

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

SUZYANE PORFIRIO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BIOESTÍMULO E BIOAUMENTO NA
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLO NÃO
SATURADO E SEM HISTÓRICO**

RECIFE

2016

SUZYANE PORFIRIO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BIOESTÍMULO E BIOAUMENTO NA
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLO NÃO
SATURADO E SEM HISTÓRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ester Ribeiro Gouveia

Co-orientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha
Gomes

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Suzyane Porfírio da
Aplicação de bioestímulo e bioaumento na biodegradação de
paclobutrazol em solo não saturado e sem histórico/ Suzyane Porfírio da
Silva– Recife: O Autor, 2016.

70folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Ester Ribeiro Gouveia

Coorientador: Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia Industrial,
2016.

Inclui referência e anexo

- 1. Biodegradação 2. Resíduos industriais 3. Testes de toxicidade**
I.Gouveia, Ester Ribeiro (orientadora) II. Gomes, Ulrich
Vasconcelos da Rocha (coorientador) III. Título

620.11323

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-167

SUZYANE PORFIRIO DA SILVA

**APLICAÇÃO DE BIOESTÍMULO E BIOAUMENTO NA
BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM SOLO NÃO
SATURADO E SEM HISTÓRICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial á obtenção do título de Mestre em Biotecnologia Industrial.

Aprovada em: 29/02/2016

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^aDr.Will de Barros Pita

UFPE

Prof^a Dr^a. Norma Buarque Gusmão

UFPE

Prof^aDr^a. Ester Ribeiro Gouveia

UFPE

Recife, 29 de fevereiro de 2016

Dedico este trabalho ao meu patrono, São Bento

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o princípio de tudo;

Agradeço a meus pais Áurea e Marcos, por todo o amor;

Às minhas irmãs Adryane e Juliane pela companhia e apoio; à tia Dalva e tia Tita por serem sempre solícitas;

Agradeço demais ao meu namorado Ewerton, por estar sempre do meu lado, nos momentos de alegria e de tristezas, dias de semana e feriados, apoiando em tudo.

Agradeço à minha orientadora Ester Gouveia por ter me cedido a honra de sua orientação, pela paciência e aprendizado adquirido.

Agradeço ao meu co-orientador Ulrich Vasconcelos, pelo apoio durante a pesquisa;

Agradeço às minhas amigas de laboratório Bárbara, Natalie, Thatiana, Mariana, Eloyza, Karén, Mayara e Jéssica pelo companheirismo e trabalho em equipe;

Agradeço à professora Ana Christina do departamento de genética, pela oportunidade de realizar os ensaios de fitotoxicidade, à Silvany e Erlânia que também ajudaram a adquirir conhecimentos nesta área.

Meu agradecimento especial à minha madrinha Ir. Severina Maria da Misericórdia Divina, pelas suas incessantes orações.

RESUMO

O paclobutrazol (PBZ) é o regulador vegetal utilizado no manejo da produção da mangueira na maioria dos pomares sob as condições semiáridas do Nordeste. Apesar da sua eficiência na produtividade, estudos demonstram que o PBZ permanece ativo no solo por muito tempo e isso pode afetar o desenvolvimento das próximas colheitas, reduzindo o vigor vegetativo. A biodegradação do paclobutrazol em solo não saturado e com histórico de aplicação, foi avaliada durante 49 dias usando glicerol e resíduos industriais (glicerol do biodiesel, torta de amendoim e torta de gergelim) como fontes de adicionais de carbono. Os resíduos agroindustriais (torta de amendoim e torta de gergelim) além de carbono, também são fontes de nitrogênio. Foram realizados estudos cinéticos do consumo de PBZ, além da contagem dos micro-organismos totais, do perfil do pH e da fitotoxicidade no início e final dos experimentos. Adicionalmente, estudos investigativos acerca de produtos da biodegradação foram realizados, com análises de espectroscopia de infravermelho. A torta de amendoim foi o melhor resíduo agroindustrial, sendo usado nas quatro estratégias realizadas na próxima etapa. Nessas quatro estratégias de biodegradação foram realizados experimentos usando 100, 80, 50 e 20 % m/m do solo sem histórico com a adição de 0, 20, 50 e 80 % m/m de solo com histórico, respectivamente. A adição de solo com histórico (50 ou 80% m/m) e a torta de amendoim favoreceram a biodegradação do solo sem histórico, cuja biodegradação foi maior que 95%. O resíduo selecionado apresentou-se como uma adequada fonte de carbono e de nitrogênio, e, o solo com histórico um eficiente reservatório de micro-organismos capazes de degradar o PBZ.

Palavras chave: Regulador vegetal, metabolismo, co-substratos.

ABSTRACT

Paclobutrazol (PBZ) is a growth regulator used in the management of mango production in most orchards in semi-arid conditions of the Northeast. Despite its efficiency in productivity, studies show that the PBZ remains active in the soil for a long time and this may affect the development of the next crop, reducing plant vigor. The biodegradation of paclobutrazol (PBZ) was evaluated during 49 days using glycerol and agro-industrial wastes (biodiesel-derived glycerol, peanut cake and sesame cake) as additional carbon sources and unsaturated soil with a history of PBZ application. Kinetic studies were performed of PBZ consumption beyond count of total microorganisms, pH profile and phytotoxicity at the beginning and end of the experiments. Additionally, investigative studies on the characterization of biodegradation samples were performed with infrared spectroscopy analysis. Biodiesel-derived peanut cake was the best agro-industrial waste, and this was used in the following four strategies. Four biodegradation strategies were performed using 100 %, 80 %, 50 % and 20 % of soil without history with the addition of 0 %, 20 %, 50 % and 80 % of soil with history, respectively. The addition of soil with history (50 or 80%) and the selected waste (peanut cake) favored biodegradation of soil without history, with rates about 95 %. The peanut cake waste proved to be an adequate source of carbon and nitrogen, and the soil with history, proved to be an efficient reservoir of microorganisms capable of biodegrading PBZ.

Key-words: Plant growth regulator, cometabolism, cosubstrates.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	iii
1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos.	14
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
3.1 Reguladores de Crescimento	15
3.2 Biorremediação: estratégias e aplicações em solos.....	21
3.3 Micro-organismos e mecanismos envolvidos na biodegradação	23
3.4 Fatores físicos associados à biodegradação	26
3.5 A Trajetória dos estudos sobre a biodegradação do PBZ.....	27
3.6 Resíduos Industriais e sua utilização em bioprocessos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1 Solo.....	33
4.2 Paclobutrazol	34
4.3 Resíduos industriais: obtenção e caracterização	34
4.4 Tortas de amendoim e de gergelim	35
4.5 Ensaio de biodegradação	36
4.6 Métodos analíticos	38
4.6.1 Determinação da concentração de células.....	38
4.6.2 Determinação da concentração de PBZ.....	39
4.6.3 Determinação da concentração de glicerol.....	40
4.6.4 Fitotoxicidade.....	40
4.6.5 Espectroscopia de infravermelho.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42

5.1 Biodegradação utilizando a estratégia de bioestímulo	42
5.2 Biodegradação utilizando bioaumento e bioestímulo	47
5.3 Caracterização das amostras de biodegradação usando espectroscopia FTIR	51
5.4 Fitotoxicidade.....	53
6. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXO A – CÓPIA DO TRABALHO PUBLICADO.....	64

LISTA DE FIGURAS

página

Figura 3.1 — Esquema simplificado das etapas da biossíntese de giberelinas e pontos de inibição por reguladores de crescimento (X, x = maior e menor atividade, respectivamente). Precursores nos protoplastos originam o difosfato de geranilo (GPP), difosfato de farnesilo (FPP) e finalmente o difosfato de geranylgeranilo (GGPP) que é ciclizado via copalil difosfato (CPP) para entcaureno. No retículo endoplasmático e posteriormente no citoplasma o entcaureno é oxidado a GA em várias etapas. (RADEMACHER, 2000)	16
Figura 3.2 — Estrutura química do paclobutrazol (MILFONT et al, 2008).....	18
Figura 5.1 — Crescimento dos experimentos usando bioestímulo. E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.....	42
Figura 5.2 — Valores do Ph nos ensaios E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: Torta de amendoim e E5: torta de gergelim....	44
Figura 2.3 — Concentração de PBZ (a) e biodegradação (b) durante os experimentos com bioestímulo: E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.....	45
Figura 5.4 — Concentração de PBZ (a) e biodegradação (b) durante os experimentos com bioestímulo e bioaumento: E6: 100 % de solo sem histórico; E7: 80 % de solo sem histórico; E8: 50 % de solo sem histórico; E9: 20 % de solo sem histórico.	49
Figura 5.5 — Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do PBZ dissolvido em água (a) e do metanol(b).	51
Figura 5.6 — Espectros das amostras de solo dos experimentos E1 (a) e E2 (b) nos tempos inicial e final.	52

LISTA DE TABELAS

	página
Tabela 3.1 —Micro-organismos degradadores de xenobióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).....	24
Tabela 3.2 — Oleaginosas com potencial para produção de biodiesel no Brasil. Teor de óleo (%), produtividade (Kg/ha/ano) e produção de óleo (Kg/ha/ano) (ABDALLA et al, 2008).....	31
Tabela 4.1 — Caracterização físico-química do solo.....	33
Tabela 4.2 — Caracterização do glicerol bruto.....	35
Tabela 4.3 — Caracterização da torta de Amendoim e gergelim.....	37
Tabela 4.4 —Condições experimentais usando bioestímulo.....	37
Tabela 4.5 — Condições experimentais dos ensaios de bioestímulo e bioaumento	38
Tabela 5.1 — Concentração de células e crescimento obtidos com 49 dias nos experimentos E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.....	43
Tabela 5.2 — Pesquisas anteriores sobre a biodegradação de PBZ em solos não saturados	46
Tabela 5.3 —. Concentração de células e crescimento obtidos com 49 dias nos experimentos E6: 100 % de solo sem histórico, E7: 80 % de solo sem histórico, E8: 50 % de solo sem histórico, E9: 20 % de solo sem histórico.....	47
Tabela 5.4 —Índices de germinação das amostras no início e no final dos experimentos de biodegradação: E1 (sem fonte adicional), E2 (glicerol comercial), E3 (glicerol bruto), E4 (torta de amendoim) e E5 (torta de gergelim).	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PBZ— Pacllobutrazol

K_d— Coeficiente de adsorção

K_{OW} — Coeficiente de partição octanol-água

FTIR — Infravermelho por Transformada por Fourier

ton — tonelada

EFSA — European Food Safety Authority

EPA— Environmental Protection Agency

INTRODUÇÃO

A mangueira (*Mangifera indica* L.) é uma planta da família Anacardiaceae importante economicamente no Submédio São Francisco, onde são colhidos mais de 90 % das mangas exportadas pelo Brasil, sendo a variedade Tommy Atkins a que ocupa 95 % dos 40 mil hectares cultivados (EMBRAPA, 2004). Entretanto, naturalmente existe uma restrição nos períodos de safra da manga, pois a mangueira é caracterizada por possuir um antagonismo entre vigor vegetativo e a intensidade da floração, de tal forma que todo fator que reduz o vigor vegetativo, sem alterar a atividade metabólica, favorece a floração (AVILAN; ALVAREZ, 1990).

Este antagonismo é um dos maiores problemas da cultura já notório em diversas regiões brasileiras, causando baixa produtividade e sérios problemas de comercialização. A necessidade de buscar soluções para este problema implicou no avanço de pesquisas visando adequar o florescimento da mangueira às épocas mais favoráveis em relação ao mercado e a fitossanidade. A indução floral por meio de reguladores surgiu como uma solução que possibilitou o escalonamento da produção de manga (SILVA, 2007).

O paclobutrazol (PBZ) é o regulador vegetal utilizado no manejo da produção da mangueira, na maioria dos pomares sob as condições semiáridas do Nordeste (VAZ *et al*, 2015). A eficiência, bem como a vida média do PBZ no solo, depende das práticas culturais, das condições climáticas e do tipo de solo. Contudo, estudos comprovam a persistência do paclobutrazol no solo por períodos prolongados. Observações em três anos indicaram que a quantidade de paclobutrazol residual aumenta ao longo dos anos, afetando severamente outras colheitas (SINGH; BHATTACHERJEE, 2005).

Outros problemas relacionados ao PBZ são encontrados por ele possuir um moderado potencial contaminante de águas subterrâneas (MILFONT *et al*, 2008) e bioacumular em tecidos comestíveis de peixes (US EPA 2007b). É considerado pelo IBAMA um pesticida classe III, perigoso ao meio ambiente e altamente persistente; e quanto à saúde humana o paclobutrazol é pouco tóxico, embora não se conheça os efeitos em pequenas doses (MAPA, 2016).

A biorremediação é um processo que visa acelerar a taxa de biodegradação de um grande número de xenobióticos, como o PBZ, permitindo a recuperação do solo em um

espaço de tempo reduzido. Ressalta-se ainda que a biorremediação seja uma alternativa atraente e de baixo custo, baseada no estímulo da atividade metabólica dos micro-organismos para a conversão dos contaminantes em metabólitos e biomassa (CHAÎNEAU *et al*, 2005). Uma das principais estratégias de biorremediação envolve o estímulo da microbiota, quando a relação C:N:P se encontra prejudicada, podendo ser empregados fertilizantes e fontes adicionais de carbono na função de cossustratos, visando a cooperação metabólica e o cometabolismo, estratégias microbianas pelas quais auxiliam na remoção dos contaminantes do solo (SENEVIRATNE *et al*, 2008).

Partindo deste princípio, a adição de pequenas quantidades de cossustratos ao solo contaminado pode contribuir para o aumento da velocidade de biodegradação de compostos persistentes. Diferentes classes de moléculas podem ser utilizadas com este propósito, dentre elas, ressalta-se o potencial dos coprodutos de processos do setor agroindustrial, em função da grande disponibilidade e oferta ou por servirem de fontes preferenciais de carbono para síntese de moléculas importantes ao processo, tema recente e ainda pouco explorado (VASCONCELOS; OLIVEIRA; FRANÇA, 2013; NASCIMENTO; OLIVEIRA; FRANÇA, 2013).

O presente trabalho investigou a biodegradação do paclobutrazol em solos não saturados. Inicialmente foi analisado o desempenho de resíduos industriais (glicerol do biodiesel, torta de amendoim e torta de gergelim) como possíveis fontes adicionais de nutrientes. A melhor fonte adicional foi selecionada e utilizada numa nova etapa do estudo, a qual testou o efeito da inoculação do solo com histórico ao solo sem histórico. Estas foram as estratégias de biorremediação do solo não saturado sem histórico de aplicação de paclobutrazol.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- O objetivo geral deste trabalho foi investigar a biodegradação de paclobutrazol em solos não saturados, utilizando bioestímulo e bioaumento.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar estudo cinético da biodegradação do PBZ, da concentração de células e do pH, em experimentos utilizando solo não saturado, tratados com duas fontes de carbono adicionais: glicerol comercial e glicerol bruto; e duas fontes de carbono e nitrogênio: tortas de gergelim e amendoim;
- Selecionar o resíduo mais adequado para a biodegradação do PBZ;
- Realizar ensaios para intensificar a biodegradação no solo sem histórico, utilizando o resíduo industrial selecionado na etapa anterior e solo com histórico de aplicação de PBZ;
- Determinar a fitotoxicidade dos experimentos com co-substratos;
- Caracterizar os ensaios de biodegradação utilizando espectroscopia FTIR.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Reguladores de crescimento vegetal

A agricultura no Brasil está cada vez mais dependente de agrotóxicos e fertilizantes químicos. Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Segundo o 2º Seminário sobre Mercado de Agrotóxicos e Regulação, realizado em Brasília em 2012, enquanto nos últimos dez anos o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, o mercado brasileiro cresceu 190% (ANVISA, 2012). Em 2009, as vendas atingiram 789.974 toneladas, e em 2010 ultrapassaram a casa de 1 milhão de toneladas (RIGOTTO, 2011).

Os reguladores de crescimento são considerados agrotóxicos e podem ser definidos como substâncias naturais ou sintéticas que podem ser aplicadas diretamente nas plantas para alterar os processos vitais ou estruturais, com a finalidade de aumentar o rendimento da produção, melhorar a qualidade ou facilitar a colheita (BRASIL, 2011; LACA-BUENDIA, 1989; MATEUS, 2004). Estes compostos reduzem o comprimento da parte aérea das plantas sem alterar os padrões de desenvolvimento ou ser fitotóxico. Os hormônios vegetais que são os principais responsáveis pelo disparo do alongamento da planta são as giberelinas (GA's) e auxinas, logo os reguladores de crescimento são antagonistas destes, alterando a estrutura morfológica da planta (RADEMACHER, 2000).

Segundo Rademacher (2000) os reguladores de crescimento podem ser classificados em dois grupos principais: etileno (p. ex. Etefon) e inibidores da biossíntese de GA (p. ex. Paclobutrazol). Dentre os reguladores de crescimento que atua inibindo a biossíntese de GA, quatro grupos são conhecidos:

- i) "ônio" (compostos que possuem carga positiva de amônio, fosfônio ou grupo sulfônio para bloquear a biossíntese de GA's diretamente antes do ent-Kaureno),
- ii) Os compostos com um heterociclo contendo N (atua na fase de oxidação do ent-caureno),

iii) Os compostos estruturalmente parecidos com ácido 2-oxoglutárico (interfere nas fases finais da biossíntese de GA), e

iv) E o 16,17-dihidro-GAs (Atua na inibição de dioxigenases, que catalizam fases finais do metabolismo de GA).

Cada um destes grupos inibe o metabolismo GA em distinta etapas durante a via de biossíntese das giberelinas. Uma visão geral sobre os pontos de interação durante esta biossíntese é mostrado na Figura 3.1.

