UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota
do solo**

Jéssica Aparecida Silva Moretto

**Ribeirão Preto
2015**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do
solo**

Jéssica Aparecida Silva Moretto

Ribeirão Preto

2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do solo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Jéssica Aparecida Silva Moretto

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Ribeirão Preto

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Moretto, Jéssica Aparecida Silva

Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do solo
Ribeirão Preto, 2015.

69 p.: il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Stehling, Eliana Guedes

1. DGGE. 2. Pesticidas. 3. Microbiota do solo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Título: Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do solo

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências aplicado à Farmácia em 26/02/2016. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2016

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação - LAMAB do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob orientação da *Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling*.

Laboratório de Microbiologia de Solos, do Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola de Agronomia Luiz de Queiroz (ESALQ-USP).

Laboratório de Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais e Sintéticos do Departamento de Física e Química Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob a coordenação do *Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes*.

*Dedico este trabalho
aos meus pais,
à meu namorado, pelo apoio
incondicional,
e a todos meus amigos e colegas de pós-graduação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida, e pelas oportunidades que me foram concedidas.

Aos meus pais Elizabeth e Juliano, e a minha irmã, pelo amor incondicional e pela paciência, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos, serei imensamente grata.

Ao meu namorado Lucas pelo eterno companheirismo, incentivo, carinho e apoio, e colaboração para que esse trabalho fosse realizado. E aos meus sogros Vergílio e Elenice pelo apoio.

A minha família que sempre me apoiou e acreditou em meus sonhos.

Agradeço ao Programa de Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar o curso de mestrado.

Agradeço a querida orientadora Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling pelo apoio, paciência, confiança e excelência na minha formação técnica e intelectual.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação (LAMAB), Ana Flávia, André, Beatriz, Danae, Danilo, Fernanda, Guilherme, João Pedro e Vânia. Aos técnicos Vinicius e Paola.

A todos do Laboratório de Microbiologia de Solo, especialmente ao Pedro e a Sonia que me ajudaram nas análises de DGGE.

À equipe do Laboratório de Tecnologia Enzimática da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela colaboração e auxílio nos experimentos.

A equipe do Laboratório de Química Analítica do Professor Norberto Peporine Lopes, em especial a Anelize pela colaboração e auxílio nos experimentos finais.

A todos os amigos e amigas de longa data pelo companheirismo e amizade.

A todos os professores do Centro Universitário Barão de Mauá que me proporcionaram uma ótima formação para que eu pudesse realizar com sucesso mais essa etapa.

Agradeço aos órgãos de fomento à pesquisa CAPES e FAPESP, que financiaram a bolsa e todos os materiais e equipamentos necessários para realização desse trabalho.

Agradeço a todos que contribuíram com a minha formação.

***“Não é na ciência que está a felicidade,
mas na aquisição da ciência.”***

Edgar Allan Poe

RESUMO

MORETTO, J. A. S. **Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do solo.** 2015. 77f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O aumento do uso de pesticidas para erradicação de pragas e ervas daninhas resultou no aumento da produção agrícola mundial, contudo, levou à preocupação sobre os impactos ambientais, sociais e econômicos decorrentes dessa prática. A microbiota nativa do solo é muito importante para manter a qualidade desse ambiente, mas com o uso intensivo de agroquímicos foram observadas alterações na biomassa microbiana e na formação de grandes quantidades de resíduos tóxicos. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genético das frações cultiváveis e não cultiváveis do solo para degradação de três diferentes herbicidas e verificar se a pressão seletiva exercida pela presença de um determinado herbicida tem potencial para alterar a composição da microbiota local, além de identificar os principais gêneros bacterianos cultiváveis da microbiota do solo portadores dos genes de degradação destes herbicidas. Para isso, foram utilizadas seis amostras de solo de diferentes regiões brasileiras, as quais foram obtidas do estado de São Paulo e de áreas de preservação ambiental dos estados do Amazonas e de Goiás. Os principais gêneros bacterianos identificados na microbiota do solo foram: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella* e *Staphylococcus* e não foram observadas variações nas frações cultiváveis e não cultiváveis do solo quanto ao potencial genético para a degradação dos diferentes herbicidas utilizados. Alguns desses isolados bacterianos apresentaram os genes para a degradação de dois herbicidas (2,4-D e diuron; atrazina e diuron) e ainda isolados que apresentam potencial genético para degradação dos três herbicidas. Além disso, pela análise em HPLC acoplado a espectrometria de massas, algumas bactérias portadoras dos genes de degradação do diuron (*puhA* e *puhB*) apresentaram formação dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA, os quais já foram descritos na literatura e também apresentaram metabólitos que ainda não estão descritos na literatura. Por meio das análises de eletroforese em gradiente desnaturante (DGGE) foi possível observar que a pressão seletiva exercida pela presença desses herbicidas altera a composição da microbiota local e a atrazina foi o herbicida que mais afetou a comunidade bacteriana do solo. Portanto, o estudo da diversidade microbiana associada à pressão seletiva causada pelo uso de herbicidas é de grande

importância, visto que os herbicidas alteram significativamente a heterogeneidade da comunidade bacteriana do solo.

Palavras-chave: DGGE; Pesticidas; Genes catabólicos

ABSTRACT

MORETTO, J. A. S. **Investigation of the influence of different pesticides in the soil microbiota**. 2015. 69f. Dissertation (Master's Degree). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The use of pesticides to eradicate pests and weeds resulted in increased agricultural production worldwide, however, led to concern about the environmental, social and economic impacts of this practice. Native soil microbiota is very important to maintain the quality of the environment, but with the intensive use of agrochemicals, changes in microbial biomass and formation of large quantities of toxic waste have been observed. This study aimed to evaluate the genetic potential of cultivable and non-cultivable soil fractions to degrade three different herbicides, to verify if the selective pressure exerted by the presence of a particular herbicide has the potential to change the composition of the local microbiota and to identify the main cultivable soil bacterial genera carrying these herbicides degradation genes. For this, six soil samples from different Brazilian regions were used, which were obtained from the state of São Paulo and from environmental preservation areas in the states of Amazonas and Goiás. The main bacterial genera identified in the soil microbiota were: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella* and *Staphylococcus*, and variations in cultivable and non-cultivable soil fractions genetic potential to degrade various herbicides were observed. Some of these strains harbored genes for degradation of two herbicides (2,4-D and diuron; atrazine and diuron) and other isolates showed genetic potential to degrade one of the three herbicides. Furthermore, analysis with HPLC-MS showed that some bacteria carrying the diuron degradation genes (*puhA* and *puhB*) presented formation of metabolites already described in the literature, such DCPMU, DCPU and DCA, and metabolites that have not been described in the literature. By electrophoresis analysis on denaturing gradient (DGGE), was observed that the selective pressure exerted by the presence of these herbicides alters the composition of the local microbiota, being atrazine the herbicide that most affected the bacterial community in the soil. Therefore, the study of the influence of the selective pressure caused by the use of herbicides in the microbial diversity is very important, since herbicides significantly alter the heterogeneity of the soil bacterial community.

Key- Words: DGGE; Pesticides; Catabolic genes.

RESUMEN

MORETTO, J. A. S. **Investigación de la influencia de distintos herbicidas sobre la microbiota del suelo.** 2015. 69f. Disertación (Maestría), Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto – Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

El aumento del uso de pesticidas para la erradicación de plagas y hierbas dañinas resultó en el aumento de la producción agrícola mundial, lo que conllevó a una preocupación sobre los impactos ambientales, sociales y económicos relacionados a dicha práctica. La microbiota nativa del suelo es muy importante para mantener la calidad de dicho ambiente, pero con el uso intensivo de agroquímicos, fueron observadas alteraciones en la biomasa microbiana y en la formación de grandes cantidades de residuos tóxicos. El presente estudio tuvo como objetivo el evaluar el potencial genético de las fracciones cultivables y no cultivables del suelo para la degradación de tres diferentes herbicidas y verificar si la presión selectiva ejercida por la presencia de un determinado herbicida tiene el potencial para alterar la composición de la microbiota local, además de identificar los principales géneros bacterianos cultivables de la microbiota del suelo portadores de los genes de degradación de dichos herbicidas. Para lo cual fueron utilizadas seis muestras de suelo de diferentes regiones brasileras, las cuales fueron obtenidas del estado de Sao Paulo y de áreas de preservación ambiental de los estados de Amazonas y de Goias. Los principales géneros bacterianos identificados en la microbiota del suelo fueron: *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella* e *Staphylococcus* y no fueron observadas variaciones en las fracciones cultivables y no cultivables del suelo en relación al potencial genético para la degradación de los diferentes herbicidas utilizados. Algunas de las cepas bacterianas aisladas presentaron genes relacionados a la degradación de dos herbicidas (2,4-D e diuron; atrazina e diuron) y además cepas que presentan potencial genético para la degradación de tres herbicidas. Además, el análisis de HPLC acoplado a espectrometría de masas, mostró que algunas bacterias portadoras de los genes de degradación de diuron (*puhA* e *puhB*) presentaron formación de los metabolitos DCPMU, DCPU y DCA, los cuales fueron previamente descritos en la literatura, los mismos que también presentaron metabolitos que no han sido previamente descritos en la literatura. Utilizando análisis de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE), fue posible observar que la presión selectiva ejercida por la presencia de dichos herbicidas, altera la

composición de la microbiota local y la atrazina fue el herbicida que tuvo un efecto mayor sobre la comunidad bacteriana del suelo. Por lo tanto, el estudio de diversidad microbiana asociada a la presión selectiva causada por el uso de herbicidas es de gran importancia, debido a que los herbicidas alteran significativamente la heterogeneidad de la comunidad bacteriana del suelo.

Palabras clave: DGGE; Pesticidas; Genes catabolicos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formação e estrutura dos diferentes tipos de solo (rocha recém-exposta, neossolo, argissolo e latossolo).....	3
Figura 2 - Participação das vendas de agrotóxico por estados brasileiros que mais utilizam herbicidas na agricultura (2010).	5
Figura 3- Representação dos processos de distribuição de uma molécula de agrotóxico a partir do momento em que esta é adicionada ao sistema solo.	6
Figura 4 -Possíveis efeitos dos agrotóxicos sobre os componentes bióticos.	7
Figura 5- Estrutura química da atrazina.....	8
Figura 6 - Estrutura química da molécula diuron.	10
Figura 7- Degradação do diuron e formação dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA.	10
Figura 8 - Estrutura química da molécula 2,4-D 11	11
Figura 9 - Via de degradação da molécula 2,4-D codificada por genes <i>tfd</i> . TCA (Ciclo do ácido tricarboxílico).12	12
Figura 10 - Representação esquemática do ensaio de degradação de herbicidas em meio líquido 28	28
Figura 11 - Modelo de experimentação para aplicação dos herbicidas 30	30
Figura 12 - Análise do padrão de restrição plasmidial 35	35
Figura 13 - <i>Pseudomonas</i> sp. ADP e S315 em meio ATZ-R 37	37
Figura 14 - Teste de degradação em placa de 2,4-D..... 38	38
Figura 15 - Estruturas químicas e suas respectivas razões massa/carga (espectrometria de massas). 39	39
Figura 16 - Espectros de fragmentação obtidos por HPLC/MS dos íons selecionados como possíveis metabólitos gerados da degradação do diuron presente na cultura de bactérias. 41	41
Figura 17 - Proposta de fragmentação para os metabólitos identificados nos cultivos das bactérias S314, S204 e S206 (m/z 197) e S204 e S206 (m/z 169), na presença de diuron 42	42
Figura 18 - Análise de PCoA, por meio da técnica de PCR-DGGE..... 44	44
Figura 19 - Análise da distribuição da comunidade bacteriana ao longo das semanas..... 45	45
Figura 20 - Análise da média das triplicatas da comunidade bacteriana sob pressão seletiva do herbicida atrazina ao longo das semanas..... 46	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras de solos de diferentes municípios brasileiros e tipo de herbicida utilizado	22
Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes envolvidos na degradação de diferentes herbicidas.	24
Tabela 3 - Isolados, amostras de DNA, perfil plasmidial e genes de degradação de herbicidas em isolados de diferentes áreas no Brasil	33
Tabela 4 - Peso molecular dos plasmídeos encontrados em oito isolados portadores dos genes envolvidos na degradação de herbicidas	36
Tabela 5 - Metabólitos detectados por HPLC/MS gerados a partir da degradação do diuron por bactérias.....	40
Tabela 6 - Porcentagem da área do pico dos íons de m/z 162, 197 e 169 considerando a área do diuron como 100%	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AM	Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Do inglês, <i>American Type Culture Collection</i>
<i>atz</i>	Genes de degradação da atrazina
BLAST	Do inglês, <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
DNA	Do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESALQ	Escola de Agronomia Luiz de Queiroz
EPA	Do Inglês, ... Agência de Proteção Ambiental
EUA	Estados Unidos da América
F	Do inglês, <i>Forward</i>
FE	Fazenda Experimental
FE	Fase estacionária
FM	Fase móvel
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
GO	Goiás
HPLC	Do inglês, <i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
IAC	Instituto Agrônomo da Cana
LB	Luria-Bertani
MS	Ministério da Saúde
NSB	Núcleo de Serviços em Biotecnologia
Pb	Pares de base
PCR	Do inglês, <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
<i>puh</i>	Genes de degradação do diuron
ppm	Partes por milhão
R	Do inglês, <i>Reverse</i>

SDS	Dodecil sulfato de sódio
SP	São Paulo
TAE	Tris Acetato EDTA
<i>tfd</i>	Genes de degradação do 2,4-D
TM	Do inglês, <i>trademark</i>
Tris	Hidroximetilaminometado
U	Unidade(s)
UPGMA	Do inglês, <i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean</i>
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
CO ₂	Gás carbônico
g	Gramma
<i>g</i>	Medida da gravidade da Terra
h	Horas
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
Kg	Quilogramas
L	Litro
MDa	Megadalton
-	Menos
µg	Microgama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
n°	Número
min	Minuto
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₃	Amônia
s	Segundo
®	Marca Registrada
%	Percento

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	iii
RESUMEN	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABELAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	x
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Solo	2
1.2 Agrotóxicos	4
1.2.1 Atrazina	7
1.2.2 Diuron	9
1.2.3 2,4-diclorofenoxiacético ácido (2,4-D)	11
1.3 Microbiota do solo	13
1.4 Biorremediação	14
2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO	17
3. OBJETIVOS	20
3.1 Objetivos gerais	20
3.2 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1 Coleta de solo	22
4.2 Amostras de solos estudadas	22
4.3 Isolamento de bactérias do solo	23
4.4 Extração de DNA	23
4.5 Identificação dos isolados bacterianos	23
4.6 PCR para pesquisa de genes envolvidos na degradação de diferentes herbicidas (genes catabólicos)	24
4.7 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR	24
4.8 Extração de DNA plasmidial	25
4.9 Eletroforese em gel de agarose	26
4.10 Reações de Digestão dos plasmídeos em estudo	26
4.11 Teste de degradação dos herbicidas	26
4.12 Teste de degradação dos herbicidas em meio líquido	27

4.13 Detecção de metabólitos do diuron por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC/MS)	28
4.14 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)	29
4.15 Análise Estatística	30
5. RESULTADOS	32
5.1 Isolamento e identificação das bactérias estudadas	32
5.2 Detecção dos genes catabólicos	34
5.3 Detecção e digestão dos plasmídeos	34
5.4. Detecção dos genes catabólicos utilizando o DNA plasmidial	35
5.5 Teste de degradação dos Herbicidas	36
5.5.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido	36
5.5.2 Teste de degradação do diuron em meio sólido	37
5.5.3 Teste de degradação do 2,4-D em meio sólido.....	37
5.6 Teste de degradação do diuron em meio líquido.....	38
5.6.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/MS)	38
5.7 DGGE.....	43
6. DISCUSSÃO.....	48
7. CONCLUSÕES.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da agricultura convencional no Brasil teve início na década de 1940 com o surgimento dos primeiros herbicidas (POKORNY, 1941) e, desde então, a utilização de praguicidas gerou aumento na produção agrícola e consequente elevação da economia nacional. De acordo com dados do Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA-ESALQ/USP), em 2013, o agronegócio, um dos pilares da economia brasileira, cresceu aproximadamente 4,5%.

