectadas (Figura 15). Este fato pode ser justificado, uma vez que mesmo ausente ou ocorrendo em baixa densidade neste substrato, estas bactérias podem ter sobrevivido graças à

capacidade de formar estruturas de resistência, como cistos, quando em condições estressantes (BASHAN, 1986; BASHAN; HOLGUIN, 1997). Embora metodologias mais eficientes na esterilização de substratos sólidos e líquidos tenham sido buscadas, ainda são detectados bactérias contaminantes (MARAFU et al., 1995; SMITH, 1992). O processo de irradiação gama nesta dose (50 KGy) aparentemente foi eficaz na eliminação parcial das bactérias nativas, permitindo o crescimento destas após 10 dias.

No tempo 0 foram detectadas: aproximadamente 10^4 UFC.g⁻¹ no tratamento que recebeu o recombinante, 10^5 UFC.g⁻¹ no tratamento inoculado com *E. coli* e 10^7 UFC.g⁻¹ no tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. (Figura 15 e Tabela 5). A densidade de células no tratamento que recebeu o isolado RHA1 (*fc*) correspondeu ao proposto na metodologia. Os meios de cultura seletivos para *Escherichia coli* (LB) e *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*) com antibióticos (ampicilina e rifampicina) selecionaram colônias brancas, difusas, de tamanho médio (Figura 16) aparentemente pertencentes a *E.coli*, e colônias amareladas pequenas, típicas de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*) (Figura 17). As colônias crescidas no meio K1 (com adição de cristais de bifenilo na tampa) possuíam coloração amarelo-escuro (Figura 17), o que pode ser devido à presença de um metabólito resultante da atividade da dioxigenase, também observado por WAGNER-DOBLER et al. (1998) em estudo com biodegradação de PCBs. As colônias isoladas do tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. eram de cor marrom claro e grandes (Figura 18).

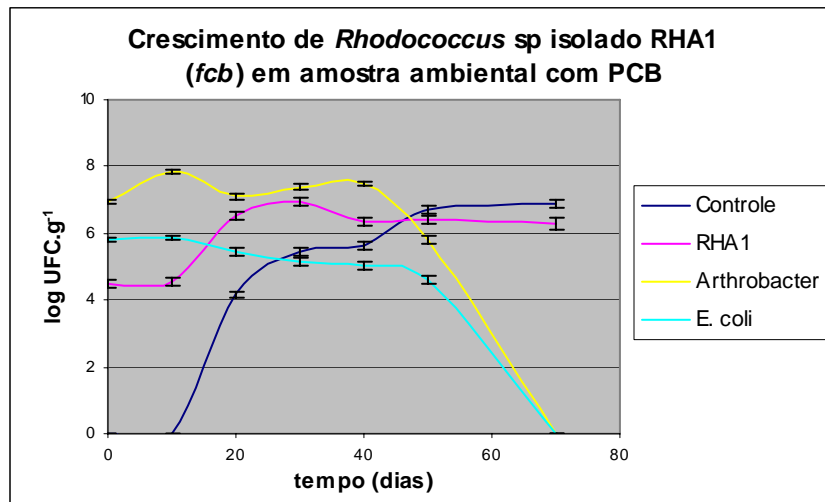


Figura 15 – Curva de crescimento do recombinante *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*) na amostra ambiental irradiada (Cosipa) comparativamente ao crescimento de *Arthrobacter* sp. e *E. coli*

Tabela 5 - Dados obtidos para a curva de crescimento dos isolados RHA1 (*fcb*), *Arthrobacter* sp. e *E. coli* na amostra da Cosipa

Tempo (dias)	Controle/meio NA (log UFC.g ⁻¹)	RHA1 (<i>fcb</i>) Meio K1 (log UFC.g ⁻¹)	<i>Arthrobacter</i> sp/meio NA (log UFC.g ⁻¹)	<i>E. coli</i> /meio LB (log UFC.g ⁻¹)
0	0 ± 0	4,51 ± 0,12	6,93 ± 0,06	5,78 ± 0,07
10	0 ± 0	4,55 ± 0,12	7,85 ± 0,06	5,84 ± 0,07
20	4,18 ± 0,10	6,54 ± 0,11	7,10 ± 0,09	5,44 ± 0,12
30	5,45 ± 0,12	6,93 ± 0,11	7,38 ± 0,09	5,14 ± 0,12
40	5,65 ± 0,11	6,35 ± 0,10	7,50 ± 0,08	5,06 ± 0,10
50	6,72 ± 0,11	6,40 ± 0,13	5,82 ± 0,11	4,61 ± 0,12
70	6,87 ± 0,13	6,28 ± 0,16	0 ± 0	0 ± 0

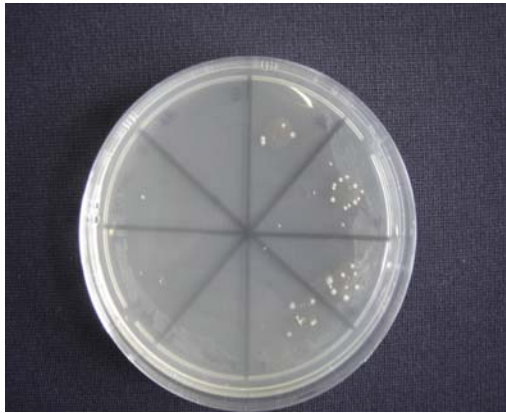


Figura 16 – Placa de petri (90 x 15 mm) contendo meio LB (ampicilina 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e colônias isoladas do tratamento inoculado com *E. coli* – tempo 0



Figura 17 – Placa de petri (90 x 15 mm) contendo meio K1 e colônias isoladas do tratamento inoculado com *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*) - tempo 0. Observa-se uma coloração amarelada em torno das colônias indicando a presença da enzima dioxigenase. A cor roxa do meio ocorre devido à mistura de rifampicina (vermelho escuro)



Figura 18 – Placa de petri (90 x 15 mm) contendo meio NA e colônias isoladas do tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. – tempo 0

As colônias isoladas do tratamento contendo *E. coli* cresceram a 37°C em uma noite. As colônias referentes ao tratamento com *Arthrobacter* sp. cresceram dentro de 3 – 4 dias a 28°C, após o plaqueamento. Porém, ao contrário do que foi observado no teste anterior (no substrato turfoso), as colônias em meio K1, isoladas do tratamento inoculado com o isolado RHA1 (*fc*) demoraram cerca de 10 dias para crescer nas placas a 28°C.