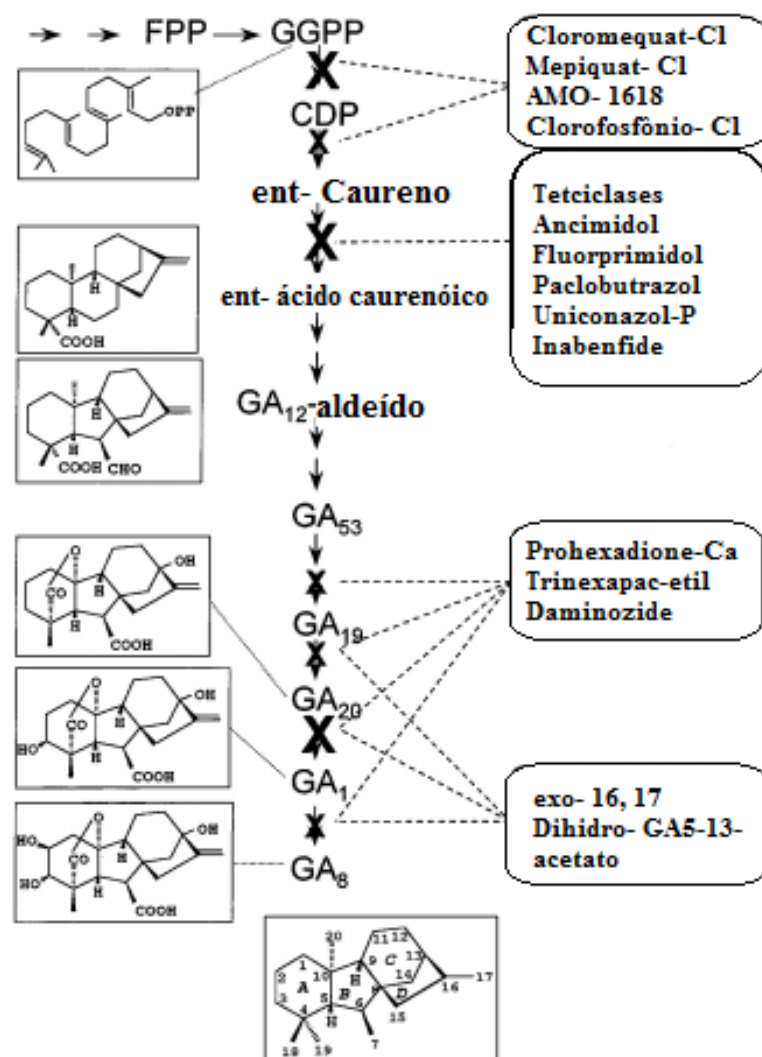


Figura 3.3 — Esquema simplificado das etapas da biossíntese de giberelinas e pontos de inibição por reguladores de crescimento (X, x = maior e menor atividade, respectivamente). Precursores nos protoplastos originam o difosfato de geranilo (GPP), difosfato de farnesilo (FPP) e finalmente o difosfato de geranilgeranilo (GGPP) que é ciclizado via copalil difosfato (CPP) para ent-caureno. No retículo endoplasmático e posteriormente no citoplasmao ent-caureno é oxidado a GA em várias etapas. (RADEMACHER, 2000).

Dentro do grupo de inibidores contendo um nitrogênio no heterociclo, compostos do tipo triazol atingiram um grau de interesse elevado, como o paclobutrazol e o uniconazol-P, que são intimamente relacionados (SAITO, 2006). Estes inibidores são utilizados em culturas de arroz, árvores frutíferas e ornamentais. Outros como ancimidol, pirimidinas e flurmidol também são comercializados para uso ornamentais; e astetciclasas (TET) têm sido utilizadas como indutor de nanismo em plântulas de arroz para transplante (RADEMACHER, 2000).

Reguladores do grupotriazol possuem uma característica estrutural comum que pode explicar seu mecanismo de ação na oxidação *ent*-caureno, estes compostos possuem um par de elétrons livres no nitrogênio hibridizado sp^2 do seu anel heterocíclico, o qual fica localizado na periferia da molécula. As enzimas envolvidas na oxidação do *ent*-caureno a ácido *ent*-caurenóico são monooxidasas que muito provavelmente contém citocromo P450 e é bem provável que os pares isolados de elétrons livres dos reguladores de crescimento deslocam o oxigênio a partir do seu local de ligação ao ferro protoheme presente no citocromo P450 (RADEMACHER, 2000).

O paclobutrazol e uniconazol-P possuem dois e um átomos de carbono assimétricos, respectivamente. Esta estrutura permite que o uniconazol possua dois enantiômeros, e no caso do paclobutrazol, quatro. De acordo com Sugavanam (1984) os enantiômeros ópticos (2S, 3S) exercem uma atividade reguladora do crescimento das plantas mais pronunciada e bloqueia a biossíntese de GA, mais especificamente, enquanto o 2R e 3R é que atuam mais na inibição da biossíntese de esteróides. A esta última ação é atribuído o efeito colateral fungicida do paclobutrazol; ambos diastereoisômeros (2RS,3RS) consistem a forma comercial do paclobutrazol (RADEMACHER, 2000).

O paclobutrazol, (PBZ) [(2RS, 3RS) -1- (4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol], é um regulador de crescimento utilizado em sistemas agrícolas com o propósito de controlar o crescimento vegetativo, e aumentar a capacidade reprodutiva das plantas. As características químicas do PBZ são: grupo químico azol, massa molecular de 293,8, fórmula molecular $C_{15}H_{20}ClN_3O$, ponto de fusão 165–166 °C, densidade de 1,22 g/mL e solubilidade em água de 35 mg/L. O PBZ é uma molécula hidrofóbica e ligeiramente polar, com partes hidrofílicas, principalmente o ciclo insaturado com o nitrogênio (N) e a hidroxila (OH) (MILFONT *et al*, 2008 p. 2167) (Figura 3.2).

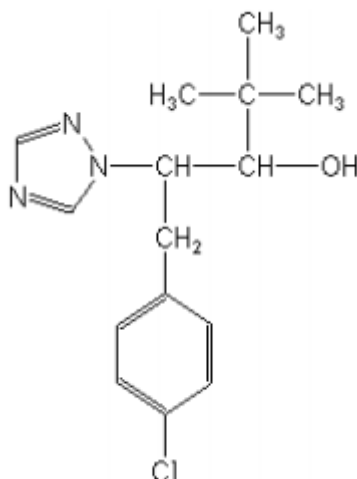


Figura 3.4 —Estrutura química do paclobutrazol (MILFONT et al, 2008)

A ação do paclobutrazol nas plantas consiste em interferir na síntese das giberelinas, inibindo a oxidação do *ent*-caureno para ácido *ent*-caurenóico, que é o precursor do ácido giberélico na via da biossíntese de giberelinas. Esta reação é catalizada pela *ent*-caureno oxidase dependente do citocromo P450. O paclobutrazol impede a ligação que forma este sistema enzimático, bloqueando assim a via (SRIVASTAV et al, 2010). Giberelinas estimulam o alongamento celular. Quando a produção de giberelina é inibida, ainda ocorre a divisão celular, mas as novas células não são alongadas. O resultado são os brotamentos com os mesmos números de folhas e entrenós comprimidos num comprimento mais curto. A diminuição do crescimento do diâmetro do tronco e ramos também são observadas (CHANEY, 2005).

Outra resposta de árvores para o tratamento com PBZ é o aumento da produção do hormônio ácido abscísico e o do componente fitol da clorofila, benéfico para o crescimento e saúde das árvores. O PBZ também pode induzir modificações morfológicas de folhas, como poros dos estômatos menores, folhas mais grossas, e aumento do número e tamanho dos apêndices superficiais, aumento da densidade de raízes que possam oferecer uma melhor tolerância ao estresse ambiental, resistência a doenças (CHANEY, 2005; FLETCHER et al, 2000); redução no comprimento do pseudocaule de bananeiras e dos perfilhos (MAIA et al, 2008). O conjunto dessas modificações fisiológicas proporciona uma maior produtividade com um fácil manejo da cultura.

O paclobutrazol é geralmente aplicado anualmente no solo, na zona das raízes, ou no dossel arbóreo, porém a aplicação no solo tem apresentado melhor eficiência (SINGH, 2000).

Mangueiras tratadas com PBZna Índia com as concentrações de 5 e 10 gramas de ingrediente ativo por árvore, em várias fases de maturação do fruto, foram detectados resíduos apenas em frutos verdes (SHAMA; AWASTHI, 2005).

Vários parâmetros definem o comportamento de um agrotóxico no solo, principalmente as propriedades químicas, estruturais e físicas da molécula, como por exemplo: solubilidade em água, constante de dissociação e pressão de vapor. A disseminação de um xenobiótico, após a sua descarga no ambiente, é determinada pela sua partição entre as fases sólida/líquida/gasosa do sistema e de seu potencial para concentrar na biota. São considerados persistentes os agrotóxicos que podem permanecer quimicamente ativos no solo por muitos anos, podendo causar efeitos negativos até sobre a saúde humana (SILVA et al, 2004).

Estudos demonstram que o paclobutrazol permanece ativo no solo durante vários anos e pode afetar severamente o crescimento e desenvolvimento de culturas subsequentes, reduzindo o comprimento da planta em cinco espécies testadas (HAMPTON, 1988). Para determinar o grau de degradação não biológico do paclobutrazol, Jackson *et al* (1996) adicionaram o componente em água estéril, em condições de escuridão e em 25°C, os resultados indicaram meia-vida de 4,5 anos. Uma vez que o PBZ não é volátil e no solo fica protegido da radiação UV, infere-se que a perda não-biológica seja pequena (JACKSON *et al.*, 1996).

O comportamento do PBZ quanto à mobilidade no solo e na água, tem sido caracterizado como um composto com um potencial moderado (US EPA, 2007). O documento de síntese para a revisão de registro preparada por US EPA (2007) mostra que os estudos de equilíbrio em laboratório, indicaram que o PBZ tem a capacidade de ser móvel sob certas condições. Estudos com nove solos US variando na textura de arenoso para argiloso indicaram valores para o coeficiente de adsorção de solo K_d no intervalo de 1,3-23,0 mL/g. A adsorção pareceu aumentar com um aumento no teor de matéria orgânica do solo e uma diminuição do pH do solo. Os resultados laboratoriais de experiências em coluna de lixiviação de solos, resumidas ainda em US EPA (2007), indicaram baixa mobilidade nos experimentos usando PBZ marcado com metino em solos que variam em textura de areia para argila-barro. Os experimentos usando PBZ marcado com triazol também mostraram pouca mobilidade em colunas de areia e areia-argila e argila-argila. Em todos os casos, a maioria (58,6-90,7%) de resíduos de PBZ aplicados não lixiviam dos 10 cm superiores das colunas de solo tratado.

Estudos de transporte e sorção do PBZ em solos de região de pomares de manga irrigada (região Vale do Rio São Francisco), evidenciaram que este composto oferece riscos reais de contaminação de águas subterrâneas para estes solos (MILFONT et al, 2008). Entretanto, o potencial para o pesticida atingir águas subterrâneas em altas concentrações é baixo (EFSA, 2006).

Em relação a volatilização do PBZ, é improvável que volatilize de forma significativa devido à baixa pressão de vapor estimado. O coeficiente de partição octanol-água ($\log K_{OW}$) de 3,2 indica um potencial para este produto químico de bioacumulação em peixes. Um estudo de bioacumulação de peixe, realizado por 14 dias, apresentou fatores BCF (fator de bioconcentração) de 20x para tecidos comestíveis (dia 3), 248x para tecidos não comestíveis (dia 3), e 44x para peixe inteiro (dia 10) (US EPA, 2007b).

O paclobutrazol foi reportado como persistente no solo, sendo encontrado em culturas de manga, três anos após a sua aplicação (SINGH; BHATTACHERJEE, 2005). O paclobutrazol é considerado um pesticida classe III – perigoso ao meio ambiente, segundo a classificação por periculosidade ambiental exigida pelo IBAMA e altamente persistente (MAPA, 2016). A classificação de periculosidade ambiental é feita segundo os parâmetros de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, teratogênico e carcinogênico. A classificação varia de Altamente, Muito, Pouco ou apenas Perigoso (IBAMA, 2016).

A classificação toxicológica dos agrotóxicos à saúde humana, a cargo do Ministério da Saúde, se baseia na dose letal 50 (DL_{50}), que se trata da quantidade suficiente para matar uma pessoa. Segundo esta classificação, o paclobutrazol está na classe IV – pouco tóxico ($DL_{50} > 5g/Kg$) (MAPA, 2016). É interessante ressaltar que esta classificação não pode ser considerada um fator de segurança, visto que leva em conta apenas a dose letal, e sabe-se que a exposição a pequenas doses de agrotóxicos podem induzir a morte celular, citotoxicidade, redução da viabilidade das células, efeitos que na maioria dos casos não são considerados (RIGOTTO, 2011).

3.2 Biorremediação: estratégias e aplicações em solos

Biorremediação é um processo no qual se utilizam agentes biológicos para remover poluentes tóxicos do ambiente terrestre e aquático. Este processo biotecnológico de remediação tem sido intensamente pesquisado e recomendado pela comunidade científica atual como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados, tais como águas superficiais, subterrâneas e solos, além de resíduos e efluentes industriais em aterro ou áreas de contenção (GAYLARDE *et al.*, 2005).

Caracteriza-se como degradação microbiana, o processo de completa mineralização das moléculas orgânicas, resultando em água, CO₂, íons inorgânicos e energia. Este processo é determinante para a eliminação ou redução de agrotóxicos no ambiente (SILVA *et al.*, 2003). Os micro-organismos, através da produção de enzimas extracelulares, co-metabolismo ou catabolismo, transformam os xenobióticos em metabólitos diversos, que servirão de substratos para si ou para outros (produção de biomassa); ou atacado por enzimas extracelulares diversas, no caso de co-metabolismo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

As tecnologias de biorremediação vêm sendo amplamente estudadas e utilizadas para remediação de locais contaminados, estas podem ser feitas a através de dois processos: *in situ*, quando o tratamento é efetuado no próprio local, e *ex situ*, quando o procedimento é efetuado fora do local impactado (BOOPATHY, 2000). Para ambos os processos é necessário conhecer a cinética da biodegradação. Os estudos *ex situ* são úteis para determinar a rapidez e extensão da biorremediação, fornecendo, assim, um desenho criterioso na obtenção de uma biorremediação ótima. No entanto, nem todos os ensaios de laboratório sobre biodegradabilidade podem ser usados para simular os complexos processos de biorremediação em condições naturais de campo. Sendo assim, opta-se por um estudo *in situ*, onde são levados em consideração fatores físicos, químicos e biológicos de forma mais eficaz (SILVA *et al.*, 2004).

O bioestímulo tem por objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos micro-organismos degradadores da comunidade nativa de uma determinada região contaminada, através da adição de receptores de elétrons, nutrientes ou doadores de elétrons. Diferentemente do bioestímulo, o bioaumento consiste na introdução propriamente dita de micro-organismos degradadores podendo ser estes geneticamente modificados, nativos ou não

(GAYLARDE *et al.*, 2005). É necessário, portanto, observar o histórico de contaminação e realizar estudos preliminares, que varia de caso para caso, para a escolha do método mais eficaz.

A aceleração da degradação microbiana de poluentes xenobióticos geralmente depende do suplemento de carbono, nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P), temperatura, disponibilidade de oxigênio, pH do solo, potencial redox e o tipo e concentração do poluente orgânico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Bioestímulos de sucesso na biorremediação de HPA's foram realizados adicionando-se nutrientes na forma de fertilizantes (DELLILE *et al* 2009) ou resíduos orgânicos (p. ex. esterco de vaca e fezes de galinha) na biorremediação da atrazina (UMAR *et al*, 2009). Em alguns casos a adição de gases (p. ex. metano, etano, eteno, propano e fenol) é realizada com objetivo de induzir enzimas do co-metabolismo bacteriano (BAEK *et al*, 2013; MCKEEVER *et al*, 2012) ou gases e nutrientes inorgânicos contendo N e P (HATZINGER; STREGER; BEGLEY, 2015).

No que diz respeito ao bioaumento, alguns estudos explicam falhas que ocasionam a menor eficiência da biodegradação devido à competitividade e adaptabilidade em relação aos membros das comunidades nativas. Na biodegradação do paclobutrazol, o bioaumento por um consórcio microbiano de *Pseudomonas* não apresentou alta eficiência, entretanto o associado ao bioestímulo por glicerol foi eficaz (VAZ, 2006; VAZ 2011; VAZ *et al* 2012; SANTOS FILHO, 2013). Outras falhas também foram relatadas devido a predação por protistas, como por exemplo no tratamento de águas residuais (BOUCHEZ *et al*, 2000). Para este tipo de estratégia, aspectos ecológicos devem ser levadas em consideração (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005) e devido à isso novas ideias têm surgido como bioaumento com genes (genes catabólicos encapsulados) (DEJONGHE *et al*, 2001) e o uso de produtos à base de enzimas livres para remediar corpos de água contaminados com atrazina (SCOTT *et al*, 2010).

3.3 Micro-organismos e mecanismos envolvidos na biodegradação

A biomassa microbiana do solo é considerada o componente vivo da matéria orgânica e representa aproximadamente de 10% desta. A matéria orgânica, por sua vez, compreende 1 % a 5 % do solo. Constituída por micro-organismos vivos menores que 5-10 μm , a biomassa microbiana tem sua atividade biológica altamente concentrada nas primeiras camadas do solo (1-30 cm) (VIEIRA, 2004). Esta biomassa é representada por fungos, bactérias, actinomicetos, leveduras e representantes da microfauna como os protozoários; e os micro-organismos são a principal fonte de enzimas do solo (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Os valores obtidos de biomassa microbiana variam muito com o tipo de solo, vegetação e clima, e sua quantidade está relacionada com a quantidade e qualidade de carbono que o solo recebe (SILVEIRA, 2007).