Devido à extensiva aplicação e persistência de agrotóxicos no ambiente, a qualidade ambiental está sendo comprometida por causa de mudanças na microbiota do solo e do aumento da formação de resíduos tóxicos. Soma-se a isso o grande crescimento populacional e o aumento da atividade industrial, que também estão causando problemas ambientais e de saúde pública, já que estão se tornando cada vez mais críticos e frequentes. Portanto, é importante monitorar a qualidade do solo e a ação dos pesticidas no meio ambiente (STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011) para minimizar os impactos ambientais, econômicos e sociais decorrentes dessa prática (SAGARKAR et al., 2013).

Alguns estudos, com o objetivo de contornar esses prejuízos, estão voltados para a biorremediação de ambientes contaminados, visto que a manutenção da qualidade do solo é fundamental para a sua produtividade, além de preservar todo o ecossistema. (FAGERIA; STONE, 2006).

1.1 Solo

O solo é um recurso natural de grande importância e sua conservação é fundamental para a manutenção da vida, uma vez que a produção de alimentos é dependente desse recurso (STEFFEN et al., 2011). Além disso, o solo é suporte para estradas e rodovias, fornece materiais para a construção civil e é utilizado como depósito de lixo. Portanto, a destruição e a contaminação desse ambiente podem trazer sérias consequências, tais como: perda do potencial de produção agrícola; redução das taxas de decomposição de matéria orgânica; aumento da emissão de gases causadores do efeito estufa; degradação, erosão e desertificação; e causar danos severos à saúde da população (CANHOS et al., 1998).

O solo é caracterizado pelo tipo de rocha matriz que o originou, pelo clima da região, pela quantidade de matéria orgânica presente, pela vegetação que o recobre e pelos micro-

organismos que compõem sua microbiota. De acordo com o sistema brasileiro de classificação de solos (EMBRAPA, 2006), é possível distinguir 13 grandes classes de solos no Brasil, com grande predominância dos neossolos, argissolos e latossolos, os quais representam aproximadamente 70% do território nacional (ÁGILO et al., 2014). A Figura 1 ilustra a formação desses solos.

Figura 1 - Formação e estrutura dos diferentes tipos de solo (rocha recém-exposta, neossolo, argissolo e latossolo).

(Fonte: Modificado de LEPSCH, 2011)

Os neossolos são constituídos por material mineral ou por material orgânico pouco espesso, contendo menos de 15% de argila em sua composição. Devido à baixa intensidade dos processos pedogenéticos, estes solos não apresentam alterações expressivas em relação ao material originário. Tais processos ocorrem em decorrência de algumas características inerentes ao próprio material de origem, como maior resistência ao intemperismo, composição químico-mineralógica ou por influência dos demais fatores de formação (clima, relevo ou tempo), que podem impedir ou limitar a evolução dos solos (EMBRAPA, 2006; LEPSCH, 2011). Esse tipo de solo faz parte do cerrado brasileiro, uma região composta de pouca vegetação devido à alta macroporosidade e permeabilidade existente entre os grãos de areia, fazendo com que os sais minerais e os nutrientes permeiem facilmente, junto com a água, para as camadas mais profundas, tornando esse solo pobre em nutrientes e pouco utilizado pelas plantas (SPERA et al., 2001).

Os argissolos têm como principal característica morfológica a diferença textural entre os horizontes superficiais (A e/ou E) e o B, classificado como B textural e que apresenta maior teor de argila. Essa diferença textural é decorrente de uma associação de fatores que favorecem o transporte gravitacional da argila, em dispersão com a água, ou a sua destruição na superfície.

Esses processos podem ocorrer de forma isolada ou simultaneamente, em alguns casos. A erosão é um fenômeno comum nos argissolos e a atividade dos organismos pode influenciar no desenvolvimento destes solos (LEPSCH, 2011).

Os latossolos são intemperizados, com pouca diferenciação entre horizontes e, em sua maior parte, não apresentam macroagregados no horizonte B. Esses solos possuem acúmulo residual principalmente de óxidos de ferro e não há alteração de textura ao longo do perfil do solo (EMBRAPA, 2006). Os perfis típicos apresentam horizonte A pouco espesso e em transição para B latossólico muito espesso, podendo atingir mais de dois metros de profundidade, com textura relativamente uniforme, variando de média a muito argilosa (LEPSCH, 2011).

A qualidade do solo também influencia na produtividade e na sustentabilidade do agroecossistema, uma vez que a alta fertilidade e a boa estruturação do solo são importantes para a diversidade e abundância de micro-organismos (AGUIAR, 2006). O solo apresenta uma grande biodiversidade, ou seja, uma enorme variedade de organismos vivos, portanto, é um sistema dinâmico, heterogêneo e complexo, agregando um grande número de nichos ecológicos (GARDI; JEFERRY, 2009). Os micro-organismos presentes no solo atuam na fixação de nitrogênio, no ciclo de nutrientes, na desintoxicação de poluentes, na purificação do ar e da água, na degradação de matéria orgânica e também contribuem para o crescimento e nutrição das plantas (SILVEIRA; FREITAS 2007).

Atualmente, uma das principais formas de degradação do solo está relacionada intimamente à utilização inadequada de compostos agroquímicos. Devido a essa prática, tem-se aumentado a formação de resíduos tóxicos no solo e em águas superficiais, elevando a exposição da população a essas substâncias.

1.2 Agrotóxicos

Os agrotóxicos, também denominados como pesticidas, praguicidas, defensivos agrícolas, biocidas e agroquímicos, são produtos químicos cuja finalidade é erradicar pragas e ervas daninhas ou doenças que atacam as culturas agrícolas. Os pesticidas podem ser divididos em diferentes grupos, entre eles, os fungicidas, os inseticidas, os nematicidas e os herbicidas.

Segundo estudos de Ghimire e Woodward (2013), foi estimado que anualmente sejam utilizados três bilhões de quilogramas de pesticidas por todo o mundo. Em 2011, a ANVISA realizou um estudo no qual foram analisadas 96 empresas no Brasil que comercializavam agrotóxicos e, de acordo com o referido estudo, os herbicidas representam 45% do total de

agrotóxicos comercializados no Brasil. Nas últimas décadas houve um crescimento de 93% no mercado mundial de agrotóxico, enquanto que o mercado brasileiro cresceu 190%. Em 2008, o Brasil assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxico.

Spadotto e Gomes (1998) realizaram um estudo no qual pesquisou as regiões brasileiras com maior uso de herbicidas. A região Sudeste é a maior consumidora de herbicidas (38%), seguida pelas regiões Sul (31%) e Centro-Oeste (23%) (Figura 2). O Norte e o Nordeste apresentam o menor consumo nacional de agrotóxico, aproximadamente 1% e 6%, respectivamente. Os estados que mais se destacam quanto à utilização desses compostos são: São Paulo (25%), Paraná (16%), Minas Gerais (12%), Rio Grande do Sul (12%), Mato Grosso (9%), Goiás (8%) e Mato Grosso do Sul (5%).

A vasta utilização de agrotóxicos concentra-se, principalmente, nas áreas de agricultura irrigada. Devido à expansão agrícola na região centro-oeste, o estado com maior consumo de agrotóxicos no Brasil é o Mato Grosso, representando 18,9% do consumo nacional, seguido de São Paulo (14,5%), Paraná (14,3%) e Rio Grande do Sul (10,8%) (IBGE, 2006; SINDAG, 2011; THEISEN; 2012).

Figura 2 - Participação das vendas de agrotóxico por estados brasileiros que mais utilizam herbicidas na agricultura (2010).

No caso de aplicação de pesticidas classificados como herbicidas, essa é feita no sistema solo-planta, sendo esse absorvido pelas folhas e raízes. Em seguida, percorre toda a planta, acumulando-se nas raízes das ervas daninhas, o que causa inibição de seu crescimento. Após a aplicação, os processos de distribuição dos agrotóxicos no solo são a adsorção, a lixiviação, a volatilização e a degradação (STEFFEN et al., 2011) (Figura 3). A adsorção é uma ligação reversível do agrotóxico às partículas do solo, sendo dependente do tipo e do teor de matéria

orgânica, das características da carga do composto e do pH do solo. A lixiviação é realizada sob a ação das chuvas, uma vez que o agrotóxico é percolado pelas águas, e a volatilização ocorre pela evaporação do agrotóxico para o ar após a degradação, que pode ser física, química ou biológica (LANGENBACH et al., 1995).

Figura 3- Representação dos processos de distribuição de uma molécula de agrotóxico a partir do momento em que esta é adicionada ao sistema solo.

(Fonte: STEFFEN, G.P.K., STEFFEN, R. B., ANTONIOLI, Z. I., 2011).

A constante utilização de agroquímicos pode resultar em efeitos indiretos sobre os componentes do ecossistema agrícola. Uma parte dos produtos fica retida nos tecidos vegetais, bem como nos organismos e no solo. A fração que atinge o solo resulta em diversas interações químicas com a biota, além de sofrer alterações que determinam a sua persistência ou dissipação, assim como seu impacto no ecossistema (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006) (Figura 4). A persistência dos agrotóxicos refere-se ao período em que o produto permanece no solo em forma dissolvida em água, vaporizado no ar, adsorvido, ou ocluído nas partículas minerais e orgânicas do solo, enquanto que a dissipação é definida como a parcela do pesticida que é degradada ou permanece no solo em outras formas que não a original do produto (LAVORENTI et al., 2003).

Figura 4 -Possíveis efeitos dos agrotóxicos sobre os componentes bióticos.

Em virtude do aumento no uso dos pesticidas na agricultura, estes se tornaram contaminantes do solo, de águas subterrâneas, de rios, de lagos e de oceanos, provocando mudanças na biomassa microbiana, além da formação de grandes quantidades de resíduos. Portanto, é de grande importância conhecer o comportamento e o destino dos pesticidas no meio ambiente e identificar a microbiota responsável pelo processo de degradação de tais compostos (STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011).

1.2.1 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-*s*-triazina) é integrante da família das *s*-triazinas. Essa molécula é classificada como um herbicida sistêmico e seletivo, sendo utilizada no controle de ervas de folhas largas em culturas de milho, sorgo, soja, cana-de-açúcar e outras culturas (DUTTA; SINGH, 2013; JAVARONI et al., 1999). O mecanismo de ação da atrazina, de acordo com os estudos de Marin-Morales et al. (2013), é a inibição da fotossíntese, onde a molécula age como inibidora do transporte de elétrons. A atrazina absorve radiação ultravioleta em um comprimento de onda de 225 nm e sua estrutura química é apresentada na Figura 5.

Figura 5- Estrutura química da atrazina.

A atrazina é considerada moderadamente tóxica, mas estudos demonstraram a sua capacidade de causar danos ao DNA de organismos aquáticos, imunotoxicidade, alterações na função endócrina em humanos com efeito estrogênico fraco e inibição de hormônios andrógenos (MIGEOT et al., 2013). A atrazina atua induzindo a atividade da enzima aromatase, que catalisa a conversão da testosterona em estrógeno, com consequente diminuição da testosterona (OLIVEIRA et al., 2008). Além disso, esse herbicida é tóxico para a reprodução, pois tem capacidade de atravessar a placenta e afetar o crescimento fetal (RAJKOVIC et al., 2012; SANTOS; MARTINEZ, 2012; SHELLEY et al., 2012).

A molécula de atrazina é degradada no meio ambiente, com tempo de meia-vida entre 13 e 260 dias, de acordo com variações ambientais e condições do solo (EPA, 2006). A principal via de biotransformação da atrazina no solo inclui a descloração, a N-desalquilação, transformações hidrolíticas que resultam na clivagem do anel *s*-triazínico, a formação de ácido cianúrico e biureto como intermediários e a mineralização com liberação de amônia. O nitrogênio resultante do metabolismo da atrazina serve como fonte de nitrogênio para bactérias do solo (DUTTA; SINGH, 2013). A via de degradação da atrazina pela *Pseudomonas* sp. ADP é bem estabelecida e envolve seis etapas enzimáticas codificadas pelos genes *atzA*, *atzB* e *atzC* e pelo operon *atzDEF*. (DE SOUZA et al., 1998). Os genes de degradação da atrazina *atzA*, *atzB* e *atzC* são dispersos e conservados (SAJJAPHAN, et al. 2004) e foram detectados no Canadá, Estados Unidos da América, França, Croácia, Chile e China com similaridade acima de 97%, fato que sugere recente dispersão na microbiota do solo (SENE et al., 2010; HERNÁNDEZ, et al., 2012).

A atrazina é mundialmente detectada como poluente orgânico em águas subterrâneas e superficiais (RHINE et al., 2003; UETA et al., 1999). Este composto é persistente no solo devido à presença de grupos N-alquil e de um átomo de cloro em sua estrutura, os quais dificultam a quebra do anel *s*-triazínico pelos micro-organismos (KRUTZ et al., 2008). De acordo com a Agência de Informação da Embrapa, o padrão de potabilidade da água para consumo humano preconiza uma concentração de até 2 µg.L⁻¹ de atrazina (Portaria 518/2004

do Ministério da Saúde), contudo, a Agência de Proteção Ambiental (EPA), nos Estados Unidos, determina um nível aceitável de $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ e considera uma exposição a essa concentração em uma expectativa de vida de 70 anos, sem danos à saúde.

