UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMCÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina

Ana Flavia Tonelli Fernandes

Ribeirão Preto

2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina

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: Ana Flavia Tonelli Fernandes

Orientadora: Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 14/02/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2014

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.

Fernandes, Ana Flavia Tonelli
Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina. Ribeirão Preto, 2014.
67 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. Degradação da atrazina. 2. Genes *atz*. 3. Contaminação ambiental

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Flavia Tonelli Fernandes
Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura:_____

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 Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Microrganismos 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 a coordenação da *Profa. Dra. Juliana Pfrimer Falcão*.

Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP), sob a coordenação do *Prof. Dr. Roberto Martinez*.

Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), nas dependências da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, sob a coordenação do *Prof. Dr. Dimas Tadeu Covas.*

Dedico este trabalho a meus pais e aos meus avós, por todo incentivo e apoio em mais uma etapa de minha vida.

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eliana Guedes Stehling, pela oportunidade de realizar o mestrado, pela confiança, orientação, incentivo e paciência e pelos valiosos ensinamentos.

À toda equipe do Laboratório de Bacteriologia, Epidemiologia Molecular, Virulência Bacteriana e Estudos da Genômica de Microrganismos, pela colaboração e constante disposição em ajudar.

Ao Prof. Dr. Roberto Martinez, Sra. Rosa Helena A. R. Gironi e a todos os funcionários do Laboratório de Microbiologia do HCFMRP-USP, pelo aprendizado, convívio e experiência adquirida.

À equipe do Laboratório de Biofarmacotoxicologia, da Universidade de Ribeirão Preto, pela colaboração nas análises por HPLC/UV.

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

À Farmacêutica Marina Monseff Campos e ao Engenheiro Agrônomo Luiz Augusto de Almeida Campos da empresa Ribersolo - Laboratório de Análises do Solo e Foliar, pelas amostras de solo cedidas.

Ao Centro de Cana do Instituto Agronômico e à Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, pelas amostras de solo cedidas.

Ao Engenheiro Agrônomo Alfredo Riciere Dias, Pesquisador/Consultor da Fundação Chapadão, Chapadão do Sul, MS e demais colaboradores de diversas regiões do Brasil pelo envio de amostras de solo.

Ao amigo Vinícius Vicente Martins, pela paciência, amizade, carinho e pela grande ajuda nos experimentos.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, juntamente com os funcionários da Seção de pós-graduação da FCFRP-USP, no programa de Biociências Aplicadas à Farmácia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de mestrado concedida.

Às colegas de laboratório, Maria Olívia, Michele e Carolina pelo aprendizado, carinho e momentos de descontração.

À Deus, por me escutar e me guiar e por me amparar nas horas difíceis.

À minha família, pelo amor, dedicação, incentivo, paciência e por acreditar em mim e me apoiar na busca de meus objetivos.

Aos amigos, pelo companheirismo, incentivo, carinho e amizade durante os dias longe da família.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Se não houver frutos, valeu a beleza das flores

Se não houver flores, valeu a sombra das folhas

Se não houver folhas, valeu a intenção da semente

(Henfil)

RESUMO

FERNANDES, A. F. T. **Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudmonas* spp. envolvidas na biodegradação da atrazina.** 2014. 67f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A atrazina é um herbicida amplamente utilizado no Brasil e no mundo em diferentes culturas agrícolas, principalmente em culturas de milho, sorgo, soja e cana-de-açúcar, entretanto, pode se tornar um contaminante de águas superficiais e subterrâneas e do solo, gerando uma preocupação ambiental, pois desequilibra e interfere no ecossistema. A atrazina pode sofrer biodegradação, tornando o processo de biorremediação uma alternativa viável e ecologicamente aceitável para o tratamento de ambientes contaminados por esse herbicida. O microrganismo de referência nesse processo de biodegradação é a *Pseudomonas* sp. ADP que possui o plasmídio pADP-1, no qual se localizam os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F, que codificam enzimas atuantes na via de degradação da atrazina. O presente estudo teve como objetivo o isolamento e a caracterização de bactérias do gênero *Pseudomonas* quanto à presença de genes de degradação da atrazina e quanto à capacidade de degradação desse herbicida. No presente trabalho foram isoladas 123 cepas de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil, as quais foram caracterizadas através de provas bioquímicas e moleculares e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (74,8%) e outras espécies (25,2%) pertencentes aos gêneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* e *Rhizobium*. A variabilidade genética dos isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* foi analisada através da técnica de ERIC-PCR e demonstrou que todos os isolados apresentam alta diversidade genética (<80%). Os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F foram detectados em seis isolados provenientes de amostras de solo das regiões Norte, Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, sendo três deles da espécie *Pseudomonas aeruginosa*, um *Cupriavidus pauculus*, uma *Burkholderia cepacea* e um *Rhizobium radiobacter*. Apenas três isolados contendo os genes *atz* apresentaram plasmídios. Os isolados bacterianos que apresentaram os genes *atz* foram testados quanto à capacidade de crescimento utilizando a atrazina como única fonte de nitrogênio e quanto à capacidade de degradação desse herbicida. Todos os isolados testados apresentaram crescimento em meio ATZ-R, mas não foi possível observar a mineralização do herbicida, tanto em meio sólido quanto em meio líquido, todavia observou-se a degradação da atrazina por uma espécie de *Pseudomonas aeruginosa* (isolado P86), com redução de 44%, em meio líquido ATZ-R contendo 33 ppm de atrazina.

Palavras-chave: Degradação da atrazina; genes *atz*; Contaminação ambiental

ABSTRACT

FERNANDES, A. F. T. **Phenotypic and molecular characterization of *Pseudmonas* spp. strains involved in atrazine degradation.** 2014. 67f. Dissertation (Master). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Atrazine - the herbicide widely used in Brazil and all over the world in different agricultural crops mainly in corn, sorghum, soy, and sugar cane can contaminate the superficial and subterraneous water, and soil creating an environmental concern due to imbalance and interference caused in ecosystem. Atrazine can suffer biodegradation, which can make the bioremediation process a viable and ecologically acceptable alternative for the treatment of the environment contaminated with this herbicide. The microorganism referred on that biodegradation process is *Pseudomonas* sp. ADP which has pADP-1 plasmid, where are the genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E, and *atz*F that codify active enzymes on atrazine degradation way. The aim of this present study was the isolation and the characterization of *Pseudomonas* genus bacteria due to the presence of the atrazine degradation genes, and the capacity of degradation of this herbicide. In the present work 123 samples of soil bacteria from different Brazilian regions were isolated, and characterized by biochemical and molecular tests, and identified as *Pseudomonas aeruginosa* (74.8%) and other species (25.2%) of *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus*, and *Rhizobium genus*. Genetic variability of the isolated of *Pseudomonas* genus was analyzed by the ERIC-PCR technique, and demonstrate that all the isolated ones presented high genetic diversity (<80%). *atzA, atzB, atzC, atzD, atzE*, and *atzF* genes were detected in six isolated of soil samples from North, Northeast, Southeast, and Midwest of Brazil being 3 *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Cupriavidus pauculus*, 1 *Burkholderia cepacea*, and 1 *Rhizobium radiobacter*. Only 3 isolated with *atz* genes presented plasmids. Bacterial isolates that presented *atz* genes were tested for growth and degradation capacity using only atrazine as nitrogen source. All tested isolates presented growth on ATZ-R, but mineralization of this herbicide in solid or liquid media was not possible to observe. However, 1 specie *Pseudomonas aeruginosa* (isolate P86) presented atrazine degradation (reduction of 44%) in ATZ-R liquid media with 33 ppm of atrazine.

Key words: Atrazine degradation; *atz* genes; Environmental contamination.

RESUMEN

FERNANDES, A. F. T. **Caracterización fenotípica y molecular de linajes de *Pseudomonas* spp. Involucradas en la biodegradación de la atrazina.** 2014. 67f. Disertación (Maestría). Facultad de Ciencias Farmacéuticas de Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

La atrazina es un herbicida ampliamente utilizado en Brasil y en todo el mundo en distintos cultivos agrícolas, principalmente en cultivos de maíz, sorgo, soja y caña de azúcar, pero puede volverse un contaminante de aguas superficiales y subterráneos y también del suelo, generando una preocupación ambiental, pues desequilibra e interfiere en el ecosistema. La atrazina puede sufrir biodegradación, tornando el proceso de biorremediación una alternativa viable y ecológicamente aceptable para el tratamiento de ambientes contaminados por ese herbicida. El microrganismo de referencia en ese proceso de biodegradación es *Pseudomonas* sp. ADP que posee el plásmido pADP-1, en el cual se localizan los genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *y atz*F, que codifican enzimas actuantes en la vía de degradación de la atrazina. El presente estudio tuvo como objetivo el aislamiento y la caracterización de bacterias del género *Pseudomonas* cuanto a la presencia de genes de degradación de la atrazina y cuanto a la capacidad de degradación de ese herbicida. El presente trabajo fueron aisladas 123 bacterias de muestras de suelo de diferentes regiones de Brasil, las cuales fueron caracterizadas por medio de pruebas bioquímicas y moleculares, e identificadas como *Pseudomonas aeruginosa* (74,8%) y otras especies (25,2%) pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Burkholderia*, *Cupriavidus* y *Rhizobium*. La variabilidad genética de los aislados pertenecientes al género *Pseudomonas* fue analizada por la técnica de ERIC-PCR y demonstró que todos los aislados presentaron alta diversidad genética (<80%). Los genes *atzA, atzB, atzC, atzD, atzE y atzF* fueron detectados en seis aislados provenientes de muestras de suelo de las regiones Norte, Nordeste, Sureste y Centro-Oeste de Brasil, siendo 3 de la espécie *Pseudomonas aeruginosa*, 1 *Cupriavidus pauculus*, 1 *Burkholderia cepacea* y 1 *Rhizobium radiobacter*. Solamente 3 aislados conteniendo los genes *atz* presentaron plásmidos. Los aislados bacterianos que presentaron los genes *atz* fueron probados cuanto a la capacidad de crecimiento utilizando la atrazina como única fuente de nitrógeno y cuanto a la capacidad de degradación de ese herbicida. Todos los aislados probados presentaron crecimiento en ATZ-R, pero no fue posible observar la mineralización del herbicida, tanto en medio sólido cuanto en medio líquido. Todavía una especie de *Pseudomonas aeruginosa* (aislado P86) presentó degradación de la atrazina (reducción de 44%.) en medio líquido ATZ-R conteniendo 33 ppm de atrazina.