Houve estabilidade no número de UFC isoladas dos tratamentos contendo *E. coli* e *Arthrobacter* sp até o quinto dia após a inoculação. Uma queda lenta no número de UFC no tratamento contendo a *E. coli* foi observado após este período. Enquanto aparentemente o número de células no tratamento contendo *Arthrobacter* sp., teria se mantido estável por cerca de 40 dias.

Observou-se após os 50 dias uma queda muito intensa no número de UFC nos tratamentos inoculados com *E. coli* e *Arthrobacter* sp. Sugerindo a morte muito repentina de células no substrato ou um estado no qual elas não podiam ser recuperadas. Em estudo com microcosmo utilizando *E. coli* com gene *AtzA* para degradação de atrazina clorohidrolase, foi obtido grande sucesso no processo degradativo, sugerindo que esta bactéria seria capaz de adaptar-se ao substrato, uma vez que lhe seja dado condições fisiológicas para isto (STRONG et al., 2000). HENSCHKE et al. (1991) efetuaram monitoramento do crescimento de um recombinante de *E. coli* em solo (microcosmo) através de reação em cadeia da polimerase (PCR). Constataram que após 28 dias não havia mais células da bactéria alvo na amostra. Entretanto, RECORBET et al. (1993), encontraram 5×10^5 células.g⁻¹ do recombinante de *E. coli* após 40 dias com uso de imunofluorescência e somente 10^2 UFC.g⁻¹ após 15 dias. Usar outra metodologia em conjunto com a de contagem de UFC, para detecção da *E. coli* neste estudo, seria necessário para se concluir com mais precisão se este isolado sobrevive por mais tempo na amostra da Cosipa. É preciso considerar também a seguinte possibilidade: os recombinantes inoculados têm tendência a agregar-se no solo para tornarem-se mais estáveis. As bactérias inoculadas que não se agregam podem morrer (RICHAUME et al., 1992), o que pode também justificar a morte delas rapidamente no substrato. A bactéria *Arthrobacter* sp. em estudos anteriores, cresceu em microcosmos contendo diuron, mas eventualmente não podia ser cultivada (WIDHEM et al., 2002), sugerindo que neste estudo o fato de não conseguir número de UFC suficiente não signifique que ela não esteja mais presente na amostra.

O número de UFC do tratamento contendo o isolado RHA1 (*fcB*) aumentou durante os primeiros 30 dias, seguido de uma estabilização até o último ponto de coleta de dados aos 70 dias (2×10^6 células.g⁻¹) (Figura 10).

2.2.3.2 Amplificação do gene 16S rRNA e dos genes *fcA* e *fcB* por PCR

Colônias foram isoladas dos tratamentos (exceto o Controle) logo no primeiro dia (tempo 0) após a inoculação para a extração de DNA (Figura 19). Porém, devido a qualidade do DNA extraído das colônias isoladas dos tratamentos inoculados com *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) e *Arthrobacter* sp. no tempo 0, não foi possível a amplificação do gene 16S rRNA (Figura 20). Embora a qualidade do DNA total extraído das colônias isoladas do tratamento contendo *E. coli* não estivesse em boa qualidade, o gene 16S rRNA foi amplificado (Figura 20). No ponto de coleta 50 e 70 dias, também foi extraído DNA de colônias isoladas do tratamento inoculado com o recombinante (Figura 19), do qual foi amplificado por PCR o gene 16S rRNA (Figura 20). Porém, não foi possível obter DNA com qualidade o suficiente para amplificação do gene 16S rRNA das colônias isoladas do tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. em nenhum ponto de coleta de dados.

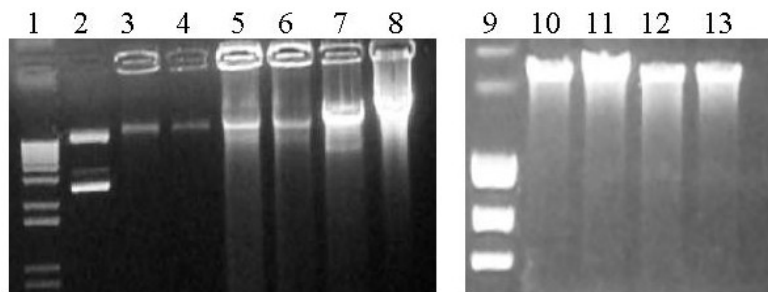


Figura 19 – Géis de agarose (1%) corados com brometo de etídio contendo produtos da extração de DNA total. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: Marcador de peso molecular pGEM (6,5µL= 100ng). 3 e 4: colônia em meio K1 isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcB*) - 0 dias. 5 e 6: colônia em meio NA isolada do tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. - 0 dias. 7 e 8: colônia em meio LB isolada do tratamento inoculado com *E. coli* - 0 dias. 9: Marcador molecular Low Mass (4µL). 10 e 11: colônia em meio K1 isoladas do tratamento inoculado com RHA1 (*fcB*) - 50 dias. 12 e 13: colônia em meio K1 isoladas do tratamento inoculado com RHA1 (*fcB*) - 70 dias

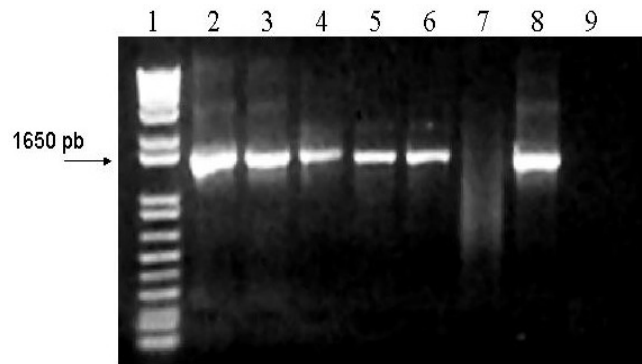


Figura 20 - Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene 16S ribossomal. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2: controle positivo RHA1 (*fcb*). 3 e 4: colônia em meio K1 isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcb*) – 50 dias. 5 e 6: colônia em meio K1 isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcb*) – 70 dias. 7: colônia em meio K1 isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcb*) - 0 dias. 8: colônia em meio LB isolada do tratamento inoculado com *E. coli* - 0 dias. 9: colônia em meio NA isolada do tratamento inoculado com *Arthrobacter* sp. - 0 dias

Os fragmentos (500 pb) correspondentes aos genes *fcbA* e *fcbB* do operon *fcb* foram amplificados por PCR nas colônias isoladas aos 50 e 70 dias do tratamento inoculado com *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcb*) (Figura 21). Indicando a presença do isolado RHA1 (*fcb*) nestas colônias. Estes genes não foram detectados através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) no DNA extraído de *Arthrobacter* sp. antes da inoculação na amostra da Cosipa, indicando que esta bactéria não possui os genes de degradação hidrolítica de ácido 4-clorobenzóico (4-CBA).