1.2.2 Diuron

O diuron (3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilureia) é um herbicida pertencente à família das fenilamidas da subclasse das fenilureias. É um herbicida sistêmico de largo espectro utilizado no controle de ervas daninhas nas culturas de algodão, café, cana-de-açúcar e citros. O diuron também é utilizado em áreas urbanas (CASTILLO, 2006; STASINAKIS et al., 2009; SINGH ; SINGH, 2014), incluindo locais de alta tensão, linhas ferroviárias, estradas e rodovias, locais de armazenamento de petróleo e edifícios industriais e agrícolas (SINGH; SINGH, 2014). A estrutura química do diuron está apresentada na Figura 6 (ARAUJO et al., 2012).

O diuron se acumula no solo devido a sua baixa solubilidade em água (42 mg.L^{-1} a 25°C) e é facilmente adsorvido à fração orgânica do solo através do sistema radicular das plantas. É rapidamente translocado pelos caules e folhas, movendo-se principalmente através do xilema. O diuron atua bloqueando a síntese de energia e de ATP (adenosina trifosfato) pela inibição da fotossistema II.

As reações químicas da fotossíntese ocorrem nos cloroplastos. Durante o processo de fotossíntese, a energia solar é capturada pelas plantas, especificamente pelos seus pigmentos (clorofila e carotenóides) e é transferida para um “centro de reação” (P680), originando um elétron excitado. Por sua vez, esse elétron é transferido para a molécula de plastoquinona, que está presa à proteína D1, presente na membrana do cloroplasto (Qa). A molécula Qa transfere o elétron para outra molécula de plastoquinona (Qb), também ligada à proteína D1. Quando outro elétron é transferido para Qb, a quinona reduzida torna-se protonada (dois íons de hidrogênio são adicionados), originando uma plastoidroquinona (QbH_2), que tem a função de transferir elétrons entre os fotossistemas II (P680 e P700). A molécula QbH_2 possui baixa capacidade de se prender à proteína D1 presente no cloroplasto. O diuron se liga à proteína D1, no sítio de ligação da plastoquinona, competindo e ocasionando a saída da plastoquinona, com interrupção do fluxo de elétrons entre os fotossistemas. Além da competição, o diuron apresenta maior tempo de interação com o sítio da proteína D1 do que a plastoquinona, o que aumenta o seu efeito inibitório. Este processo inibe a produção de ATP e outros compostos de alta energia, que são necessários para o crescimento das plantas (HESS; WARREN, 2002).

Figura 6 - Estrutura química da molécula diuron.

Muitos estudos apontam a importância do uso da biorremediação para a redução da concentração do diuron do ambiente, bem como outros pesticidas, sendo esse o principal mecanismo de eliminação do diuron no solo (CASTILLO et al., 2006). Esse composto é biodegradado principalmente sob condições aeróbicas, na qual micro-organismos realizam uma N-demetilação do grupo ureia e, posteriormente, uma hidrólise, podendo haver a produção de três diferentes metabólitos, o 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCMPU), o 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e o 3,4-dicloroanilina (DCA), os quais estão descritos na Figura 7 (GIACOMAZZI; COCHET, 2004).

Figura 7- Degradação do diuron e formação dos metabólitos DCMPU, DCPU e DCA.

O herbicida diuron, assim como outros herbicidas, é considerado um composto tóxico para organismos não alvos. Estudos sobre a toxicidade desses compostos indicam que baixas concentrações do diuron e dos seus metabólitos podem causar deficiência no desenvolvimento dos peixes, como malformações, alterações comportamentais, além de disfunções reprodutivas (ZHU, 2013; ROCHA, 2013). O diuron é considerado teratogênico quando administrado em doses elevadas (250 mg/kg/dia). O principal metabólito do diuron (3,4-DCA) pode induzir aneuploidias em células de mamíferos por interação com o aparelho mitótico (GIACOMAZZI ; COCHET, 2004; EL SEBAI et al., 2004).

1.2.3 2,4-diclorofenoxiacético ácido (2,4-D)

O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) foi o primeiro herbicida registrado no Brasil, sendo utilizado desde o início da década de 1940 (POKORNY, 1941). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), este composto é classificado com nível de toxicidade II. Esse herbicida atua como um regulador de crescimento que possui efeito análogo ao hormônio auxina. Nas últimas décadas, este composto tem sido mundialmente utilizado para o controle de ervas daninhas de folhas largas em diferentes culturas, como trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café, pastagens e em florestas. A molécula 2,4-D absorve radiação ultravioleta em um comprimento de onda de 280 nm e sua estrutura química está apresentada na Figura 8.

Figura 8 - Estrutura química da molécula 2,4-D

Segundo a Agência de Proteção Ambiental (EPA, 2004), o 2,4-D é degradado no meio ambiente com uma meia-vida entre 20 e 200 dias, de acordo com variações ambientais, condições e tipo de solo. Esse herbicida é altamente solúvel em água e tem baixa tendência a acumular-se em matéria orgânica (El-BESTAWY; HANS-JORGEN, 2007), sendo assim um contaminante de águas superficiais e subterrâneas após a drenagem de terras agrícolas. No ambiente aquático, o 2,4-D é mais comumente encontrado como ânion livre (BURNS et al., 2012).

A via de degradação desse herbicida é bem conhecida. Esta via é iniciada pela enzima cetoglutarato-dioxigenase dependente de 2,4-D, que catalisa a oxidação simultânea de 2,4-D e cetoglutarato para gerar 2,4-DCP, sendo essa enzima codificada pelo gene *tfdA*. A enzima 2,4-DCP hidroxilase codificada pelo gene *tfdB* transforma 2,4-DCP hidroxilado em 3,5-dichlorocatechol (3,5-DCC). Esta molécula é posteriormente metabolizada através de uma via de clivagem codificada por anel intradiol *tfdCDEF*. Estes genes estão descritos em plasmídeos. A seguinte via está apresentada na Figura 9.

O início da via de degradação é dependente de uma dioxigenase, para isso há descrição de genes homólogos ao *tfdA*. Embora vários estudos estejam voltados à pesquisa de genes homólogos ao *tfdA*, ainda pouco se sabe a respeito desses genes homólogos (KITAGAWA et al., 2002).

Figura 9 - Via de degradação da molécula 2,4-D codificada por genes *tfd*. TCA (Ciclo do ácido tricarboxílico).

(KITAGAWA et al., 2002).

A exposição de indivíduos a esses compostos ocorre devido à falta de uso ou má utilização dos equipamentos de proteção individual (EPIs). Esta exposição pode ocorrer através da inalação, do contato direto com a pele ou por ingestão. Na grande maioria dos casos, a via predominante de exposição ocorre através da pele (CHAUDRY e HUANG, 1988). A molécula 2,4-D é facilmente absorvida no organismo humano a partir do trato digestivo e da pele e é, subsequentemente, excretado na urina em uma forma praticamente inalterada. Estudos demonstram que o 2,4-D apresenta efeito cancerígeno, teratogênico, neurotóxico, imunossupressor, citotóxico e hepatóxicos em animais e seres humanos (ATAMANIUK, 2013; BORTOLOZZI et al., 2001; BUKOWSKA, 2006; BURNS et al., 2012; COADY et al, 2013; GARABRANT; PHILBERT, 2002; MIKOV et al., 2010; MUNRO et al., 1992).

Em virtude do aumento no uso dos pesticidas na agricultura, ocorrem mudanças na biomassa microbiana e formação de grandes quantidades de resíduos, além de se tornar potenciais contaminantes do solo, águas subterrâneas, rios, lagos e oceanos. Portanto, é de grande importância conhecer o comportamento e o destino dos pesticidas no meio ambiente (STEFFEN; ANTONIOLLI, 2011).

1.3 Microbiota do solo

O solo possui uma vasta diversidade de micro-organismos e estes apresentam uma imensa variabilidade genética e desempenham funções cruciais na manutenção do ecossistema. A presença dessa microbiota depende de alguns fatores, tais como adubação, grau de aeração, presença de matéria orgânica, nutrientes, temperatura e umidade. Estudos descrevem que quanto mais complexa a comunidade microbiana, maior é a sua estabilidade e equilíbrio biológico (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Segundo um estudo de Canhos *et al.* (1998), estima-se que em 1 g de solo podem ser encontradas entre 20 e 40 mil diferentes espécies bacterianas, o que corresponde a apenas 1% das espécies bacterianas presente no solo (BRIDGE; SPOONER, 2001). Dentre estas, aproximadamente 4.000 espécies bacterianas já foram descritas na literatura (CANHOS *et al.*, 1998).

Dados da literatura demonstram que a maioria dos micro-organismos presentes no ambiente não são cultiváveis em meios de cultura sintéticos (GARDI; JEFERRY, 2009). Entretanto, a partir das amostras de solo, é possível isolar fragmentos de DNA de comunidades microbianas e, através de análise genômica, observar variações nas frações cultiváveis e não cultiváveis quanto ao potencial genético para a degradação dos diferentes herbicidas. Além disso, é possível comparar geneticamente os principais gêneros encontrados utilizando o gene RNA ribossomal 16S, o qual é utilizado como padrão para a classificação e identificação dos micro-organismos (STREIT; SCHMITZ, 2004).

Pela primeira vez, vários pesquisadores brasileiros estão coletando novas sequências que foram geradas em todas as regiões brasileiras, com o intuito de reunir informações sobre a diversidade genética microbiana no projeto Microbioma Brasileiro (PYLRO *et al.*, 2013). Há um grande desafio ao avaliar o microbioma do solo, principalmente em regiões tropicais, uma vez que há uma vasta heterogeneidade física e química no solo, os quais sofrem alterações espaciais e temporais muito intensas (ANDREOTE *et al.*, 2014).

Em 2006, Silva e colaboradores descreveram os principais gêneros bacterianos encontrados na microbiota do solo. Dentre eles, estão às bactérias Gram-negativas dos gêneros *Pseudomonas* (*P. aeruginosa*, *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. cepacia*, *P. paucimobilis*, *P. putrefaciens*, *P. vesicularis*), *Shigella* (*S. flexner*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*), *Achromobacter* (*Achromobacter sp.*), *Aeromonas* (*A. hydrophila*), *Serratia* (*S. odorífera*), *Enterobacter* (*E. agglomerans*), *Flavobacterium* (*F. meningosepticum*, *F. odoratum*), *Kluyvera*, *Tatumella*, *Escherichia* (*E. coli*), *Pasteurella* (*P. haemolyticus*) e *Yersinia* (*Y. enterocolitica*), e os bacilos esporulados, principalmente as espécies dos gêneros *Bacillus*, *Clostridium*, *Arthrobacter*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Nitrobacter*, *Nocardia*, *Streptomyces* e *Micromonospora*.

Os micro-organismos apresentam tolerância a várias condições ambientais desfavoráveis para organismos macroscópicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Nos estudos de KIM et al. (2015), os autores descrevem que as variáveis ambientais regulam a estrutura das comunidades bacterianas. Neste estudo, investigou-se a comunidade bacteriana do solo continental da Antártica, demonstrando que as variáveis ambientais podem regular a estrutura da comunidade bacteriana. Portanto, os autores concluíram que quanto maior heterogeneidade da estrutura da comunidade bacteriana, maior é a sua capacidade de adaptação a diferentes variáveis edáficas em condições ambientais extremas.

Muitos destes micro-organismos descritos são capazes de utilizar praguicidas como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo, promovendo a degradação parcial, podendo formar compostos de menor toxicidade, ou total do pesticida, com formação de CO₂ e água. Portanto, a ação dos micro-organismos sobre os pesticidas, inclusive herbicidas, contribui para a degradação e para a dissipação dessas moléculas no meio ambiente (ANDRIGHETTI, 2011).

Estudos de SILVEIRA e FREITAS (2007) descrevem que os principais gêneros degradadores destas moléculas no ambiente são as bactérias *Agrobacterium*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Achromobacter*, *Rhodotorula*, *Aerobacter*, *Hydrogenomas* e *Brevibacterium*, os fungos *Alternaria*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizoctonia* e *Trichoderma* e os actinomicetos *Micromonospora*, *Nocardia* e *Streptomyces*.

Os micro-organismos nativos do solo são responsáveis por aproximadamente 90% do metabolismo no solo e estão associados ao equilíbrio e manutenção da fertilidade do mesmo. Devido a esta informação, muitos estudos estão voltados para a bioestimulação de micro-organismos nativos com o objetivo de biodegradar sítios de poluição por herbicidas (EMBRAPA). Com isso, novos avanços biotecnológicos surgiram na área agrícola, os quais estão voltados principalmente para remediação de resíduos tóxicos, fertilização de solos e controle biológico de pragas e doenças relacionadas a diferentes plantios (CANHOS et al., 1998).

1.4 Biorremediação

Biorremediação é um processo que utiliza, tecnologicamente, organismos vivos para remover ou reduzir poluentes no ambiente a níveis aceitáveis. Este processo é uma alternativa economicamente viável e ecologicamente adequada para o tratamento de ambientes contaminados, sendo o solo um dos principais (LEE et al., 2011). Portanto, esta alternativa pode

ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e atividade dos micro-organismos degradadores. A biorremediação é dependente de alguns fatores como umidade, pH e temperatura, uma vez que esses fatores afetam diretamente a atividade dos micro-organismos (JACQUES et al., 2007).

As técnicas de biorremediação normalmente são aplicadas *in-situ*, onde o tratamento é diretamente na área contaminada, permitindo o tratamento de regiões extensas (LÜ et al., 2011). Para empregar a biorremediação é necessário avaliar as características do poluente, a composição de nutrientes do solo, a população microbiana local e a extensão da área afetada.

Muitos trabalhos descrevem a utilização da bioestimulação para a descontaminação de ambientes altamente poluídos com herbicidas (DAI et al., 2015). Esta técnica tem como objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos micro-organismos degradadores autóctones de uma determinada região contaminada, através da adição de nutrientes e aceptores de elétrons. Outra técnica muito utilizada é a bioadição, a qual adiciona micro-organismos cultivados em laboratório com o objetivo de transferir a informação genética do micro-organismo degradador para a região afetada. As técnicas podem ser usadas isoladamente ou de forma combinada (ALISI et al., 2009).

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A crescente e frequente utilização de pesticidas na agricultura moderna levou a preocupação sobre os impactos ambientais, econômicos e sociais decorrentes dessa prática. A contaminação do solo por agrotóxicos provoca o desgaste e, conseqüentemente, a redução da produtividade deste ambiente ao longo dos anos, além de provocar danos severos à saúde da população em geral. No entanto, sabe-se que a ação dos micro-organismos sobre os praguicidas contribui para a degradação e dissipação dessas moléculas no meio ambiente.

Os herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D são os agrotóxicos mais comercializados e utilizados no Brasil e no mundo e, como consequência, são os principais contaminantes de solos, de oceanos e de águas superficiais e subterrâneas. Assim, determinar o potencial da microbiota em degradar tais compostos foi um passo importante para o isolamento e seleção de bactérias que utilizam herbicidas como fonte de carbono e nitrogênio, promovendo a degradação parcial ou total desses praguicidas, com formação de compostos de menor toxicidade.