Os mecanismos metabólicos envolvidos na biodegradação dos xenobióticos podem ser: a) diretamente no metabolismo celular central, no caso de moléculas com massa molar menor que 600 (catabolismo); b) através de catálise com enzimas extracelulares, as quais geram metabólitos com estruturas mais simples para serem metabolizadas; e c) transformações não programadas geradas por enzimas de pouca especificidade do metabolismo periférico (co-metabolismo) (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Sendo assim, a biodegradação pode ser metabólica ou co-metabólica.

As transformações na biodegradação metabólica ocorrem gerando energia necessária para a biossíntese e é derivada da oxidação completa do composto remanescente em CO_2 e água. As reações envolvidas em tais vias, resultam em molécula passível de entrar no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), como por exemplo, a via ácido-acetoadipico é uma via geral do metabolismo de compostos aromáticos, levando aos produtos acetil-CoA e o ácido succínico, os quais entram no ciclo TCA (SILVA *et al*, 2004). Já os metabólitos gerados durante as transformações incidentais do co-metabolismo podem ainda conjugar-se com outros compostos, condensar ou polimerizar, adquirindo uma conformação química semelhante ao húmus (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Nos estudos de Silva *et al* (2008) o paclobutrazol foi usado como fonte de carbono e energia em condições aeróbias e mesofílicas e, entre os micro-organismos enriquecidos em meio de cultura, não foi detectada a presença de fungos. Em virtude do baixo número de

actinomicetos, estes não foram considerados importantes. Portanto, o consórcio resultante foi composto de bactérias, as quais foram isoladas, purificadas e agrupadas por RAPD (*Random Amplified PolimorphicDNA*). A identificação de alguns isolados por seqüenciamento parcial do gene 16SrDNA revelou a predominância de bactérias pertencentes aos gêneros *Stenotrophomonas*, *Bacillus* e *Brevibacillus*.

Em geral, micro-organismos decompositores de xenobióticos podem ser bactérias, fungos e clorófitas. Os principais representantes degradadores procariotos e eucariotos estão representados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1—Micro-organismos degradadores de xenobióticos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

	Bactérias	gram-negativas,	<i>Azospirillum</i> e <i>Hafnia</i>
	aeróbias/	microaerofílica	
	fixadoras de N₂		
Procariotos	Bastonetes gram-negativos, aeróbios		<i>Pseudomonas</i> (inúmeras espécies) e <i>Xanthomonas</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Paracoccus</i> , <i>Azotobacter</i> , <i>Rhizobium</i> , <i>Agrobacterium</i> e <i>Flavobacterium</i> .
	Bastonetes anaeróbio facultativo	gram-negativos,	<i>Proteus</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Klebsiella</i> e <i>Serratia</i>
	Bastonetes e Coccus esporulantes	gram-positivos	<i>Micrococcus</i> , <i>Bacillus</i> e <i>Clostridium</i>
	Outros esporulantes	gram-positivos não	<i>Arthobacter</i> e <i>Nocardia</i>
Eucariotos	Aeróbios e heterotróficos		<i>Mucor</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Chaetomium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Rhizoctonia</i> , <i>Trametes</i> e <i>Phanerochaete</i> .
	Clorófitas		<i>Chorella</i>

Em experimentos de avaliação de campo, Silva *et al* (2003), verificaram por meio da técnica de contagem em placa, o efeito do paclobutrazol nas diferentes comunidades microbianas de solos sob cultivo comercial de manga. Os resultados obtidos demonstraram o efeito tóxico do paclobutrazol nos micro-organismos do solo, sendo que o número de colônias bacterianas, fúngicas e de actinomicetos cultiváveis, apresentaram um decréscimo médio de 58 %, 28 % e 28 %, respectivamente. Jacobs e Berg (2000) verificaram o efeito inibidor do paclobutrazol sobre diversos fungos patogênicos da madeira, como: *Armillaria*, *Botryosphaeria*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Ophiostoma*, *Sirococcus*, *Sphaeropsis* e *Verticilium*. Este efeito inibidor, segundo Jackson *et al.* (1996) é em consequência da estrutura química do PBZ que apresenta grande similaridade estrutural com os fungicidas do grupo dos triazóis, que são usados no controle de um amplo espectro de fitopatógenos.

Os micro-organismos que realizam biodegradação co-metabólica necessitam de uma fonte adicional de carbono para garantir seu crescimento, chamado substrato primário. Estes fornecem fontes de carbono e energia para os micro-organismos crescerem, promovendo a atividade metabólica; que estimula a liberação de enzimas chave para a formação de metabólitos assimiláveis (HORVATH, 1972). Lu *et al* (2015) verificaram a aceleração da biodegradação, por uma bactéria fotossintética de amido em águas residuais, adicionando ácido málico como substrato primário. Este causou, rapidamente, um acúmulo de biomassa e forneceu enzimas celulares que atuaram na quebra do amido em dextrina, sacarose, malte e glicose.

Com o intuito de investigar os mecanismos moleculares envolvidos no co-metabolismo, Sun *et al* (2015) observaram, através de dados obtidos de análises transcriptômica, que os genes das vias de degradação de um corante (polímero aromático) foram regulados positivamente nos tratamentos em que estava presente o substrato adicional lignina. O fungo *Irpex lacteus* CD2 é capaz de secretar várias enzimas mesmo sem corante ou lignina, a presença do corante pode ligeiramente aumentar a expressão destas, entretanto a expressão causada apenas pelo corante tende a diminuir, impossibilitando que o fungo alcance de alta eficiência na biodegradação. Apenas com a adição de lignina houve uma significativa expressão dos genes envolvidos e uma degradação de alta eficiência do corante.

3.4 Fatores físicos associados à biodegradação

Fatores como propriedades químicas do composto aplicado e as características do solo, como matéria orgânica, pH, conteúdo de argila e umidade; afetam o processo de sorção, o qual determina a disponibilidade do composto em relação à ação dos micro-organismos alvo e não-alvos à sua degradação. Se um composto for ligado primeiramente a um constituinte do solo, como por exemplo caulinita e areia, ele será rapidamente mineralizado em taxa e extensão equivalentes como se tivesse sido adicionado ao solo em solução aquosa. Já quando os compostos ligam-se primeiramente a outros compostos do solo, como por exemplo montmorilonita, ácidos fúlvicos ou ácidos húmicos, suas mineralizações são lentas ou inexistentes, sendo que normalmente, a interação com esses constituintes do solo inibem a degradação (KNABEL *et al*, 1996).

A temperatura tem sua influência nos processos de sorção, solubilidade e viscosidade, os quais têm grande influência na taxa de reação e na atividade da população do solo. Processos de biodegradação são máximos em temperaturas entre 24 e 35°C (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). A temperatura no solo afeta muitos processos que contribuem para a dissipação dos xenobióticos, como a atividade microbiana, a volatilização e os processos de transporte. Dentro da faixa de temperatura, normalmente encontrada nos solos agricultáveis, a biodegradação geralmente aumenta com a temperatura e umidade (SILVA; FAY, 2004).

A água presente no solo compete pelos sítios de adsorção com o agrotóxico, determinando também sua disponibilidade ao ataque microbiano (SILVA; FAY, 2004). Segundo Alexander (1977), a umidade auxilia nas trocas gasosas, dissolve e transporta os diferentes nutrientes. Por esses motivos, a meia-vida dos agrotóxicos tende a ser mais longa em solos secos (VAN DER WERF, 1996).

O pH ideal para a biodegradação para maioria dos solos é entre 5,6 e 8,0 (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Bactérias heterotróficas dependem de um pH neutro ou próximo disso para degradar compostos xenobióticos (SPINELLI, 2006). Os valores de pH para um determinado microambiente devem estar relacionados ao tamanho dos organismos e à multiplicidade de enzimas, as quais são, em sua maioria, pH dependentes e estão relacionadas aos componentes celulares, como, por exemplo, as membranas (SILVA; FAY, 2004).

3.5 A Trajetória dos Estudos sobre a Biodegradação do PBZ

Utilizando oito solos agrícolas, Jackson *et al* (1996) enriqueceram um meio mineral com PBZ e obteve nove isolados bacterianos capazes de degradar o paclobutrazol, sendo oito pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e um ao *Alcaligenes*. O processo de biodegradação funcionou apenas em condições aeróbias e temperaturas mesófilas. Estudos com ^{14}C localizado no anel cloro-benzeno mostraram a total mineralização deste a $^{14}\text{CO}_2$. Por outro lado, dados obtidos na investigação da suscetibilidade do anel 1,2,4-triazol, a partir de cultivos utilizando apenas o PBZ como fonte de nitrogênio revelaram crescimento limitado, sugerindo que as bactérias inoculadas não utilizaram o PBZ como fonte de nitrogênio (JACKSON *et al*, 1996).

Em solos do Vale São Francisco (Nordeste do Brasil), bactérias capazes de degradar o PBZ foram isoladas de solos com e sem histórico de aplicação e, a partir destes isolados, foram selecionadas apenas bactérias do gênero *Pseudomonas*. Este gênero foi escolhido devido à sua capacidade de degradar hidrocarbonetos, agrotóxicos com estruturas similares ao paclobutrazol, como a atrazina e o cloro-benzeno (VAZ *et al* 2012); e por ser anteriormente relatada como degradadora de PBZ nos trabalhos de Jackson *et al* (1996). Os isolados obtidos de dois solos das Fazendas Mandacarú e Bebedouro, com e sem histórico foram testados como inóculo nos ensaios de biodegradação — meio mineral + PBZ — e os melhores resultados foram 47 e 43% para os consórcios do solo Mandacarú (MS) sem histórico e Bebedouro com histórico (BC). Testes de biodegradação com as três bactérias utilizadas no consórcio (MS) quando usadas cada uma isoladamente, obtiveram-se baixas taxas de biodegradação (14% e 20%), levando à inferir-se que a biodegradação é resultado da cooperação de mais de uma espécie microbiana. Entretanto, outros gêneros (*Streptomyces* e *Rhodococcus*) testados pelo autor, em adição à cultura mista MS, resultou num crescimento menor e não ocorreu biodegradação do PBZ. A possível causa seria a inibição competitiva, ocasionada pela presença de compostos antibacterianos produzidos por *Streptomyces* (Vaz, 2006; Vaz *et al*, 2015).

Os mesmos autores também avaliaram o efeito da adição de glicose ou glicerol como fontes de carbono adicionais na biodegradação do PBZ. Nos ensaios que continham glicose e PBZ, apenas a glicose foi consumida devido à repressão catabólica causada pela glicose. A literatura já prevê que presença de repressor catabólico reprime os genes responsáveis pela

utilização de fontes alternativas de carbono, ou seja, o cometabolismo (BRUCKNE; TITGEMEYER, 2002). Já o uso do glicerol comercial como uma fonte adicional de carbono, a taxa de biodegradação foi maior atingindo cerca de 75% em 10 dias de cultivo (VAZ, 2006; VAZ *et al* 2015).

Estudos sobre a biodegradação do PBZ nos solos mencionados do Vale do São Francisco, usando três bactérias do gênero *Pseudomonas* presentes no consórcio MS, citado anteriormente, foram realizados em condições estéreis e não-estéreis, adicionando apenas 10 ou 25 mg/L de PBZ, ou adicionando PBZ e 50 ou 100 mg/L de glicerol (Vaz *et al.*, 2012). Os resultados de biodegradação não foram diferentes com relação ao tipo de solo, nem em relação ao solo ser ou não estéril, ou ainda com relação à concentração de PBZ utilizada. Em todos os ensaios, a biodegradação foi, em média, 40% após 14 dias de cultivo. Já no conjunto de ensaios contendo glicerol a biodegradação atingiu cerca de 70% em 28 dias. Os autores verificaram, através da cinética de crescimento microbiano, que quando foi utilizado o glicerol como fonte adicional, houve um período de consumo apenas do glicerol, que ocorreu em quatro dias, e somente após este período, houve consumo do PBZ.

Vaz *et al* (2015b) realizaram estudos sobre a cinética de biodegradação em solos não saturados. Foram utilizados solos com ou sem histórico de aplicação de PBZ, adicionando ou não glicerol. Os experimentos com glicerol, com ou sem histórico de aplicação do PBZ, apresentaram redução significativa do xenobiótico a partir de 14 dias, permanecendo apenas 1% de PBZ após 63 dias. Contudo, em solo sem histórico, com ou sem a adição do glicerol a biodegradação foi de aproximadamente 64% a partir de 14 dias. Estes dados nestas condições experimentais dão uma certa relevância ao critério de ter ou não ter histórico de aplicação de PBZ direcionando para melhores condições. Acredita-se que a menor biodegradação obtida em solos sem histórico seja devido à microbiota não adaptada ao PBZ.

Santos-Filho (2014) avaliou o efeito do bioestímulo e do bioaumento, na biodegradação de PBZ, em solos não saturados e não estéreis. Em casos onde se aplicou o bioestímulo com glicerol, a biodegradação variou entre 79 e 60% e, para o bioestímulo com meio mineral, a biodegradação alcançou, em média 94%. Quando no bioestímulo foram combinados glicerol e meio mineral, a biodegradação foi cerca de 85%. Já nos ensaios onde o autor utilizou apenas bioaumento, a biodegradação variou entre 29 e 38 %. A combinação de bioestímulo e bioaumento se mostrou promissora com 81 a 96% de biodegradação. Em algumas situações, o bioestímulo combinado de bioaumento consiste numa estratégia eficiente

para biodegradação, uma vez que a fonte de nutriente fornece mais receptores de elétrons favorecendo micro-organismos nativos e não-nativos (FANTROUSSI; AGATHOS, 2005).

3.6 Resíduos industriais e sua utilização em bioprocessos

O glicerol bruto é obtido do processo de transesterificação de ácidos graxos presentes em óleos e gorduras, com um álcool de cadeia curta, metanol ou etanol, em presença de um catalisador alcalino, ácido ou enzimático. Esta reação resulta em uma mistura heterogênea de duas fases: uma de ácidos graxos metilados (biodiesel) e outra que é o glicerol bruto (BOURNAY *et al*, 2005; OOI *et al*, 2004).

Mundialmente, o glicerol, co-produto do biodiesel, cresceu de 200.000 toneladas em 2004 para 1.224 milhões de toneladas em 2008 (YANG *et al*, 2012). A produção de biodiesel gera aproximadamente 10% de glicerol por volume (ZHOU *et al*, 2008) e foi estipulado que o mercado do biodiesel geraria 37 bilhões de galões de biodiesel e 4 bilhões de galões de glicerol bruto em 2016 (ANAND; SAXENA, 2011). Como consequência do aumento da produção, em 2007 o preço do glicerol bruto caiu nos EUA de \$0,25 para \$0,05 por libra (YANG *et al*, 2012). No Brasil o BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento Econômico e Social) tornou isenta de receita a venda do glicerol bruto, tendo em vista que o preço poderia causar uma crise no mercado, e a descarga do glicerol ser suscetível de causar um sério problema ambiental (BNDES, 2009). A maioria do glicerol residual é descartado em rios ou simplesmente incinerados, caracterizando o biodiesel como um combustível cinza e não verde (ANAND; SAXENA, 2011).

A indústria usa apenas glicerol purificado como matéria-prima, consequentemente o glicerol não refinado tornou-se um potencial poluente ambiental, e sua gestão precisa ser bem estudada (YANG *et al*, 2012). Recentemente, pesquisas vêm sendo desenvolvidas para a utilização direta do glicerol bruto, incluindo seu uso como matéria-prima na produção de químicos por via biológica. O 1,3 propanediol, por exemplo, é produzido através de fermentação anaeróbia por *Klebsiella pneumoniae* (MU *et al*, 2006) e sua produção foi otimizada com um rendimento máximo de 56 g/L (HIREMATH; KANNABIRAN;

RANGASWAMY,2011). O ácido cítrico é outro composto que foi biossintetizado a partir de glicerol bruto por *Yarrowia lipolytica*, com rendimento de 0,62 g/g (RYMOWICZ *et al*, 2006). A produção de hidrogênio foi possível pela fotofermentação do glicerol bruto por *Rhodopseudomonas palustris* com rendimentos 75% do valor teórico (SABOURIN-PROVOST; HALLENBECK, 2009). Ainda, os polihidroxialcanoatos (PHA) são poliésteres que podem ser produzidos por *Cupriavidus necator* utilizando glicerol bruto (FIGUEIREDO *et al*, 2014). O glicerol bruto foi utilizado na biodegradação de PAHs em solo contaminado (VASCONCELOS *et al*, 2013) e na denitrificação de águas residuais (BODIK *et al*, 2009).

Resíduos obtidos após a extração mecânica do óleo de sementes são denominados de tortas. Na extração por prensagem, o teor de óleo observado nas tortas depende da espécie processada e das especificações das prensas, e varia entre 15 e 27% para grãos como algodão, girassol, pinhão-manso e nabo-forrageiro (NEIVA JÚNIOR, 2007; VAN CLEEF, 2008). Os farelos geram um resíduo bastante inferior de óleos, da ordem de 1,5%, resultando num maior teor de proteína bruta (RAKSHIT *et al.*, 2008).

Esses resíduos agroindustriais se destacam pela abundância em determinadas regiões do país e pelo baixo custo. Segundo o Foreign Agricultural Service (FAS- United States Department of Agriculture) o consumo em toneladas de óleos vegetais vem aumentando através dos anos, gerando em torno de 178.280.000 toneladas de óleos e 2.674.200 toneladas de farelo em 2015. O Brasil é o 7º maior produtor de óleos vegetais e farelos do mundo, com uma produção de 8,50 milhões de toneladas em dezembro de 2015, e 127,500 toneladas de farelo e tortas (FAS, 2015). A Tabela 3.2 apresenta as espécies de oleaginosas potencialmente mais produtivas para a produção de biodiesel.

Tabela 3.2: Oleaginosas com potencial para produção de biodiesel no Brasil. Distribuição por região, teor de óleo, produtividade e produção de óleo (ABDALLA *et al*, 2008).