Palabras llave: Degradación de la atrazina; genes *atz*; Contaminación del medio ambiente.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos agrotóxicos no solo 05
Figura 2. Distribuição dos municípios brasileiros que apresentaram agrotóxicos com valores acima do Valor Máximo Permitido (VPM) conforme descrito no padrão de potabilidade. Brasil, 2011..... 06
Figura 3. Estrutura química da Atrazina 06
Figura 4. Plasmídeo pADP-1 10
Figura 5. Via catabólica de degradação da atrazina 11
Figura 6. Representação esquemática do isolamento bacteriano de amostras de solo 18
Figura 7. Representação esquemática do ensaio de degradação da atrazina em meio líquido ATZ-R 24
Figura 8. Porcentagem das bactérias isoladas por local de origem (estado brasileiro) 27
Figura 9. Fontes de isolamento (cultura/plantio) das bactérias isoladas no estudo 28
Figura 10. Identificação dos isolados bacterianos 29
Figura 11. Diversidade regional das bactérias selecionadas no estudo 31
Figura 12. Gel de agarose 1% representativo dos produtos de amplificação dos genes *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F do isolado de *Pseudomonas aeruginosa* P59 32
Figura 13. Gel de agarose 1% representativo dos produtos de amplificação dos genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F em *Cupriavidus pauculus*, após eletroforese horizontal 32
Figura 14. A: Perfil plasmidial em gel de agarose 0,8% do isolado bacteriano de *P. aeruginosa* P59. B: Perfil plasmidial em gel de agarose 0,8% do isolado bacteriano de *P. aeruginosa* P86 34
Figura 15. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA, representando as relações genéticas entre 5 isolados de *P. putida*, com base na técnica de ERIC-PCR 36
Figura 16. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA, representando as relações genéticas entre 15 isolados de *P. aeruginosa*, com base na técnica de ERIC-PCR 36

Figura 17. *Pseudomonas* sp. ADP em meio ATZ-R 37
Figura 18. Teste de crescimento e degradação em meio ATZ-R 38
Figura 19. Avaliação da biotransformação da atrazina em meio líquido por espectrofotometria 39
Figura 20. Curva analítica da atrazina 40
Figura 21. Teste de degradação da atrazina em meio líquido pela técnica de HPLC/UV 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Condições da reação de PCR para o gene *opr*L 19
Tabela 2- Condições da reação de ERIC - PCR 21
Tabela 3- Condições das reações de detecção dos genes *atz* 21
Tabela 4- Iniciadores utilizados nas reações de detecção de genes *atz* 22
Tabela 5- Isolados bacterianos selecionados para detecção dos genes de degradação da atrazina 30
Tabela 6- Resultado da detecção dos genes de degradação da atrazina em 25 bactérias selecionadas 33
Tabela 7- Peso molecular dos plasmídios encontrados em 10 isolados portadores e não portadores de genes *atz* 35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Do inglês, *Atrazine Degrading Pseudmonas*
AM	Amazonas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Do inglês, *American Type Culture Collection*
atz	Genes de degradação da atrazina
BLAST	Do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*
CDB	Convenção sobre Diversidade Biológica
DF	Distrito Federal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Agência de Proteção Ambiental
ERIC	Do inglês, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase*
EUA	Estados Unidos da América
F	*Forward*
FE	Fazenda Experimental
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FUNDHERP	Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto
GO	Goiás
HC	Hospital das Clínicas
HPLC	Do inglês, *High-perfomance Liquid Chromatography*
IAC	Instituto Agronômico da Cana
LB	Luria-Bertani
Lys-R	Do inglês, *Transcriptional Regulator Family*
MG	Minas Gerais
Min	Minuto
MS	Ministério da Saúde
MS	Mato Grosso do Sul
NSB	Núcleo de Serviços em Biotecnologia
Pb	Pares de base

PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PI	Piauí
PPM	Partes por milhão
PR	Paraná
R	*Reverse*
RO	Rondônia
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg.	Segundo (s)
spp.	Espécies
SP	São Paulo
TAE	Tris Acetato EDTA
TM	Do inglês, *trademark*
Tris	Hidroximetilaminometado
U	Unidade (s)
UPGMA	Do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean*
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta
VPM	Valor Máximo Permitido

LISTA DE SÍMBOLOS

˚C	Grau Celsius
CO_2	Gás carbônico
g	Grama
g	Medida da gravidade da Terra
h	Horas
H	Hidrogênio
HCl	Ácido clorídrico
H_2O	Água
Kg	Kilogramas
Kt	Kilotons
L	Litro
M	Molar
MDa	Megadalton
-	Menos
µg	Microgama
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
n˚	Número
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
pmol	Picomol
NaOH	Hidróxido de sódio
NH_3	Amônia
®	Marca Registrada
%	Percento

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**

ABSTRACT ..... **ii**

RESUMEN ..... **iii**

LISTA DE FIGURAS ..... **iv**

LISTA DE TABELAS ..... **vi**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **vii**

LISTA DE SÍMBOLOS ..... **ix**

1. INTRODUÇÃO **1**

1.1 Pesticidas e Contaminação Ambiental..... 2

1.1.1 O Solo 2

1.1.2 Pesticidas..... 3

1.1.3 Atrazina 6

1.2 Biorremediação 7

1.3 Pseudomonas spp..... 8

1.4 Pseudomonas spp. *e Biorremediação* 9

2. RELEVÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO **13**

3. OBJETIVOS **15**

3.1 Objetivo Geral 16

3.2 Objetivos Específicos 16

4. MATERIAL E MÉTODOS **17**

4.1 Coleta do solo e obtenção dos isolados de Pseudomonas spp 18

4.2 Caracterização bioquímica e molecular dos isolados 19

4.3 Extração do DNA genômico 20

4.4 Eletroforese em gel de agarose 20

4.5 Tipagem molecular das amostras isoladas de solo por ERIC-PCR 20

4.6 Detecção dos genes de degradação da atrazina por PCR 21

4.7 Extração de DNA plasmidial 22

4.8 Teste de degradação da atrazina 23

4.8.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido 23

4.8.2 Teste de degradação da atrazina em meio líquido 23

4.8.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV) 24

4.9 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR 25

5. RESULTADOS **26**
5.1 Isolamento e identificação das bactérias 27
5.2 Detecção dos genes de degradação da atrazina (atzA, atzB, atzC, atzD, atzE, atzF) 29
5.3 Detecção de plasmídeos 34
5.4 ERIC-PCR 35
5.5 Teste de degradação da atrazina 37
5.5.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido 37
5.5.2 Teste de degradação da atrazina em meio líquido 38
5.5.3 Análise por HPLC/UV 39
5.6 Sequenciamento dos genes de degradação da atrazina 41
6. DISCUSSÃO **42**
7. CONCLUSÕES **49**
8. PERSPECTIVAS **51**
9. REFERÊNCIAS **53**
APÊNDICE **63**

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A atrazina é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo e é comumente utilizado em uma grande variedade de culturas, tais como soja, milho, sorgo e cana-de-açúcar (GAO et al., 2011). Devido à sua extensiva aplicação e persistência, a atrazina tem sido detectada em águas subterrâneas e de superfície e, por possuir propriedades toxicológicas, é considerada um contaminante ambiental, causando preocupação sobre seus efeitos ao ambiente e às populações, o que leva à busca de novas opções tecnológicas para a descontaminação de ambientes poluídos (SAGARKAR et al., 2013).

A biorremediação é um processo tecnológico que utiliza plantas e microrganismos para remover contaminantes, minimizando alguns impactos de contaminação do ambiente e possibilitando a reestruturação de habitats naturais (FAGERIA & STONE, 2006). Devido à necessidade de melhor qualidade ambiental, os tratamentos utilizando microrganismos têm alcançado abrangência mundial, visto que a manutenção da qualidade do solo é fundamental para manter sua produtividade, assim como para controlar a qualidade do ambiente e preservar o ecossistema (FAGERIA & STONE, 2006).

A preocupação com a contaminação de solos é recente. Há 50 anos, o livro "Primavera Silenciosa" (CARSON, 1962) fez críticas ao uso intensivo e indiscriminado de agrotóxicos e deu origem ao movimento ambientalista. A publicação levou ainda à regulamentação mais rígida dos agrotóxicos em diversos países e mudou o discurso público sobre progresso e meio ambiente (DUNN, 2012).

1.1 Pesticidas e Contaminação Ambiental

1.1.1 O Solo

O solo é considerado um forte recurso econômico, seja na agricultura, na pecuária e na indústria, e sua conservação é fundamental para a manutenção da vida. Este possui biodiversidade abundante, com milhões de diferentes espécies vivendo em apenas uma pequena quantidade de solo (FAGERIA & STONE, 2006). Estas espécies variam de acordo com as estações do ano e estão diretamente ligadas ao regime hídrico, ao clima da região, à estrutura do solo e ao teor de resíduos vegetais (ZILLI et al., 2003; PULLEMAN et al., 2012).

A microbiota do solo é responsável pela transformação da matéria orgânica através de reações bioquímicas, além de atuar na fixação de nitrogênio, na ciclagem de nutrientes, na desintoxicação de poluentes e na purificação do ar e da água, os quais são processos importantes para a manutenção da qualidade do solo. Em condições ideais, esta microbiota permite que os nutrientes sejam gradualmente liberados, o que contribui para o crescimento e

nutrição das plantas (SILVEIRA & FREITAS 2007; GÓMEZ-SAGASTI et al., 2012; HAVLICEK, 2012). Devido a estes processos, a Convenção sobre Diversidade Biológica (CDB) reconheceu a importância da biodiversidade do solo para o funcionamento do ecossistema e sua grande representatividade na biodiversidade mundial (CLUZEAU et al., 2012).

Embora o solo seja capaz de absorver uma ampla quantidade de contaminantes sem sofrer grandes transformações, com o passar do tempo estas são quase sempre irreversíveis e os danos causados ao ambiente são de difícil recuperação (STEFFEN et al., 2011). Fenômenos naturais ou causados pelo homem afetam aproximadamente 35% do planeta (ZILLI et al., 2003), e os danos provocados por poluentes levam à destruição do solo e podem ser desastrosos ao atingirem as populações de microrganismos, ocasionando danos ao ecossistema local e levando à extinção de espécies.

1.1.2 Pesticidas

Os pesticidas, também denominados agrotóxicos, praguicidas, defensivos agrícolas, biocidas e agroquímicos, são produtos de natureza química que têm a finalidade de exterminar pragas ou doenças que ataquem as culturas agrícolas. Os pesticidas podem ser divididos em diferentes grupos, entre eles os fungicidas, os herbicidas, os inseticidas e os nematicidas, e estes e outros produtos para aplicação no solo são produzidos, atualmente, a partir de 520 ingredientes ativos pertencentes a 100 classes diferentes de substâncias químicas que são utilizados em quase 3000 produtos comerciais.