Embora existam novos isolados bacterianos descritos na literatura que degradam ou mineralizam compostos químicos, até o momento, nenhum trabalho descreve um isolado bacteriano com o potencial genético para degradar mais de um herbicida, e pouco se sabe sobre a análise molecular, com a determinação da localização dos genes envolvidos no processo de biodegradação.

Outro fator importante no presente estudo é o isolamento de bactérias de áreas de preservação da região amazônica e da Chapada dos Veadeiros, ou seja, de áreas sem pressão seletiva, visto que todos os trabalhos publicados relatam bactérias isoladas de amostras de solo com forte histórico de uso de herbicidas.

Dessa forma, o isolamento, a caracterização e a análise do potencial genético de biodegradação desses herbicidas por isolados bacterianos obtidos de locais que fazem uso de herbicidas e de locais de preservação ambiental, poderão contribuir para um melhor entendimento do processo de aquisição dos genes responsáveis por tal mecanismo, além de promover uma análise do potencial da microbiota do solo para a degradação dos herbicidas, a qual seria responsável e eficaz em diminuir o tempo de meia-vida dos compostos nos locais estudados.

De acordo com essas considerações, verifica-se a importância de estudar e avaliar se a pressão seletiva exercida pela presença de um determinado herbicida altera a composição da

microbiota local, além de identificar os principais gêneros bacterianos com potencial genético para biodegradar os diferentes herbicidas em estudo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial genético das frações cultiváveis e não cultiváveis do solo para degradação de três diferentes herbicidas e verificar se a pressão seletiva exercida pela presença de um determinado herbicida tem potencial para alterar a composição da microbiota local, além de identificar os principais gêneros bacterianos cultiváveis da microbiota do solo portadores dos genes de degradação destes herbicidas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o potencial genético das frações cultiváveis e não cultiváveis do solo e dos isolados bacterianos obtidos para degradação dos herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D.
- Avaliar o potencial fenotípico de degradação dos isolados bacterianos obtidos das frações cultiváveis do solo.
- Determinar se os genes catabólicos são de natureza plasmidial ou cromossômica.
- Identificar os principais gêneros bacterianos cultiváveis da microbiota do solo portadores de genes responsáveis pela degradação dos herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D usados em Ribeirão Preto e em diferentes regiões do Brasil.
- Avaliar, pela técnica de DGGE, se a pressão seletiva exercida pela presença de um determinado herbicida altera a composição da microbiota local.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de solo

Para a análise das amostras de solo, foram estabelecidas parcerias com a empresa Ribersolo – Laboratório de Análise de Solo e Foliar, a qual fornece amostras de solo cultivadas com diferentes plantios, com o Centro de Cana do Instituto Agrônomo de Ribeirão Preto e com a Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, as quais fazem uso de diferentes herbicidas.

As amostras de solo também foram coletadas em fazendas localizadas em São Pedro dos Morrinhos, distrito da cidade de Tambaú (SP), e em Casa-Branca (SP). As amostras de áreas de preservação foram coletas na região amazônica (AM) e no Parque Nacional da Chapada dos Veadeiros (GO).

A coleta de solo foi realizada em uma profundidade de 5 a 10 cm e em três diferentes pontos da mesma área a ser analisada para compor um amostra, ou seja, foram necessárias três amostragens para cada amostra de solo.

4.2 Amostras de solos estudadas

A Tabela 1 descreve o local de isolamento das amostras de solo estudadas e o tipo de herbicida utilizado. As amostras de solo estudadas foram escolhidas pelo seu histórico de uso de herbicidas ao longo dos anos.

Tabela 1 - Amostras de solos de diferentes municípios brasileiros e tipo de herbicida utilizado

Amostra	Solo	Cultura	Histórico herbicida	Município/Estado
1	Nativo	Reserva ambiental da floresta amazônica	Sem uso	Manaus/AM
2	Nativo	Reserva ambiental da chapada dos Veadeiros	Sem uso	Alto Paraíso/GO
3	Cultivado	Milho	Atrazina	Casa Branca/SP
4	Cultivado	Soja	2,4-D e Glifosato	Ribeirão Preto/SP
5	Cultivado	Sorgo	Tembotriona e atrazina	Ribeirão Preto/SP
6	Cultivado	Cana-de-açúcar	Diuron	Tambaú/SP

4.3 Isolamento de bactérias do solo

O isolamento bacteriano a partir das amostras de solo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mukherjee et al. (2011), com modificações. Inicialmente as amostras de solo foram intensamente homogeneizadas e 1 g de cada amostra foi adicionado em um tubo de ensaio contendo 5 mL de caldo Luria-Bertani (LB), o que permite o crescimento da fração cultivável das bactérias do solo. De cada tubo, foi retirada uma alíquota de 200 µL para inóculo em meio de cultura sólido contendo os diferentes herbicidas em estudo.

4.4 Extração de DNA

Uma fração das amostras de solo foi utilizada para a extração de DNA diretamente do solo utilizando o Powerlyzer Powersoil DNA Isolation Kit (Mobio), de acordo com as recomendações do fabricante. A extração de DNA das frações cultiváveis do solo, após semeadura em meio líquido LB, e das bactérias isoladas em meio sólido foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN), de acordo com as recomendações dos fabricantes.

O DNA extraído dos isolados bacterianos foi utilizado nas reações de amplificação do gene RNA ribossomal 16S ou 23S e para detecção de genes envolvidos na degradação dos diferentes herbicidas em estudo. Após as extrações, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas em NanoDrop 2000 (ThermoScientific) com comprimento de onda de 260 e 280 nm.

4.5 Identificação dos isolados bacterianos

Os isolados que cresceram nos meios de cultura contendo os herbicidas em estudo foram identificados pelo ensaio de sequenciamento para o gene rRNA 16S e/ou 23S, conforme metodologia descrita por Marchesi et al. (1998) e Hunt et al. (2006), respectivamente. Os iniciadores 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') e 1387R (5'-GGGCGGWTGTACAAGGC-3') foram usados para amplificação do gene 16S e os iniciadores 129f (5'-CYGAATGGGGVAACC-3') e 2490r (5'-CGACATCGAGGTGCCAAAC-3') foram utilizados para amplificação do gene 23S em bactérias não fermentadoras de açúcares.

4.6 PCR para pesquisa de genes envolvidos na degradação de diferentes herbicidas (genes catabólicos)

As reações de PCR para detecção dos genes envolvidos na degradação dos herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D foram realizadas com o DNA obtido diretamente do solo (fração total), da fração cultivável do solo e dos isolados bacterianos, o que permitiu caracterizar a relação entre os genes de degração das duas populações estudadas. As reações foram realizadas no termociclador ProFlex™ PCR system (Life Technologies), e os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1%.

Em cada reação de PCR foi utilizado 1 mmol.L⁻¹ de MgCl₂, 0,2 mmol.L⁻¹ de dNTP, 0,5 µmol.L⁻¹ de cada oligonucleotídeo, 1 U de DNA polimerase (Sigma) e 7 µL de DNA para volume final de 50 µL. A Tabela 2 apresenta os oligonucleotídeos que foram utilizados na amplificação dos genes codificadores de enzimas envolvidas nas vias de degradação dos herbicidas em estudo.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para detecção dos genes envolvidos na degradação de diferentes herbicidas.

Herbicida	Gene	Sequência (5'-3')	Amplicon (pb)	Temperatura anelamento (°C)	Referências
Atrazina	<i>atzA</i>	F: ACGGGCGTCAATTCTATGAC R: CACCCACCTCACCATAGACC	200	58	Devers et al.; 2004
	<i>puhA</i>	F: CGGACGTTCTGACCGTAT R: CGCGATCTTGAGCATGTCTAC	156	58	
Diuron	<i>puhB</i>	F: CGGACGTTCTGACCGTAT R: CGCGATCTTGAGCATGTCTAC	154	58	Pesce et al, 2012.
	<i>tfdAI</i>	F: GTGAGCGTCGTCGAAAT R: GCATCGTCCAGGGTGGTC	856	58	
2,4-D	<i>tfdAII</i>	F: GAGCATCAATTCGAATACC R: AAGACTGACCCCGTGACT	882	58	Bælum et al, 2010.
	<i>tfdAIII</i>	F: GAGCATCACTTCGAATACC R: ACAGCGTCGTCCAACGTC	856	58	

4.7 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR

O sequenciamento dos produtos de PCR obtidos pela amplificação dos genes 16S e 23S e dos genes catabólicos foi realizado para confirmar a identidade genética com outros genes depositados no GenBank. Para tal, os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose após eletroforese e coloração com brometo de etídio (1 µg.mL⁻¹). A seguir, esses foram purificados utilizando o kit Illustrat™ GFX™ PCR (GE Health Care,) para, posteriormente,

serem sequenciados. Os produtos purificados foram sequenciados, pelo menos três vezes. As reações de sequenciamento foram realizadas no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP) (<http://lgmb.fmrp.usp.br/nsb/>), no sequenciador ABI 3130 GeneticAnalyser (AppliedBiosystems,). As sequências obtidas foram analisadas no site NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) através da ferramenta BLAST, para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no Genebank.

4.8 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada de acordo com a técnica de lise alcalina de Birboin e Doly (1979). Os isolados bacterianos foram inoculados em meio LB e incubados a 37°C por 12-18 horas. A seguir, 1,0 mL do crescimento bacteriano foi transferido para um tubo tipo “eppendorf” esterilizado e, então, centrifugado a 12000 g por 2 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de solução I (glicose 50 mmol.L⁻¹; Tris HCl 10 mmol.L⁻¹ pH 8,0; EDTA 10 mmol.L⁻¹ pH 8,0) e mantido em gelo por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2 mol.L⁻¹; SDS 1%), o conteúdo misturado por inversão suave e, posteriormente, os tubos foram mantidos em gelo por aproximadamente 2 minutos. Após esse tempo, foram adicionados 150 µL da solução III (solução de acetato de potássio 5 mol.L⁻¹ e ácido acético glacial 111,5 mL.L⁻¹), o conteúdo misturado por inversão suave e os tubos mantidos em banho de gelo por 15 minutos. A suspensão foi centrifugada a 12000 g por 4 minutos e 400 µL do sobrenadante foram transferidos para outro tubo tipo "eppendorf". A este volume foi adicionado 1,0 mL de etanol 100% gelado (-20°C), sendo o tubo invertido suavemente para mistura do conteúdo e, então, mantido a -20°C por 24 horas. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 g por 4 minutos, ressuspenso em 30 µL de água deionizada esterilizada e mantido a -20°C. As linhagens padrão *Escherichia coli* 39R861 (THRELFALL et al., 1986) e *Escherichia coli* V517 (MACRINA et al., 1987), portadoras de plasmídeos com pesos moleculares conhecidos, foram usadas como controle dos experimentos.

Os plasmídeos detectados foram visualizados em eletroforese em gel de agarose 0,8%, e os pesos moleculares foram calculados utilizando o programa BioNumerics.

4.9 Eletroforese em gel de agarose

A eletroforese de DNA foi realizada em gel de agarose horizontal com TAE 1X (solução estoque 50X – Tris 2 mol.L⁻¹, ácido acético 1 mol.L⁻¹ e EDTA 0,5 mol.L⁻¹ pH 8,0), e o mesmo tampão foi utilizado para as corridas eletroforéticas. Ao término da corrida, as bandas foram visualizadas, após coloração em brometo de etídio (0,5 µg.mL⁻¹), no transluminador E-Gel Imager (Life technologies).

4.10 Reações de Digestão dos plasmídeos em estudo

Reações de digestão do DNA plasmidial dos isolados bacterianos em estudo foram realizadas com as enzimas de restrição *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I (Sigma). As digestões foram realizadas seguindo as recomendações do fabricante e de acordo com a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001). Essas reações foram realizadas para avaliar se plasmídeos de diferentes isolados, mas com peso molecular semelhante, possuíam o mesmo perfil de digestão.

4.11 Teste de degradação dos herbicidas

O ensaio fenotípico para detecção da capacidade de degradação dos herbicidas pelas bactérias isoladas foi realizado de acordo com as metodologias descritas por Mandelbaum et al. (1995), Liphay et al. (2003) e Cullington e Walker (1999), com modificações. Os meios de cultura foram utilizados para detectar a capacidade dos micro-organismos crescerem e/ou degradarem os herbicidas. Os testes foram realizados nos meios ATZ-R, Diuron e 2,4-D, os quais estão listados abaixo. Para o preparo do meio sólido foi acrescentado 1,5% de ágar. A interpretação do teste de degradação ocorre pela visualização da formação de halos em torno das colônias bacterianas, indicando a degradação do composto.

Meio ATZ-R: O meio de cultura ATZ-R, líquido ou sólido, contém 0,1% de citrato de sódio e glicose como fontes de carbono e atrazina como a única fonte de nitrogênio. Os isolados foram semeados em meio ATZ-R contendo 1000 ppm de atrazina para verificar a capacidade de crescimento e utilização do herbicida. O meio ATZ-R contém 67 mL.L⁻¹ de KH₂PO₄ 1 mol.L⁻¹ (pH 6,8), 2 g.L⁻¹ de citrato de sódio, 5 mL.L⁻¹ de Sal-R (80 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 2 g.L⁻¹ de FeSO₄.7H₂O e 4 mL.L⁻¹ de HCl 4 mol.L⁻¹), 0,2 mL.L⁻¹ de CaCl₂ 1 mol.L⁻¹, 10 mL.L⁻¹ de glicose 20% e 5 mL.L⁻¹ de uma suspensão de atrazina (1 g de atrazina em 10 mL de metanol).

Meio Diuron: O meio de cultura Diuron, líquido ou sólido, contém 2,27 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 5,97 g.L⁻¹ de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,5 g.L⁻¹ de NaCl; 0,5 g.L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,01 g.L⁻¹ CaCl₂.2H₂O, 0,02 g.L⁻¹ de MnSO₄.4H₂O), 0,025 g.L⁻¹ de FeSO₄ e suspensão de 500 ppm diuron (0,04 g de diuron em 1 mL de metanol) (pH 6,9).

Meio 2,4-D: O meio de cultura 2,4-D, líquido e sólido, contém 0,5 g.L⁻¹ de K₂HPO₄, 0,5 g.L⁻¹ de (NH₄)₂SO₄, 0,5 g.0,1L⁻¹ de MgSO₄.7H₂O, 0,1 g.L⁻¹ de FeCl₃.6H₂O, 0,1 g.L⁻¹ de CaCl₂, 0,1 mg.L⁻¹ de MnCl₂, 0,01 mg.L⁻¹ de ZnSO₄ e 500 ppm de 2,4-D como única fonte de carbono e pH final de 7,5.

4.12 Teste de degradação dos herbicidas em meio líquido

O teste de degradação em meio líquido foi realizado apenas para o herbicida diuron, sendo utilizada a metodologia descrita por Hernández et al. (2008). Os isolados bacterianos que apresentaram potencial genético para degradação do diuron foram inoculados em 5 mL de meio LB a 30°C sob agitação por 18-24 horas. Em seguida, 1 mL do crescimento bacteriano foi transferido para 100 mL do meio líquido contendo 100 ppm de diuron e, novamente, incubado a 30°C sob agitação. A cada 24 horas, três alíquotas de 2 mL foram retiradas, centrifugadas e o sobrenadante coletado para análise da degradação do herbicida. As alíquotas foram analisadas em HPLC-MS.