Espécie	Distribuição	Teor de óleo (%)	Produtividade (kg/ha/ano)	Produção de óleo (kg/ha/ano)
Amendoim	NE, CO	49	1800	882
Babaçu	N, NE	4	15000	600
Canola	S	38	1800	684
Caroço de Algodão	N, NE, CO, S, SE	15	1800	270
Dendê/Palma	N	20	10000	2000
Gergelim	NE, CO	39	1000	390
Girassol	S, SE, CO	42	1600	672
Mamona	NE	44	1500	660
Nabo forrageiro	S, SE, CO	29	500	145
Pinhão manso	NE, SE, CO	40	8000	3200
Soja	CO	19	2200	418

Após a criação do Programa Brasileiro de Desenvolvimento do Biodiesel (PROBIODIESEL), em 2002, concebido com o objetivo de fomentar a produção de biodiesel, a partir de diferentes matérias-primas; de acordo com a Petrobio (2005) a produção de tortas a partir das oleaginosas, correspondente ao biodiesel a ser produzido em 2008, foi estimada em 3.676.566 ton, mas a capacidade autorizada para produção de biodiesel foi de 2.537.000 m³ (249% maior). Considerando as mesmas proporções, o Brasil poderá estar produzindo cerca de 8,9 bilhões de ton de torta

O aproveitamento biotecnológico destes resíduos, juntamente com a redução da poluição ambiental e adoção de tecnologias limpas tem sido uma tendência na indústria e trazem vantagens nos aspectos ambiental, social e econômico. Neste sentido, pesquisas envolvendo a biomassa das tortas foram direcionadas na geração de bioetanol e outros compostos de extensa faixa valores. A torta de dendê, foi investigada por Ferreira (2013) como possível fonte de matéria celulósica (32,4 %), prevendo uma produção de etanol de

segunda geração de 210 L de etanol por tonelada de torta. Para isso, foram testados pré-tratamentos com ácido sulfúrico, alcalino e de sacarificação enzimática, todos bem sucedidos. A fermentação foi realizada utilizando *Saccharomyces cerevisiae* a qual mostrou-se eficiente com o rendimento de $Y_{p/S}$ de 0,49.

Em relação a composição, o teor protéico nas tortas é relativamente alto, 36 % nas tortas de amendoim e 40 % nas de mamona (JARDIM, 1976; MOTA; PESTANA, 2011). O teor de gordura também varia consideravelmente (3 a 24 %) e o teor de fibra é cerca de 20 %, o que leva a utilização de tortas em larga escala na alimentação de animais ruminantes (MORRISON, 1966). A torta de mamoma possui um alto teor de nitrogênio e por isso é muito utilizada na alimentação animal, mas seu uso é limitado pela presença de ricina e princípios alergênicos, necessitando de um processo de destoxicação. Outros resíduos de oleaginosas, como o farelo de babaçu, de algodão, de dendê e de soja podem ser utilizados na alimentação animal sem a necessidade de processamento prévio (ABDALLA *et al*, 2008).

Outros resíduos agroindustriais como bagaço de cana, bagaço de laranja, casca de arroz e farelo de soja foram avaliados como substratos, em fermentações semi-sólida com *Aspergillus niger*, para a produção de celulasas, com a finalidade de serem destinadas para a conversão enzimática da biomassa lignocelulósica em bioetanol. Os melhores resultados foram obtidos com farelo de soja e bagaço de laranja (FARINAS *et al*, 2008). Castilho (2000) investigou diversas condições de umidade na fermentação semi-sólida com *Aspergillus niger* utilizando farelos de trigo e soja como substratos presentes na composição do meio de cultura, a fim de obter e extrair pectinases.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Solo

Foram utilizadas amostras de solos coletados de região com plantio de manga (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) irrigada, na região do São Francisco (Fazenda Andorinhas), as quais foram fornecidas pela EMBRAPA Semiárido. Estes solos foram coletados junto ao tronco onde o PBZ foi aplicado, entre 0 e 20 cm de profundidade e em quatro pontos, em 6 plantas, totalizando em média 3 Kg. O solo em questão foi identificado como sendo um solo com histórico de paclobutrazol (PBZ) por oito anos (2007-2014). No entanto, é preciso ressaltar que a última aplicação do paclobutrazol neste solo foi 6 meses antes da coleta desta amostra.

As amostras de solo foram colocadas em isopor com gelo até sua chegada ao laboratório, onde foram espalhadas e acondicionadas em bandejas plásticas e colocadas para secar ao sol a temperatura ambiente. Após o procedimento de secagem, o solo passou por peneira de abertura de malha de 5 mm/ 32 Mesh para a retirada de detritos, raízes, pedregulhos, etc, obtendo-se uma amostra homogênea. As amostras foram armazenadas a 4° C em geladeira.

A caracterização das amostras de solo compreendeu um conjunto de análises, a saber: pH, CTC (Capacidade de retenção de cátions), carbono fósforo total, cálcio, magnésio, sódio, potássio, alumínio, hidrogênio e enxofre (Tabela 4.1). As análises foram realizadas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco-IPA, seguindo a metodologia da Embrapa (1997).

Tabela 4.1.Caracterização físico-química do solo

pH	CTC	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	P
		(g/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(g/L)	(mg/L)
7,8	14,4	2,1042	255,276	82,8	312,816	0	6,552	4,416	393

4.2 Paclobutrazol

O paclobutrazol utilizado foi proveniente de sua formulação comercial Cultar 250 SC (Syngenta), que apresenta uma concentração de 250 g/L de paclobutrazol e 750 g/L de ingredientes inertes. Para o preparo de soluções padrões foi utilizada sua forma pura (Sigma).

4.3 Resíduos industriais: obtenção e caracterização

O glicerol bruto foi cedido pelo Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE). Este foi obtido a partir do processo de transesterificação de ácidos graxos presentes no óleo de algodão, gerando biodiesel e glicerol bruto. A caracterização (Tabela 4.2) foi realizada pelo Laboratório de Análise de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Tabela 4.2 —.Caracterização do glicerol bruto

Nutriente	Média	Nutriente	Média
MS*	80,46%	Fe	22,37mg
Ácidos	9,75%	Proteína	0,05%
Graxos		Bruta	
Glicerol	55,95%	Energia	5,24 KJ
Metanol	10,96 meq	pH	8,75
Ca	0,23 mg	NDT**	65%
Mg	0,12 mg	CHOT***	12,34%
Cu	0,12 mg	FDN*****	3,45%

* Nutrientes calculados com base na MS (Matéria Seca) dos Alimentos.

** Nutrientes Digestíveis Totais

*** Carboidratos Totais

***** Fibra em Detergente Neutro

4.4 Tortas de amendoim e de gergelim

As tortas resultantes da extração do óleo das sementes de amendoim e de gergelim foram obtidas pelo processo de pressão mecânica a frio, e cedidas pela Embrapa Algodão em Campina Grande. A caracterização química (Tabela 4.3) foi realizada e cedida por esta Empresa.

Tabela 4.3 —Caracterização da torta de Amendoim e gergelim.

Nutriente	Torta de amendoim (%)	Torta de gergelim (%)
C	55,3	48,5
N	7,2	5,8
H	8,6	7,6
S	1,9	1,9
O	27,0	36,3

4.5 Ensaios de biodegradação

Os ensaios de biodegradação foram conduzidos conforme metodologia adotada por Vazet *al* (2015), que consiste em colocar 2,5 g solo com histórico de aplicação de PBZ em erlenmeyers de 125 mL, e adicionar 1 mL da solução contendo PBZ e os substratos dissolvidos (tabela 4.4). Os experimentos foram realizados $28 \pm 1^\circ\text{C}$, durante o período de 49 dias, sem agitação. A umidade foi mantida pela adição, semanalmente, de 1 mL de água destilada estéril.

Os bioestímulos utilizando os resíduos industriais (glicerol bruto, torta de amendoim e torta de gergelim) foram comparados com o ensaio controle (contendo apenas solo e PBZ) e com o ensaio com glicerol comercial. As condições dos experimentos usando bioestímulo estão representadas na Tabela 4. Partindo dos resultados obtidos nessas condições, novos experimentos foram realizados para investigar a quantidade necessária de solo com histórico, para ser usada como uma fonte de micro-organismos, promovendo assim o bioaumento em solo sem histórico de aplicação (Tabela 4.5). Nessa etapa do trabalho, além de bioaumento, também foi utilizado o bioestímulo com o resíduo selecionado. Em todos os experimentos a concentração de PBZ foi $4,0 \mu\text{g/g}$. Nos experimentos usando bioestímulo e bioaumento, a concentração do resíduo selecionado foi a mesma utilizada nos experimentos apenas com bioestímulo (Tabela 4.4). As concentrações de tanto de glicerol comercial quanto de glicerol

bruto foram de acordo com aquela utilizada por Santos-Filho (2014). A concentração utilizada de tortas foi 0,1%, e esta foi definida sendo aproximadamente duas vezes a quantidade de nitrogênio necessária para o crescimento dos micro-organismos estimada por Ridgway *et al* (1990) na elaboração do seu meio mineral.

Tabela 4.4 — Condições experimentais usando bioestímulo.

Experimento	Fonte adicional	concentração (mg/g)
E1	—	—
E2	Glicerol comercial	2,4
E3	Glicerol bruto	2,4
E4	Torta de amendoim	4,0
E5	Torta de gergelim	4,0

Tabela 4.5 — Condições experimentais usando bioestímulo e bioaumento.

Ensaio	torta de amendoim (mg/g)	Solo com histórico (g)	Solo sem histórico (g)
E6	4,0	0,0	2,5
E7	4,0	0,5	2,0
E8	4,0	1,25	1,25
E9	4,0	2,0	0,5

4.6 Métodos Analíticos

4.6.1 Determinação da concentração de células

Concentração de células (bactérias e fungos cultiváveis) no solo foi determinada pela técnica do Spread plate, após diluições seriadas das amostras e expressa em Unidade Formadora de Colônia por grama de solo (UFC/g). A metodologia adotada foi baseada na Instrução Normativa nº 62 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2003). O procedimento consistiu em adicionar à 2,5g de solo, 100 mL de solução salina 0,9 %(m/V) gerando uma solução mãe, e a partir desta solução retirou-se 1mL e iniciou-se as diluições seriadas em tubos com 9 mL de solução salina. Estas diluições (0,1 mL) foram semeadas em placas de petri com meio de cultura Ágar Triptona Soja (TSA) e incubadas por 24-48h em estufa a 30°C. Após o período de incubação, as colônias foram contadas, tendo-se o cuidado de considerar apenas as placas que continham de 30 a 300 colônias. A Equação 1 foi utilizada para a quantificação da concentração de células.

$$C = \frac{n}{v} \times d \times \frac{V}{m} \quad (1)$$

C = concentração de células (UFC/g)

n = número de UFC;

d = diluição da contagem de colônias.

v = volume colocado na placa;

m = massa de solo utilizada no experimento;

V = volume de solução salina utilizado na solução mãe.

4.6.2 Determinação da concentração de PBZ

Na determinação da concentração de PBZ, foram adicionados 10 mL de metanol a 2,5 g de solo contidos em frasco Erlenmeyer de 125 mL. Esta suspensão foi colocada em mesa incubadora rotativa (New Brunswick Scientific Company, SC 25) a 150 rpm e 25°C. Após 30 minutos, a suspensão foi filtrada a vácuo em membrana de 0,2 µm de porosidade. A amostra filtrada foi injetada no cromatógrafo líquido, equipado com uma bomba quaternária acoplado a um sistema desgaseificador (DGU-20A5r), um forno para controlar a temperatura da coluna, e um detector de arranjo de diodos (DAD)(SPD-M20A). O software utilizado foi o LC-Solutions fabricado pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japan). A coluna usada no método foi uma C-18(150mmx4,6mm - Phenomenex, Torrance, CA, EUA) e as condições de operação foram: fase móvel composta de água e metanol na proporção de 20:80 (V/V), 0,4 mL/min e 221 nm. O teste de recuperação foi realizado enriquecendo o solo com 4µg e extraindo-se conforme a metodologia descrita acima, e obteve-se 105,75% da quantidade inicial de PBZ. A concentração de PBZ foi calculada pela Equação 2.

$$C = \left(\frac{m}{V_i} \times \frac{V_m}{M_s} \right) \times \frac{100}{R} \quad (2)$$

C = concentração de PBZ na amostra (µg/g);

m = massa de PBZ calculada pelo software do Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência(µg);

V_m = volume de metanol usado na extração (mL);

M_s = massa de solo usada no experimento (g);

V_i = volume injetado no cromatógrafo líquido(em µL);

R = recuperação (%).

4.6.3 Determinação da concentração de glicerol

Às amostras de 2,5 g de solo, dos ensaios contendo PBZ e glicerol, foram adicionados 10 mL de água destilada. Os frascos de Erlenmeyer contendo as suspensões foram acondicionados em mesa agitadora a 150 rpm e 30°C, durante 30 min. Em seguida, foi realizada uma filtração em papel filtro qualitativo. O filtrado foi utilizado para a determinação da concentração de glicerol utilizando-se o Kit Triglicerides Liquiform (Labtest Diagnóstica). A leitura da absorbância foi realizada em 505 nm em espectrofotômetro (700 plus, Femto).

4.6.4 Fitotoxicidade

A determinação da fitotoxicidade foram realizados utilizando amostras de: solo, PBZ nas concentrações dos ensaios, tortas, e os ensaios (E1, E2, E3, E4, e E5) nos tempos inicial e final. Utilizou-se sementes de *Allium cepa* (Vale Ouro - IPA 11), cedidas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA). Cada 30 sementes foram submetidas aos diferentes tratamentos referente aos ensaios de biodegradação, em placas de Petri, as quais foram acondicionadas a temperatura ambiente $\pm 28^\circ\text{C}$ por 3 dias. As raízes foram coletadas e medidas com auxílio de uma régua, e o índice de germinação foi calculado pela Equação 3.

$$IG = \left(\frac{S1}{S2} \times \frac{R1}{R2} \right) \times 100 \quad (3)$$

GI- Índice Germinação (%);

S1- o número de sementes germinadas no extrato de solo;

S2- o número de sementes germinadas no controle;

R1- comprimento médio da raiz no extrato de solo (cm);

R2- comprimento médio da raiz no controle (cm).

4.6.5 Espectroscopia de infravermelho

As alterações na estrutura química do PBZ, após os cultivos de biodegradação foram analisadas pelo CETENE (Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste) via espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (*Fourier Transmission Infrared* – FTIR), em espectrofotômetro Burker (Vertex 70), seguindo a metodologia ATR (Reflexão Total Atenuada) com a utilização de um cristal de Germânio.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Biodegradação utilizando a estratégia de bioestímulo

A quantificação de micro-organismos heterotróficos cultiváveis durante a biodegradação é mostrada na Figura 5.1. No segundo dia de biodegradação observa-se nos ensaios E1 (PBZ - controle), E2 (glicerol comercial), E4 (torta de amendoim) e E5 (torta de gergelim) um considerável aumento no crescimento microbiano. Em E3 (glicerol bruto) esta fase é observada com sete dias de cultivo. Houve maior crescimento nos primeiros dois dias no experimento E5. A partir de sete dias, houve um decréscimo na concentração de células em E1, E2 e E5. A partir de 35 dias houve um aumento na concentração de células em todos os experimentos, com exceção daquele em que foi adicionado apenas PBZ como fonte de carbono. De uma forma geral, houve crescimento de heterotróficos cultiváveis em todos os experimentos.

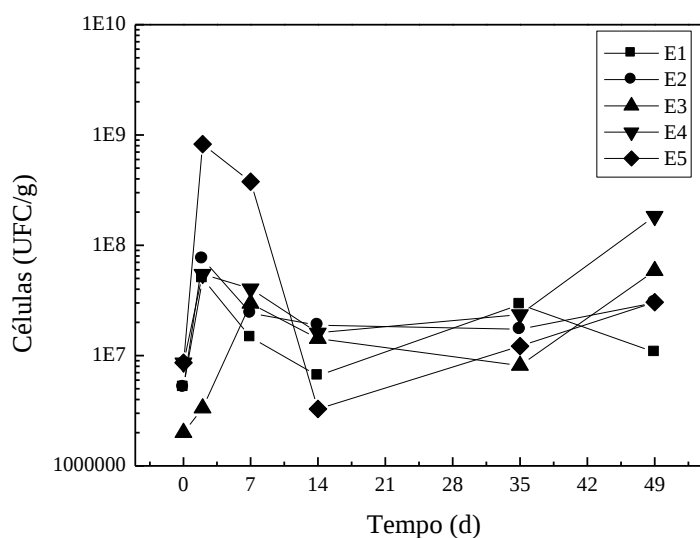


Figura 5.1 — Crescimento dos experimentos usando bioestímulo. E1: sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.

Ao final dos experimentos de biodegradação todos ensaios suplementados com fontes de carbono adicionais apresentaram maior crescimento do que aquele obtido no experimento E1 (Tabela 5.1). O experimento E4 apresentou crescimento 18 % maior que o do experimento E1. Não houve diferença significativa entre E2 e E5, e o crescimento em E3 foi 11 % maior do que em E1.

Tabela 5.1 — Concentração de células e crescimento obtidos com 49 dias nos experimentos E1: sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.

Experimento	Concentração (Log UFC/g)	Δconcentração (%)
E1	7,0 ± 4,3	4,6
E2	7,5 ± 20,5	11,3
E3	7,8 ± 3,0	15,6
E4	8,3 ± 5,7	23,0
E5	7,5 ± 4,58	11,4

A quantificação do glicerol revelou que em dois dias este já tinha sido totalmente consumido nos ensaios E2 e E3. A confirmação de que a fonte adicional é consumida no início do processo também foi relatado nos experimentos com solos saturados de Vaz *et al.* (2012).