O uso anual de pesticidas está estimado em 3 bilhões de quilogramas por todo o mundo (GHIMIRE & WOODWARD, 2013). Um estudo realizado pela ANVISA em 2011 analisou 96 empresas no Brasil, representativas de quase 100% do mercado nacional de agrotóxicos. De acordo com os resultados da pesquisa, os herbicidas representam 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas representam 14%, os inseticidas 12 % e os demais tipos de agrotóxicos totalizam 29% do mercado nacional. Em 2008, o Brasil ultrapassou os EUA e assumiu o primeiro lugar em consumo de agrotóxicos no mundo e, em 2010, o mercado nacional representou 19% do mercado mundial de agrotóxicos. Até 2016, estima-se que o mercado global de herbicidas irá crescer em uma taxa anual de 4,6%, atingindo 1,35 milhões de toneladas (IMFELD &VUILLEUMIER, 2011; ANDREU & PICÓ, 2012). O glifosato é o herbicida mais utilizado, representando 29% das vendas nacionais, enquanto a atrazina responde por 5% dos herbicidas utilizados no Brasil (ANVISA, 2011).

A extensiva utilização de agrotóxicos representa um grave problema de saúde pública devido aos efeitos tóxicos ocasionados pela exposição aguda ou crônica a essas substâncias. Os agrotóxicos podem ser introduzidos no organismo por via cutânea, respiratória e digestiva, sendo essa última a mais comum. As intoxicações agudas, resultantes da absorção de elevada quantidade da substância, produzem uma reação imediata do organismo e, nesses casos, os sintomas são aparentes e reversíveis (FROST et al., 2011). Os principais sintomas são cefaleia, tontura, alterações de memória e do sono, náuseas, vômitos, irritabilidade, alterações do sistema imunológico e dificuldade de concentração. Na intoxicação crônica, resultante da exposição gradual ao agrotóxico, não há sintomatologia imediata e pode ser irreversível. Após exposições prolongadas, podem ocorrer hemorragias, morte fetal e teratogênese, lesões cerebrais irreversíveis, esterilidade masculina, tumores malignos, dermatites e lesões hepáticas (SILVA et al., 2005).

Ao ser aplicado no sistema solo-planta, o agrotóxico torna-se um potencial contaminante, e uma variedade de processos determina o destino ambiental destas substâncias que, por serem bioativas e tóxicas, influenciam na produtividade do solo e na qualidade do ecossistema local (FAGERIA & STONE, 2006). Os processos de distribuição dos agrotóxicos no solo são a adsorção, a lixiviação, a volatilização e a degradação (STEFFEN ET AL., 2011). A adsorção é a ligação do agrotóxico às partículas do solo e depende do tipo e teor de matéria orgânica. A lixiviação é o deslocamento da substância no solo feito pelas chuvas e pode ocorrer no sentido horizontal ou vertical, podendo levar à contaminação de águas superficiais, rios e lagos. A volatização é a dissipação do agrotóxico para o ar após a degradação, que pode ser física – fotodecomposição pelo sol –, química – múltiplas reações no ambiente –, e biológica – promovida por animais, plantas e microrganismos (LANGENBACH et al., 1995). A Figura 1 apresenta o esquema da interação de um tipo de agrotóxico aplicado no solo.

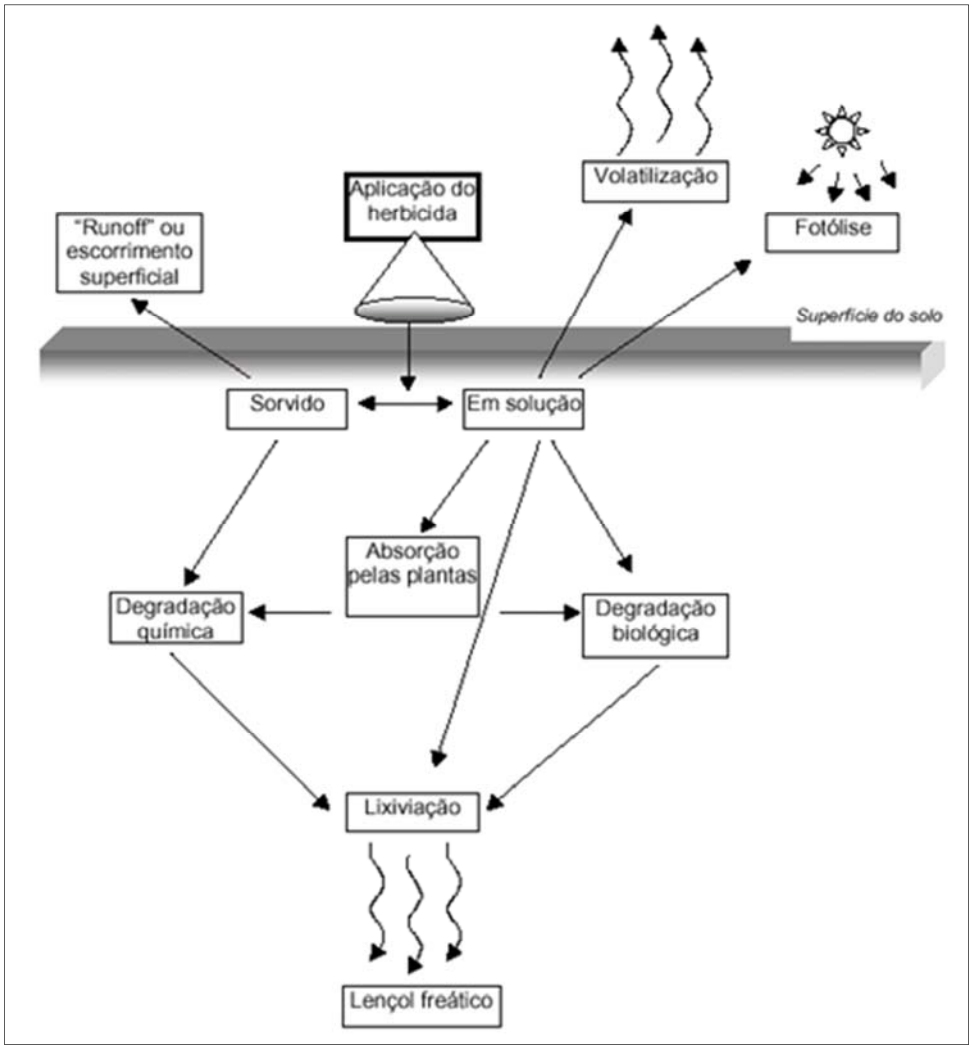

Figura 1. Distribuição dos agrotóxicos no solo.
Fonte: MACÊDO, 2002.

O monitoramento de agrotóxicos na água potável é obrigatório no Brasil desde 1990, a partir da publicação da Portaria GM/MS n° 36 de 19 de janeiro de 1990. O padrão de potabilidade da água é definido como um conjunto de valores permitidos como parâmetro da qualidade da água potável (Portaria MS n° 2914/2011), e o sistema de abastecimento de água é responsável pela verificação do padrão de potabilidade da água distribuída à população. Os dados são repassados ao Setor de Vigilância do Ministério da Saúde que deve verificar a qualidade da água, considerando aspectos socioambientais para avaliar se a água consumida apresenta risco à saúde humana (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). A Figura 2 apresenta os municípios participantes do monitoramento realizado pela Vigilância em Saúde, no ano de 2011, que apresentaram valores de agrotóxico acima do permitido.

Figura 2. Distribuição dos municípios brasileiros que apresentaram agrotóxicos com valores acima do Valor Máximo Permitido (VPM) conforme descrito no padrão de potabilidade. Brasil, 2011.
Fonte: Boletim Epidemiológico: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2013.

1.1.3 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é integrante da família das s-triazinas e é um composto polar, fracamente básico e com peso molecular igual a 215,69 $g.mol^{-1}$, além de ser solúvel em diferentes solventes orgânicos, tais como acetato de etila, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e éter. 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 (JAVARONI et al., 1999; DUTTA & SINGH, 2013). De acordo com Marin-Morales et al. (2013), a atrazina atua através da inibição da fotossíntese, onde age como inibidora do transporte de elétrons. A Figura 3 apresenta a estrutura química da molécula de atrazina.

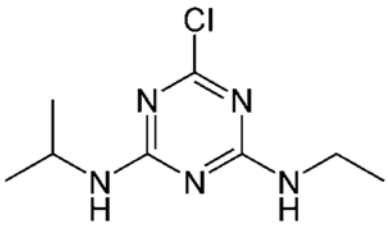

Figura 3. Estrutura química da atrazina

Apesar de ser considerada moderadamente tóxica, a atrazina pode causar danos no DNA de organismos aquáticos e imunotoxicidade. Estudos demonstraram que a atrazina altera a 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, a atrazina é uma substância tóxica para a gestação, pois tem capacidade de atravessar a placenta e afetar o crescimento fetal (RAJKOVIC et al., 2012; SANTOS & MARTINEZ, 2012; SHELLEY et al., 2012).

O herbicida atrazina é degradado lentamente no meio ambiente, com uma meia-vida entre 13 e 260 dias, de acordo com variações ambientais e condições do solo (EPA, 2006). A principal via de transformação 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 atrazina é frequentemente detectada como poluente orgânico em águas subterrâneas e superficiais em vários países (UETA et al., 1999; RHINE et al., 2003). Ela apresenta elevada persistência 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 microrganismos (KRUTZ et al., 2008). Uma pesquisa realizada em Luxemburgo para avaliar a contaminação ambiental encontrou níveis significativos deste herbicida e de seus produtos de degradação na água potável, em água de nascentes e em água de torneira. A atrazina foi o herbicida predominante, sendo encontrado até 44 $ng.L^{-1}$ em água de torneira, mesmo após a proibição do uso deste herbicida na Europa desde 2004 (BOHN et al., 2011).

De acordo com a Agência de Informação Embrapa, o padrão de potabilidade da água para consumo humano preconiza uma concentração de até 2 $\mu g.L^{-1}$ 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 $\mu g.L^{-1}$ e considera uma exposição a essa concentração, em uma expectativa de vida de 70 anos, sem danos à saúde.

1.2 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 ecologicamente adequada para o tratamento de ambientes contaminados, como águas

subterrâneas e superficiais e solos (LEE et al., 2011). Os processos de biorremediação utilizam microrganismos do próprio ambiente (autóctone) com capacidade de biodegradação, ou microrganismos introduzidos (nativos ou geneticamente modificados) que geram compostos químicos mais simples e menos resistentes, como CO_2, H_2O e NH_3 (GAYLARDE et al., 2005). Apesar de bactérias, fungos e plantas participarem do processo de biorremediação, o sistema metabólico microbiano é o mais apto para biodegradar moléculas xenobióticas.

As técnicas de biorremediação podem ser aplicadas *ex-situ*, que envolvem a escavação e remoção da região contaminada de seu local original, ou *in-situ*, onde o tratamento é diretamente no local contaminado, permitindo o tratamento de regiões extensas (LÜ et al., 2011). A escolha da técnica a ser utilizada deve avaliar as características do poluente, a composição de nutrientes do solo, a população microbiana local e a extensão da área afetada. A técnica de bioestimulação tem como objetivo aumentar o número ou estimular a atividade dos microrganismos degradadores autóctones de uma determinada região contaminada, através da adição de nutrientes e aceptores de elétrons. Pode-se utilizar também a técnica de bioadição, na qual ocorre a adição de microrganismos cultivados em laboratório com o objetivo de transferir a informação genética do microrganismo degradador para a região afetada. As técnicas podem ser usadas isoladamente ou de forma combinada (ALISI et al., 2009).