Figura 10 - Representação esquemática do ensaio de degradação de herbicidas em meio líquido

4.13 Detecção de metabólitos do diuron por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC/MS)

As amostras obtidas do experimento descrito no item anterior (4.12) foram centrifugadas por 5 minutos a 7000 rpm, 18°C. Ao sobrenadante (2 mL) foi adicionado 1 mL de solução saturada de cloreto de sódio e, em seguida, extraído com 6 mL de acetato de etila. As frações orgânicas foram secas sob ar comprimido e diluídas em 0,5 mL de acetonitrila.

As amostras foram analisadas em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC) Modelo LC-20AD (Shimadzu), com detector DAD modelo SPD-M20A (Shimadzu); acoplado a um espectrômetro de massas modelo amazona ESI-IT (Bruker Daltonicx, Billerica, MA, EUA), com fonte de ionização por eletrospray e analisador ion-trap.

As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Luna C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm), fluxo de 1,000 mL.min⁻¹ e a fase móvel água e acetonitrila (ACN) contendo 0,1% de ácido fórmico, com gradiente de 10% até 100% de ACN em 35 minutos, com tempo total de análise de 45 minutos.

As condições do espectrômetro de massas utilizadas foram: capilar 3,5 kV; temperatura do gás: 330°C; fluxo do gás: 10 L.min⁻¹, pressão: 60 PSI, nitrogênio.

4.14 Eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE)

A técnica de DGGE possibilita a separação de produtos de PCR em função das diferenças nas sequências de pares de bases parcialmente desnaturados. A técnica foi realizada com o objetivo de avaliar variações na composição da microbiota do solo após a aplicação de diferentes tipos de herbicidas.

Para avaliar se ocorrem variações na composição da microbiota do solo após a aplicação dos diferentes herbicidas em estudo, foram feitos três quadrantes de 9 m² em uma área de produção agrícola. Em cada quadrante foi aplicado um dos herbicidas em estudo (atrazina, diuron e 2,4-D), e amostras de solo foram coletadas a cada sete dias, durante as quatro primeiras semanas, do início do experimento, o qual foi realizado em triplicata (Figura 11).

As amostras de solo obtidas foram submetidas à extração de DNA utilizando o Powerlyzer Powersoil DNA isolation Kit (Mobio) e o DNA obtido foi usado nas reações de PCR (Peixoto et al., 2002) para amplificação da região V6 do gene 16S rRNA de bactérias utilizando os iniciadores 27F (GAGAGTTTGATCCTGGCTCA) e 1492R (TACGGYTACCTTCTTACGACT). A amplificação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 1 minuto, 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 63°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos.

A partir da reação descrita acima, o amplicon foi utilizado como molde em outra reação de PCR utilizando iniciadores com um grampo de CG, 968 GC: CGCCCGGGGAGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGAACGCGAAG e 1387R: CGGTGTGTACAACGCCCCGGGAACG. A reação foi realizada com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. As reações foram realizadas para um volume final de 50 µL.

Os amplicons obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, em tampão TAE 1x, corados com GelRed (0,5 µg mL⁻¹) e visualizados em luz UV (DNR-BioImaging Systems/MiniBis Pro). O tamanho dos amplicons foram estimados por comparação com o GeneRuler DNA ladder Mix (Fermentas Life Sciences).

Os produtos de PCR obtidos a partir dos oligos com o grampo de GC foram aplicados em gel de poliacrilamida 6%, na proporção 30:1 acrilamida:bis-acrilamida, no qual foi usado

gradiente desnaturante de ureia e formamida equivalente a 45%-65%, onde 80% significa a concentração de 5,6 mol.L⁻¹ de ureia e 32% de formamida deionizada.

Para a eletroforese, foram utilizados 12 µL dos amplicons acrescidos de 5 µL de Loading Buffer 6x. A corrida foi realizada a 60°C e mantido a uma voltagem de 100 volts durante 16 horas (ABOIM et al., 2004). Os géis foram corados com SYBR-green (Invitrogen), em TAE 0,5x na ausência de luz durante 15 minutos e, posteriormente, os géis foram escaneados em no equipamento Storm 845: New Phosphorimager/Gel scanner. As análises de DGGE foram realizadas com o auxílio do aparelho phoU2 system (Ingeny, Goes, Holanda) seguindo a metodologia adaptada de Muyzer et al. (1993).

Figura 11 - Modelo de experimentação para aplicação dos herbicidas

4.15 Análise Estatística

O software PAST 1.90 (HAMMER et al., 2001) foi utilizado para análise multivariada dos dados da diversidade bacteriana. Para analisar a significância do estudo foi realizado o teste PERMANOVA e para avaliar a similaridade entre os grupos observados foi utilizado o método Mutivariado de Análise de Coordenadas Principais (Principal Coordinates Analysis - PCoA).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação das bactérias estudadas

Para a realização do presente trabalho foram selecionados 19 isolados bacterianos de seis amostras de solos, as quais foram obtidas do estado de São Paulo e de áreas de preservação ambiental dos estados do Amazonas e de Goiás.

Entre os 19 isolados estudados, oito deles (42%) foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*. Os demais isolados pertencem aos gêneros *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Leclercia*, *Lysinibacillus*, *Klebsiella* e *Staphylococcus* (Tabela 3).

Tabela 3 - Isolados, amostras de DNA, perfil plasmidial e genes de degradação de herbicidas em isolados de diferentes áreas no Brasil

Localização/ uso de herbicida	Isolados	Identificação	Plasmídeo (MDa)	<i>tfdAI</i>	<i>tfdAII</i>	<i>tfdAIII</i>	<i>atzA</i>	<i>puhA</i>	<i>puhB</i>
Área preservação- AM/sem uso	1 TF	NA	NA	+	-	-	+	+	+
	1 CF	NA	NA	+	-	-	+	+	+
	S271	<i>Bacillus</i> sp.	40; 2,4; 1,9	+	-	-	+	+	+
	S272	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	-	-	+	+	+
	S273	<i>Acinetobacter</i> sp.	11; 9,0	+	-	-	-	+	+
Área preservação- GO/sem uso	2 TF	NA	NA	+	-	-	+	+	+
	2 CF	NA	NA	+	-	-	+	+	+
	S275	<i>Bacillus</i> sp.	25	+	-	-	-	+	+
	S276	<i>Leclercia</i> <i>adecarboxulata</i>	2,2	-	-	-	+	+	-
	S277	<i>Lysinibacillus</i> sp.	-	+	-	-	+	-	+
Casa Branca- SP/ tembotriona e atrzina	3 TF	NA	NA	-	-	-	+	+	+
	3 CF	NA	NA	-	-	-	+	+	+
	S192	<i>Enterobacter</i> sp.	-	-	-	-	+	+	+
Ribeirão Preto- SP/ atrazina	4 TF	NA	NA	-	-	-	+	+	+
	4 CF	NA	NA	-	-	-	-	+	+
	S278	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
	S279	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
	S280	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
Ribeirão Preto- SP/ 2,4-D e glifosato	5 TF	NA	NA	+	-	-	+	+	+
	5 CF	NA	NA	-	-	-	-	+	+
	S281	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
	S282	<i>Bacillus</i> sp.	-	-	-	-	-	+	+
	6TF	NA	NA	+	-	+	+	+	+
Tambaú-SP/ diuron	6CF	NA	NA	+	-	+	+	+	+
	S203	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	+	-	+	+	-	-
	S204	<i>Escherichia</i> <i>fergusonii</i>	40; 2,4; 1,9	-	-	-	-	+	+
	S205	<i>Acinetobacter</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-
	S206	<i>Escherichia</i> <i>fergusonii</i>	40; 2,4; 1,9	+	-	-	+	+	+
	S207	<i>Escherichia coli</i>	40; 2,4; 1,9	-	-	-	-	+	+
	S315	<i>Klebsiella</i> sp.	15	-	-	-	-	-	-

TF: Pool de DNA total obtido diretamente das amostras de solo; CF: Pool de DNA obtido da fração cultivável do solo; NA: não se aplica; (+): resultado positivo; (-): resultado negativo.

5.2 Detecção dos genes catabólicos

A detecção dos genes catabólicos foi realizada através da técnica de PCR, utilizando o DNA genômico dos isolados bacterianos e iniciadores específicos para os genes *atzA* (atrazina), *puhA* e *puhB* (diuron), *tfdAI*, *tfdAII* e *tfdAIII* (2,4-D).

O resultado da detecção dos genes catabólicos é apresentado na Tabela 3. Dentre as 19 bactérias em estudo, sete apresentaram o gene *atzA*, quatorze apresentaram o gene *puhA*, onze apresentaram o gene *puhB*, seis apresentaram o gene *tfdAI*, dois isolados apresentaram o gene *tfdAIII* e nenhum isolado apresentou o gene *tfdAII*, um gene que é conservado no cromossomo de *Burkholderia* sp. (BAELUM, JACOBSEN e HOLBEN, 2009). A partir destes resultados é possível observar a prevalência dos genes *puhA* e *puhB* nos isolados, indicando que genes envolvidos na degradação do diuron são amplamente distribuídos entre os isolados bacterianos do solo.

Os produtos de PCR obtidos pela amplificação dos genes catabólicos foram sequenciados para confirmar a identidade com outras sequências depositados no GenBank. Foi observado que os genes *atzA*, *puhA* e *puhB* apresentaram 100% de homologia com outras sequências depositadas para os mesmos genes. Entretanto, apesar da obtenção de um produto de PCR com o peso molecular esperado para a amplificação do gene de degradação do 2,4-D, não foi observada homologia com nenhuma sequência depositada para o referido gene.

5.3 Detecção e digestão dos plasmídeos

A extração de DNA plasmidial foi realizada com todos os isolados em estudo. Destes isolados, verificou-se que apenas oito (S271, S273, S275, S276, S204, S206, S207 e S315) apresentaram plasmídeos, sendo quatro deles (S271, S204, S206, S207) com um plasmídeo de mesmo peso molecular (40 MDa).

Um dos isolados citados acima, S271, foi obtido de uma área de preservação ambiental, localizada na Floresta Amazônica (AM), e os isolados S204, S206 e S207 foram obtidos a partir de uma amostra de solo com cultivo de cana-de-açúcar do estado de São Paulo.

Para avaliar a similaridade genética entre os plasmídeos com o mesmo peso molecular, mas encontrados em diferentes isolados, foram realizadas reações de digestão para verificar o perfil de restrição dos mesmos. A Figura 12 apresenta os plasmídeos encontrados nos isolados e seu perfil de restrição, onde é possível observar que os isolados S204, S206, S207 e S271

possuem o mesmo padrão de restrição do DNA plasmidial quando digeridos com *Bam*HI, *Eco*RI e *Xho*I, sugerindo que estes isolados possuem os mesmos plasmídeos.

Figura 12 - Análise do padrão de restrição plasmidial

A) Marcador de 1kb; B) Padrão de peso molecular plasmidial (V517); C) Plasmídeos do isolado S271; D, E, F) perfil de restrição plasmidial do isolado S271 digerido com as enzimas *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I, respectivamente; G) Plasmídeos do isolado S204; H, I, J) perfil de restrição plasmidial do isolado S204 digerido com as enzimas *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I, respectivamente; K) Plasmídeos do isolado 206; L, M, N) perfil de restrição plasmidial do isolado S206 digerido com as enzimas *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I, respectivamente; O) Plasmídeos do isolado S207; P, Q, R) perfil de restrição plasmidial do isolado S207 digerido com as enzimas *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I, respectivamente; S) Padrão de peso molecular plasmidial 39R; T) Plasmídeos do isolado S275; U, V, W) perfil de restrição plasmidial do isolado S275 digerido com as enzimas *Bam*-HI, *Eco*-RI e *Xho*-I, respectivamente.

5.4. Detecção dos genes catabólicos utilizando o DNA plasmidial

A partir do DNA plasmidial extraído dos isolados citados acima, foram realizadas reações de PCR para detecção dos genes catabólicos já encontrados no DNA genômico. O ensaio foi realizado para determinar se os genes catabólicos eram de natureza plasmidial e, portanto, facilmente transmissíveis no meio ambiente.

A Tabela 4 apresenta os plasmídeos presentes nos isolados bacterianos que possuem genes de degradação para os herbicidas estudados. Através dos resultados apresentados, observa-se que os plasmídeos com 40 MDa e 25 MDa são portadores dos genes de degradação do diuron e que apenas um desses isolados, o S271, possui também o *atzA*, gene envolvido na degradação da atrazina.

Tabela 4 - Peso molecular dos plasmídeos encontrados em oito isolados portadores dos genes envolvidos na degradação de herbicidas

Isolado	Localização	Genes	Peso molecular do plasmídeo
S204 (<i>E. fergusonii</i>)	Tambaú- SP	<i>puhA e puhB</i>	40 MDa
S206 (<i>E. fergusonii</i>)	Tambaú- SP	<i>puhA e puhB</i>	40 MDa
S207 (<i>E. coli</i>)	Tambaú- SP	<i>puhA e puhB</i>	40 MDa
S271 (<i>Bacillus</i> sp.)	Chapada dos Veadeiros- GO	<i>atzA, puhA e puhB</i>	40 MDa
S275 (<i>Bacillus</i> sp.)	Floresta amazônica- AM	<i>puhA e puhB</i>	25 MDa

5.5 Teste de degradação dos Herbicidas

5.5.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido

As bactérias em estudo (Tabela 3) foram testadas quanto à capacidade de crescimento em placas de ágar ATZ-R contendo glicose e citrato de sódio como fontes de carbono e 500 ppm de atrazina como única fonte de nitrogênio. Este teste permite detectar a capacidade do micro-organismo utilizar a atrazina como fonte de nitrogênio para seu crescimento e a capacidade de degradar a atrazina.

A interpretação do teste de degradação ocorre pela visualização do crescimento de colônias, indicando que são capazes de utilizar atrazina como fonte de nitrogênio, e pela formação halos em torno das colônias bacterianas, indicando a degradação de atrazina. A Figura 13 ilustra a degradação da atrazina pelo isolado S315 (*Klebsiella* sp.) juntamente com a bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP em meio ATZ-R após 72 horas de incubação a 30°C, onde é possível visualizar a formação de halos.

Os resultados apresentados demonstram que as bactérias testadas apresentam capacidade para crescer utilizando a atrazina como fonte de nitrogênio. Entretanto, apenas para o isolado S315 foi observada a formação de halos em torno das colônias, sugerindo que essa bactéria foi capaz de degradar este composto, enquanto que as demais bactérias foram capazes de crescer na presença de atrazina, mas não houve formação de halos de degradação, indicando que não foram capazes de mineralizar este herbicida.