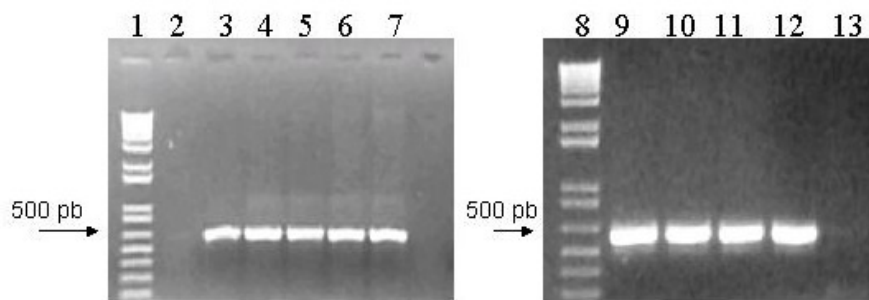


Figura 21 - Géis de agarose (1%) corados com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene *fcbA* (2 a 7) e *fcbB* (9 a 13). 1 e 8: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2 e 13: controle negativo - *Rhabdoderma cosoide*. 3: controle positivo RHA1 (*fcb*). 4, 5, 9 e 10: colônia em meio K1 isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcb*) – 50 dias. 6, 7, 11 e 12: colônia em meio K1 isoladas do tratamento inoculado com RHA1 (*fcb*) – 70 dias

2.2.3.3 Sequenciamento do gene 16S rRNA

Os fragmentos do gene 16S rRNA amplificados das colônias isoladas (tempo 0) do tratamento inoculado com *E. coli* e do tratamento inoculado com *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) (50 e 70 dias) foram sequenciados (as duas fitas: F e R). A análise das seqüências pertencentes às colônias isoladas aos 50 e 70 dias do tratamento inoculado com o isolado RHA1 (*fcB*) feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project, apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene ribossomal 16S de *Rhodococcus* sp. isolado ZC-3 (AM076672.1) (Figura 22) e 97% de identidade com o gene ribossomal 16S de *Rhodococcus* sp. isolado 3-1 (AY451325.1) (Figura 23). A análise das seqüências pertencentes às colônias isoladas no tempo 0 do tratamento inoculado com *E. coli*, apresentou 99% de identidade com a seqüência do gene ribossomal 16S de *E. coli* isolado K-12 MG 1655 (U00096.2) (Figura 24). Estes resultados sugerem que as colônias isoladas desses tratamentos, pertenciam a *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) e *E. coli*, corroborando com os resultados obtidos na amplificação dos genes *fcBA* e *fcBB* nos mesmos.

Verificou-se que o isolado RHA1 (*fcB*) de *Rhodococcus* sp. sobreviveu neste sedimento e nestas condições de armazenamento durante 70 dias. ANGLE et al. (1996) em estudo com inoculação de recombinante (*Pseudomonas aureofaciens* 3732 RN - L11) em solo, verificou que a bactéria sobreviveu aproximadamente 63 dias em solo peneirado e 96 dias na rizosfera, concluindo que em solos impactados o recombinante sobreviveria menos. WAGNER – DOBLER et al. (1998) verificaram que as bactérias biodegradadoras de PCB sobreviveram até cerca de 180 dias em microcosmo enriquecido com bifenilo (60 mg.Kg⁻¹). RONCHEL et al. (1995) em estudo com a bactéria *Pseudomonas putida* degradando alkylbenzoatos em solo, concluíram que o tempo de sobrevivência da bactéria no substrato, recombinante ou não, foi influenciado pela presença do composto tóxico na amostra. A bactéria biodegradadora sobrevive por mais tempo na amostra com o agente tóxico e quando ela é inoculada em densidade baixa (10⁴ a 10⁵ UFC.g⁻¹). Entretanto, em densidade baixa (10⁴ UFC.g⁻¹), mas na ausência do contaminante, o crescimento estabilizou-se em 10⁶ UFC.g⁻¹ dentro de 30 dias. RODRIGUES et al. (2001) inoculou *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fcB*) em solo contendo ou não 4-CB e concluiu que a bactéria cresce em solo não estéril e estéril. Porém na ausência de 4-CB este isolado não cresce em solo não estéril. RODRIGUES et al. (2001) alerta para dois componentes importantes para se obter

sucesso na tecnologia de remediação: eficiência na inoculação de baixa densidade de células e crescimento no substrato contaminado. Analisando-se os resultados obtidos neste teste e comparando-se com os estudos anteriores, pode-se observar que o isolado RHA1 (*pcb*) de *Rhodococcus* sp. (tendo sido inoculado em baixa densidade (10^4 células.g⁻¹)), teve o crescimento estabilizado em 10^6 UFC.g⁻¹ após 40 dias, sugerindo que os PCBs presentes na amostra (253,74 ng.g⁻¹) não influenciaram o crescimento do recombinante. É preciso considerar a hipótese de que estes compostos já não estavam mais disponíveis para a bactéria biodegradadora, uma vez que esta amostra foi coletada há 5 anos atrás.