A presença da fonte adicional na biodegradação, bem como a concentração utilizada parecem ter uma determinada influência no crescimento dos microorganismos. Nos experimentos com PBZ em solos não saturados de Vaz *et al.* (2015a), utilizando a razão PBZ:glicerol (1:5) a concentração UFC/mL ficou em torno de 10^6 . Já nos ensaios de Santos Filho (2015b) utilizando uma razão PBZ:glicerol (1:600) mostram que houve um aumento no Log UFC/g de 10^6 para 10^7 quando se utilizou glicerol, meio mineral de Ridgway, ou ambos. Em experimentos de biodegradação de HPA's o número heterotróficos total, bactérias totais e específicos micro-organismos degradadores de HPA's aumentaram em torno de 10^3 para 10^7 e 10^9 nos experimentos em que foram adicionados fertilizantes industriais (DELILLE, 2009).

A presença de um substrato adicional também auxilia nos processos de remediação onde os níveis de contaminação são baixos; pois o crescimento microbiano é uniformemente igualado ao declínio do substrato numa situação denominada “mínima concentração do substrato”. Nestes casos, a metabolização do contaminante precisa ser sustentada por outro composto numa concentração adequada (SILVA, 2004).

O pH do solo durante a biodegradação, apresentou pequena variação, mantendo-se entre 6,7 e 8,0 em todos experimentos (Figura 5.2), estando dentro da faixa ideal para a biodegradação citada por Moreira& Siqueira (2006) que é entre 5,6 a 8,0. Este parâmetro é um dos mais importantes, uma vez que influencia na disponibilidade do composto.

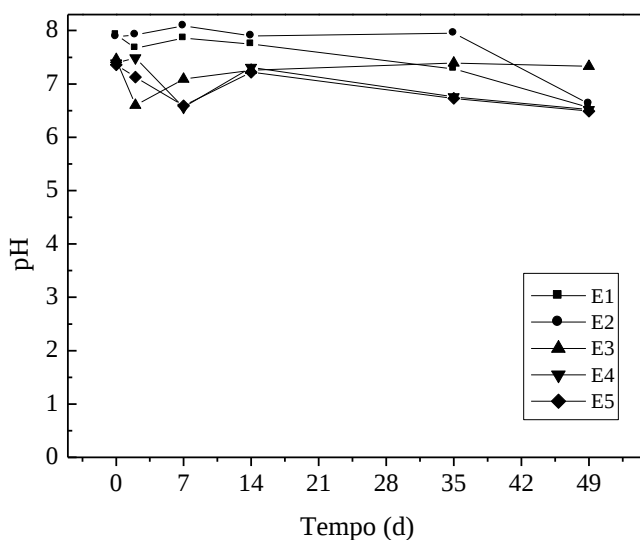


Figura 5.2 —Valores do pH nos ensaios E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: Torta de amendoim e E5: torta de gergelim.

A biodegradação ocorreu independente da presença de uma fonte adicional de carbono (Figura 5.3a e 5.3b). No ensaio controle E1, a biodegradação em sete dias foi 26,08 %, consideravelmente maior que nos ensaios E2 (4,81 %), E3 (9,58 %), e E4 (0,0 %). Por outro lado, uma taxa similar ao E1 foi obtida no ensaio E5 (23,09 %), entretanto nestas duas condições a biodegradação estabilizou aos 35 dias. Entre o 7° e 35° a biodegradação aumenta consideravelmente em todos experimentos adicionados de fontes de carbono e/ou nitrogênio: 67,09% (E2), 54,09% (E3), 70,87% (E4) e 51,94% (E5). Na fase final, entre 35° a 49° dias,

foi um período em que foi possível testar a resistência e biodegradabilidade da microbiota nativa. Nesta fase ocorreu biodegradação apenas nos ensaios E2 (12,52%) e E4 (15,76%), considerando todo o período de experimento, as taxas foram em torno de 85,0 % a biodegradação nestes dois ensaios.

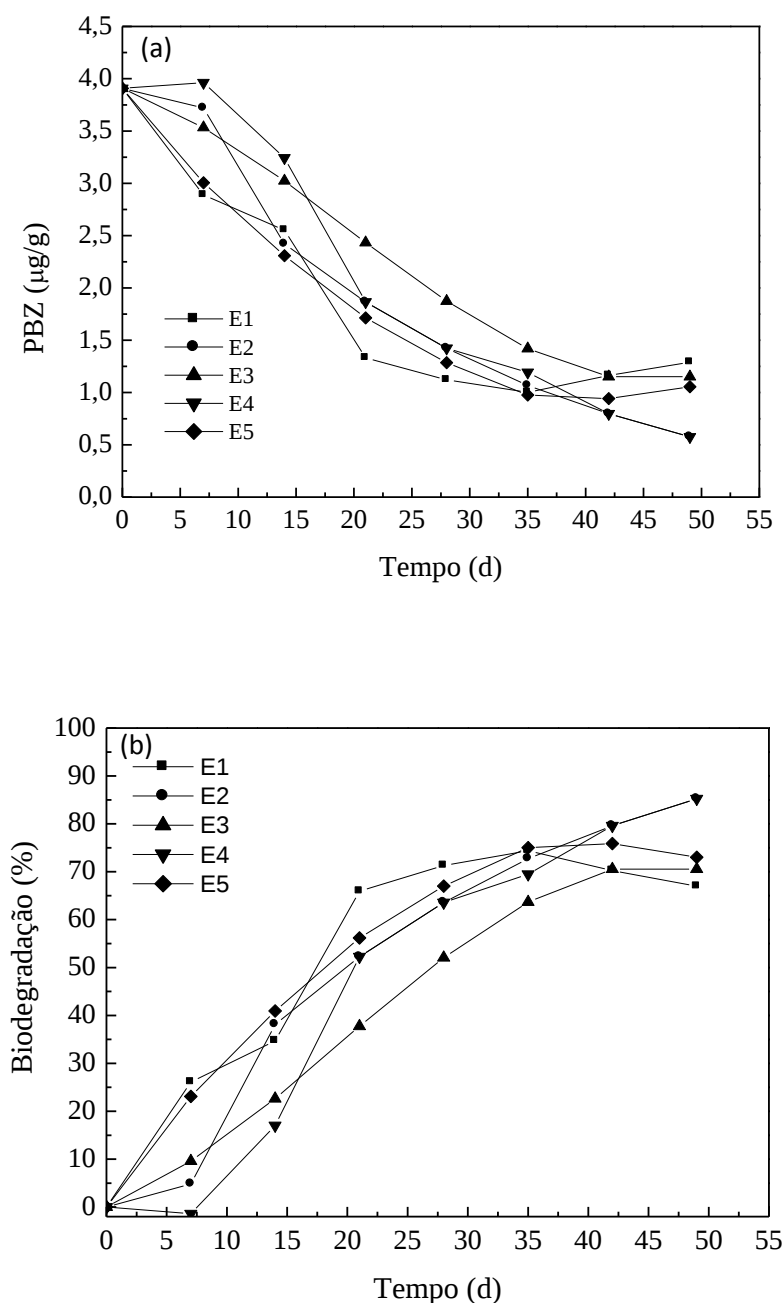


Figura 5.3 — Concentração de PBZ (a) e biodegradação (b) durante os experimentos com bioestímulo: E1:sem fontes adicionais, E2: glicerol comercial, E3: glicerol bruto, E4: torta de amendoim e E5: torta de gergelim.

Dentre os vários processos metabólicos envolvidos na biodegradação, o co-metabolismo é caracterizado por estimular a produção de enzimas chave através da suplementação do meio com um substrato primário, promovendo a degradação do segundo substrato com uma maior eficiência (HORVATH, 1972; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; LU *et al.*, 2015). A presença do co-substrato ativa mecanismos moleculares nas células, aumentando a expressão de genes codificadores de enzimas (SUN *et al.*, 2015). É possível ainda afirmar que resíduos orgânicos adicionados causam mudanças ambientais no solo favorecendo a degradação de poluentes pela microbiota nativa e um resíduo pode ser melhor que o outro devido aos seus respectivos teores de carbono e nitrogênio em relação ao contaminante (UMAR *et al.*, 2009).

O bioestímulo como estratégia de biodegradação tem sido relatado com sucesso em vários estudos. A adição de fertilizantes comerciais aumentaram taxas de biodegradação de hidrocarbonetos para 50% (DELLILE *et al.* 2009), e biofertilizantes em pesquisas com o herbicida ametrina diminuíram o tempo de biodegradação a aumentaram a taxa de CO₂ acumulado para 300 mg/L em comparação a 200 mg/L no controle (RÉGO *et al.*, 2014).

Os estudos na linha de biodegradação do PBZ anteriormente realizados apontam que altas percentuais de biodegradação são atingidos quando se utiliza solos com histórico e aplicando altos teores de fontes adicionais (tabela 5.2). O resultado da utilização da torta de amendoim (ensaio E4) como cossubstrato, de 85% de biodegradação, significa um dos maiores valores já atingidos. A utilidade deste resíduo em bioprocessos agrega mais valor a um co-produto que é na maior parte das vezes descartado em aterros (SEVERINO *et al.*, 2002).

Tabela 5.2 — Pesquisas anteriores sobre a biodegradação de PBZ em solos não saturados.

	PBZ:Glicerol	% de biodegradação	
		Solo sem histórico	Solo com histórico
Vaz <i>et al.</i> (2015a)	1:5	64% com ou sem glicerol	99%com ou sem glicerol
Santos Filho (2014)	1:600	—	Com glicerol 60 – 79%
e			Com meio mineral 94%
Vaz <i>et al.</i> (2015b)			Com glicerol e meio mineral 85%
			Com inóculo 29 – 38%
			Bioestímulo + bioaumento 81 – 96%

5.2 Biodegradação utilizando bioaumento e bioestímulo

Nos estudos realizados por Silva (2003) testando vários solos, o solo com histórico de aplicação do paclobutrazol foi o que apresentou maior capacidade degradativa (42 %). Vaz *et al.* (2015), utilizando solos não saturados, observaram que a presença de histórico de aplicação de PBZ foi o fator que determinou a maior eficiência biodegradativa do solo. Sendo assim, nesta etapa dos experimentos, o solo com histórico foi misturado ao solo sem histórico em diferentes porcentagens combinado do melhor resíduo como fonte de carbono adicional, a torta de amendoim.

Em relação aos micro-organismo heterotróficos totais, a Tabela 5.3 apresenta a concentração de células e o crescimento obtidos com 49 dias de cultivo dos solos sem histórico utilizando bioaumento pela adição de solo com histórico de aplicação. O experimento usando apenas o solo sem histórico, E6, apresentou um decréscimo no número de micro-organismos. Por outro lado, o experimento com 80 % de solo com histórico (E9) apresentou o maior crescimento, não havendo significativa diferença com relação ao experimento usando 50 % de solo com histórico (E8). No experimento com 20 % de solo com histórico (E7) houve um crescimento discreto.

Tabela 5.3 —.Concentração de células e crescimento obtidos com 49 dias nos experimentos E6: 100% de solo sem histórico, E7: 80% de solo sem histórico, E8: 50% de solo sem histórico, E9: 20% de solo sem histórico.

Experimento	Concentração (Log UFC/g)	Δ concentração (%)
E6	6,2 $\pm$ 6,2	-4,6
E7	6,5 $\pm$ 6,9	0,11
E8	6,9 $\pm$ 6,5	7,0
E9	6,9 $\pm$ 6,9	7,3

Segundo Silva (2003), ao se aplicar um composto químico ao solo a microbiota passa por um período de adaptação. Após esse período, a velocidade em que ocorrem as reações metabólicas pode ser mais lenta ou mais rápida, porém caso haja outras adições do composto orgânico durante o período de metabolismo ativo, ocorre dissipação da segunda adição sem ocorrer o período de adaptação. Neste caso, a taxa de biodegradação pode aumentar com outras aplicações subsequentes.

A concentração de PBZ no solo e a biodegradação são apresentadas nas Figuras 5.4a e 5.4b, respectivamente. atingiram altos valores nos experimentos E9 e E8, 97,5 e 95%, respectivamente. Nos experimentos E6 e E7, os valores foram 47,5 e 55%, respectivamente. Além disso, nos ensaios E6 e E7 a biodegradação estabilizou em 21 dias, diferentemente dos ensaios E8 e E9 em que a concentração de PBZ diminuiu até 49 dias.

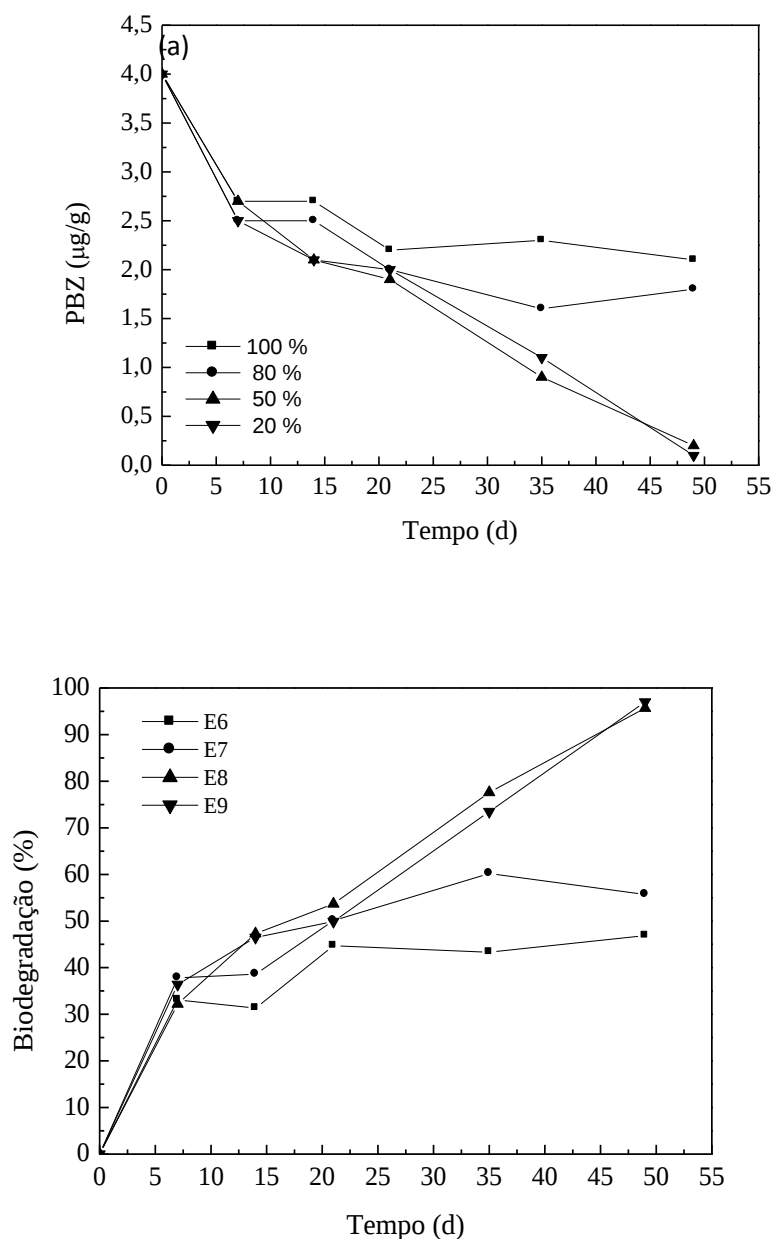


Figura 5.4 —Concentração de PBZ (a) e biodegradação (b) durante os experimentos com bioestímulo e bioaumento: E6: 100 % de solo sem histórico; E7: 80 % de solo sem histórico; E8: 50% de solo sem histórico; E9: 20% de solo sem histórico.

Na natureza os micro-organismos existem em consórcio e culturas raramente são puras. É comum que a tendência que culturas mistas apresentem uma degradação mais rápida que cultivos puros (SORIANO&SORIANO, 2015; SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI et al., 2015), isto porque a sua biodiversidade pode aumentar a sobrevivência no ambiente e o aumento do número de vias catabólicas disponíveis para a biodegradação do contaminante

(SMITH; PAUL, 2005). Vários gêneros de actinomicetos tem sido encontrados com capacidade de degradar pesticidas como organoclorados, triazinas, triazinonas, carbamatos, organofosfatos, acetanilidas e sulfonilúrias (SORIANO&SORIANO, 2015). Isolados de *Arthrobacter* e *Streptomyces* juntos são capazes de mineralizar diazinon, mas nenhuma das bactérias puras produz CO₂ a partir deste inseticida. O mesmo ocorre com uma mistura de *Pseudomonas* e *Arthrobacter*, onde apenas juntos degradam o herbicida silvex (ALEXANDER, 1999). O consórcio de *Pseudomonas plecoglossicida* e *Pseudomonas aeruginosa* foi isolado de um solo contaminado, e foi capaz de degradar em torno de 95 % do inseticida organofosforado profenofos (SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI et al., 2015).

No solo apenas a abundância dos micro-organismos não parece ser tão importante quanto a diversidade (Kennedy 1999), pois há um fenômeno conhecido como redundância onde várias espécies possuem funções biológicas semelhantes, e a perda de uma espécie é compensada funcionalmente por outras, exibindo diversas formas de sobrevivência, adaptando-se às diferentes condições de crescimento e suportando adversidades do ambiente (Perry et al, 1989). Logo um solo que apresenta alta redundância de funções no ecossistema provavelmente é capaz de manter o equilíbrio de processos ecológicos, mesmo sob um distúrbio (Zilli et al, 2003). Este efeito tampão de distúrbios externos é abordado como resiliência, o qual depende diretamente da biodiversidade das interações e processos ecológicos (Perry et al, 1989)

Sendo assim, visto que os ensaios E8 e E9 que continham uma mistura de solo com histórico e solo sem histórico obtiveram porcentagens de biodegradação maiores que o ensaio E4 que continha 100% solo com histórico, atribui-se que provavelmente seja devido à maior diversidade da comunidade microbiana oriunda da mistura de solos, determinando uma maior eficiência da biodegradação caracterizando o efeito tampão, atrelado à alta adaptabilidade dos micro-organismos.