Figura 13 - *Pseudomonas* sp. ADP e S315 em meio ATZ-R

5.5.2 Teste de degradação do diuron em meio sólido

As bactérias que apresentaram os genes de degradação do diuron (Tabela 3) foram testadas quanto à capacidade de crescimento em placas de ágar Diuron contendo glicose como fonte de carbono e 500 ppm de diuron. Os resultados demonstram que as bactérias testadas apresentaram capacidade para crescer no meio contendo diuron, entretanto, diferentemente do ágar ATZ-R, o meio não apresenta opacidade suficiente para observar a formação de halos em torno das colônias, não sendo possível concluir se houve degradação do diuron.

5.5.3 Teste de degradação do 2,4-D em meio sólido

Os isolados bacterianos (Tabela 3) também foram testadas quanto à capacidade de crescimento em placas de Ágar contendo o herbicida 2,4-D.

Os resultados apresentados demonstram que as bactérias S192 (*Enterobacter* sp), S203 (*Acinetobacter* sp.) e S205 (*Acinetobacter* sp.) cresceram no meio contendo o 2,4-D, sendo possível observar halos em torno das colônias, sugerindo que as bactérias foram capazes de degradar o composto (Figura 14). As demais bactérias cresceram no meio, mas não degradam o herbicida em estudo.

Figura 14 - Teste de degradação em placa de 2,4-D

5.6 Teste de degradação do diuron em meio líquido

Os isolados que apresentaram os genes para degradação do diuron foram submetidos ao ensaio de degradação em meio líquido, com o objetivo de avaliar se tais bactérias são capazes de degradar este herbicida.

5.6.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/MS)

O diuron pode ser degradado por N-desmetilação ou por descloração, sob condições aeróbicas. Uma das principais formas da redução da concentração do diuron do ambiente, bem como outros pesticidas é a biodegradação. Alguns fungos do solo apresentam alta capacidade de degradação das fenilureias, inclusive para o diuron, tendo em alguns estudos também sido encontrada atividade biodegradativa de bactérias para este herbicida (CASTILLO et al, 2006). Os metabólitos do diuron comumente encontrados são: 3,4- diclorofenilmetilureia (DCPMU) 3,4-diclorofenilureia (DCPU), 3,4-dicloroanilina (DCA) e, como produto secundário, o N,N'- Bis (p-clorofenil)ureia (4,4'-diclorocarbanilida) (Field, 1997). Dados contidos na Figura 15 A.

Figura 15 - Estruturas químicas e suas respectivas razões massa/carga (espectrometria de massas).

A) Estruturas químicas do diuron e de seus metabólitos conhecidos. **B)** Estrutura química dos possíveis metabólitos a serem gerados pela degradação do diuron (ainda não descritos na literatura).

Para detectar a separação do diuron e seus metabólitos foi realizada a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC/MS). A Tabela 5 apresenta todos os íons dos metabólitos detectados e relacionados com sua presença ou ausência nas amostras avaliadas. Esses metabólitos foram detectados por espectrometria de massas de acordo com a razão massa/carga de possíveis metabólitos a serem gerados pela degradação do diuron. A presença de cloro ajuda na identificação da molécula devido ao seu padrão isotópico diferenciado. Sendo assim, todas as bactérias utilizadas neste estudo foram capazes de degradar o diuron e formar os metabólitos DCPMU, de m/z 219 $[M + H]^+$, referente a reação de desmetilação; e DCA, de m/z 162 $[M + H]^+$, formado pela hidrólise do resíduo de ureia (rompimento da ligação entre o carbono da carbonila e a amina secundária). Apenas as bactérias S315 (*Klebsiella* sp) e S204 (*E. fergusonii*) apresentaram um metabólito pela substituição nucleofílica aromática de um átomo de cloro por um grupamento hidroxila, gerando os respectivos íons de m/z 187 e 215. Esses resultados sugerem que estes isolados tem um potencial biodegradativo diferenciado para o herbicida diuron.

Tabela 5 - Metabólitos detectados por HPLC/MS gerados a partir da degradação do diuron por bactérias.

Íons <i>m/z</i>	TR min	S315	S204	S206	S271	S275
219	18.2	+	+	+	+	+
205	16.4	-	+	+	-	-
162	20.4	+	+	+	+	+
215	4.4	-	+	-	-	-
187	12.1	+	-	-	-	-
197	8.6	+	+	+	-	-
183	8.6	+	-	+	-	-
169	8.6	-	+	+	-	-

m/z = relação massa/ carga. **TR**= tempo de retenção. Isolados bacterianos: **S315** (*Klebsiella* sp.), **S204** (*E. fergusonii*), **S206** (*E. fergusonii*), **S271** (*Bacillus* sp.) e **S275** (*Bacillus* sp.)

Apesar da presença do cloro ajudar na identificação dos íons, devido ao padrão isotópico, não é possível afirmar que os mesmos são referentes aos metabólitos gerados do diuron. Para confirmação da estrutura são necessários dados mais específicos, que podem ser obtidos de fragmentação por espectrometria de massas, ou de interações nucleares por ressonância magnética nuclear (RMN). A espectrometria de massas tem sido muito utilizada neste tipo de estudo devido à alta sensibilidade, que permite a análise de compostos em baixa concentração; à facilidade de acoplamento com a cromatografia líquida, que permite a análise de diferentes compostos em mistura; e ao desenvolvimento de métodos como CID (*Collision Induced Dissociation* – Dissociação induzida por Colisão), que fornece informações estruturais que auxiliam na caracterização e na confirmação dos analitos estudados.

Sendo assim, os íons detectados foram submetidos à fragmentação através do processo de ativação colisional em um sistema de HPLC-MSⁿ, para confirmação da estrutura dos metabólitos. No entanto, alguns íons detectados, apresentaram-se em concentração muito baixa, o que dificultou o acúmulo de moléculas protonadas suficientes para gerar bons espectros de íons filhos. Mesmo assim, foi possível confirmar a estrutura pelo perfil de fragmentação dos seguintes íons: *m/z* 197 e 169. Os outros íons foram detectados, mas necessitam de dados de fragmentação para confirmação de sua estrutura. Os espectros de fragmentação estão apresentados na Figura 16.

Figura 16 - Espectros de fragmentação obtidos por HPLC/MS dos íons selecionados como possíveis metabólitos gerados da degradação do diuron presente na cultura de bactérias.

A Figura 17 apresenta uma proposta de fragmentação para os metabólitos identificados nos cultivos das bactérias S315, S204 e S206 (m/z 197) e S204 e S206 (m/z 169), na presença do diuron. Esses compostos ainda não se encontram descritos na literatura como metabólitos gerados pela degradação do diuron.

Figura 17 - Proposta de fragmentação para os metabólitos identificados nos cultivos das bactérias S314, S204 e S206 (m/z 197) e S204 e S206 (m/z 169), na presença de diuron

Os metabólitos presentes em maior quantidade, inclusive os que tiveram suas estruturas caracterizadas pelo perfil de fragmentação, tiveram também seus referentes picos comparados com o do diuron das respectivas amostras, pela área cromatográfica. Considerando a área do pico cromatográfico do diuron como 100%, a Tabela 6 apresenta as porcentagens presente nas amostras para os metabólitos de m/z 197 e 169.

Tabela 6 - Porcentagem da área do pico dos íons de m/z 162, 197 e 169 considerando a área do diuron como 100%.

Isolado	Porcentagem da área do pico cromatográfico		
	m/z 162	m/z 197	m/z 169
S315	0,6%	0,9%	---
S204	1,7%	7,5%	1,3%
S206	1,7%	6,4%	1,4%
S271	3,7%	---	---
S275	1,8%	---	---

S315 (*Klebsiella* sp.) / Tambaú-SP, **S204** (*E. fergusonii*) / Tambaú-SP, **S206** (*E. fergusonii*) / Tambaú-SP, **S271** (*Bacillus* sp.) / Reserva ambiental-AM e **S275** (*Bacillus* sp.) Reserva ambiental-GO

Apesar da detecção de diferentes metabólitos nos cultivos das bactérias estudadas, de acordo com os dados da Tabela 6, pode ser observado que ainda resta uma quantidade relevante do herbicida não degradado nos cultivos. Sendo assim, sabendo-se da capacidade das bactérias

estudadas para degradar o diuron, outros experimentos são necessários para otimizar os parâmetros de cultivo para melhor degradação do herbicida estudado.

5.7 DGGE

A técnica de DGGE foi realizada com o objetivo de avaliar as variações na composição da microbiota do solo após a aplicação dos herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D.

Por meio da análise do perfil de bandas da DGGE verificou-se alterações na estrutura da comunidade bacteriana associada ao impacto da aplicação dos três herbicidas. De acordo com a análise de PERMANOVA, foi observado um maior efeito do tempo de persistência dos herbicidas no solo ($p = 0,0001$), efeito do tipo do herbicida ($p = 0,006$) e efeito da interação entre esses dois fatores ($p = 0,0003$).

Para avaliar qualitativamente a distribuição dos perfis de bandas de cada amostra em relação ao efeito demonstrado na análise de PERMANOVA, foi realizada uma Análise Multivariada de Coordenadas Principais (PCoA). A análise permite observar quais amostras apresentam estrutura e composição da comunidade bacteriana semelhante ou distinta.

As análises baseadas na beta-diversidade demonstraram haver um gradiente de separação da comunidade ao longo do tempo. Ainda assim, notou-se uma maior separação nos períodos da 3ª e 4ª semana em relação aos períodos anteriores à aplicação dos herbicidas e após duas semanas da aplicação. Neste mesmo contexto, pode-se observar que no período sem aplicação de pesticidas e na primeira semana, as amostras tendem a estarem mais próximas, ou seja, apresentam uma maior semelhança entre os perfis dos grupos bacterianos, enquanto que nas últimas semanas de amostragem, ocorreu uma maior separação dos tratamentos. (Figura 18).

Figura 18 - Análise de PCoA, por meio da técnica de PCR-DGGE

Os pontos vermelhos correspondem a comunidade bacteriana antes do tratamento com os herbicidas. Em azul está representada a comunidade bacteriana após uma semana de tratamento com os herbicidas. Em rosa corresponde à segunda semana após o tratamento e o verde corresponde a terceira semana após o tratamento. Os pontos pretos correspondem a quarta semana após o tratamento. A seta representa o sentido das semanas de tratamento.

De uma forma mais específica, foram realizadas análises de coordenadas principais em cada tempo analisado. Foi possível observar que em todos os tempos a estrutura da comunidade apresentou-se distinta para os pesticidas analisados (Figura 19).

Figura 19 - Análise da distribuição da comunidade bacteriana ao longo das semanas

A) uma semana após tratamento com os herbicidas. B) duas semanas após tratamento com os herbicidas. C) três semanas após tratamento com os herbicidas. D) quatro semanas após tratamento com os herbicidas.

Por meio das análises baseadas na riqueza de grupos de amostras, verificou-se uma resposta específica da comunidade microbiana para cada tipo de herbicida (Figura 20). Para a atrazina, observou-se um gradiente decrescente ao longo do tempo (valores de riqueza), onde se observou um maior número de grupos no período anterior à aplicação do pesticida. Contudo, essa riqueza diminuiu de acordo com o período de exposição da comunidade bacteriana ao herbicida aplicado no solo. O mesmo ocorreu após o tratamento com o diuron, com um gradiente decrescente a partir da segunda semana de tratamento e diminuição na riqueza de acordo com o período de exposição da comunidade microbiana ao herbicida. Já para o 2,4-D, foi possível observar que ocorreu uma redução constante da diversidade até a terceira semana (valores de riqueza).

Figura 20 20 - Análise da média das triplicatas da comunidade bacteriana sob pressão seletiva do herbicida atrazina ao longo das semanas.

Por meio desses resultados pode-se inferir que a presença de um herbicida no solo alterou toda a comunidade bacteriana local. Essa comunidade bacteriana é mais afetada ao longo do tempo (valores de riqueza), de acordo com o período de exposição da comunidade bacteriana ao herbicida aplicado no solo.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O solo possui uma vasta diversidade de micro-organismos e é considerado um sistema dinâmico, heterogêneo e complexo, agregando um grande número de nichos ecológicos. As bactérias estão presentes na maioria dos ambientes, participando de importantes processos no ecossistema e são responsáveis, em parte, pela manutenção da vida no planeta (ANDREOTE et al., 2007). Estudos de Gardi e Jeferry (2009) estimam que existam aproximadamente 10 mil diferentes espécies bacterianas no solo, entretanto, a maioria delas não são cultiváveis em meios de cultura sintéticos. Rebiere (2015) verificou em seu estudo que a família *Bacillaceae* foi a mais representativa, sendo 81,81% dos isolados identificados como *Bacillus* sp.

No presente trabalho, 19 isolados bacterianos obtidos de amostras de solo de diferentes estados do Brasil foram selecionadas. Dentre estas, 42% pertencem ao gênero *Bacillus* e as demais foram identificadas como *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lysinibacillus* e *Staphylococcus*. Esses dados são condizentes com o estudo de Coba (2012) que, ao analisar a diversidade de bactérias cultiváveis do solo do cerrado brasileiro, identificou também a prevalência de bactérias destes mesmos gêneros, além de ter encontrado outros gêneros como *Hafnia*, *Microbacterium*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Streptomyces*, *Rhizobium* e *Rummeliibacillus*. Estes gêneros bacterianos também já foram descritas na literatura como microbiota do solo por Silva et al. (2006).

Embora o solo e sua microbiota sejam capazes de absorver uma ampla quantidade de contaminantes sem sofrer grandes transformações, com o passar do tempo estas podem se tornar irreversíveis e os danos causados ao ambiente de difícil recuperação (STEFFEN et al., 2011). A contaminação do solo tornou-se um problema de saúde pública, pois à presença de agrotóxicos no solo leva à contaminação das águas superficiais, subterrâneas e de consumo humano e, conseqüentemente, causa riscos de intoxicação à população (LI et al., 2007).

A biorremediação é a principal alternativa para a descontaminação de ambientes poluídos por herbicidas, pois ela é a via primordial de degradação desses compostos. Assim, um dos objetivos do presente trabalho foi avaliar o potencial genético das frações cultiváveis e não cultiváveis do solo para degradação dos herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D, os quais são muito utilizados em culturas agrícolas no Brasil, e também isolar bactérias que possuem um potencial genético para biodegradar esses herbicidas. A partir da amplificação dos genes catabólicos da fração total e da fração cultivável, não foi observada diferença quanto ao potencial genético entre as duas frações, uma vez que os genes catabólicos foram detectados igualmente distribuídos na fração total e na cultivável.

Os 19 isolados bacterianos também foram analisados quanto ao potencial genético para a degradação dos três herbicidas, e os resultados mostraram que alguns isolados apresentaram os genes para a degradação de dois deles (2,4-D e diuron; atrazina e diuron) e ainda isolados que apresentam potencial genético para degradação dos três herbicidas. Até o presente estudo, não havia descrição de nenhuma bactéria com potencial para degradação de mais de um herbicida. Deste modo, é possível sugerir a existência de uma grande dispersão dos genes, que leva à aquisição de diferentes genes de degradação pela mesma bactéria, principalmente para o diuron, que foi encontrado na maioria dos isolados do estudo.