Não foi possível comparar a viabilidade de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*pcb*) na amostra da Cosipa em relação a *Arthrobacter* sp. devido à ausência de DNA total extraído das colônias isoladas do tratamento inoculado com este isolado. Entretanto, *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*pcb*) aparentemente é mais viável nesta amostra e dentro destas condições, em relação a *E. coli*. Foi observado que a umidade nos frascos foi diminuindo no decorrer dos dias, o que pode ter influenciado a sobrevivência do isolado de *E. coli*. Porém, as bactérias do tratamento controle, parecem não ter sido influenciadas por este parâmetro, tendo sido observado aumento no número de UFC mesmo na ausência de umidade (Figura 15). Uma vez que a amostra deste ponto de coleta (Cosipa) possui aspecto lodoso, pode-se questionar o crescimento das bactérias nativas e de *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*pcb*) em ambiente com umidade não controlada. NAIK et al. (1994) examinaram a sobrevivência e a transferência gênica em microrganismos em solos secos antes da inoculação nos microcosmos, concluindo que estes morreram muito mais rapidamente em relação aos que estavam agregados nos solos úmidos. No solo seco podem ser liberados íons inorgânicos como o manganês, os quais podem ser tóxicos para as bactérias (WOLF et al., 1989).

Pode-se inferir que, a partir dos resultados obtidos na amplificação dos genes *pcbB* e *pcbA* por PCR nas colônias isoladas do tratamento com o recombinante, que houve estabilidade do operon *pcb* até os 70 dias. Porém, estudos são necessários analisando-se a presença destes genes em um número maior de colônias, se ocorre a expressão destes genes e se há degradação do PCB no substrato. RONCHEL et al. (1995) verificou que o plasmídio introduzido em *Pseudomonas putida* foi transferido no solo entre os isolados de *Pseudomonas*, porém os genes de degradação presentes não foram capazes de metabolizar os contaminantes. RODRIGUES et al. (2001) em estudo com o isolado RHA1 (*pcb*) de *Rhodococcus* sp. verificou que o operon *pcb* parece ser

estável em solo estéril e não estéril, tendo detectado os genes *fcba* e *fcbb* em 700 colônias isoladas dos tratamentos durante 60 dias de ensaio.

BELLICANTA (2005), encontraram em sedimentos da região do Estuário de Santos, seqüências similares aos genes *alkB4* de *Rhodococcus* sp., sugerindo a presença desta bactéria neste local. Neste ensaio, observou-se que o meio seletivo K1 contendo rifampicina, selecionou colônias as quais continham o operon *fcba*, indicando que elas provavelmente pertenciam ao recombinante inoculado e recuperado do sedimento.

Estudos com microcosmos e microrganismos recombinantes (POPOVA et al., 1999) tem concluído que o desenho do microcosmo afeta a sobrevivência e o crescimento do microrganismo no solo, o que torna difícil à comparação de resultados obtidos em estudos elaborados de forma muito diferentes. Porém, os estudos com microcosmos adequados devem buscar as informações necessárias de forma simples e barata, tais como neste ensaio.

```
5' TGGCGGCGTGCTTACACATGCAAGTCGAGCGGTAAGGCCCTTCGGGGTACACNA
GCGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGTGATCTGCCCTGCACCTTCGGGATAAGCCTG
GGAAACTGGGTCTAATACCGGATATGACCTTCGGCTGCATGGCTGAGGGTGGAAAGG
TTTACTGGTGCAGGATGGGCCCCGCGCCTATCAGCTTGTGGTGGGGTAATGGCCTA
CCAAGGCGACGACGGGTAGCCGACCTGAGAGGGTGACCGCCACACTGGGACTGAGA
CACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAG
CCTGATGCAGCGACGCCGCGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGAAACCTCTTTCAC
AGGACAACGAAAGTGACGGACCTGCAAAAACACCG 3'
```

Figura 22 - Seqüência do fragmento do gene 16S rRNA de colônia isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcba*) aos 50 dias, com 99% identidade com *Rhodococcus* sp. isolado ZC-3 (AM076672.1)

```
5' TTCGGTNGGCTNCTTGTTCGNCTTCGTCCNNATCGCCGATCCCACCTTCGAC
GGCTCCCTCCCACAAGGGGTAGGCCACCGGCTTCGGGTGTTACCGACTTTCAT
GACGTGACGGGCGGTGTGTACAAGGCCGGGAACGTATTCACCGCAGCGTTGCT
GATCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCACGGGGTCGAGTTGCAGACCCCGAT
CCGAAC TGAGACCAGCTTTAAGGGATTTCGCTCCACCTCACGGTCTCGCAGCCCT
CTGTACTGGCCATTGTAGCATGTGTGAAGCCCTGGACATAAGGGGCATGATGAN
TTGACGTCGTCCCCACCTTCCCTCCGAGTTGACCCCGGNAGTCTCTTACGAGTNC
CCACCAT TACGTGCTGGNAANATAAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGNGGNACTTA
ACCCAANATCTCAGCAGNTG 3'
```

Figura 23 - Seqüência do fragmento do gene 16S rRNA de colônia isolada do tratamento inoculado com RHA1 (*fcba*) aos 70 dias, com 97% identidade com *Rhodococcus* sp. isolado 3-1 (AY451325.1)

```

5' TGGTTTCTTGTTCCTTCAACCCAGTCATGAATCACAAAGTGGTAAGCGCCCTCCC
GAAGGTTAAGCTACCTACTTCTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGT
GTGTACAAGGCCCGGGAACGTATTACCCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGC
GATTCCGACTTTCATGGAGTCGAGTTGCAGACTCCAATCCGGACTACGACGCACTT
TATGAGGTCCGCTTGTCTTCGCGAGGTGCTTCTCTTTGTATGCGCCATTGTAGC
ACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACGTCATCCCCACCTTC
CTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACCGCTGGCAACA
AAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTTACAACACGAGC
TGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACATTTCTCATCTC
TGAAAACCTCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCAATTA
ACCACATGCTCCACCGCTTGGCGGCCCGATTTCATTTGAGTTTAA 3'

```

Figura 24 - Seqüência do fragmento do gene 16S rRNA de colônia isolada do tratamento inoculado com *E. coli* - 0 dias, com 99% identidade com *E. coli* isolado K-12 MG 1655 (U00096.2)

2.2.3.4 Detecção de bactéria nativa com potencial biodegradador de PCB

Observou-se o crescimento de colônias ($2,3 \times 10^4$ células.g⁻¹ durante os 10 primeiros dias de ensaio) no meio K1 contendo bifenilo, antes da amostra ser submetida a irradiação. Algumas destas colônias foram isoladas e crescidas em meio K1 líquido contendo ácido 4-clorobenzóico (2 mM). As culturas foram precipitadas para extração de DNA (Figura 25), amplificação dos genes *pcbA* e *pcbB* por PCR. O gene 16S rRNA foi amplificado com uso dos seguintes conjuntos de primers: 341 –357F 5'CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' e 357R 5' CTG CTG CCT CCC GTA GG 3', 685-704F 5' GTA GSG GTG AAA TSC GTA GA 3' e 704R 5' TCT ACG SAT TTC ACC SCT AC 3', 1099-1114F 5' GCA ACG AGC GCA ACC C 3' e 1114R 5' GGG TTG CGC TCG TTG C 3'. As seqüências dos fragmentos foram analisadas qualitativamente e montadas no programa Phred/Phrap/Consed.