No entanto, a biorremediação pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e atividade dos microrganismos degradadores. A umidade do solo é considerada o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana necessita de adequada disponibilidade de água. A temperatura também é outro fator importante, pois afeta a atividade metabólica e o consumo de substrato pelos microrganismos. As maiores taxas de biodegradação ocorrem entre 25 a 35°C, sendo que temperaturas acima ou abaixo destas ocasionam prejuízos para o processo. Outro fator é o pH do solo, pois este afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos protóns H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática e, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes, sendo o carbono, normalmente, o nutriente que mais limita o crescimento microbiano (JACQUES et al., 2007).

1.3 *Pseudomonas* spp.

O gênero *Pseudomonas* está incluído no filo Proteobacteria, na classe Gammaproteobacteria e na família Pseudomonadaceae. Possui mais de 60 espécies em uma

variedade de ambientes, incluindo o solo, a água e as superfícies de plantas e animais e, por esse motivo, é conhecido por sua ubiquidade no ambiente natural (GROSS et al., 2009). Bactérias deste gênero possuem a habilidade de assimilar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia, sendo que as fontes de carbono mais utilizadas são ácidos orgânicos e aminoácidos, em detrimento da glicose (ROJO, 2010). Além disso, apresentam adaptabilidade a uma grande variedade de condições físicas, incluindo capacidade para crescerem em temperaturas baixas e na presença de elevadas concentrações de corantes e sais, propriedades que contribuem para sua presença em diferentes ambientes (PIRNAY et al., 2005). A presença de genes que codificam metabólitos secundários é um fator primordial para a manutenção das características das *Pseudomonas*, pois são os agentes responsáveis por promover a aquisição de nutrientes, o aumento da virulência e a defesa contra outros microrganismos nos habitats naturais (BOTELHO et al., 2006).

A espécie mais estudada e de maior importância clínica é a *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa, oportunista e com capacidade de causar infecções graves, agudas e crônicas (EDRINGTON et al., 2011). Os numerosos fatores de virulência dessa bactéria refletem em sua patogenicidade e contribuem para os vários estágios infecciosos (WOLF et al., 2008). Devido à sua presença em uma grande diversidade de ambientes, pode carrear plasmídios e genes que lhe conferem multirresistência a antimicrobianos e capacidade catabólica frente a diversos compostos (MARTINEZ et al., 2001; LI et al., 2004; MAIA, 2009). Estudos recentes mostraram que alguns genes de virulência são mais frequentes em isolados clínicos e outros em isolados ambientais de *P. aeruginosa*, indicando o potencial patogênico de todas essas linhagens (MARTINS et al. 2013).

Algumas linhagens de *P. aeruginosa* foram relatadas como rizobactérias promotoras do crescimento de plantas e com potencial para degradação de poluentes ambientais, e as espécies *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas putida* são consideradas benéficas para as plantas e capazes de prosperar na rizosfera. Linhagens ambientais de *P. aeruginosa* também têm sido consideradas como potenciais agentes de controle biológico ou indutoras de resistência sistêmica adquirida, em programas de biorremediação e outras aplicações (FERREIRA et al., 2009).

1.4 *Pseudomonas* spp. e Biorremediação

O metabolismo dos compostos *s*-triazínicos por culturas bacterianas puras tem sido estudado, e os genes de codificação das enzimas envolvidas na degradação da atrazina já foram bem caracterizados (VIBBER et al., 2007). A *Pseudomonas* sp. ADP (de *Atrazine*

Degrading Pseudomonas), um microrganismo de referência para o processo degradativo da atrazina (DE SOUZA et al., 1998), possui um plasmídio autotransmissível denominado pADP-1 (Figura 4), onde localizam-se os genes que codificam as enzimas responsáveis pela mineralização da atrazina (WACKETT et al., 2001).

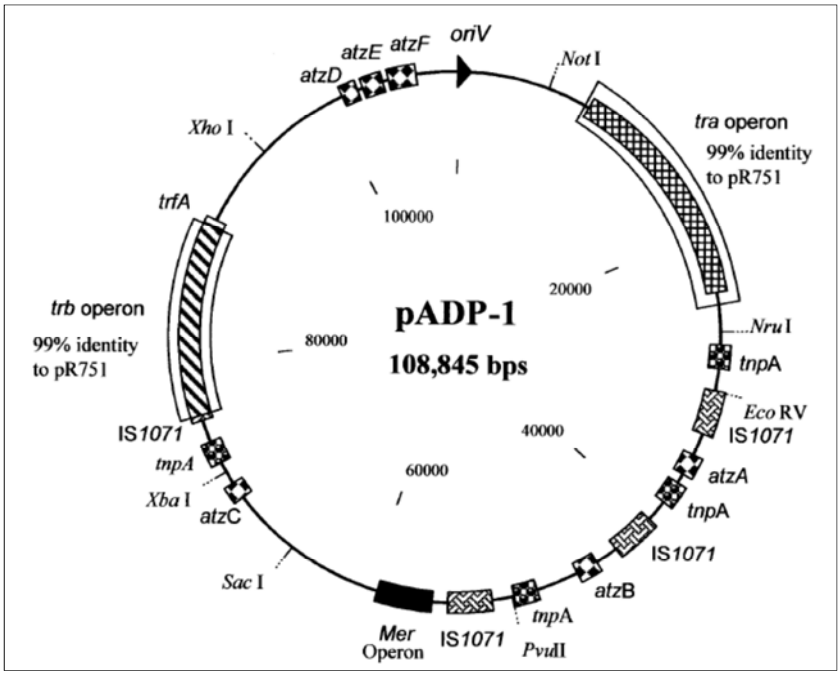

Figura 4. Plasmídeo pADP-1
Fonte: MARTINEZ et al., 2001.

A mineralização da atrazina pela *Pseudomonas* sp. ADP envolve seis etapas enzimáticas codificadas pelos genes *atz*A, *atz*B e *atz*C e pelo operon *atz*DEF. Os produtos dos genes *atz*A, *atz*B e *atz*C são responsáveis pela remoção do cloro e dos resíduos de isopropilamina e etilamina para produzir ácido cianúrico (SADOWSKY et al., 1997; GARCÍA-GONZÁLEZ, et al., 2005), sendo que este é convertido a NH_3 e CO_2 pela ação das enzimas codificadas pelos genes *atz*D, *atz*E e *atz*F. Na primeira etapa, a enzima atrazina clorohidrolase remove o cloro da atrazina e converte-a em hidroxiatrazina. Em seguida, a enzima hidroxiatrazina etilaminohidrolase promove a remoção da etilamina da cadeia lateral e catalisa a formação da molécula de *N*-isopropilamelida, que é convertida a ácido cianúrico pela ação da enzima N-isopropilamelida isopropilaminohidrolase. A enzima ácido cianúrico hidroxilase metaboliza o ácido cianúrico a biureto, que é convertido em alofanato pela ação da biureto hidroxilase. O alofanato é hidrolisado, com formação de NH_3 e CO_2 pela alofanato hidroxilase (SHAPIR et al., 2005), completando assim, o ciclo de biodegradação da atrazina. A Figura 5 ilustra a via de degradação da atrazina.

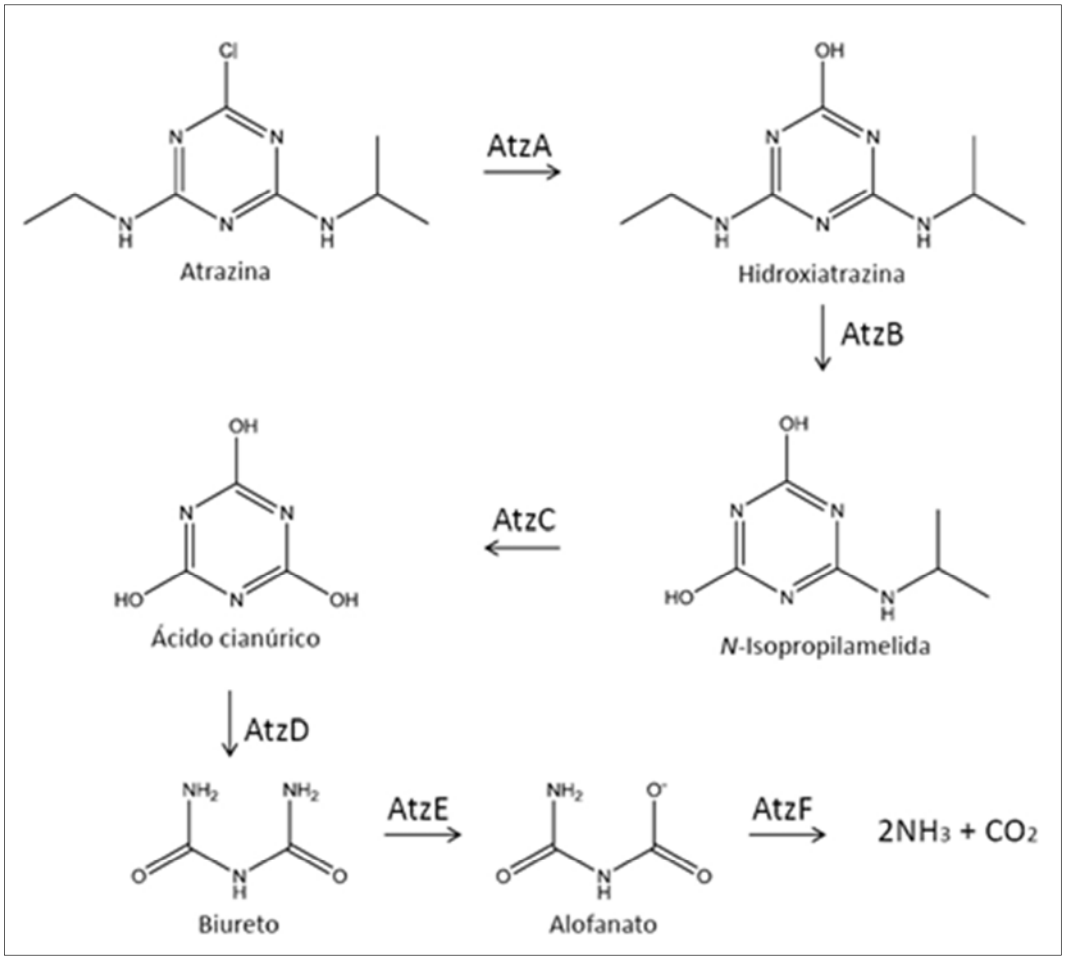

Figura 5. Via catabólica de degradação da atrazina.