5.3 Caracterização das amostras dos experimentos de biodegradação usando espectroscopia FTIR

As Figuras 5.5a e 5.5b apresentam as análises de espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier das amostras: PBZ dissolvido em água destilada e apenas do metanol, respectivamente. Comparando os espectros destas figuras é possível verificar uma banda a 1650 cm^{-1} única para espectros de PBZ.

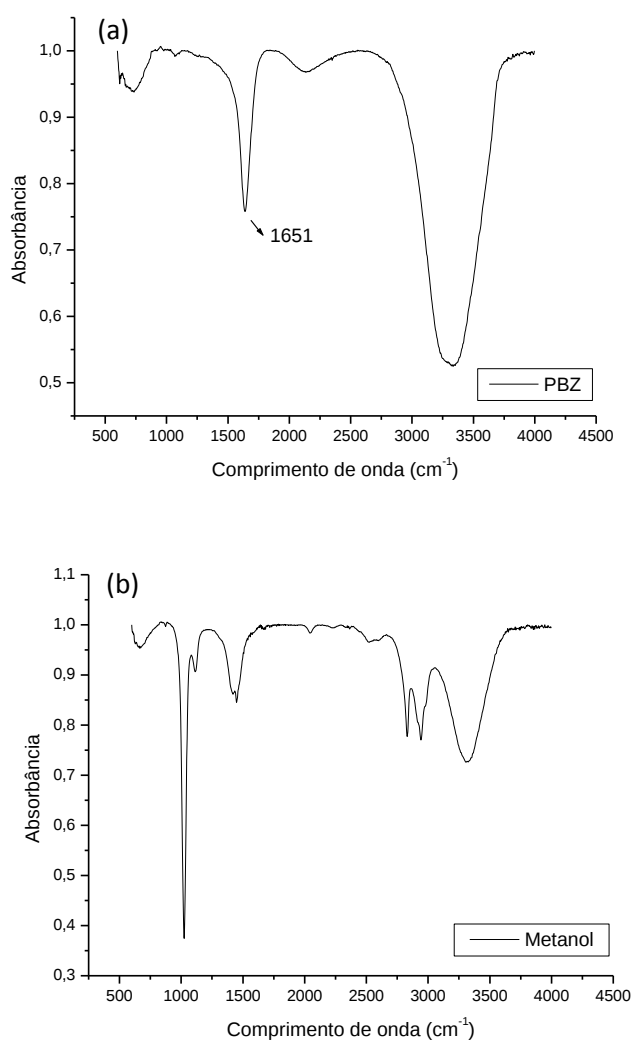


Figura 5.5— Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) do PBZ dissolvido em água (a) e do metanol (b).

Os espectros das amostras de solo dos experimentos E1 e E2 nos tempos inicial e final são apresentados nas Figuras 5.6a e 5.6b, respectivamente. Comparando-se os espectros das amostras no início e no final dos experimentos, observa-se a ausência da banda a 1650 cm^{-1} apenas na amostra final de ambos os experimentos. Esta banda corresponde a $\text{C}=\text{C}$ pertencente ao grupo benzeno e o $\text{C}=\text{N}$ pertencente ao anel 1,2,4 - triazol, presentes na estrutura do paclobutrazol.

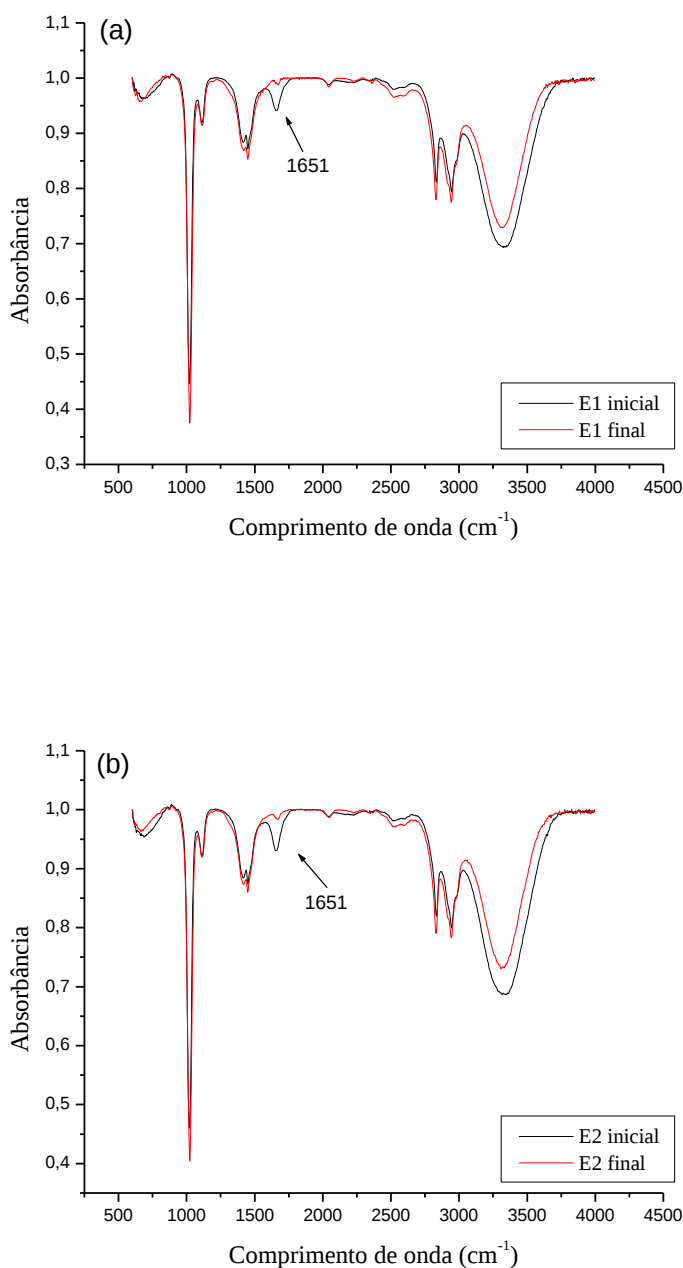


Figura 5.6 —Espectros das amostras de solo dos experimentos E1 (a) e E2 (b) nos tempos inicial e final.

Provavelmente esta validação de biodegradação do PBZ pode ser estendida para os demais ensaios, uma vez que esta ocorreu independente da utilização da fonte de carbono e foi utilizado o mesmo solo contendo a mesma microbiota em todos ensaios.

5.4 Fitotoxicidade

Os resultados do teste de fitotoxicidade do pesticida, dos resíduos agro-industriais e dos ensaios, foram avaliados através do índice de germinação das sementes de *Allium Cepa*, representado na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 —Índices de germinação das amostras no início e no final dos experimentos de biodegradação: E1 (sem fonte adicional), E2 (glicerol comercial), E3 (glicerol bruto), E4 (torta de amendoim) e E5 (torta de gergelim).

Amostra	Índice de Germinação (%)	
	tempo inicial	tempo final
Apenas PBZ	52,27	—
Glicerol bruto	48,94	—
Torta de amendoim	51,27	—
Torta de gergelim	52,27	—
E1	82,4	96,6
E2	96,6	85,17
E3	81,87	65,61
E4	90,11	85,51
E5	80,71	135,83

De acordo com Paradelo et al. (2008), a fitotoxicidade pode ser considerada moderada entre 50 e 80%, e ausente, quando acima de 80%. Observa-se que a concentração de PBZ (4 µg/g) utilizada não foi considerada tóxica, entretanto o índice de germinação foi aumentado ao se adicionar o solo (ensaio E1- controle). Dentre os resíduos agroindustriais apenas o glicerol bruto se apresentou tóxico. Nos ensaios observou-se um aumento no índice de germinação comparado com os resíduos separadamente, acredita-se que o solo auxiliou de alguma forma a germinação das sensíveis sementes de *Allium cepa*. Contudo, em relação ao início e final dos experimentos observa-se que índice sofre uma diminuição de 6 % no experimento E2 (glicerol comercial), 16,3 % em E3 (glicerol bruto), 4,6 % em E4 (torta de amendoim) e em E5 (torta de gergelim), o índice aumentou 55,12 %. Com excessão do E3, os índices de germinação das amostras no tempo final dos experimentos revelam fitotoxicidade negativa para os produtos resultantes da biodegradação.

6. CONCLUSÕES

Os experimentos de biodegradação por bioestímulo revelaram que a torta de amendoim promoveu uma bioestimulação mais acentuada associada a um maior crescimento microbiano, e os dados foram similares aos ensaios com glicerol comercial.

As condições de pH também favoreceram a ação dos micro-organismos.

A otimização da biodegradação para o solo sem histórico (bioestímulo + bioaumento) mostrou que o solo com histórico de aplicação de PBZ é uma excelente fonte de micro-organismos adaptados e que o bioestímulo em solos sem histórico não foi suficientemente alta.

Espectros FTIR indicam biodegradação dos anéis aromáticos PBZ pela microbiota diversificada e especializada do solo com histórico de aplicação.

Para a concentração de 4 µg/g de PBZ os ensaios não foram considerados fitotóxicos, exceto nos casos em que o glicerol bruto foi usado. A biodegradação aumentou o índice de germinação quando foi usada a torta de gergelim, proporcionando uma melhora na qualidade do solo.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, A. L.; et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 37, p. 260-266. 2008
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and Bioremediation**. London :Academic Press,1999.
- ALEXANDER, M. **Introduction to soil Microbiology**. New York: J. Wiley, 1977. 467p.
- ANAND, P.; SAXENA, R.K. A comparative study of solvent-assisted pretreatment of biodiesel derived crude glycerol on growth and 1,3- propanediol production from *Citrobacter freundii*. **New Biotechnology**, p. 1-7. 2011
- ANVISA. **Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/sala+de+imprensa/menu+-+noticias+anos/2012+noticias/seminario+volta+a+discutir+mercado+de+agrototoxicos+em+2012>. Acesso em 08 de junho de 2015.
- AVILAN, L. A; ALVAREZ , C .R. **El mango**. Caracas, Editorial América, 1990.401p.
- BAEK, K., WENG, M., MCKEEVER, R., RIEBER, K., PARK, C., NUSSLEIN K. Biodegradation of low concentrations of 1,2-dibromoethane in groundwater is enhanced by phenol. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 98, pp. 1329–1338, 2013.
- BASAK, B., DEY, A., Chapter 9: Bioremediation approaches for recalcitrant pollutants: potentiality, successes and limitation. In: RATHOURE, A. K., DHATWALIA, V. K. Toxicity and waste Management using Bioremediation. **Engineering Science Reference**. IGI Global. 2015.
- BNDES Setorial, . **Formação do mercado de biodiesel no Brasil**. Rio de Janeiro, n. 25, p. 39-64, mar. 2007. Disponível em: http://www.bndes.gov.br/SiteBNDES/export/sites/default/bndes_pt/Galerias/Arquivos/conhecimento/bnset/set2502.pdf. Acesso em 20 de novembro de 2015.
- BODÍK, I. et al. Biodiesel waste as source of organic carbon for municipal WWTP denitrification. **Bioresource technology**, v. 100, n. 8, p. 2452-2456, 2009
- BOUCHEZ, T.; PATUREAU, D; DABERT, P.; JURETSCHKO, S.; DORÉ, J. DELGENÈS, P; MOLETTA, R.; WAGNER, M. Ecological study of a bioaugmentation failure. **Environmental Microbiology**. v. 2, n. 2, p. 179-190.
- BOURNAY, L.; CASANAVE, D.; DELFORT, B.; HILLION, G.; CHODORGE, J. A. New heterogeneous process for biodiesel production: a way to improve the quality and the value of the crude glycerin produced by biodiesel plants. **Catalysis Today**. Amsterdam. v. 106, n. 1-4, p. 190-192, 2005.
- BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**. V. 74, P. 63-67, 2000.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**. v. 209, p.141-148, 2002.

BRASIL. **Orientação Técnica CGA nº 03/2011, 06 de setembro de 2011**. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/agrotoxicos/Orienta%C3%A7%C3%A3o%20T%C3%A9cnica%20n%C2%BA%203-2011.PDF. Acesso em 08 de junho de 2015.

CASTILHO, L. R.; MEDRONHO, R. A.; ALVES, T. L. M. Production and extraction of pectinases obtained by solid state fermentation of agroindustrial residues with *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. V.71, p 45-50, 2000.

CAVALHEIRO, J. M. B. T.; DE ALMEIDA, M. C. M. D.; GRANDFILS, C.; DA FONSECA, M. M. R. Poly(3-hydroxybutyrate) production by *Capriavidus necator* using waste glycerol. **Process Biochemistry**. v. 44, n. 5, p. 509-515, 2009.

CHAÎNEAU, C. H.; ROUGEUX, G.; YÉPRÉMIAN, C.; OUDOT, J. Effect of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in soil. **Soil Biol Biochem**. New York. v. 37, n. 8, p. 1490-1497, 2005.

CHANEY, W.R. Growth retardants: A promising tool for managing urban trees. **Purdue Extension**. Document FNR-252-W. 2005. Disponível em: <http://www.extension.purdue.edu/extmedia/FNR/FNR-252-W.pdf>. Acesso em 30 de março de 2015.

DEJONGHE, W., BOON, M., SEGHERS, D., TOP, E. M., VERSTRAETE, W. Bioaugmentation of soils by increasing microbial richness: missing links. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 649–657, 2001.

EFSA, 2006. Paclobutrazol Draft Assessment Report (DAR). **Report and proposed decision of the United Kingdom made to the European Commission**. Available at: <http://dar.efsa.europa.eu/dar-web/provision>. Acesso em 20 de março de 2015.

EMBRAPA – EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro: SNLCS, 1979.

FAS — Foreigner Agricultural Service (United States Department of Agriculture). **Oilseeds: World Markets and Trade**. 2016. Disponível em: <http://www.fas.usda.gov/data/oilseeds-world-markets-and-trade>. Acesso em 12 de janeiro de 2016.

FARINAS, C. S.; LEMO, V.; RODRIGUEZ-ZUNIGA, U. F.; VICTOR, B. N.; COURI, S. V. Avaliação de diferentes resíduos agroindustriais como substratos para a produção de celulases por fermentação semi-sólida. São Carlos: **Embrapa Instrumentação Agropecuária**, 2008.

FERREIRA, C. M. A. **Avaliação da torta de dendê (*Elaeis guineensis*) para a produção de etanol de segunda geração**. Dissertação (Mestrado em Química) — Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri. Diamantina, 2013.

FLETCHER, A., GILLEY, A.; SANKHLA, N.; DAVIES, T. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**. v. 24, p. 55-138, 2000.

FIGUEIREDO, Tamiris V. B. et al. Produção e caracterização de polihidroxialcanoatos obtidos por fermentação da glicerina bruta residual do biodiesel. **Química Nova [online]**. v.37, n.7, p. 1111-1117, 2014.

FANTROUSSI, E. S., AGATHOS, S. N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? **Current Opinion in Microbiology**. n.8, p.268-275, 2005.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. n.34, p.36-43, 2005.

HAMPTON J. G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**. v. 16, n.2, p. 167-172, 1988.

HATZINGER, P. B., STREGER, S. H., BEGLEY, J. F. Enhancing aerobic biodegradation of 1,2-dibromoethane in groundwater using ethane or propane and inorganic nutrients. **Journal of Contaminant Hydrology**. v. 172, p. 61-70. 2015.

HOVARTH, R, S. Microbial Co-Metabolism and the Degradation of Organic Compounds in Nature. **Bacteriological Reviews**. P. 146-155, 1972.

IBAMA, **Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental (PPA) de Agrotóxicos e Afins**. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/qualidade-ambiental/avaliacao-do-potencial-de-periculosidade-ambiental-ppa>. Acesso em 28 de janeiro de 2016.

HIREMATH, A.; KANNABIRAN, M.; RANGASWAMY, V. 1, 3-Propanediol production from crude glycerol from jatropha biodiesel process. **New Biotechnology**. n. 28, p.19-23, 2011.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A.; HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant – paclobutrazol (PP333). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 1265-1267, 1996.

JARDIM, W.R. Alimentos e alimentação do gado bovino. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976. 338p. In: ABDALLA, A. L.; et al. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **Revista Brasileira de Zootecnia**. V. 37, p. 260-266. 2008

JACOBS, K. A.; BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. **Pest Management Science**. v. 56, n.5, p.407-412, 2000.

KENNEDY, A. C. Bacterial diversity in agroecosystems. Agriculture, **Ecosystems and Environment**, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 65-76, 1999.

KNAEBEL, D. B.; FEDERLE, T. W.; MCAVOY, D. C.; VESTAL, J. R. Microbial mineralization of organic compounds in an acidic agricultural soil: effects of preadsorption to various soil constituents. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 15, n. 11, p. 1865-1875, 1996.

LACA-BUENDIA, Julio Pedro. Efeito De Doses De Reguladores De Crescimento No Algodoeiro (*Gossypium hirsutum* L.). **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 1, n. 1, p. 109-113, 1989. Disponível em: <http://www.cnpdia.embrapa.br/rbfv/pdfs/v1n1p109.pdf>

LU, H.; ZHANG, G.; LU, Y.; ZHANG, Y.; LI, B.; CAO, WEI. Using co-metabolism to accelerate synthetic starch wastewater degradation and nutrient recovery in photosynthetic bacterial wastewater treatment technology. **Environmental Technology**. 2015.

MAIA, E. et al. Desenvolvimento de bananeiras cultivadas em ambiente protegido sob efeito do paclobutrazol aplicado nas folhas. **Revista Brasileira de Fruticultura**. V. 30, n.4, Jaboticabal, 2008.

MAPA, **Agrofit – sistema de agrotóxicos fitossanitários: consulta de produtos formulados**. Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons. Acesso: 28 de janeiro de 2016.