Os resultados observados demonstraram que as colônias crescidas no meio K1 com 4-CBA pertenciam realmente a bactérias (Figura 26) e além disso, possivelmente possuem os genes *pcbA* e *pcbB* para degradação de ácido 4-clorobenzóico (Figura 27). Em locais contaminados, a presença dos genes que codificam as enzimas de degradação dos compostos xenobióticos pode indicar o potencial genético para os processos de biodegradação (BELLICANTA, 2004).

A análise das seqüências (das duas fitas: F e R) feita através de BLAST nos sites do NCBI e Ribossomal Database Project, apresentaram 98% de identidade com a seqüência do gene 16S ribossomal de *Exiguobacterium aurantiacum* (NCDO 2321) (EA16RNAA). Esta bactéria qual já possui registros anteriores de alta capacidade de degradação de compostos xenobióticos em amostra de lago oligotrófico na Europa (LÓPEZ et al., 2005). Porém, não foram encontrados na literatura registros deste microrganismo em amostras ambientais nacionais.

Estes resultados não apenas sugerem a presença de bactérias biodegradadoras de PCBs na amostra de sedimento da Cosipa, como também que estas bactérias potencialmente podem degradar ácido 4-clorobenzoico (uma vez que foi verificado crescimento destas em meio líquido K1 com 4-CBA). Porém, mais estudos deverão ser feitos após o isolamento destas bactérias do sedimento para a obtenção de informações mais confiáveis acerca deste potencial biodegradador.

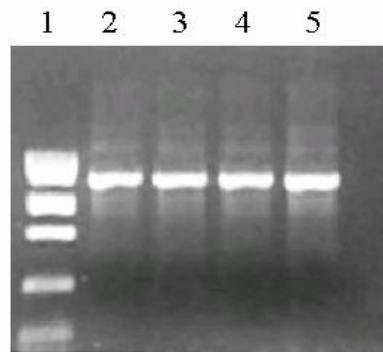


Figura 25 - Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da extração de DNA total. 1: Marcador molecular Low Mass (4µL). 2 – 5: colônia isolada do sedimento da Cosipa antes de irradiada, crescida em meio K1 com 4-CBA

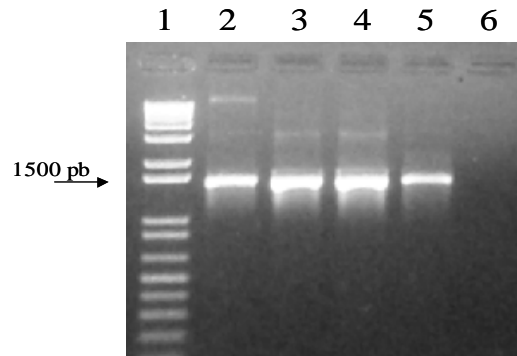


Figura 26 - Gel de agarose (1%) corado com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene 16S rRNA. 1: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 2 – 5: colônia isolada do sedimento da Cosipa antes de irradiada, crescida em meio K1 com 4-CBA. 6: controle negativo