Os genes de degradação da atrazina *atz*A, *atz*B *e atz*C 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 organização dos genes parece ser variável, localizando-se principalmente em grandes plasmídios, contudo, em algumas espécies foram associados a sequências de inserção e transposons, indicando que podem ser adquiridos por transferência horizontal (ROUSSEAUX et al. 2002) e podem se localizar no DNA cromossômico bacteriano. Os genes *atz*A, *atz*B *e atz*C são expressos constitutivamente e não sofrem regulação por indução da atrazina ou repressão por fontes de nitrogênio (SENE et al., 2010), entretanto, os genes *atz*D, *atz*E e *atz*F estão organizados em um operon sob a regulação do gene *atz*R. O gene *atz*R é um regulador do tipo *Lys*R e é responsável pela ativação da utilização do ácido cianúrico, um metabólito intermediário da mineralização da molécula de atrazina. Os três genes são cotranscritos em resposta à privação de nitrogênio e presença do ácido cianúrico, após a ligação de *atz*R à

região promotora (GARCÍA-GONZÁLES et al, 2003; DEVERS et al., 2005; PORRÚA et al., 2010).

A biodegradação da atrazina não é realizada apenas por bactérias do gênero *Pseudomonas*. Foi reportado o isolamento de diversas bactérias gram-negativas com capacidade para degradar a atrazina e contendo os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F ou os genes *atz*A, *atz*B e *atz*C combinados com o gene *trz*D, análogo ao *atz*D. As espécies isoladas pertencem a diversos gêneros bacterianos, como *Agrobacterium, Alcaligenes, Ancylobacter, Chelatobacter, Pseudaminobacter e Ralstonia* (UDIKOVIÉ-KOLIÉ et al., 2012). Entretanto, alguns estudos reportam que a maioria dos isolados não consegue mineralizar a atrazina (RHINE et al., 2003).

Além da mineralização por culturas puras individuais, foi relatada a mineralização por consórcios simples ou complexos contendo até oito espécies bacterianas diferentes, e os genes *atz* foram detectados nos diversos microrganismos que realizam as etapas da degradação da molécula de atrazina. Espécies de *Rhizobium*, *Pseudomonas*, *Agrobacterium, Burkholderia, Sphingomonas, Nocardia, Flavobacterium, Achromobacter* foram descritos em consórcios bacterianos, contendo genes *atz* (BOUQUARD et al., 1997; SMITH et al., 2005; MARTIN-LAURENT et al., 2006; UDIKOVIÉ-KOLIÉ et al., 2010).

Devido ao intenso uso do herbicida atrazina no Brasil e no mundo e pela necessidade de melhor qualidade ambiental, vários estudos abordam este assunto, e os tratamentos utilizando microrganismos têm alcançado abrangência mundial. A manutenção da qualidade do solo é fundamental para manter sua produtividade, assim como para controlar a qualidade do ambiente e preservar o ecossistema (FAGERIA & STONE, 2006).

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2. RELEVÂNCIA DO ESTUDO

A utilização crescente e frequente de agrotóxicos após a modernização da agricultura levou à preocupação sobre os impactos ambientais, sociais e econômicos decorrentes dessa prática. A contaminação de solos por agentes químicos provoca desgaste e, consequentemente, diminuição da produtividade do solo com o passar dos anos, além de causar danos graves à saúde da população em geral. Os agrotóxicos em contato com o solo tornam-se potenciais contaminantes de águas subterrâneas, rios, lagos e oceanos e, por isso, a microbiologia associada à degradação de poluentes é um campo de pesquisa em desenvolvimento. A biorremediação destaca-se como prática de remoção de substâncias contaminantes de solos e ambientes aquáticos. Por esta razão, atualmente há um grande interesse em se desenvolver biotecnologias para a descontaminação de ambientes poluídos por xenobióticos, bem como para elucidar os mecanismos relacionados ao processo de degradação desses compostos e também para avaliar a microbiota responsável por tais mecanismos.

Os herbicidas são os agrotóxicos mais utilizados no Brasil e no mundo e a atrazina é ainda muito utilizada em diferentes tipos de cultura no Brasil, principalmente nas regiões de plantio de cana-de-açúcar, milho, soja e sorgo. Embora existam muitos trabalhos nacionais e internacionais relatando novos isolados bacterianos que degradam ou mineralizam a atrazina, poucos estudos fazem referência à análise molecular, com a determinação da localização de todos os genes envolvidos no processo. Além disso, alguns trabalhos mostram que nem todos os isolados conseguem mineralizar a atrazina, mas fazem apenas uma degradação parcial do herbicida, mesmo naqueles que possuem todos os genes *atz*. Outro fator importante no estudo é o isolamento de bactérias de uma área de preservação da região amazônica, ou seja, uma área em que não existe pressão seletiva, pois todos os trabalhos publicados relatam bactérias isoladas de amostras de solo com forte histórico de uso da atrazina.

Dessa forma, o isolamento, a caracterização e a análise do potencial de biodegradação desse herbicida, por isolados bacterianos obtidos de locais que fazem uso da atrazina 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 mineralização desse herbicida, a qual seria responsável e eficaz em diminuir o tempo de meia-vida da atrazina nos locais estudados.

Com base nessas considerações, verifica-se a importância de estudar os microrganismos degradadores da atrazina, em especial *Pseudomonas* spp.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar isolados de *Pseudomonas* spp. a partir de amostras de solo de áreas de plantio de milho, cana-de-açúcar e outras culturas, com e sem uso de herbicidas, para avaliar o potencial genotípico e fenotípico de tais isolados para degradar a atrazina, um herbicida da classe das *s*-triazinas.

3.2 Objetivos Específicos

- Isolar bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. de solos provenientes de áreas de plantio de cana-de-açúcar, milho, soja, sorgo e outras culturas que fazem uso de atrazina e também de culturas que não utilizam herbicidas, incluindo áreas de mata virgem;
- Caracterizar bioquímica e molecularmente os isolados bacterianos selecionados;
- Avaliar a similaridade genética dos isolados pela técnica de ERIC-PCR;
- Pesquisar os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F, responsáveis pela degradação da atrazina;
- Pesquisar a presença de plasmídios nos isolados selecionados;
- Avaliar, através de testes fenotípicos em meios de cultura sólido e líquido, a degradação da atrazina pelos isolados bacterianos.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de solo e obtenção dos isolados de *Pseudomonas* spp.

Para a obtenção dos isolados bacterianos estudados, foram coletadas 115 amostras de solo, entre estas, 20 amostras de solo de áreas de plantio de cana-de-açúcar, milho e sorgo do Centro de Cana do Instituto Agronômico de Ribeirão Preto, 27 amostras de solo de plantios de cana-de-açúcar e milho da Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, 67 amostras de solo provenientes de diferentes tipos de cultura, de diferentes cidades e estados brasileiros e fornecidas pela empresa Ribersolo e por outros colaboradores e uma amostra de solo de uma área de mata virgem do estado do Amazonas.

O isolamento bacteriano a partir das amostras de solo foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mukherjee et al. (2011). De cada amostra coletada, 1 g de solo foi adicionado a 5 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani) em tubo e este incubado à temperatura de 37ºC por até 24 horas, sob agitação a 130 rpm. Após esse período, foram realizadas diluições seriadas (até 10^{-4}) com solução fisiológica (NaCl 0,85%) esterilizada, e um volume de 200 µL do material diluído foi semeado em placas de ágar Cetrimida (Oxoid, Reino Unido), de onde foram obtidos 123 isolados morfologicamente caracterizados como *Pseudomonas* spp. A metodologia do isolamento bacteriano está ilustrada na Figura 6.

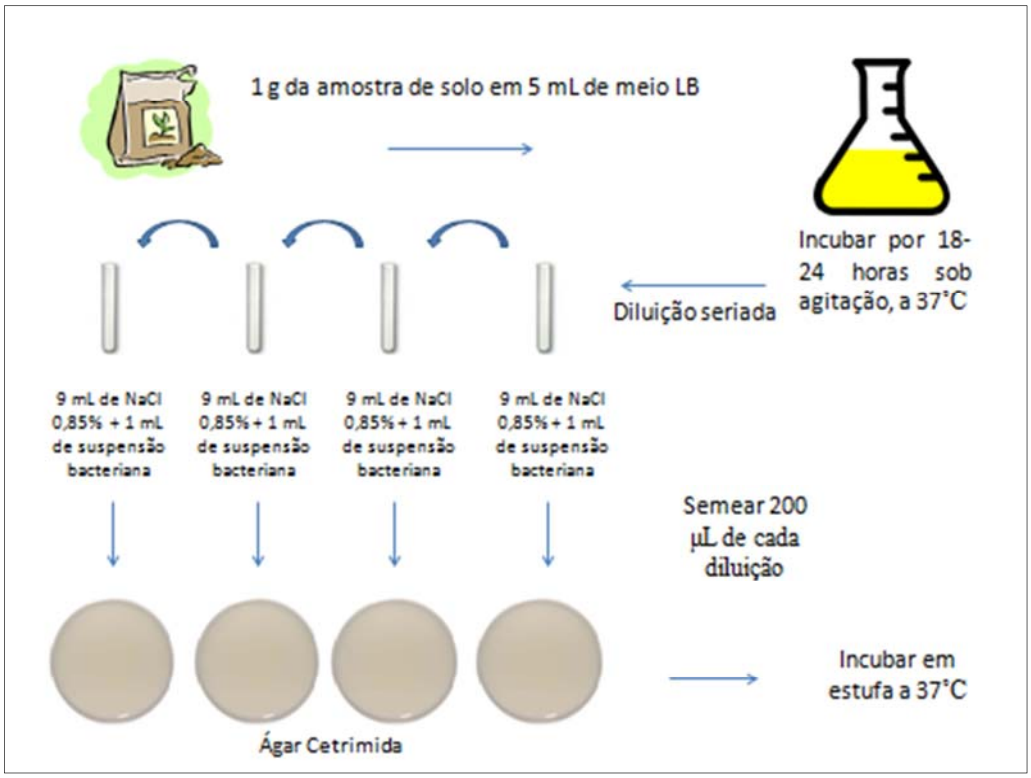

Figura 6. Representação esquemática do ensaio de isolamento bacteriano de amostras de solo.

4.2 Caracterização bioquímica e molecular dos isolados

Os isolados bacterianos obtidos em meio Cetrimida foram caracterizados bioquimicamente pelos testes de oxidase, teste de crescimento a 42°C, utilização do citrato como fonte de carbono, teste de motilidade e indol.