MATEUS, G. P; et al. Perdas de cloreto de mepiquat no algodoeiro por chuva simulada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 3, n. 7, Brasília, 2004.

MCKEEVER, R., SHEPPARD, D., NUSSELEIN, K., BAEK, H., RIEBER, K., ERGAS, S. J., FORBES, R., HILYARD, M. PARK, C. Biodegradation of ethylene dibromide (1,2-dibromoethane [EDB]) in microcosms simulating in situ biostimulated conditions. **Journal of Hazard Materials**, v. 209–210, p. 92–98. 2012.

MILFONT, M.L.; ANTONINO, A.C.D.; MARTINS, J.M.F.; NETTO, A.M.; GOUVEIA, E.R.; CORREA, M.M. Transporte do paclobutrazol em colunas de solos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, 32:2165-2175, 2008.

MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do Solo**. 2 ed, Lavras: UFLA, 2006. ISBN: 85-87692-33-X

MORRISON, F.B. **Alimentos e alimentação dos animais**. 2.ed. São Paulo: Edições Melhoramentos, 1966. 892p.

MOTA, C. J. A.; PESTANA, C. F. M. Co-produtos da Produção de Biodiesel. **Revista Virtual de Química** 2011, 3, 416.

MU, Y.; TENG, H; ZHANG, D. J.; WANG, W; XIU, Z. L. Microbial production of 1, 3-propanediol by *Klebsiella pneumonia* using crude glycerol from biodiesel preparations. **Biotechnololy Letters**. n. 28, p.1755-1759, 2006.

NASCIMENTO, T.C. F.; OLIVEIRA, F. J. S.; FRANÇA, F. P. Biorremediación de um suelo tropical contaminado com residuos aceitosos intemperizados. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**. Ciudad de México, v. 29, n. 1, p. 21-28, 2013.

NEIVA JÚNIOR, A.P.; VAN CLEEF, E.H.C.B.; PARDO, R.M.P. et al. Subprodutos agroindustriais do biodiesel na alimentação de ruminantes. In: **CONGRESSO DA REDE BRASILEIRA DE TECNOLOGIA DE BIODIESEL**, 2007, Brasília: ABIPTI, 2007. Disponível em:

<http://www.biodiesel.gov.br/docs/congresso2007/coproduto/22.pdf>. Acesso em: 27 de junho 2015.

OOI, T. L.; YONG, K. C.; HAZIMAH, A. H.; DZULKEFLY, K.; WAN YUNUS, W. M. Z. Glycerol residue – a rich source of glycerol and medium chain fatty acids. **Journal of Oleo Science**. Tokyo. v. 53, n. 1, p. 29-33, 2004.

PARADELO, R.; MOLDES, A. B.; RODRÍGUEZ, M.; BARRAL, M. T. Relationship between heavy metals and phytotoxicity in composts. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Reynosa. v.6, n. 2, p. 143-151, 2008

PERRY, D. A.; AMARANTHUS, M. P.; BORCHERS, J. G.; BORCHERS, S. L.; BRAINERD, R. E. Bootstrapping in ecosystems. **Bioscience**, Washington, v. 39, n. 4, p. 230-237, 1989.

PETROBIO. Biodiesel: **Viabilidade econômica**. Ribeirão Preto, 2005. Disponível em: <http://www.plantebiodiesel.com.br/MANUAIS%20DO%20CD/27%20-%20BIODIESEL%20%20VIABILIDADE%20ECONOMICApara%20100000%20Litros%20de%20Biodiesel%20por%20dia.pdf>. Acesso: 05 maio de 2015.

RADEMACHER, W. Growth Retardants: Effects On Gibberellin Biosynthesis And Other Metabolic Pathways. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, n. 51, p.501-531. 2000.

RAKSHIT, K.D.; DARUKESHWARA, J.; RATHINA RAJ, K.; NARASIMHAMURTHY, K.; SAIBABA, P.; BHAGYA, S. Toxicity studies of detoxified Jatropha meal (*Jatropha curcas*) in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.3621-3625, 2008.

RÉGO, A. P. J.; et al. CO₂ Production of Soil Microbiota in the Presence of Ametryne and Biofertilizer. **Water Air Soil Pollut.** P. 225-2222, 2014.

RIDGWAY, H. F.; SAFARIK, J.; PHIPPS, D.; CARL, P. & CLARK, D. Identification and catabolic activity of well-derived gasoline-degrading bacteria from a contaminated aquifer. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 56, p. 3565-3575, 1990.

RIGOTTO, R (org). **Agrotóxicos, Trabalho e Saúde: vulnerabilidade e resistência no contexto da modernização agrícola no Baixo Jaguaribe/CE**. Fortaleza: UFC, 2011. ISBN: 978-85-7282-482-8.

RYMOWICZ, W. et al. Citric acid production from raw glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Papers**, v. 60, n. 5, p. 391-394, 2006.

SABOURIN-PROVOST, G.; HALLENBECK, P.C. High yield conversion of a crude glycerol fraction from biodiesel production to hydrogen by photofermentation. **Bioresource Technology**. v. 100, p. 3513-3517, 2009.

SAITO, S et al. A Plant Growth Retardant, Uniconazole, Is a Potent Inhibitor of ABA Catabolismo in *Arabidopsis*. **Bioscience Biochemistry**, v. 70, n. 7, p. 1731-1739, jul. 2006.

SANTOS FILHO, E. A. **Efeito do bioestímulo e do bioaumento sobre a biodegradação de paclobutrazol em solos**. Dissertação (mestrado em Biotecnologia Industrial) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

SCOTT, C.; LEWIS, S. E.; MILLA, R.; TAYLOR, M. C. RODGERS, A, J, W. DUMSDAY, G., RUSSEL, R. J. et al. A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. **Journal of Environmental Management**, v. 91, n. 10, p. 2075-2078, 2010.

SENEVIRATNE, G.; ZAVAHIR, J. S.; BANDARA, W. M. M. S. Fungal-bacterial biofilms: their development for a novel biotechnological applications. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 6, p. 739-743, 2008.

SEVERINO, L. S. et al. A review on the challenges for increased production of castor. **Agronomy journal**, v. 104, n. 4, p. 853-880, 2012.

SHARMA, D.; AWASTHI, M. D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit in soil. **Chemosphere**, v. 60, p. 164-169, 2005.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação de paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, p. 1223-1227, 2003.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In: SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. **Agrotóxico e Ambiente**. 1º Edição, Brasília: Embrapa, 2004. p.144-163.

SILVA, C.M.M. S; VIEIRA, R, F. Impacto de xenobióticos e metais pesados na microbiota do solo. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**. 2º Edição, Jaguariúma: Embrapa, 2008, p. 18-41.

SILVA, J. I. O. **Uso de reguladores de crescimento na indução floral de mangueiras da variedade tommy atkins**. Dissertação (mestrado em Agronomia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2007.

SILVEIRA, A, O. **Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul**. Dissertação (mestrado em Ciência do Solo) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SINGH, V. K.; BHATTACHERJEE, A. K. Genotypic response of mango yield to persistence of paclobutrazol in soil. **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 1, p. 53-59, 2005.

SINGH, Z. Effect of (2RS, 3RS) paclobutrazol on tree vigour, flowering, fruit set and yield in mango. **Acta Horticulturae**. v. 525, p.459-462, 2000.

SPINELLI, L. F., et al. Enhancing Bioremediation of Diesel Oil and Gasoline in Soil Amended with an Agroindustry Sludge. **Japca Journal Air & Waste Management Association**, n. 55, p. 421-429, 2005.

SIQUEIRA, D. P.; BARCENA, J. L. G.; ESPOSTI, M. D. D. Florescimento de tangerineiras satsuma 'Owari' tratadas com paclobutrazol, anelamento do caule e baixa temperatura. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 26, n. 3, p. 406-409, 2004.

SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI, S., VANGNAI, A.S., SANGTHEAN, P., SINGKIBUT, S. Profenofos insecticide degradation by novel microbial consortium and isolates enriched from contaminated chili farm soil. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 22, n. 1, p. 320-328, 2015.

SMITH, J.L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G (eds.) Soil Biochemistry. In: SILVEIRA A. O. **Atividades enzimáticas como indicadores biológicos da qualidade de solos agrícolas do Rio Grande do Sul**. 2007, 94f. Dissertação (Mestrado em ciências do Solo), Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SORIANO, B.; SORIANO, E. Degradación de pesticidas por Actinomicetos. **UCV- Scientia**. v. 2, n. 1, 2015.

SRIVASTAV, M. et al. Effect of paclobutrazol and salinity on ion leakage, proline content and activities of antioxidant enzymes in mango (*Mangifera indica* L.). **Scientia Horticulturae**. V.125, p.785–788, 2010.

SUN, S. et al. Genomic and molecular mechanisms for efficient biodegradation of aromatic dye. **Journal of Hazardous Materials**. V. 302, p. 286–295, 2016.

SUGAVANAM, B. Diastereoisomers and enantiomers of paclobutrazol: their preparation and biological activity. **Journal of Pesticide Science**, v 15, n. 161, p. 296–302, 1984.

UMAR, A, F.; et al. In-Situ Biostimulatory Effect of Selected Organic Wastes on Bacterial Atrazine Biodegradation. **Advances in Microbiology**. v.2, p. 587-592, 2012.

U.S. EPA. **Paclobutrazol summary document for registration review: Initial Docket. Case Number 7002**. Disponível no documento de número EPA-HQ-EPA-2006-0109 em: regulations.gov. 2007.

VAN CLEEF, E.H.C.B. **Tortas de nabo forrageiro (*Raphanus sativus*) e pinhão manso (*Jatropha curcas*): caracterização e utilização como aditivos na ensilagem de capim elefante**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

VASCONCELOS, U. **Tratamento microbiológico sequencial de solo proveniente de unidade de dessorção térmica**. 2011. Tese (Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

VASCONCELOS, U.; OLIVEIRA, F. J. S.; FRANÇA, F. P. Raw glycerol as cosubstrate on the PHAs biodegradation in soil. **Canadian Journal Pure & Applied Sciences**. Burnaby. v. 7, n. 1 p. 2203-2209, 2013.

VAZ, F. L. **Avaliação sobre a biodegradação de paclobutrazol utilizando culturas mistas de bactérias**. 2006. 83f. Dissertação (Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.

VAZ, F. L. **Biodegradação de Paclobutrazol em dois tipos de Solos cultivados com manga no Vale do São Francisco**. 2011. 90f. (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

VAZ, F. L.; GOMES, T. A.; ROCHA, C. C. A., MOUCO, M. A.; GOUVEIA, E. R. Paclobutrazol Biodegradation in unsaturated soil in the Semi-Arid Northeast of Brazil. **African Journal of Biotechnology**. n. 14, p. 298-303, 2015.

VAZ, F. L., NETTO, A. M., ANTONINO, A. C. D., GOUVEIA, E. R., MARTINS, J. M. F. Biodegradation of paclobutrazol in saturated soil systems by *Pseudomonas* spp. **Química Nova**. n. 35, p. 1090-1096, 2012.

VAZ, F. L. et al. Biodegradation of Paclobutrazol — A Plant Growth Regulator Used in Irrigated Mango Orchard Soil. In: **Biodegradation and Bioremediation of Polluted systems – New Advances and Technologies**. Intech, 2015b.

VIEIRA, F. R. Efeito de agrotóxicos em organismos não-alvo do solo. In: SILVA C. M.M. S; FAY, E. F. **Agrotóxicos e meio ambiente**. Brasília: EMBRAPA, 2004. p.259-288.

VAN DER WERF, H. M. G. Assessing the impact os pesticide on the environment. **Agriculture, Ecosystems and Environment**. Amsterdam, v.60, p.81-86, 1996.

YANG, F.; HANNA, M. A.; SUN, R. Value-added uses for crude glycerol—a byproduct of biodiesel production. **Biotechnology for Biofuels**. v. 5, n. 13, 2012.

ZHOU, C. C. et al. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. **Chemical Society Reviews**, v. 37, n. 3, p. 527-549, 2008.

ZILLI, J. E. et al. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 20, n. 3, p. 391-411, 2003.

ANEXO A: CÓPIA DO TRABALHO PUBLICADO

Strategy for Bioremediation of Unsaturated Soil Without a History of Paclobutrazol Application

Suzyane Porfirio da Silva¹ · Ulrich Vasconcelos² · Ester Ribeiro Gouveia¹

Received: 14 December 2015 / Accepted: 28 March 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract The biodegradation of paclobutrazol (PBZ) was evaluated during 49 days using glycerol and agro-industrial wastes (biodiesel-derived glycerol, peanut cake and sesame cake) as additional carbon sources and unsaturated soil with a history of PBZ application. Biodiesel-derived peanut cake was the best agro-industrial waste, and this was used in the following four strategies. Four biodegradation strategies were performed using 100, 80, 50 and 20 % of soil without history with the addition of 0, 20, 50 and 80 % of soil with history, respectively. The addition of soil with history (50 or 80 %) and the selected waste (peanut cake) favored biodegradation of soil without history, with rates about 95 %. The peanut cake waste proved to be an adequate source of carbon and nitrogen, and the soil with history, proved to be an efficient reservoir of microorganisms capable of biodegrading PBZ.

Keywords Bioestimulation · Bioaugmentation · Recalcitrant contaminants · Pesticides

Introduction

The mango (*Mangifera indica* L.) is a plant of the anacardiaceae family originated in Southeast Asia, which exhibits alternate bearing and a considerable variation in yield in alternate years. Plant growth regulators can effectively induce flowering in the mango in off years [1]. Mango plantations in Brazil occupy about 74,000 hectares, generating a production of over 1.1 million tons; production characterized by a high level of technology, such as irrigation, floral induction and improved varieties [2].

Paclobutrazol [(2RS, 3RS)-1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl) pentan-3-ol] is a plant growth regulator which inhibits the synthesis of gibberellins and is applied as a soil drench [3, 4]. Paclobutrazol (PBZ) remains active in soil, however, and can affect the growth and development of subsequent crops, mainly by influence on the soil microbial activity [5, 6]. Persistence of PBZ in soil for longer than 3 years increases the residual amount and affects other crops severely [1].

Degradation of chemical pollutants by indigenous microbes in the soil is limited by sub-optimal growth conditions. Nutrient supplementation, however, can be used to stimulate biodegradation in soil [7]. Biostimulation contributes to the fertility of soil by adding organic matter and nutrients [8], since it increases the activity of indigenous bacteria [9]. Biostimulation, however, does not always work well due to the scarcity of indigenous degraders [10]. On the other hand, bioaugmentation is the direct application of selected microorganisms to the site. This is a promising and low-cost bioremediation method, in which effective bacterial isolates or microbial consortia are introduced into contaminated soil. The inoculation of soil with exogenous or laboratory-modified bacterial cultures still arouses many reservations [11]. Moreover, introducing

✉ Suzyane Porfirio da Silva
suzyaneeporfirio@hotmail.com

Ulrich Vasconcelos
ulvasco@gmail.com

Ester Ribeiro Gouveia
estergouveia@gmail.com

¹ Laboratory of Bioprocess and Bioproducts, Department of Antibiotics, Federal University of Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, PE 50670-901, Brazil

² Laboratory of Environmental Microbiology, Biotechnology Centre, Federal University of Paraíba, Campus I, Castelo Branco, João Pessoa, PB, Brazil

alien species to soil is not easily acceptable by the public [12]. Agro industrial wastes are excellent sources of nutrients for soil and can be used in biodegradation by biostimulation. The addition of small amounts of cosubstrate to contaminated soil may contribute to increase the biodegradation rate of recalcitrant compounds. Different classes of molecules can be used for this purpose, among which potential by-products of industrial processes in the food sector, agribusiness and fuel stand out due to their wide availability and supply or because of the osmoregulatory properties of some of them or because they serve as preferred sources of carbon for synthesis of molecules important to the process. This is a recent conclusion and has not yet been well explored [13].

Biodiesel-derived glycerol is a major challenge to the biodiesel industry due to the huge volumes that must be processed. This sub-product has been used in the bioremediation of parboiled rice effluent as an efficient carbon source for *Pichia pastoris* X-33 [14]. Biodegradation of PBZ by *Pseudomonas* [15], *Alcaligenes*, *Stenotrophomonas*, *Bacillus* and *Brevibacillus* [3] in mineral medium was possible using PBZ as sole carbon source. However, biostimulation with glycerol was more effective than the bioaugmentation with a mixed culture of *Pseudomonas*, when sterilized saturated soils [16]. The most significant factor for the increase of biodegradation in unsaturated soil was the application history of PBZ [15].

The present work investigated the biodegradation of PBZ in unsaturated soils with and without an application history of PBZ. Initially the performance of commercial glycerol and agro industrial wastes (biodiesel-derived glycerol, peanut cake and sesame cake) were analyzed as potential additional sources of nutrients. The best additional source was used in a new phase of the study, in which we tested the soil inoculation effect with history into soil with no history. These were strategies for bioremediation of unsaturated soil without an application history of PBZ.

Materials and Methods

Soil

Soil samples were collected from areas used for mango plantation (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) in the irrigated region of San Francisco—Andorinhas Farm. The soil was collected near the trunk where the PBZ had been applied between 0 and 20 cm deep and at four points of six plants, totaling an average of 3 kg. The soil concerned had been identified as a soil with application history of PBZ for the previous 8 years (2007–2014). The last application of

PBZ in the soil was 6 months prior to collection of the samples.

Paclobutrazol

The paclobutrazol used was from a commercial formulation, Cultar 250 SC (Syngenta), having a concentration of 250 g/L of paclobutrazol and 750 g/L of inert ingredients. To prepare standard solutions the pure form (Sigma) was used.