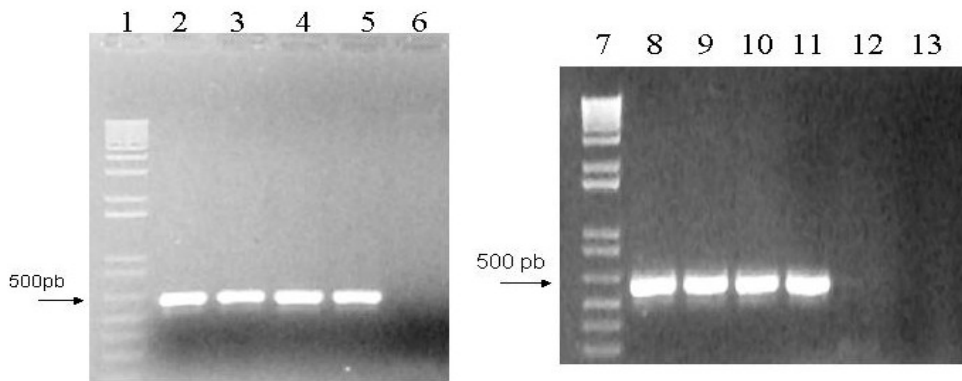


Figura 27 - Géis de agarose (1%) corados com brometo de etídio contendo produtos da amplificação do gene *fcbA* (2 a 5) e *fcbB* (9 a 11) das colônias isoladas do sedimento da Cosipa (tempo 0) e crescidas em meio K1 com 4-CBA. 1 e 7: Marcador molecular 1Kb DNA Plus Ladder; 6 e 12: controle negativo - *Rhabdoderma cosoide*. 13: controle negativo H₂O

```

5 ' GACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCGCGGAATTCGATTAAGG
AGGTGATCCAGCCGCACCTTCCGATACGGCTACCTTGTTACGACTTCACC
CCAATCATCTGTCCCACCTTCGGCGGCTGGCTCCCTAAGGTTACCTCACC
GACTTCGGGTGTTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGA
CCCGGGAACGTATTCACCGCAGTATGCTGACCTGCGATTACTAGCGATTTC
CGACTTCATGCAGGCGAGTTGCAGCCTGCAATCCGAAC TGAGAACGGCTT
TCTGGGATTGGCTCCACCTCGCGGCTTCGCTGCCCTTTGTACCGTCCATT
GTAGCACGTGTGTAGCCCAACTCATAAGGGGCATGATGATTTGACGTCAT
CCCCACCTTCCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCCTTAGAGTGCCCAACT
AAATGCTGGCAACTAAGGACAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCCCT
GCCCCGAAGGGGAAGGTACATCTCTGTACCGGTCAGGGGGATGTCAAGA
GTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGC
TTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGCCTTGCGACCGTACT
CCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTTCAGCACTGAAGGGCGGAAAC
CCTCCAACACCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCT
AATCCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGCGTCAGTTATAGGCCA
AAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACC
GCTACACGTGGAATTCACCTCTTCTCTCCTATACTCAAGCCTCCCAGTTT
CCAATGGCCCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAG
GCCGCCTGCGCGCGCTTACGCCCAATAATTCGGGACAACGCTTGCCACC
TACGTATTACC GCGGCTGCTGGCAGTAGTTAGCCGTGGCTTTCCTCGCAA
GGTACCCTCAAGGTGCCGCCATTGCC TGCGGCAC TTGTTCTTCCCTTACA
ACAGAAC TTTACGACCCGAAGGCCTTCATCGTTCACGCGGCGTTGCTCCA
TCAGACTTTCGTCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC GTAGGA
GTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCCG
CTATGCATCGTCGCCCTTGGTGGGCCATTACCCCACTAGCTAATGCA
CCGCAAAGCCATCCCCAGGCGACGCCGAAGCGCCTTTCATCCTCGGACCA
TGCGGTCCGATGACCCATCCGGTATTAGCCCCGATTTCTCGTGGTTATCC
CAGACCTGAGGGCAGGTTCTTTACGTGTTACTCACCCGTCGCGGCTCAT
TCCATCGACTTCCCCCGAAGGGTTCCGTCGACTTCC TGCGCTCGACTTG
CATGTATTAGGCACGCCCGCAGCGTTTCGTCTGAGCCAGGATCAAAC TCT
AATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTCGACCATATGGGAGAGCT
CCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGA 3 '

```

Figura 28 - Sequência do gene 16S rRNA de colônia isolada do Sedimento da Cosipa - 0 dias, crescida em meio K1 com 4-CBA. Possuindo 98% identidade com o gene ribossomal 16S de *Exiguobacterium aurantiacum* (NCDO 2321) (EA16RNAA) e 1676 pb

3 CONCLUSÕES

- *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*) sobrevive e cresce na turfa irradiada, na presença e ausência de 200 mg.Kg⁻¹ de bifenilo até 150 dias.
- *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*) sobrevive e cresce na amostra de sedimento da Cosipa irradiada até 70 dias.
- O operon *fc* foi estável durante 70 dias no recombinante *Rhodococcus* sp. isolado RHA1 (*fc*) inoculado neste sedimento nestas condições.
- As bactérias *Escherichia coli* e *Arthrobacter* sp. isolado de um solo de Terra Preta de Índio da Amazônia, não sobreviveram no sedimento coletado na região do Estuário de Santos.
- Foi observada a ocorrência de bactérias nativas do sedimento coletado na região do Estuário de Santos, com potencial degradador de ácido 4-clorobenzóico.

REFERÊNCIAS

- ALBAIGES, J. **Analytical techniques in environmental chemistry**. London: Pergamon Press, 1980. v. 3, 167 p.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 215, p. 403 – 410, 1990.
- ANGLE, J.S.; LEVIN, M.A.; GAGLIARDI, J.V.; McINTOCH, M.S. Validation of microcosms for examining the survival of *Pseudomonas aureofaciens* (lacZY) in soil. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, n. 8, p. 2835-2839, 1995.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **Líquidos isolantes elétricos : determinação do teor de Bifenilas Policloradas; NBR 13882/97**, São Paulo, 1997.
- BACHE, C.A; SERUM, J.W.; YOUNGS, W.D.; LISK, D.J. Polychlorinated biphenyl residues: accumulation in Cayuga Lake trout with age. **Science**, London, v. 177, n. 55, p. 1191 –1192, Sept.1972.
- BALLSCHMITER, K.; ZELL, M. Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. **Fresenius Zeitschrift für Analytische Chemie**, Berlin, v. 302, p. 20-320, 1980.
- BASHAN, Y. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 51, p.1089 –1098, 1986.
- BASHAN, Y.; HOLGUIN, G. *Azospirillum* - plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 43, p.103 -121, 1997.
- BELLICANTA, G. S. **Diversidade de genes catabólicos em amostras de sedimentos do sistemas estuarino de Santos e São Vicente, SP**. 2004. 112 p. Tese de Doutorado, Área de Ciências (Microbiologia). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- BIRNBOIM, H.C.; DOLY, J. A rapid alkaline extractor procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 7, p. 1513-1518, 1979.

BRILHANTE, O.M. Gestão e avaliação da poluição, impacto e risco na saúde ambiental. In: BRILHANTE, O.M; CALDAS, L.Q. A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999. p. 19-73.

CAMPANILI, M. Poluição ainda é grande no estuário da Baixada Santista. **Estadão Meio Ambiente**. Disponível em: (<http://www.estadao.com.br/ciencia/noticias/2001/ago/22>). Acesso em: 15 Sept. 2005.

COELHO, P.E. “PCBs: Incineração de fornos de cimento e reciclagem de equipamentos em serviço. **Revista Eletricista Moderno**, São Paulo, v. 303, p. 150-154, 1999.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. **Sistema estuarino de Santos e São Vicente**. São Paulo, 2001. 178 p.

DELGADO, I.F.; BARRETO, H.H.C.; KUSSUMI, T.A.; ALLELUIA, I.B.; BAGGIO, C.A.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Níveis séricos de pesticidas organoclorados e bifenilos policlorados em habitantes da área metropolitana do Rio de Janeiro. **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p. 401 – 411, 2002.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. **Basic plant pathology methods**. Gainesville: CRC Press, 1985. 355 p.

DIDONET, A.D.; LIMA, O.S.; CANDATEN, A.A. Realocação de nitrogênio e de biomassa para os grãos, em trigo submetido à inoculação de *Azospirillum*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 35, p. 401-411, 2000.