A confirmação da espécie *Pseudomonas aeruginosa* foi realizada molecularmente pela detecção do gene *opr*L (DE VOS et al., 1997), o qual codifica uma lipoproteína de membrana externa e é específico para linhagens de *Pseudomonas aeruginosa*. Os iniciadores utilizados nos ensaios de PCR foram: PAL1, 5'-ATGGAAATGCTGAAATTCGGC-3'e PAL2, 5'-CTTCTTCAGCTCGACGCGACG-3'. As reações foram realizadas com 33 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 µL de $MgCl_2$ (25 $mmol.L^{-1}$), 1 µL de solução contendo 10 $mmol.L^{-1}$ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP) (Fermentas, Lituânia), 2 µl de PAL1 (25 pmol), 2 µL de PAL2 (25 pmol), 1 µL de DNA genômico (37,5 ng) extraído conforme metodologia descrita no item 4.3, e 2,5 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerase) (Fermentas, Lituânia). Como controle positivo foi utilizada a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. A técnica de PCR foi realizada no termociclador My Cycler™ (Bio-Rad, EUA), conforme as condições descritas na tabela 1.

Tabela 1 - Condições da reação de PCR para o gene *opr*L.

Gene	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
	94°C	58°C	72°C	72°C
oprL	20 seg	20 seg	45 seg	5 min
		35 ciclos		

As reações foram armazenadas a 4ºC e os genes amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1%), para a detecção do gene *opr*L. Aproximadamente 10 µL de cada reação de PCR foram misturados a 5 µL do tampão de ressuspensão e foram aplicados nos poços do gel de agarose. O tamanho dos fragmentos de DNA amplificados foram comparados com o marcador de peso molecular de 100 pb DNA Ladder (Fermentas, Lituânia).

Os isolados não identificados molecularmente, através da detecção do gene *opr*L, foram identificados bioquimicamente pelo sistema VITEK® II (BioMérieux, França), no Laboratório de Microbiologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto. O VITEK® II é um

sistema automatizado de identificação que utiliza cartões de identificação contendo poços com substratos bioquímicos desidratados.

4.3 Extração do DNA genômico

O DNA genômico dos isolados foi extraído para ser utilizado como molde nas reações de PCR. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração e a pureza do DNA genômico foram determinadas em espectrofotômetro de luz ultravioleta UV 2100 (UNICO, EUA) utilizando os comprimentos de onda de 260 e 280 nm. As extrações de DNA com razão entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

4.4 Eletroforese em gel de agarose

Os produtos amplificados nas reações de PCR foram visualizados em eletroforese horizontal em gel de agarose com tampão 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 $\mu g.mL^{-1}$), no transluminador Universal Hood II (Bio-Rad,EUA).

4.5 Tipagem molecular das amostras isoladas de solo por ERIC-PCR

Os isolados obtidos das amostras de solo e previamente caracterizados foram analisados pela técnica de tipagem molecular ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR), a qual se baseia na amplificação de regiões intergênicas repetitivas altamente conservadas, presentes no genoma bacteriano. Essa técnica foi aplicada com o objetivo de avaliar a similaridade genética entre as bactérias do estudo.

A técnica ERIC-PCR foi realizada conforme metodologia descrita por Versalovic et al. (1991), com algumas modificações, utilizando os seguintes iniciadores: ERIC-1R, 5′-CACTTAGGGGTCCTCGAATGTA-3′ e ERIC-2, 5′-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3. O volume final das reações foi de 50 µL. Cada reação foi realizada com 18 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 8 µL de $MgCl_2$ (25 $mmol.L^{-1}$) , 2 µL do mix dNTP contendo 10 $mmol.L^{-1}$ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 3 µL de cada primer (10 $pmol.L^{-1}$), 4 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerase) e 7 µL de DNA genômico (10 $ng.\mu L^{-1}$). As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições da reação de ERIC - PCR.

Reação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
ERIC-PCR	94°C 30 seg	52°C 1 min	65°C 8 min	65°C 10 min
		30 ciclos		

Os produtos amplificados foram visualizados em eletroforese horizontal em gel de agarose (1,5%). O padrão de peso molecular GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Lituânia) foi inserido três vezes em cada gel para normalizar as imagens e para a validação técnica dos géis. A análise do perfil de bandas foi realizada utilizando-se o programa BioNumerics versão 5.1 (AppliedMaths, Bélgica). A similaridade genética dos isolados bacterianos foi determinada pelo coeficiente DICE e um dendrograma foi construído pelo método UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*).

4.6 Detecção de genes de degradação da atrazina por PCR

As reações de PCR para detecção dos genes a*tz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por Mulbry et al. (2002). Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 50 µL, sendo 23 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão PCR *buffer minus* Mg-10X, 3,5 µL de $MgCl_2$ (25mM), 1 µL de solução contendo 10 $mmol.L^{-1}$ de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 4 µl de cada primer (25 pmol), 7 µL de DNA genômico e 2,5 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerase). As reações foram realizadas de acordo com as condições descritas na tabela 3.

Tabela 3 - Condições das reações de detecção dos genes *atz.*

Genes	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
***atz* (A, B,C,D,E,F)**	94°C 1 min	58°C 1 min	72°C 2 min	72°C 10 min
		35 ciclos		

Os iniciadores utilizados nas reações para detecção dos genes *atz* foram descritos por Devers et al.; 2004 e estão detalhados na tabela abaixo.

Tabela 4 - Iniciadores utilizados nas reações de detecção de genes *atz*.

Gene	Iniciador (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
*atz*A	Af ACGGGCGTCAATTCTATGAC Ar CACCCACCTCACCATAGACC	200
*atz*B	Bf AGGGTGTTAGGTGGTGAAC Br CACCACTGTGCTGTGGTAGA	200
*atz*C	Cf GCTCACATGCAGGTACTCCA Cr TCCCCCAACTAAATCACAGC	200
*atz*D	Df TCCCACCTGACATCACAAAC Dr GGGTCTCGAGGTTTGATTG	200
*atz*E	Ef GAGCCTCTGTCCGTAGATCG Er GATGGCGTGTACCGTTTACC	200
*atz*F	Ff ACCAGCCCTTGAATCATCAG Fr TATTGTCCCGATACCCAACG	200

As reações foram realizadas no termociclador My Cycler^{TM} (Bio-Rad, EUA). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose (1,0%).

4.7 Extração de DNA plasmidial

A extração de DNA plasmidial foi realizada de acordo com a técnica de lise alcalina de Birboin & Doly (1979). As linhagens bacterianas foram inoculadas em meio líquido LB e incubadas a 37ºC 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 sobrenadante foi desprezado, e o sedimento ressuspendido em 100 µL de solução I (glicose 50 mmol.L^{-1}; Tris HCl pH 8,0; EDTA 10 mmol.L^{-1} pH 8,0) foi mantido em gelo por 5 minutos. A seguir, foram adicionados 200 µL da solução II (NaOH 0,2 mol.L^{-1}; SDS 1%) e o conteúdo misturado por inversão suave e, posteriormente, os tubos foram mantidos em gelo por aproximadamente 2 minutos. Após esse tempo, 150 µL da solução III (solução de acetato de potássio 5 mol.L^{-1} e ácido acético glacial) foram acrescentados ao conteúdo dos mesmos, os tubos foram invertidos suavemente e 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 (-20ºC), sendo o tubo invertido suavemente para mistura do conteúdo e, então, mantido a -20ºC por 30 minutos. O DNA plasmidial foi precipitado por centrifugação a 12000 *g* por 4 minutos, ressuspendido em 30 µL de água deionizada esterilizada e mantido a –20ºC.

As linhagens padrão *Escherichia coli* 39R861 e *Escherichia coli* V517, portadoras de plasmídios com pesos moleculares conhecidos, foram usadas como controle dos experimentos.

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

4.8 Teste de degradação da atrazina

4.8.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido

O ensaio fenotípico para detecção da capacidade de degradação da atrazina pelas bactérias isoladas foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mandelbaum et al. (1995), com modificações. O teste foi realizado em placas de meio sólido ATZ-R, contendo 0,1% de citrato de sódio e glicose como fonte de carbono e atrazina como a única fonte de nitrogênio. Os isolados foram semeados em ágar ATZ-R contendo 500 ppm de atrazina para verificar a capacidade de crescimento e utilização do herbicida. O meio ATZ-R contém 67 $mL.L^{-1}$ de KH_2PO_4 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 $MgSO_4.7H_2O$, 2 $g.L^{-1}$ de $FeSO_4.7H_2O$ e 4 $mL.L^{-1}$ de HCl), 0,2 $mL.L^{-1}$ de $CaCl_2$ 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). Para o preparo de placas acrescentou-se 1,5% de ágar. A atrazina (99% de pureza) foi adquirida da empresa Sigma Aldrich (EUA).

A interpretação dos resultados foi feita pela formação de halos em torno das colônias, indicativo da degradação da atrazina após um período de até 72 horas de observação.

4.8.2 Teste de degradação da atrazina em meio líquido

Para análise de degradação da atrazina em meio líquido, foi utilizada a metodologia descrita por Hernández et al. (2008). Os isolados bacterianos 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 de meio líquido ATZ-R contendo 33 ppm de atrazina e, novamente incubados a 30˚C sob agitação, por 18-24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante desprezado. As células foram ressuspendidas em 25 mL de meio líquido ATZ-R contendo 33 ppm de atrazina e, após incubação a 30˚C sob agitação, três alíquotas de 1 mL foram retiradas a cada 24 horas por até 96 horas, centrifugadas e o sobrenadante coletado para análise da degradação da atrazina. A leitura foi realizada em comprimento de onda de 225 nm no espectrofotômetro Genesys 10S UV VIS (Thermo

Scientific, EUA). O ensaio de degradação da atrazina em meio líquido está ilustrado na Figura 7.