A detecção dos genes catabólicos nos isolados bacterianos foi importante para a caracterização dos micro-organismos degradadores dos herbicidas. Os isolados bacterianos identificados no presente estudo já foram descritos por Silveira e Freitas (2007) como gêneros degradadores dessas moléculas.

Um total de 31,5% dos isolados apresentaram o gene catabólico *tfdAI*, envolvido na degradação do herbicida 2,4-D. Os produtos obtidos por PCR apresentaram o peso molecular esperado para a amplificação do gene de degradação *tfdA*, entretanto, não foi observada homologia com nenhuma sequência para o referido gene. Dentre os isolados, as bactérias S192, S203 e S205 foram as únicas que apresentaram capacidade de degradar o herbicida 2,4-D no ensaio fenotípico. Entretanto, mesmo apresentando a capacidade de biodegradar esse herbicida em ensaio fenotípico, os isolados S192 e S205 não apresentaram nenhum dos genes catabólicos envolvidos na degradação do 2,4-D, sugerindo a existência de uma via de degradação alternativa, ainda não descrita na literatura.

Os estudos de Han et al. (2015) identificaram um isolado de *Cupriavidus campinensis* capaz de biodegradar o herbicida 2,4-D, e tal atividade biodegradativa até então não havia sido descrita por essa espécie. Os estudos de Dai et al. (2015) identificaram o potencial de biorremediação da bactéria Gram-negativa do gênero *Novosphingobium* em solos amplamente contaminados com o herbicida 2,4-D. Ambos os estudos associam o potencial genético, ou seja, a presença do gene *tfdA* com a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D. No presente trabalho, assim como naqueles obtidos por Han et al. (2015) e Dai et al. (2015), o gene *tfdA* foi encontrado em alguns isolados dos gêneros *Acinetobacter* e *Escherichia fergusonii*.

Fernandes et al. (2014) publicaram o primeiro relato da detecção dos genes *atz* em amostras de solo brasileiro. Os genes *atz* fazem parte do processo de mineralização da atrazina, são altamente conservados e já foram identificados em bactérias isoladas de solos dos Estados Unidos, China, França, Canadá, Croácia e Chile (SENE et al., 2010; HERNÁNDEZ et al., 2012).

No presente trabalho, o primeiro gene da via de degradação da atrazina (*atzA*) foi identificado em sete isolados provenientes de diferentes solos brasileiros, sendo estes resultados condizentes com a literatura, que evidencia que a microbiota do solo pode apresentar os genes *atz* isoladamente ou em grupos, em decorrência da transferência horizontal ou perda de fragmentos de DNA (ROUSSEAU et al., 2002). Entretanto, apenas o isolado S315 apresentou a capacidade de degradar a atrazina no ensaio fenotípico, porém este isolado não apresentou o gene *atzA*.

O diuron, um herbicida pertencente à família das fenilamidas-fenilureias, é amplamente utilizado na agricultura nacional e é considerado um poluente biologicamente ativo, persistente no solo e em águas superficiais e subterrâneas. Castillo et al. (2006) descreveram a capacidade biodegradativa de algumas bactérias a diferentes contaminantes ambientais, tais como diuron. Poucos trabalhos, no entanto, foram realizados com base na pesquisa de genes de degradação do diuron (*puhA* e *puhB*). Turnbull et al. (2001) correlacionaram um plasmídeo de 30 MDa com o potencial de degradar esse herbicida, uma vez que esses genes estavam inseridos no mesmo. Os genes catabólicos envolvidos na degradação do diuron (*puhA* e *puhB*) foram amplificados em 73,7% dos isolados deste estudo, a partir de seis amostras de solos. Assim como descrito na pesquisa de Turnbull et al. (2001), o presente estudo observou que os genes *puhA* e *puhB* também estão localizados em plasmídeos de 40 e 25 MDa, em isolados bacterianos de diferentes regiões do Brasil, com e sem histórico de uso de herbicidas.

Com base nesses resultados e em decorrência da dificuldade de analisar a degradação deste herbicida em meio sólido, os isolados bacterianos que apresentaram os genes catabólicos envolvidos na degradação do diuron foram submetidos ao teste de degradação em meio líquido. De acordo com um estudo realizado por Giacomazzi e Cochet (2004), o diuron pode ser degradado em três metabólitos: 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCMPU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA). Mello e colaboradores (2009) também relataram a presença dos mesmos metabólitos citados. Tixier et al. (2000) pesquisaram a degradação do diuron em fungos e demonstraram que o composto não é mineralizado e que os metabólitos identificados exibiram alta toxicidade a organismos não alvos, sugerindo uma preocupação ambiental maior do que a anteriormente reconhecida ao diuron quando usado. Outros trabalhos publicados apresentam a formação dos metabólitos do diuron no solo, contudo as validações das metodologias de extração e quantificação não estão descritas (GOODDY; CHILTON; HARRISON, 2002; GUZZELLA et al., 2006).

Além dos três metabólitos já descritos na literatura (DCPU, DCA e DCMPU), no presente estudo foram detectados outros metabólitos ainda não descritos na literatura como

produto do metabolismo do diuron (m/z 215, m/z 187, m/z 197, m/z 183, m/z 169 e m/z 126), embora alguns deles ainda necessitem da caracterização estrutural para confirmação. A alta sensibilidade da espectrometria de massas proporcionou a identificação de metabólitos, ainda não descritos no metabolismo do diuron, presentes em baixa concentração. Com base nessas informações, foi possível sugerir que as bactérias do estudo que apresentaram outros metabólitos além daqueles já descritos (DCPU, DCA e DCMPU) tem um maior potencial para degradação deste herbicida no solo.

Outro aspecto abordado no presente estudo diz respeito às alterações sofridas pela microbiota do solo em decorrência da exposição aos herbicidas, que ocorre na maioria vezes de forma indiscriminada na agricultura moderna. Muitos estudos têm avaliado a pressão seletiva exercida por estes compostos na comunidade microbiana. Girvan et al. (2004) avaliaram a composição da comunidade microbiana de solo cultivado de trigo, após ser submetido a diferentes práticas agrícolas em diferentes estações. Os autores descrevem que os pesticidas não afetaram significativamente o número de bactérias ou a heterogeneidade da comunidade, uma vez que as bactérias podem utilizar os pesticidas como fonte de energia e degradar estes compostos. Apesar disso, de acordo com outros estudos, os pesticidas podem afetar negativamente o número de organismos na comunidade microbiana se forem aplicados em taxas excedentes às recomendadas (GHANI, 2001; REBECCHI et al. 2000 ; GIGLIOTTI et al., 1998; TU et al., 1995).

Por meio da DGGE, no presente trabalho, verificou-se que ocorreram alterações na estrutura da comunidade bacteriana associada ao impacto da presença dos herbicidas estudados. Foi observado um gradiente de separação da comunidade microbiana ao longo das semanas, com predominância das alterações na terceira e quarta semanas. Nas duas primeiras semanas após a exposição aos herbicidas os perfis dos grupos bacterianos foram mais semelhantes (Figura 14). As principais alterações observadas foram em decorrência da exposição à atrazina e ao diuron, onde foi observado um gradiente decrescente a partir da segunda semana de tratamento.

Assim como neste trabalho, o grupo de Fantroussi et al. (1998) estudaram o efeito de herbicidas da família das fenilureias na comunidade microbiana do solo. Os dendrogramas de similaridade mostraram que a estrutura da comunidade microbiana do solo tratado com herbicida foi significativamente diferente da microbiota do solo não tratado. Além disso, os resultados demonstraram ainda que a diversidade bacteriana diminuiu após o tratamento com estes herbicidas. Sendo assim, os autores concluíram que a presença dos herbicidas diuron e

linuron afetou a comunidade bacteriana, mais especificamente, algumas espécies foram eliminadas da comunidade após a aplicação desses herbicidas por um longo período.

Nesse contexto, verifica-se que o estudo da diversidade microbiana associada à pressão seletiva causada pelo uso de herbicidas é de grande importância, visto que os herbicidas atrazina, diuron e 2,4-D, muito utilizados no Brasil, alteram significativamente a heterogeneidade da comunidade bacteriana do solo.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Houve predomínio de isolados de *Bacillus* sp. nas amostras de solo analisadas, em comparação às demais espécies isoladas no trabalho.
- Existe uma grande dispersão entre os genes envolvidos na degradação dos herbicidas, principalmente para o diuron (*puhA* e *puhB*).
- Os genes de degradação do diuron foram encontrados em plasmídeos de 40 MDa e 25 MDa nos isolados S271, S275, S204, S206 e S207, obtidos de diferentes regiões brasileiras.
- O isolado S315 (*Klebsiella* sp.) foi capaz de degradar a atrazina em meio sólido, contudo, não apresentou nenhum dos genes de degradação pesquisados, sugerindo a presença de genes adicionais.
- Os isolados S204 (*E. fergusonii*), S206 (*E. fergusonii*) e S315 (*Klebsiella* sp.) degradaram o diuron em meio líquido e apresentaram formação de metabólitos descritos e, ainda, não descritos pela literatura.
- Não houve diferença no potencial genético para degradação de diferentes herbicidas entre as frações cultiváveis e não cultiváveis.
- A pressão seletiva exercida pela presença dos herbicidas alterou a composição da microbiota local.
- Os grupos bacterianos são mais semelhantes antes do tratamento e após a primeira de tratamento com os herbicidas.
- A atrazina foi o herbicida que mais afetou a comunidade bacteriana (valores de riqueza) ao longo do tempo.
- O herbicida diuron afetou a comunidade microbiana do solo a partir da segunda semana de tratamento, apresentando uma diminuição na riqueza de acordo com o período de exposição da comunidade microbiana ao herbicida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOIM, M.C.R, BARBOSA, J.C, COUTINHO, H.L.C ROSADO, S.A. Avaliação de Diversidade Microbiana em amostras de solos- Técnica do PCR/DGGE. Rio de Janeiro, RJ, Embrapa solos, 2004.

AGILO, M.L.D, FIFALDO, E.C.C, SANTOS, H.G Extensão e distribuição dos solos. EMBRAPA arroz e feijão. Disponível em <<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/arroz/arvore/CONT000fesi63xh02wx5eo0y53mhyx67oxh3.html>> visualizado em 10 de fevereiro de 2014.

AGUIAR, A.C.F. Sustentabilidade do sistema plantio direto em argissolo no trópico úmido. Botucatu, SP. 2006.

ALISI, C., MUSELLA, R., TASSO, F., UBALDI, C., MANZO, S. Bioremediation of diesel oil in a co-contaminated soil by bioaugmentation with a microbial formula tailored with native strains selected for heavy metals resistance. *Science of the Total Environment*, 407: 3024-3032, 2009.

ANDRIGHETTI, M.S. Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida, Porto Alegre, RS. 2011.

ARAÚJO, I.C., MELO, V.F. Sorção de diuron em minerais da fração argila. *Química Nova*, 35:1312-1317, 2012.

BAELUM, J., JACOBSEN, C.S., HOLBEN, W.E. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. *Systematic and Applied Microbiology*. 33:67–70, 2010.

BIRDOIM, HC; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6):1513-1523, 1979.

BIRNOBOIM, H.C, DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7; 6:1513-1523, 1979.

BORTOLOZI, A., EVANGELISTA de DUFFARD, F., DAJA, R., SILVEIRA, R. Intracerebral administration of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid induces behavioral and neurochemical alterations in the rat brain. *Neurotoxicology* 22:221–32, 2001.

BRIDGE, p., Spooner, B. Soil fungi: diversity and detection. Plant and Soil, The Hague, 232: 147-154, 2001.

BRIDGE, P; SPOONER, B. Soil fungi: diversity and detection. Plant and Soil, The Hague, 232: 147-154, 2001.

BUKOWSKA, B. Toxicity of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid – molecular mechanisms. Polish Journal of Environmental Studies. 15:365–74, 2006.

BURNS, C.J., SWAEN, G.M. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) biomonitoring and epidemiology. Critical Reviews in Toxicology. 42: 768–86, 2012.

CANHOS, V.P, COUTINHO, H.L.C, VAZOLLER, R, RUMJANEK, N, ROSADO, A, et al.. Grupo de Trabalho Temático: Microrganismos e Biodiversidade de solos. In: Estratégia Nacional de Diversidade Biológica. Campinas: Unicamp. 1998.

CASTILLO, M.A., FELIS, N., ARAGON, P, et al. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. Internation Biodeterioration & Biodegradation. 58:196–202, 2006.

CENTRO DE ESTUDOS AVANÇADOS EM ECONOMIA APLICADA (CEPEA-ESALQ/USP). 2013. Disponível em: www.cepea.esalq.usp.br, último acesso em: Maio de 2015.

CHAUDRY, G. R., and HUANG, G. H. Isolation and characterization of a new plasmid from a Flavobacterium sp. which carries the genes for degradation of 2,4-dichlorophenoxyacetate. Jounal of Bacteriology. 170:3897–3902, 1988.

COADY K, MARINO T, THOMAS J, et al. An evaluation of 2,4- dichlorophenoxyacetic acid in the amphibian metamorphosis assay and the fish short-term reproduction assay. Ecotoxicology Environmental Safety 90:143–50, 2013.

COUTURIER, M., BEX, F.P., BERGQUIST, L., MAAS, W. K. Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiology Review. 52; 3:375-395, 1988.

CULLINGTON, J. E., and WALKER, A. 1999. Rapid biodegradation of diuron and structure other phenylurea herbicides by a soil bacterium. Soil Biology & Biochemistry. 31:677–686.

DAI, Y., LI, N., ZHAO, Q., XIE, S. 2015. Bioremediation using Novosphingobium strain DY4 for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid-contaminated soil and impact on microbial community. Biodegradation. 6: 161-170.

DELIPTHAY, J.R., BARKAY, T., SORENSEN, S.J. Enhanced degradation of phenoxyacetic acid in soil by horizontal transfer of the *tfdA* gene encoding a 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dioxygenase. *FEMS Microbiology Ecology*. 35;1:75-84, 2001.

DE SOUZA, M. L., NEWCOMBE, D., ALVEY, S., CROWLEY, D. E., HAY, A., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. Molecular basis of a bacterial consortium: Interspecies catabolism of atrazine. *Applied Environmental Microbiology*, 64(1): 178, 1998.

DEVERS, M., AZHARI, N. E., KOLIC, N-U., MARTIN-LAURENT, F. Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic function. *FEMS Microbiol Lett*, 273: 78-86, 2007.

DUTTA, A., SINGH, N. Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 48: 860-868, 2013.

EI FANTROUSSI, S., L. VERSCHUERE, W. VERSTRAETE, AND E. M. TOP. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16S rRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied Environmental Microbiology*. 65:982–988, 1999.