DOYLE, J.J.T.; DOYLE, J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, Ithaca, v. 12, p. 13-18, 1990.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Polychlorinated biphenyls (PCBs): manufacturing, processing, distribution in commerce and use prohibitions. Use in electrical equipment. Statement of policy. **Federal Register**, v. 48, n. 35, pt.761, 1983.

ERICKSON, M.D. **Analytical chemistry of PCBs**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1992. 171 p.

FERREIRA-DA-SILVA, A.M. **Bifenilas policloradas e pesticidas organoclorados persistentes em peixes e botos da Baía de Guanabara, RJ.** 2000. 90 p. Dissertação (Mestrado, em Gestão Ambiental). Universidade Estácio de Sá, Rio de Janeiro, 2000.

FERNANDES, F. M. Bioremediation – state of the art. In: 3th LATIN AMERICAN BIODEGRADATION AND BIODETERIORATION SYMPOSIUM, 3., 1998, Florianópolis.

FRANCHI, J.G.; SÍGOLO, J.B.; BAPTISTA DE LIMA, J.R. Turfa utilizada na recuperação ambiental de áreas mineradas: metodologia para avaliação laboratorial. **Revista Brasileira de Geociências**, São Paulo, v. 3, p. 255-262, 2003.

GOODFELOW, M.; WILLIAN, S.T.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G. Genus *Rhodococcus*. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, East Lansing, v. 4, p. 2362-2371, 1989.

GORIS, J.; DE VOS, P.; CABALLERO-MELLADO, J.; PARK, J.; FALSEN, E., QUENSEN, J. F., TIEDJE, J. M.; VANDAMME, P. Classification of the biphenyl- and polychlorinated biphenyl-degrading strain LB400^T and relatives as *Burkholderia xenovorans* sp. **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 54, p.1677-1681, Nov. 2004.

HATTA, T.; SHIMADA, T.; YOSHIHARA, T.; YAMADA, A.; MASAI, E.; FUKUDA, M.; KIYOHARA, H. Meta-Fission product hydrolases from a strong PCB degrader *Rhodococcus* sp. RHA1. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, Amsterdam, v. 85, p.174-179, 1998.

HENSCHKE, R.B.; HENSCHKE, E.J., SCHMIDT, F.R. Monitoring survival and gene transfer in soil microcosms of recombinant *Escherichia coli* designed to represent an industrial production strain. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 247 – 252, 1991.

HOLDEN, A.V.; MARSDEN, K. Organochlorine pesticides in seals and porpoises. **Nature**, London, v. 216, p. 1274 – 1276, 1967.

HOLMES, D. C., SIMMONS, J. H., TATTON, J. O. G. Pesticide residues in foodstuffs in Great Britain XII. Organochlorine insecticide residues in hens' eggs from battery, deep. Litter and free-range-systems and from house containing insecticide thermal vaporizes. **Journal of Science of Food and Agriculture**, London, v. 20, n. 8, p. 495 –498, 1969.

JACOBS, M.N.; JOHNSTON, P.A.; WYATT, C.L. Organochlorine residues in fish oil supplements: comparison with industrial grade oils. **Chemosphere**, Oxford, v. 37, p. 1709, 1998.

KIRK, R.E.; OTHMER, D.F. **Encyclopedia of chemical technology**, New York: John Wiley, 1979. 867 p.

LARA, W.H. Bifenilas policloradas – sua história e seus problemas. In: CONGRESSO DE TOXICOLOGIA TROPICAL 1., 1976, Manaus. **Anais...** Manaus: Sociedade Brasileira de Toxicologia: ALATOX, 1976. p. 181-184.

LETCHER, R.J.; NORSTRON, R.J.; MUIR, D.C.G. Toxicological evaluation and endocrine activity of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). **Environmental Science and Technology**, Iwoa, v. 32, p. 1656, 1998.

LÓPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; JUARES, B.; MARTINEZ-TOLEDO, M. V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Identificantion of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities. **Ecotoxicology**, Oak Ridge , v. 14, p. 299-312, 2005.

MARAFU, L.; KARANJA, N.; RYDER, M. Legume inoculant production and use in east and southern Africa. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 27, p. 735 –738, 1995.

NAIK, G.A.; BHAT, L.N.; CHOPADE, B.A.; LYNCH, J.M. Transfer of broad-host-range antibiotics resistance plasmids in soil microcosms. **Currently Microbiology**, New York, v. 28, p. 209-215, 1994.

NAKAYAMA, C. R. **Degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4-TCP) e 2,6-diclorofenol (2,6-DCP) por culturas enriquecidas a partir de sedimento contaminado do Sistema Estuarino Santos e São Vicente**. 2005. 188 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

OEHME, M. Further evidence for long-range air transport of polychlorinated aromatics and pesticides: North America and Eurasia to the Arctic. **Science of Total Environmental**, Amsterdam, v. 8, n. 106, p. 43, 1991.

PAZINATO, J.M.; PANDOLFI, V.; DUARTE, F.; MEDAU, R.; FERREIRA, S.; TSAI, S.M. Isolamento e Caracterização de Actinomicetos em Terra Preta Antropogênica. Piracicaba. In: I ENCONTRO CIENTÍFICO DA PÓS GRADUAÇÃO DA ESALQ, 1., 2005, Piracicaba. Piracicaba: ESALQ, 2005. 1 CD ROM.

PEARSON, C.R. Halogenated aromatics. In: HUTZINGER, O. **The handbook of environmental chemistry** Berlin; New York: Springer – Verlag, 1982. chap. 3, p. 90-116.

PEDERSEN, T.F.; MALCOLM, S.J.; SHOLKOVITZ, E.R. A lightweight gravity corer for undisturbed sampling of soft sediments. **Canadian Journal of Earth Sciences**, Ottawa, v. 22, p. 133-135, 1985.

PELLIZARI, V.H. Detecção e diversidade molecular de genes metabólicos em amostras ambientais. In: WORKSHOP INTERNACIONAL SOBRE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 2005, Campinas. Campinas: UNICAMP, 2005. 1 CD-ROM.

PEÑA, C.E.; DEAN, E.C.; AYALA-FIERRO, F. **Toxicologia ambiental: evaluación de riesgos y restauración ambiental**. Disponível em : (<http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb>). 2001. Acesso em: 01 Out 2005.