Agro-industrial Wastes

Crude glycerol was ceded by the Northeast Center for Strategic Technologies (Pernambuco, Brazil). This waste had been obtained from the transesterification process of fatty acids of cotton seed oil for biodiesel production. The characterization of biodiesel-derived glycerol had been carried out by the Food Analysis Laboratory of the Federal Rural University of Pernambuco (Brazil). Crude glycerol contained: 55.95 % glycerol; 9.75 % fatty acids; 0.23 mg Calcium; 0.12 mg Magnesium; 0.12 mg Copper; 22.37 mg iron; 0.05 % crude protein; 12.34 % total carbohydrates and 3.45 % neutral detergent fiber; pH 8.75. Cakes from the extraction of oil from seeds of peanut and sesame were obtained by the cold mechanical pressure process. These cakes were ceded by Brazilian Agricultural Research Corporation (Parafba, Brazil). Peanut cake contained: 55.3 % carbon; 7.2 % nitrogen; 8.6 % hydrogen; 1.9 % sulfur and 27 % oxygen. Sesame cake contained: 48.5 % carbon; 5.8 % nitrogen; 7.6 % hydrogen; 1.9 % sulfur and 36.3 % oxygen.

Biodegradation

Experiments were carried out according to the methodology reported by Vaz et al. [15]. A mass of 2.5 g of soil was put into a 125 mL-Erlenmeyer and 1 mL of a solution containing PBZ. The experiments were carried out at 28 ± 1 °C for 49 days. The soil was manually agitated weekly and 1 mL of sterile distilled water was added each time to retain moisture. The conditions of the experiments are shown in Table 1.

Analytical Methods

The viable cell counting technique was applied to the samples taken at 0 and 49 days. Serial dilutions in saline solution 0.9 %w/V were performed for the viable cell count. Aliquots of 0.1 mL of the diluted samples were plated, in triplicate, in plates containing Tryptone Soya Agar (pancreatin digest of casein; papain digest of soybean

Table 1 Conditions for biodegradation experiment

Experiment	Soil with history (g)	Soil without history (g)	Additional carbon source (ACS)	ACS concentration (mg/g)
A1	2.5	0.0	–	–
A2	2.5	0.0	Glycerol	2.4
A3	2.5	0.0	Crude glycerol	2.4
A4	2.5	0.0	Peanut oil cake	4
A5	2.5	0.0	Sesame oil cake	4
A6	0.0	2.5	Peanut oil cake	4
A7	0.5	2.0	Peanut oil cake	4
A8	1.25	1.25	Peanut oil cake	4
A9	2.0	0.5	Peanut oil cake	4

meal; sodium chloride; agar). The plates were incubated upside down (agar up) at 30 °C for 48 h. Plates containing 30–300 colonies were measured and recorded as colony forming units (CFU) per gram of soil.

To each 2.5 g of soil in a 125 mL Erlenmeyer flask, 10 mL of methanol (HPLC grade, Mallinckrodt Baker—Phillipsburg, NJ, USA) was added. The Erlenmeyer flask was placed on a rotating incubator at 150 rpm and 25 °C, for 30 min. The suspension was subjected to vacuum filtration, using a membrane of 0.45 µm. The filtrate was analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC) in a Shimadzu system equipped with a quaternary pump coupled with a degasser (DGU-20A5r), an oven for controlling column temperature, an auto sampler and a diode array detector (DAD)(SPD-M20A). The chromatographic conditions were: methanol/water (80/20), 0.4 mL/min, 30 °C, 221 nm and C-18 column (Shim-pack; 46 mm × 25 cm). Glycerol was quantified by spectrophotometry (spectrophotometer Fento 700 plus) using the Triglyceride Liquiform kit. The phytotoxicity of additional carbon sources and biodegrading products were carried out using seeds of *Allium cepa* (Vale Ouro—IPA 11). The seeds, provided by the Agronomic Institute of Pernambuco—IPA, were germinated in Petri dishes (20 seeds/plate) filled with the additional carbon source and at ambient temperature. After three days the roots were measured and the result was expressed as germination index (GI) according to Eq. (1).

$$GI = \left(\frac{S1}{S2} \cdot \frac{R1}{R2} \right) \cdot 100 \quad (1)$$

where: *GI*, germination index; *S1*, number of seeds germinated in the soil; *S2*, number of seeds germinated in distilled water; *R1*, length of rootlets in the soil; *R2*, length of rootlets in distilled water.

Table 2 Colony forming unit per gram of soil and microbial growth percentage obtained in experiments A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8 and A9

Experiment	Log (CFU/g) with 49 days	Growth (%)
A1	7.0	4.6
A2	7.5	11.3
A3	7.8	15.6
A4	8.3	23.0
A5	7.5	11.4
A6	6.2	−4.6
A7	6.5	0.11
A8	6.9	7.0
A9	6.9	7.3

Results and Discussion

Biodegradation of PBZ Using Commercial Glycerol and Agro-industrial Waste as an Additional Carbon Source

In relation to number of microorganisms in unsaturated soil, Table 2 shows the Log (CFU/g) with 49 days. There was growth in all experiments, even when only PBZ was used (A1). The greatest growth was observed in A4. On the other hand, the growth was very discrete when no additional carbon source (A1) had been added. At 49 days, the Log (CFU/g) showed A4 about 18 % higher than A1. There was no significant difference between A2 and A5, that is, when we used glycerol or sesame oil cake as additional carbon sources, respectively. A3 was about 11 % higher than A1.

With respect to pH, there was almost no variation, it remained between 6.7 and 7.6 in all experiments. The pH is

one of the most important parameters for biodegradation, since it has direct influence on the organic molecule. The pH influences the availability and absorption of the compound and the heterotrophic bacteria depend on a pH close to neutrality to degrade xenobiotics [17].

Biodegradation was independent of the presence of an additional source of carbon (Fig. 1a). However, in the experiment with only PBZ as the carbon source (A1) or with addition of sesame cake (A5), biodegradation ceased at 35 days. Biodegradation with commercial glycerol (A2), crude glycerol (A3) and peanut cake (A4) was more pronounced only after 7 days. Biodegradation was higher when commercial glycerol or peanut oil cake was added (Fig. 1b). This higher biodegradation in the A4 experiment agrees with the highest growth presented in Table 2.

In the control experiment (A1), the biodegradation at 7 days was 26.08 %. This rate was much higher in relation to experiments A2 (4.81 %), A3 (9.58 %) and A4 (0.0 %). On the other hand, the rate was similar that obtained in experiment A5 (23.09 %). Biostimulation is necessary when the ratio C:N:P is impaired and the addition of nutrient sources aims at metabolic cooperation and catabolism [18]. The biodegradation had a considerable

increase between the 7th and 35th days in all experiments with additional sources of carbon and/or nitrogen: 67.09 % (A2), 54.09 % (A3), 70.87 % (A4) and 51.94 % (A5). The final phase, between 35 and 49 days, was a period to test the resistance and biodegradability of native microbiota. In this phase, biodegradation only occurred in experiments A2 (12.52 %) and A4 (15.76 %).

For the degradation of PBZ by a mixed bacterial culture composed of three species of *Pseudomonas* spp. in saturated soils, biodegradation was considerably higher, on average 70 %, when commercial glycerol was used as an additional carbon source. In trials without glycerol, it was around 40 % [16].

The PBZ concentration used in these work (4 µg/g) was not phytotoxic (Table 3). None of the additional carbon sources presented phytotoxicity (GI higher than 80 %). On the other hand, after 70 days of biodegradation, phytotoxicity was moderate when crude glycerol was used (65.61 % GI). Phytotoxicity can be considered moderate when the GI is between 50 and 80 % and there is no phytotoxicity, when GI is above 80 % [19].

Effect of Inoculation of Soil with PBZ Application History on the Biodegradation in Soil Without Application History

Peanut cake was selected to the next experiments, since this waste was the one which showed the highest biodegradation. Experiments were performed with 100 % soil with no history, as well as experiments with a mixture of 80, 50, and 20 % with soil with no history and 20, 50, and 80 % of soil with a history of application (Table 1: A6 A7 A8 and A9) respectively. After repeated application of some pesticides, the soil microorganisms were able to detoxify the pesticides. These microorganisms adapt the pesticide to use as a carbon or energy source and they can grow on it [20].

Table 2 shows the Log (CFU/g) at 49 days and the increase or decrease compared to the initial time. In A6 (100 % of soil without application history) there was a decrease in the Log (CFU/g). The highest growth was observed in A9 (80 % of soil with application history). On

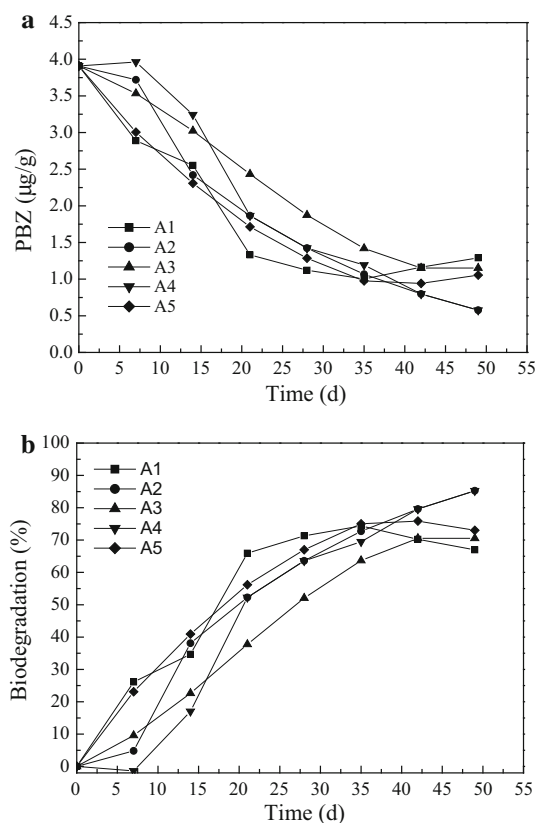


Fig. 1 Time course of PBZ concentration (a) during experiments A1, A2, A3, A4 and A5. Time of course of PBZ biodegradation (b) during experiments A1, A2, A3, A4 and A5

Table 3 Germination index (IG) of the carbon sources and after 70 days of biodegradation

Carbon source	IG (%)	Experiment	IG (%) after 70 days
PBZ	82.4	A1	96.6
Glycerol	96.6	A2	85.2
Crude glycerol	81.9	A3	65.6
Peanut oil cake	90.1	A4	85.5
Sesame oil cake	80.7	A5	135.8

the other hand, the growth was very discrete, when 80 and 20 % of soil without and with application history, were used, respectively (A7). There was no significant difference between A8 and A9, that is, as we used 50 or 80 % of soil with application history.

In the experiment with 100 % soil without an application history of PBZ (A6), biodegradation occurred until 21 days (Fig. 2a, b). Similar behavior was observed in the experiment with 80 % soil without an application history (A7). On the other hand the residual concentration of PBZ was almost exhausted at 49 days when 50 or 80 % of soil with history were used (A8 and A9, respectively). The highest biodegradation values with 50 or 80 % soil with a history coincided with the highest values of log (CFU/g).

Many biodegradations require the cooperation of more than a single species. The various interactions represent several types of synergism, where a multispecies mixture is more rapid than the sums of the rates of reactions effected by each of the separate species. Isolates of *Arthrobacter* and *Streptomyces* together were able to mineralize diazinon, but neither bacterium alone produces CO₂ from this insecticide. A mixture of *Pseudomonas* and *Arthrobacter*

together degrades the herbicide silvex, although neither alone has this capacity [21].

Conclusions

Biostimulation increased degradation of PBZ, by native microbiota, more sharply when glycerol or peanut cake were used as the additional source of carbon, due to higher microbial growth. Biodegradation products were not phytotoxic, except those obtained when crude glycerol was used. Biostimulation did not provide high biodegradation when soil without PBZ application history was used. The soil with an application history of PBZ proved to be an excellent source of microorganisms adapted to the degradation of PBZ.

Acknowledgments The authors acknowledge the financial support from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco, Brazil (FACEPE). The English text of this paper was revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip—TESL (Cambridge University).

References

1. Singh, V.K., Bhattacharjee, A.K.: Genotypic response of mango yield to persistence of paclobutrazol in soil. *Sci. Hortic. Amsterdam* **101**, 53–59 (2005)
2. Silva, P.C.G., Correia, R. C.: *Sócioeconomia*. In: *Cultivo da Mangueira*. Embrapa Semi-Árido, Petrolina (2004)
3. Jackson, M.J., Line, M.A., Hasan, O.: Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant—paclobutrazol (PP333). *Soil Biol. Biochem.* **28**, 1265–1267 (1996)
4. Hedden, P., Graebe, J.E.: Inhibition of gibberellin biosynthesis by paclobutrazol in cell-free homogenates of *Cucurbita maxima* endosperm and *Malus pumila* embryos. *J. Plant Growth Regul.* **4**, 111–122 (1985)
5. Hampton, J.G., Hebblethwaite, P.D.: The effect of the growth regulator paclobutrazol (PP333) on the growth, development and yield of *Lolium perenne* grown for seed. *Grass Forage Sci.* **40**, 93–101 (1985)
6. Silva, C.M.M.S., Fay, E.F., Vieira, R.F.: Degradação de paclobutrazol em solos tropicais. *Pesqui. Agropecu. Bras.* **38**, 1223–1227 (2003)
7. Adieze, I.E., Nwabueze, R.N., Onyeze, G.O.C.: Effect of poultry manure on the microbial utilization of hydrocarbon in oil polluted soil. *Nig. J. Microbiol.* **17**, 12–16 (2003)
8. Opkokwasili, G.C., James, W.A.: Microbiol contamination of kerosene, gasoline and crude oil and their spoilage potential. *Nig. J. Microbiol.* **29**, 147–156 (1995)
9. Coulon, F., Delille, D.: Effects of biostimulation on growth of indigenous bacteria in sub-Antarctic soil contaminated with oil hydrocarbons. *Oil Gas Sci. Technol.* **58**, 469–479 (2003)
10. Ueno, A., Ito, Y., Yumoto, I., Okuyama, H.: Isolation and characterization of bacteria from soil contaminated with diesel oil and the possible use of these in autochthonous bioaugmentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **23**, 1739–1745 (2007)
11. Fantroussi, E.S., Agathos, S.N.: Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* **8**, 268–275 (2005)

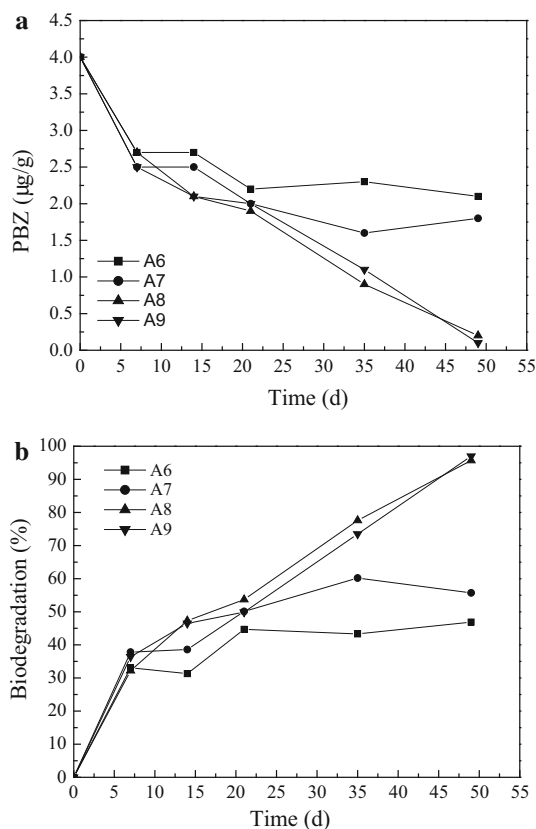


Fig. 2 Time course of PBZ concentration (a) during experiments A6, A7, A8 e A9. Time of course of PBZ biodegradation (b) during experiments A6, A7, A8 and A9

12. Hosokawa, R., Nagai, M., Morikawa, M., Okuyama, H.: Autochthonous bioaugmentation and its possible application to oil spills. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 1519–1528 (2009)
13. Vasconcelos, U., Oliveira, F.J.S., França, F.P.: Raw glycerol as cosubstrate on the PHAs biodegradation in soil. *Can. J. Pure Appl. Sci.* **7**, 2203–2209 (2013)
14. Gil de Los Santos, D.G., Turnes, C.G., Conceição, F.R.: Bioremediation of parboiled rice effluent supplemented with biodiesel-derived glycerol using *Pichia pastoris* X-33. *ScientificWorldJournal* (2012). doi:[10.1100/2012/492925](https://doi.org/10.1100/2012/492925)
15. Vaz, F.L., Gomes, T.A., Rocha, C.C.A., Mouco, M.A., Gouveia, E.R.: Paclobutrazol biodegradation in unsaturated soil in the semi-arid northeast of Brazil. *Afr. J. Biotechnol.* **14**, 298–303 (2015)
16. Vaz, F.L., Netto, A.M., Antonino, A.C.D., Gouveia, E.R., Martins, J.M.F.: Biodegradation of paclobutrazol in saturated soil systems by *Pseudomonas* spp. *Quim. Nova* **35**, 1090–1096 (2012)
17. Spinelli, L.F., et al.: Enhancing bioremediation of diesel oil and gasoline in soil amended with an agroindustry sludge. *JAPCA J. Air Waste Manag. Assoc.* **55**, 421–429 (2005)
18. Seneviratne, G., Zavahir, J.S., Bandara, W.M.M.S.: Fungal-bacterial biofilms: their development for a novel biotechnological applications. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **24**, 739–743 (2008)
19. Paradelo, R., Moldes, A.B., Rodríguez, M., Barral, M.T.: Relationship between heavy metals and phytotoxicity in composts. *Cienc. Tecnol. Aliment. Reynosa*. **6**, 143–151 (2008)
20. Abdelrahman, H.: Biodegradation of some pesticides by soil microorganisms. Master thesis. Zagazig University (2004)
21. Alexander, M.: Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, London (1999)