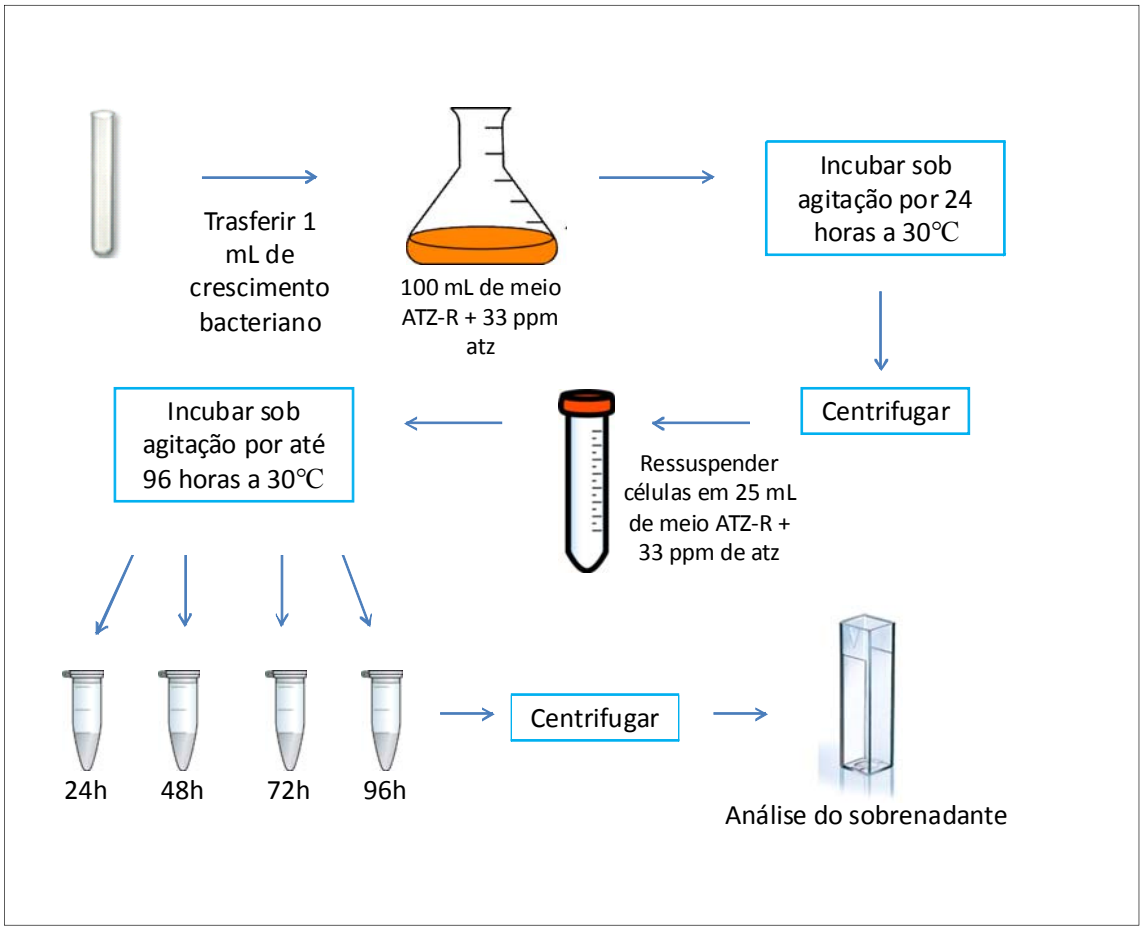

Figura 7. Representação esquemática do ensaio de degradação da atrazina em meio líquido ATZ-R.

Como controle positivo foi utilizada a bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP, a qual nos foi gentilmente cedida pelo Dr. Michael Sadowsky, professor da Universidade de Minnesota, EUA (SADOWSKY et al., 1998). Para controle negativo do experimento utilizou-se o meio líquido ATZ-R sem inóculo bacteriano, o qual foi preparado nas mesmas condições das amostras analisadas.

4.8.3 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV)

O preparo das amostras a serem analisadas por HPLC para análise da degradação da atrazina foi feito de acordo com a metodologia descrita no item 4.8.2, após um período de 24 e 96 horas de incubação. As amostras passaram pelo processo de extração da atrazina com metanol (1:1) e, em seguida, foram filtradas utilizando o filtro Minisart® Sartorius Stedium (Biotech, Alemanha) com poro de 0,2 µm. A análise foi realizada em cromatógrafo líquido de

alta eficiência com os seguintes componentes: unidade de propulsão da fase móvel Varian (modelo 9012), injetor Rheodyne (modelo 7125), unidade de detecção UV-VIS Varian (modelo 9050) interfaceada com uma estação cromatográfica para controle e aquisição de dados. As condições cromatográficas foram as seguintes: uma coluna RP18 (5 µm) como fase estacionária (FE), uma vazão de 1,3 $mL.min^{-1}$, uma solução metanol:água (70:30) como fase móvel (FM) e alça de amostragem de 50 µL. A análise foi realizada em comprimento de onda de 225 nm, e os experimentos foram realizados em triplicata. A análise estatística foi realizada através da comparação de médias de amostras independentes.

4.9 Sequenciamento dos genes amplificados por PCR

O sequenciamento de alguns genes de degradação da atrazina foi realizado para confirmar a identidade genética com outros genes *atz* depositados no GenBank. Para tal, os produtos de amplificação obtidos foram visualizados em gel de agarose após eletroforese e coloração com brometo de etídio (1 $\mu g.mL^{-1}$) e, em seguida, foram purificados utilizando o kit Illustra™ GFX™ PCR (GE Health Care, Reino Unido) para, posteriormente, serem sequenciados. Os produtos purificados foram sequenciados, pelo menos 3 vezes, com os mesmos iniciadores utilizados na reação de amplificação dos respectivos produtos gênicos. 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 Genetic Analyser (Applied Biosystems, EUA). As sequências obtidas foram analisadas no programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no Genebank.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Isolamento e identificação das bactérias

Durante a etapa inicial do presente trabalho, foram isoladas 123 bactérias em ágar Cetrimida (Oxoid, Reino Unido), as quais foram inicialmente caracterizadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp. Do total de 123 isolados obtidos de 115 amostras de solo, 36 foram recuperados de uma mescla de amostras coletadas de um mesmo local e 87 foram obtidos de amostras individuais. Os 123 isolados estão descritos na Tabela 8, em apêndice.

As Figuras 8 e 9 apresentam a distribuição das bactérias isoladas no estudo de acordo com o local e a cultura de origem. A maior parte dos isolados bacterianos (72%) foi isolada de amostras de solo coletadas de doze diferentes cidades do estado de São Paulo, 9% foram isoladas de sete cidades do estado de Minas Gerais e 5% de duas cidades do estado de Goiás e do Distrito Federal. Um total de 14% dos isolados foi obtido de cinco diferentes estados brasileiros (Paraná, Piauí, Mato Grosso do Sul, Rondônia e Amazonas) (Figura 8).

A Figura 9 apresenta o tipo de cultura de onde foram isoladas as bactérias do estudo, onde se observa que 37 delas foram obtidas de cultura de milho, 39 de cana-de-açúcar, 8 de sorgo e 39 de outras culturas.

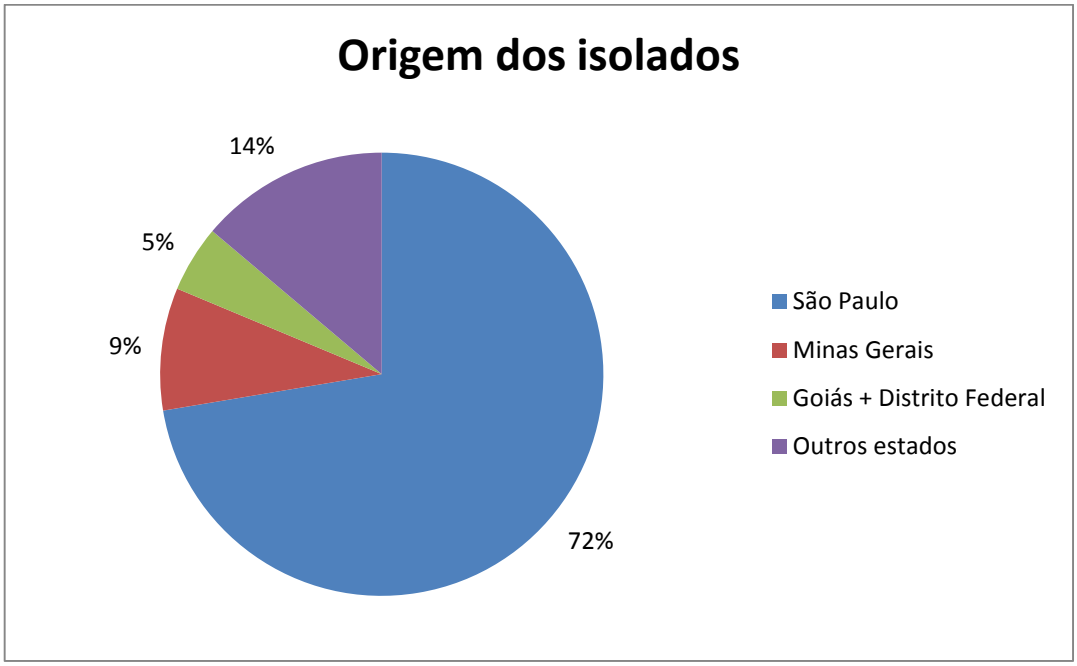

Figura 8. Porcentagem das bactérias isoladas por local de origem (estado brasileiro).

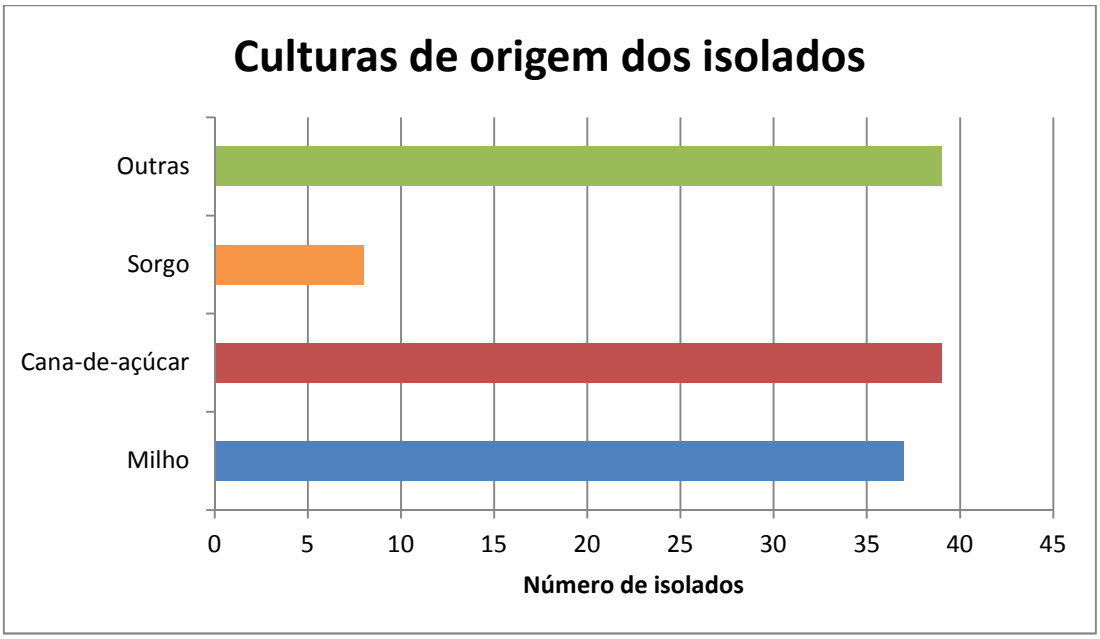

Figura 9**.** Fontes de isolamento (cultura/plantio) das bactérias isoladas no estudo.

A identificação preliminar das bactérias isoladas em ágar Cetrimida (n=123) foi feita através de testes bioquímicos para confirmação do gênero *Pseudomonas* e, posteriormente, pela detecção do gene *opr*L para identificação da espécie *Pseudomonas aeruginosa*. Os isolados não identificados como *P. aeruginosa* através da detecção do gene *opr*L foram encaminhados ao laboratório de Bacteriologia do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, para identificação pelo sistema automatizado VITEK® II.