PENTEADO, J.C.P.; VAZ, J.M. The legacy of the polychlorinated biphenyls (PCBs). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, p. 390-398, 2001.

POPOVA, Lyu; PERCHURKIN, N.S.; MAKSIMOVA, E.E.; KARGATOVA, T.V.; KRYLOVA, Tyu; LOBAVA, T.I.; BOYANDIN, A.N. Experimental microcosms as models of natural ecosystems for monitoring survival of genetically modified microorganism. **Life Support Biosphere Science**, New York, v. 6, n. 3, p. 193-197, 1999.

PORTA, M.; KOGEVINAS, M.; ZUMETA, E.; SUNYER, J.; RIBAS-FITA, N. Concentraciones de compuestos tóxicos persistentes el población española: el rompe cabezas sin piezas y la protección de la salud pública. **Gaceta Sanitaria**, Barcelona, v.16, n.3, p. 257 – 266, 2002.

RECORBET, G.; PICARD, C.; NORMAND, P.; SIMONET, P. Kinetics of the persistence of chromosomal DNA from genetics engineered *Escherichia coli* introduced into soil. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 59, n.12, p. 4289 – 4294, 1993.

REZENDE, M.O.O.; DEL GRANDE, M.; ROCHA, O. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do rio Piracicaba / SP – Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 678-686, 2003.

RICHAUME, A.; SMIT, E.; FAURIE, G.; ELSAS, J. van. Influence of soil type on the transfer of plasmid RP4 p from *Pseudomonas fluorescens* to introduced recipient and to indigenous bacteria. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 168, p. 123 –129, 1992.

RODRIGUES, J.L.M. **Construction and detection of the recombinant *Rhodococcus* sp. strain RHA1 for mineralization of PCBs in soil.** 2000. 100 p. Thesis (PhD) - Michigan State University, Michigan, 2000.

RODRIGUES, J. L. M.; MALTSEVA, O.V.; TSOI, T.V.; HELTON, R.R.; QUEENSEN III, J.F.; FUKUDA, M.; TIEDJE, J.M. Development of a *Rhodococcus* recombinant strain for degradation of products from anaerobic dechlorination of PCBs. **Environmental Science Technology**, Iowa, v. 35, p. 663-668, 2001.

RONCHEL, M.C.; RAMOS, C.; JENSEN, L.B., MOLIN, S.; RAMOS, J.L. Construction and behavior of biologically contained bacteria for environmental applications in bioremediation. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 61, p. 2990 – 2994, 1995.

SCHERER, E.M; WANG, Q.Q.; HAY, A.G.; LEMLEY, A.T. The binary treatment of aqueous metribuzin using anodic fenton treatment and biodegradation. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 47, n. 2, p.154-161, 2004.

SILBERHORN, E.H.; GLAUDERT, H.P.; ROBERTSON, L.W. Carcinogenicity of polyhalogenated biphenyls: PCBs. **Critical Review and Toxicology**, London, v. 20, p. 439-496, 1990.

SMITH, R. S. Legume inoculant formulation and application. **Canadian Journal of Microbiology**, Ottawa, v. 38, p. 485-492, 1992.

SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H.J. **Handbook of Rhizobia**, New York: Springer – Verlag, 1994. 450 p.

STEPHENS, J.H.G.; RASK, H.M. Inoculant production and formulation. **Field Crops Research**, Amsterdam, v. 65, p. 249 – 258, 2000.

STRONG, L.C.; McTavish, H.; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. Field-scale remediation of atrazine-contaminated soil using recombinant *Escherichia coli* expressing atrazine chlorohydrolase. **Environmental Microbiology**, New York, v. 2, n. 1, p. 91 – 98, 2000.

TEIXEIRA, G. Aqui, o Brasil também pode ser campeão mundial. **Brasil Nuclear**, v. 9, n. 25, 2002. Disponível em: (<http://www.aben.com.br/texto/rev25/9.html>). Acesso em 13 ago. 2005.

UMBUZEIRO, G.A.; ROUBICEK, D.A.; STOPPE, N.C.; RODRIGUES, P.F.; RECH, M.C.; COIMBRÃO, C.A., SATO, M.I.Z. Caracterização de amostras de sedimento hídrico do estuário de Santos utilizando análises de toxicidade aguda e genotoxicidade e quantificação de bactérias dos ciclos biogeoquímicos. **O mundo da saúde**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 436 – 443, 2004.

WAGNER – DOBLER, I.; PIPKE, I.R. TIMMIS, K.N., DWYER, D.F. Evaluation of aquatic sediment microcosms and their use in assessing possible effects of introduced microorganisms on ecosystem parameters. **Applied Environmental Microbiology**, Baltimore, v. 58, p.1249 –1258, 1992.

WAID, J.F. **PCBs and the environment**. Boca Raton: CRC Press, 1986. 3 v.

WARHUST, A.W.; FEWSON, C.A. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. **Critical Review Biotechnology**, London, v. 14, p. 29-73, 1994.

WEISBURG, W.G.; BARNS, S.M.; PELLETIER, D.A.; LANE, D.J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, Baltimore, v. 173, p. 697-703, 1991.

WIDEHEM, P.; AT-ASSA, S.; TIXIER, C.; SANCELME, M.; VESCHAMBRE, H.; TRUFFAUT, N. Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. **Chemosphere**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 527-534, 2002.

WOLF, D. C.; DAO, T. H.; SCOTT, H. D.; LAVY, T. L. Influence of sterilization methods on selected soil microbiological physical and chemical properties. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.18, p. 39-44, 1989.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental health criteria for PCBs and PCTs: international register of toxic chemicals. Geneva, 1990. pt. 2.

ZAITSEV, G.M.; TSOI, T.V.; GRISHENKOV, V.G.; PLOTNIKOVA, E.G.; BORONIN, A.M. Genetic control of degradation of chlorinated benzoic acids in *Arthrobacter globiformis*, *Corynebacterium sepedonicum*, and *Pseudomonas cepacia* strains. **FEMS FEMS Microbiology Letters**, Palo Alto, v. 81, p.171-176, 1991.

ZUIN, V. G. **Determinação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em águas naturais de subsuperfície de áreas afetadas por resíduos de organoclorados**. 1997. 66 p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 1997.