

AVALIAÇÃO GÊNICA E PROTEICA DE CONSÓRCIOS MICROBIANOS NA DEGRADAÇÃO DO DIFENOCONAZOL.

Giovanna Clarice de Souza Santos¹ (PIBIC/CNPq); Esther Santos Santana²
(Doutoranda/PBI); Samuel Oliveira Santos² (Doutorando/PBI); María Lucila Hernández
Macedo² (Orientador)
(giovannaclarice2016@gmail.com)

¹Universidade Tiradentes/Biomedicina/Aracaju/SE.

²Universidade Tiradentes/Pós graduação em Biotecnologia Industrial/Instituto de
Tecnologia e Pesquisa/Aracaju/SE

2.12.00.00-9 – Microbiologia; 2.12.02.00-1 – Microbiologia Aplicada

RESUMO

O uso extensivo de pesticidas é crucial para atender a produtividade agrícola no Brasil, mas apresenta impactos negativos no meio ambiente e na saúde humana. Dentre os pesticidas, o Difenconazol (DFZ) se destaca por inibir o crescimento fúngico de diversos fitopatógenos. Contudo é classificado como altamente perigoso e de baixa biodegradabilidade, possui persistência ambiental e bioacumulação em tecidos humanos e animais. Diante das características do DFZ, a biorremediação é vista como uma alternativa viável por utilizar microrganismos para converter poluentes em compostos menos tóxicos, e está centrada na produção de enzimas microbianas, especialmente oxirredutases, se tornando uma estratégia econômica, promissora e com potencial na degradação de compostos recalcitrantes como o DFZ. Portanto, o presente projeto visa explorar o uso de consórcios microbianos para degradar o DFZ, realizando uma avaliação do crescimento bacteriano em meio suplementado com DFZ, construção de consórcios bacterianos, análise da toxicidade dos meios contendo DFZ antes e após o tratamento biológico e investigação dos perfis proteicos e gênicos dos consórcios microbianos. Nesse sentido, foi realizada a ativação de algumas bactérias da biblioteca do laboratório de biologia molecular – ITP/SE, em meios LB (Luria Bertani) com meio MSM (meio de sais mínimos) e em meio MSM suplementado com DFZ comercial a 0,05%. Ademais, foram construídos seis consórcios constituídos por trios bacterianos e um consórcio constituído por todos os isolados utilizados nesse estudo. O crescimento microbiano com meio suplementado foi avaliado, e realizados testes de antagonismos, além da ecotoxicidade em sementes de alfafa. O perfil gênico foi verificado por PCR referente aos genes catecol 1,2-dioxigenase e catecol 2,3-dioxigenase. Por fim foi verificado o perfil proteico através da eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-page) a 12%. Os resultados mostraram que os isolados têm capacidade de crescimento nesses meios, indicando seu potencial de crescimento e degradação do pesticida. Os testes de antagonismo não mostraram formação de halos inibitórios, indicando que os microrganismos não inibem o crescimento entre eles e não apresentam atividade antagônica. Em relação ao crescimento dos consórcios, o C2, C4, C6 e C7 foram os que apresentaram maior crescimento em 48 h e 72 h, indicando uma adaptabilidade e capacidade de degradação destes consórcios ao meio com o pesticida. O teste de ecotoxicidade mostrou que o tratamento do DFZ com os consórcios C2 e C7 diminuem a toxicidade do pesticida na diluição de 50%. A análise do perfil proteico por SDS-PAGE mostrou quatro bandas com cerca de 30 kDa comuns entre os isolados MI1 (*Bacillus cereus*), MI3 (*Bacillus sp.*), P.sp (*Pseudomonas sp.*) e consórcio C7. As bandas exibidas provavelmente correspondem a enzimas peroxidases associadas ao processo de degradação do DFZ. O perfil gênico apresentou que o microrganismo MI29 (*Bacillus sp.*) possui o gene catecol 2,3-dioxigenase e o microrganismo 8BR possui o gene catecol 1,2-dioxigenase. Contudo, o presente trabalho proporcionou a formação de um consórcio eficaz na degradação do DFZ, diminuindo sua toxicidade e indicando a participação de enzimas oxirredutases no processo de degradação do pesticida por meio da análise proteico-enzimática.

PALAVRAS-CHAVE: Consórcios microbianos, biodegradação, difenoconazol.

ABSTRACT

The extensive use of pesticides is crucial to meet agricultural productivity in Brazil, but it has negative impacts on the environment and human health. Among pesticides, Difenconazole (DFZ) stands out for inhibiting the fungal growth of various phytopathogens. However, it is classified as highly dangerous and has low biodegradability, environmental persistence, and bioaccumulation in human and animal tissues. Given these characteristics, bioremediation is seen as a viable alternative that utilizes microorganisms to convert pollutants into less toxic compounds. It focuses on the production of microbial enzymes, especially oxidoreductases, becoming an economical and promising strategy with potential for degrading recalcitrant compounds like DFZ. This project aims to explore the use of microbial consortia to degrade DFZ. It involves evaluating bacterial growth in media supplemented with DFZ, constructing bacterial consortia, analyzing the toxicity of media containing DFZ before and after biological treatment, and investigating the proteomic and genomic profiles of microbial consortia. Bacteria from the molecular biology laboratory library – ITP/SE were activated in LB (Luria Bertani) and minimal salt medium (MSM), and MSM supplemented with commercial DFZ at 0.05%. Six consortia consisting of bacterial trios and one consortium consisting of all isolates used in this study were constructed. Microbial growth with supplemented media was assessed, and antagonism tests, as well as ecotoxicity tests on lettuce seeds, were conducted. The gene profile was verified by PCR for catechol 1,2-dioxygenase and catechol 2,3-dioxygenase genes. Finally, the protein profile was examined using 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Results indicated that the isolates have the capacity for growth in these media, indicating their potential for pesticide growth and degradation. Antagonism tests did not show inhibitory halos, indicating that microorganisms do not inhibit each other's growth and do not exhibit antagonistic activity. Regarding consortium growth, C2, C4, C6, and C7 showed the highest growth at 48 h and 72 h, indicating adaptability and degradation capacity to the pesticide-containing medium. Ecotoxicity tests showed that treatment with DFZ by consortia C2 and C7 reduced pesticide toxicity by 50%. Protein profile analysis revealed four common bands around 30 kDa among isolates MI1 (*Bacillus cereus*.), MI3 (*Bacillus sp.*), P.sp (*Pseudomonas sp.*), and consortium C7, likely corresponding to peroxidase enzymes associated with the DFZ degradation process. The gene profile showed that microorganism MI29 (*Bacillus sp.*) has the catechol 2,3-dioxygenase gene, and microorganism 8BR has the catechol 1,2-dioxygenase gene. In conclusion, this work led to the formation of an effective consortium in DFZ degradation, reducing its toxicity and indicating the involvement of oxidoreductase enzymes in the pesticide degradation process through proteomic-enzymatic analysis.

KEYWORDS: Microbial consortium, biodegradation, difenconazole.