EI-BESTAWY, E., HANS-JORGEN, A. Effect of nutrient amendments and sterilization on mineralization and/or biodegradation of ¹⁴C-labeled MCPP by soil bacteria under aerobic conditions. *Internation Biodeterioration Biodegradation*. 59:193–201, 2007.

FAGERIA, N.K, STONE, L.F. *Qualidade do Solo e Meio Ambiente*. Santo Antônio de Goiás, Embrapa Arroz e Feijão, 2006.

FERNANDES, A.F.T, PARTATA, M.S, MARTINS, V.V, MIRANDA, C.E.S., STEHLING, E.G. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. *Environmental Science Pollution Research*. 21:13974–13978, 2014.

FERREIRA, F.A; SILVA, AA.; FERREIRA, L.R. 2005. Mecanismos de ação de herbicidas. V Congresso Brasileiro de algodão < <http://www.plantprotection.org/hrac>> último acesso: 2 de Setembro de 2015.

GARABRANT, D.H., PHILBERT, MA. 2002. Review of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) epidemiology and toxicology. *Critical Reviews in Toxicology*. 32:233–57.

GARDI, C., JEFFERY, S. *Soil and Biodiversity: JRC Scientific and Technical Reports*. European Communities, 2009.

GHANI, A., WARDLE, D. A. Fate of C-14 from glucose and the herbicide metsulfuron-methyl in a plant-soil microcosm system. *Soil Biology & Biochemistry*. 33:777–785. 27, 2001.

GHIMIRE, N., WOODWARD, R. T. Under- and over-use of pesticides: An international analysis. *Ecological Economics*, 89: 73-81, 2013.

GIACOMAZZI, S., COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere*. 56: 1021-1032, 2004.

GIGLIOTTI, C, ALLIEVI, L.; SALARDI, C.; FERRARI, F; FARINI, A. Microbial ecotoxicity and persistence in soil of the herbicide bensulfuron-methyl. *Journal Environmental Science Health Part B Pesticides*. 33:381–398, 1998.

GIRVAN, M.S., BULLIMORE, J. BALL, A.S., PRETTY, J.N., OSBORN, M.A. Responses of Active Bacterial and Fungal Communities in Soils under Winter Wheat to Different Fertilizer and Pesticide Regimens. 70: 2692–2701, 2004.

GODDY, D. C.; CHILTON, P. J.; HARRISON, I. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. *The Science of the Total Environment*, Amsterdam, 297(1/3): 67–83, 2002.

GUZZELLA, L.; CAPRI, E.; CORCIA, A.; BARRA, A.; CARACCIOLO, B.; GIULIANO, G. Fate of Diuron and Linuron in a Field Lysimeter Experiment. *Journal of Environmental Quality*, Madison, 35(1): 312-323, 2006.

HAMMER, O; HARPER, D.A.T; RYAN, P.D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4:1, 2001.

HAN, L., ZHAO, D., LI, C. 2015. Isolation and 2,4-D-degrading characteristics of *Cupriavidus campinensis* BJ71. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46, 2:433-441.

HERNÁNDEZ, M. VILLALOBOS P, MORGANTE V, GONZÁLEZ M, REIFF C, MOORE E, SEEGER M. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF A NOVEL SIMAZINE-DEGRADING BACTERIUM from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS Microbiology Ecology*, 286: 184-190, 2008.

HESS, D., WARREN, F. The herbicide handbook of the Weed Science Society of America. 8th ed., Weed Science Society of America. Herbicide Handbook Committee. 159–61, 2002.

JACQUES, R.J.S; BENTO, F.M; ANTONIOLLI, Z.I; CAMARGO, F.A.O. Bioremediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ciência Rural*, 37(4): 1192-1201, 2007.

JAVARONI, R.A., LANDGRAF, M. D., REZENDE, M.O.O. Comportamento dos Herbicidas Atrazina e Alaclor Aplicados em Solo Preparado para o Cultivo de Cana-de-açúcar. *Química Nova*, 22(1), 1999.

KIM M, CHO A, LIM HS, HONG SG, KIM JH, LEE J, CHOI T, AHN TS, KIM OS. Highly heterogeneous soil bacterial communities around Terra Nova Bay of Northern Victoria Land, Antarctica. *PLoS One*.10: 3, 2015.

KITAGAWA, W., K. MIYAUCHI, E. MASAI, M. FUKUDA. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. strain RHA1. *Journal of Bacteriology*. 183: 6598–6606, 2001.

KRUTZ, L. J., SHANER, D. L., ACCINELLI, C., ZABLOTOWICZ, R. M., HENRY, W. B., Atrazine dissipation in s-triazine-adapted and nonadapted soil from Colorado and Mississippi: Implications on enhanced degradation on atrazine fate and transport parameters. *Journal of Environmental Quality*, 37: 848-857, 2008..

LANGENBACH, T, PAIM, S. Os Pesticidas no Ecossistema do Solo. *Ecologia Brasiliensis*, 1:349-363, 1995.

LANGENBACH, T., PAIM, S. Os Pesticidas no Ecossistema do Solo. *Ecologia Brasiliensis*, 1:349-363, 1995.

LEE, KANG, Y-S., CHO, K-S. Bioremediation of Diesel-Contaminated Soils by Natural attenuation, Biostimulation and Bioaugmentation Employing *Rhodococcus* sp. EH831. *Korean Journal of Microbiol. Biotechnol.*, 39, 1: 86–92, 2011.

LEPSCH, I. F. 19 Lições de Pedologia. – São Paulo: Oficina de Textos, 2011.

LEPSCH, I. F. Formação e Conservação dos Solos. São Paulo: Oficina de Textos. 178. 2002.

LI, Q., LUO, Y., SONG, J., WU, L. Risk assessment of atrazine polluted farmland and drinking water: a case study. *Bull Environ Contam Toxicol*, 78: 187-190, 2007.

LIPTHAY JR, TUXEN N, JOHNSEN K, HANSEN LH, ALBRECHTSEN HJ, BJERG PL; AAMAND J. In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Appl Environ Microbiol* 69: 461– 467, 2003.

LÜ, J.C; Li, Z.T., Hussain, K; YANG, G.K. Bioremediation: The New Directions of Oil Spill Cleanup. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 7 (5): 738-740, 2011.

MANDELBAUM, R.T., ALLAN, D. L., WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied Environmental Microbiology*. 61:1451–1457, 1995.

MARCHESI, J.R, Sato, T, Weightman, A.J, Martin, T.A, Fry, J.C et al. "Design and Evaluation of Useful Bacterium-Specific PCR Primers That Amplify Genes Coding for Bacterial 16S rRNA." *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 795-799, 1998.

MARIANO, A.P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. Unesp, Rio Claro, SP, 2006.

MARIN-MORALES, M. A., 2013. Toxicity of herbicides: Impact on aquatic and soil biota and human health. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/55851>.

MELO, I.S. <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_68_410200710544.html> último acesso em: 2 de Setembro de 2015.

MIGEOT, V., ALBOUY-LLATY, M., CARLES, C., LIMOUSI, F., STREZLEC, S., DUPUIS, A., RABOUAN, S. Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: A historic cohort study. *Environmental Research*, 122: 58-64, 2013.

MIKOV, I., VASOVIC, V., MIKOV, A, et al. Hypoglycemic effect of herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Pestic Phytomed (Belgrade)* 25:349–52, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2011. *Boletim Epidemiológico, Secretaria de Vigilância em Saúde*, v.44, 2013.

MORAES, N.V., GRANDO, M. D., VALERIO, D. A. R., OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. *Revista Brasileira de Toxicologia*, 21;1: 1-8, 2008.

MOREIRA, F.M.S, SIQUEIRA, J.O. MICROBIOLOGIA E BIOQUIMICA DE SOLO. 2ª ed. Editora Ufla, 2006.

MUKHERJEE, K.; TRIBEDI P, CHOWDHURY A, RAY T, JOARDAR A, GIRI S, SIL AK. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. *Biodegradation*, 22:377-388, 2011.

MUNRO, I.C., CARLO, G.L., ORR, J.C., et al. A comprehensive, integrated review and evaluation of the scientific evidence relating to the safety of the herbicide 2,4-D. *J Am Coll Toxicol* 11:559–664, 1992.

PEIXOTO, R. S, COUTINHO, H. L. C, RUMJANEK, N. G., MACRAE, A., ROSADO, A. S. Use *rpoB* and 16S rRNA genes to analyse bacterial diversity of a tropical soil using PCR and DGGE. *Letters in Applied Microbiology*, London. 35; 316-320, 2002.

PESCE, S.; BEQUET, J.; DEVERS-LAMRANI, M.; MARTIN-LAURENT, F. Response of a diuron-degrading community to diuron exposure assessed by real-time quantitative PCR monitoring of phenylurea hydrolase A and B encoding genes. *Applie Microbiology Biotechnology*. 97 (4): 1661-1668, 2013.

POKORNY, R. Some chlorophenoxyacetic acids. *Journal American Chemistry Society*, 63:1768, 1941.

PYLRO, V.S., ROESCH, L.F., ORTEGA, J.M, do AMARAL, I A.M, TÓTOLA, M.R, HIRSCH, P.R, ROSADO, A.S, GÓES-Neto, A., da COSTA, A.L.S., ROSA, CA, MORAIS, D.K., ANDREOTE, F.D., DUARTE, G.F., de MELO, I.S., SELDIN, L., LAMBAIS, M.R, HUNGRIA M., PEIXOTO R.S., KRUGER RH, TSAI, S.M., AZEVEDO, V. Brazilian Microbiome Project: revealing the unexplored microbial diversity--challenges and prospects. *Microb Ecol*. 67; 2:237-241, 2014.

RAJKOVIC, V., KOVAC, R., KOLEDIN, I., MATAVULJ, M. Atrazine-induced degranulation thyroid mast cells in peripubertal and adult rats. *Central European Journal of Biology*. 7: 25-32, 2012.

REBECCHI, L., M. A. SABATINI, C. CAPPI, P. GRAZIOSO, A. VICARI, G. DINELLI, AND R. BERTOLANI. Effects of a sulfonylurea herbicide on soil microarthropods. *Biology Fertilization Soils*. 30:312–317, 2000.

REBIERE, C. Identificação molecular e fenotípica de bactérias de solo rizosférico com tolerância ao fungicida Mancozeb, em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 6;2:37-43, 2015.

RHINE, E. D., FUHRMANN, J. J., RADOSEVICH, M. Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Microbiology Ecology*, 46:145-160, 2003.

SAJJAPHAN K., SHAPIR, N., WACKETT, L. P., PALMER, M., BLACKMON, B.; TOMKINS, J., SADOWSKY, M. J. *Arthrobacter aureus* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 70:4402–4407, 2004.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor. 1584, 2001.

SANTOS, T. G., MARTINEZ, C. B. R. Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. 89: 1118-1125, 2012.

SENE, L., CONVERTI, A., SECCHI, G. A. R., SIMÃO, R. C. G. New aspects on atrazine biodegradation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 53: 487-496, 2010.

SHAPIR, N. SADOWSKY MJ. <
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Wackett%20LP%5BAuthor%5D&cauthor=true&cauthor_uid=15901697>. Purification and characterization of allophanate hydrolase (*AtzF*) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 187: 3731–3738, 2005.

SHELLEY, L. K., ROSS, P. S., MILLER, K. M., KAUKINEN, K. H., KENNEDY, C. J. Toxicity of atrazine and nonylphenol in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effects on general health, disease susceptibility and gene expression. *Aquatic Toxicology*, 124-125: 217-226, 2012.

SILVA, J.M. NOVATO-SILVA,E.; FARIA, H.P.; PINHEIRO, T.M.M. Pesticides and work: a dangerous combination for the Brazilian agricultural worker's health. *Ciência e Saúde Coletiva*. 10;4: 891-903, 2005.

SILVA, V. A. et al. Isolamento e identificação de bactérias presentes nos solos de cobertura utilizados no cultivo do cogumelo *Agaricus blazei* MURRIL. *Ciênc. agrotec.*, Lavras, 31: 5, 1364-1373, 2007.

SILVEIRA, A.P.D, FREITAS, S.S. *Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental*. Instituto Agrônomo Campinas, São Paulo, 2007.

SINDAG - SINDICATO NACIONAL DAS INDÚSTRIAS DE DEFENSIVOS AGRÍCOLAS. Uso de defensivos é intensificado no Brasil. 2005. Disponível em: <http://www.sindiveg.org.br/>. último acesso em: 30 de Outubro de 2015.

SPADOTTO, C.A E GOMES, M.A.F. Agrotóxicos no Brasil. EMBRAPA. 1998 <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html> último acesso 27 de setembro de 2015

SPERA, S.T., REATTO, A., MARTIS, E.S., CUNHA, T.J.F, CORREIA, J.R. 2001. Disponível em <www.agroescola.com.br/artigos/SolosArenosos.htm> visualizado em 10 de setembro de 2015.

STASINAKIS, A.S, KOTSIFA, S., GATIDOU, G., MAMIS, D. 2009. Diuron biodegradation in activated sludge batch reactors under aerobic and anoxic conditions. *Water Res* 43:1471–9.

STEFFEN, G.P.K. ANTONIOLLI, Z.I. Contaminação do Solo e da Água pelo Uso de Agrotóxico. *Tecnológica*. 15: 15-21, 2011.

STREIT, W.R and SCHMITZ, R.A. Metagenomics the key to the uncultured microbes. *Curr Opin Microbiol*. 7;5: 492-498, 2004.

THEISEN, G. O mercado de agroquímicos. 2012. Disponível em: <http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/>. último acesso em: 30 de Outubro de 2015..

THRELFALL, E.J, ROWE B, FERGUSON, J.L., WARD, L.R. Characterization of plasmids conferring resistance to gentamicin and apramycin in strains of *Salmonella typhimurium* phage type 204c isolated in Britain. *Journal Hyg (London)*. 97: 419–426, 1986.

TU, C. M., C. F. MARKS, P. W. JOHNSON, S. K. GAYED, M ELLIOT, J. Effects of pesticides on soil enzymatic-activities, *Pratylenchus penetrans* populations, black root-rot, and growth of flue-cured tobacco. *Journal Environmental Science Health Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes*. 30:141–162, 1995.

TURNBULL, G.A., OUSLEY, M., WALKER, A., SHAW, E., MORGAN, J.A.W. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol*. 67, 2270–2275, 2001.

UETA, J. ; PEREIRA, N.L; SHUHAMA, I.K. Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, 10:10-13, 1999.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). 2004. Environmental data and effects division's risk assessment for the reregistration eligibility document for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Disponível em: <<http://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main> (Docket IDEPA-HQ-OPP-2004-0167)>último acesso 10 de setembro de 2015.

ZHU, B.; LIU,T.; HU, X.; WANG, G. Developmental toxicity of 3,4-dichloroaniline on rare minnow (*Gobiocrypris rarus*) embryos and larvae. *Chemosphere*, 90, 1132-1139, 2013.