Entre os 123 isolados analisados, um total de 113 bactérias foram caracterizadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, sendo 92 delas identificadas como *P. aeruginosa*, 20 como *P. putida* e 1 como *P. fluorescens* (Figura 10). Além das bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, foram encontradas 10 bactérias com características bioquímicas semelhantes às *Pseudomonas*, mas pertencentes a gêneros diversos. Dentre estes isolados, foram identificados 4 *Achromobacter xylosoxidans*, 3 *Burkholderia cepacea*, 2 *Cupriavidus pauculus* e 1 *Rhizobium radiobacter.* Linhagens destas espécies já foram descritas como degradadoras do herbicida atrazina (SENE et al., 2010) e, por este motivo, tais bactérias foram mantidas no estudo para pesquisa dos genes *atz*.

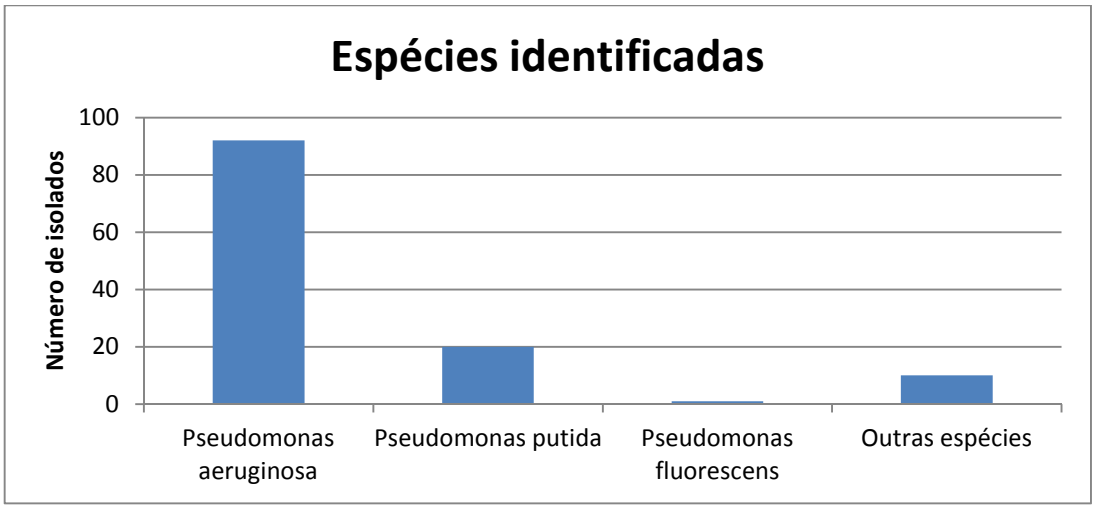

Figura 10**.** Identificação dos isolados bacterianos.

5.2 Detecção dos genes de degradação da atrazina (*atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F)

Os 123 isolados pertencentes ao estudo foram testados quanto à presença do gene *atz*A. O resultado da detecção do gene *atz*A nos 123 isolados do estudo é apresentado na Tabela 8, em apêndice. Dentre todas as bactérias testadas, em 59 observou-se o gene *atz*A.

Dentre os 59 isolados que apresentaram o gene *atz*A, foram selecionadas 20 bactérias para serem analisadas quanto à presença dos demais genes *atz (atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F), além de 5 bactérias que não apresentaram o gene *atz*A, totalizando 25 bactérias. Foram selecionadas 15 *P. aeruginosa*, 5 *P.putida* e 5 bactérias pertencentes a outros gêneros.

Os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* (20 isolados) também foram submetidos ao ensaio de ERIC-PCR para avaliação de variabilidade genética entre eles. Os isolados foram originados de diferentes amostras de solo e de culturas diversas, além de representarem regiões distintas do Brasil. A Tabela 5 apresenta, em detalhes, os isolados selecionados para a detecção do grupo de genes *atz* (*atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F) e a Figura 11 apresenta a diversidade regional representada pelos 25 isolados escolhidos no estudo.

Tabela 5 - Isolados bacterianos selecionados para detecção dos genes de degradação da atrazina.

Isolados	Região	Cultura
P. aeruginosa P59	Nuporanga (SP)	Cana-de- açúcar
C. pauculus P69	Brasília (DF)	Citros
P. aeruginosa P120	Rib. Preto (SP)	Milho
B. cepacea P80	Prata (MG)	Soja
R. radiobacter P34	Rib. Preto (SP)	Milho
A. xylosoxidans	Prata (MG)	Soja
P. putida P70	Brasília (DF)	Banana
P. putida P115	Rib. Preto (SP)	Cana-de-açúcar
P. putida P72	Manaus (AM)	Salsinha
P. putida P37	Rib. Preto (SP)	Milho
P. putida P78	Serra Salitre (MG)	Café
P. aeruginosa P102	Rib. Preto (SP)	Milho
P. aeruginosa P86	Manaus (AM)	Mata Virgem
B. cepacea P87	Manaus (AM)	Pimenta
P. aeruginosa P45	São Pedro do Boaçuí (MG)	Pastagem
P. aeruginosa P54	Cajuru (SP)	Café
P. aeruginosa P77	Porto Velho (RO)	Braquiaria
P. aeruginosa P25	Rib. Preto (SP)	Milho
P. aeruginosa P03	Rib. Preto (SP)	Milho
P. aeruginosa P15	Rib. Preto (SP)	Cana-de-açúcar
P. aeruginosa P81	Chapadão do Sul (MS)	Milho
P. aeruginosa P82	Chapadão do Sul (MS)	Girassol
P. aeruginosa P83	Teresina (PI)	Milho
P. aeruginosa P84	Maringá (PR)	Milho
P. aeruginosa P85	Alto Paraíso (GO)	Mata Virgem

Figura 11. Diversidade regional das bactérias selecionadas no estudo.

Os 25 isolados selecionados no estudo foram analisados pela técnica de PCR para detecção dos genes de degradação da atrazina (*atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F), com amplificação de fragmentos de 200 pb. A *Pseudomonas* sp. ADP foi utilizada como controle positivo das reações de PCR, já que possui o grupo de genes *atz* e é o microrganismo de referência no processo de degradação da atrazina, com capacidade para mineralização de altas concentrações do herbicida, utilizando-o como fonte de nitrogênio para seu crescimento (MANDELBAUM et al., 1995; DE SOUZA et al., 1996).

Dentre os isolados testados, seis deles apresentaram todos os genes *atz*, exibindo potencial para a mineralização completa da atrazina. Destes seis isolados, três foram caracterizados como *Pseudomonas aeruginosa* (isolados P59, P86 e P120) e os demais identificados como *Rhizobium radiobacter* (P34), *Cupriavidus pauculus* (P69) e *Burkholderia cepacea* (P87). A Figura 12 ilustra a detecção dos genes *atz* no isolado de *Pseudomonas aeruginosa* P59.

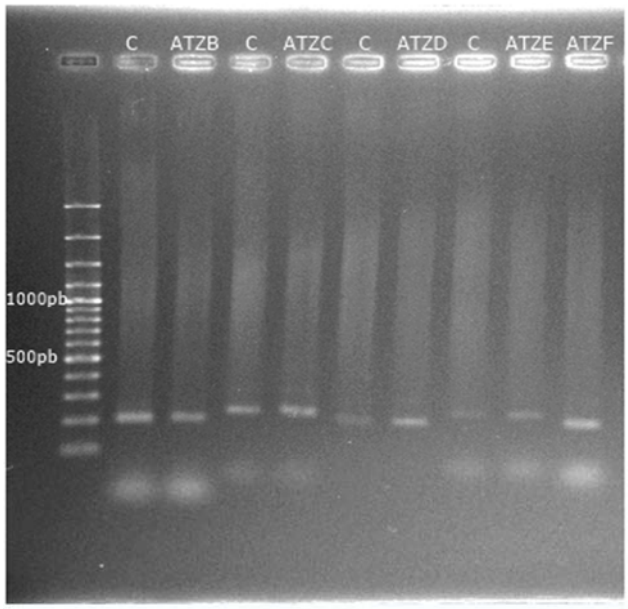

Figura 12**.** Gel de agarose 1% representativo dos produtos de amplificação dos genes *atzB, atzC, atzD, atzE e atzF* do isolado de *Pseudomonas aeruginosa* P59; M: marcador de peso molecular de 100pb; C: controle positivo *Pseudomonas* sp. ADP.

Dois outros isolados, uma *Burkholderia cepacea* e um *Achromobacter xylosoxidans*, apresentaram cinco (a*tz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*E *e atz*F) e três (a*tz*A, *atz*B e *atz*C) dos genes de degradação *atz*, respectivamente. A Figura 13 apresenta a amplificação dos genes *atz* no isolado de *Cupriavidus pauculus*.

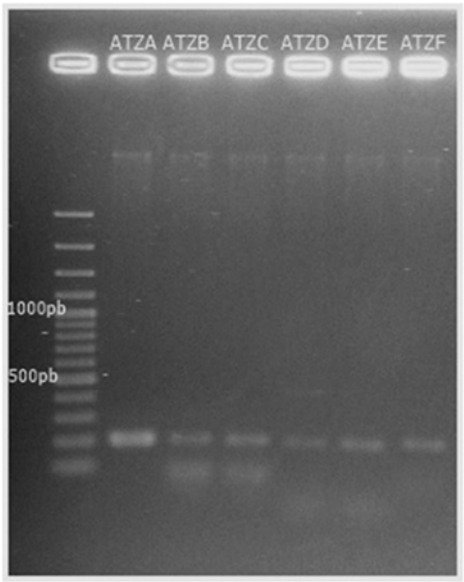

Figura 13**.** Gel de agarose 1% representativo dos produtos de amplificação dos genes *atzA, atzB, atzC, atzD, atzE* e *atzF* em *Cupriavidus pauculus,* após eletroforese horizontal.

Os resultados da detecção do grupo de genes *atz* em todos os 25 isolados selecionados está apresentado na Tabela 6.

Tabela 6 - Resultado da detecção dos genes de degradação da atrazina em 25 bactérias selecionadas.

Isolado	***atz*A**	***atz*B**	***atz*C**	***atz*D**	***atz*E**	***atz*F**
P. aeruginosa P59	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa P86	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa P120	+	+	+	+	+	+
B. cepacea P87	+	+	+	+	+	+
R. radiobacter P34	+	+	+	+	+	+
C. pauculus P69	+	+	+	+	+	+
P. aeruginosa P102	+	-	+	-	+	+
P. aeruginosa P45	+	-	-	-	-	+
P. aeruginosa P54	+	-	-	-	-	+
P. aeruginosa P77	+	-	-	-	-	-
P. aeruginosa P25	+	-	+	-	-	-
P. aeruginosa P03	+	-	-	-	+	+
P. aeruginosa P15	+	-	-	-	+	+
P. aeruginosa P81	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa P82	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa P83	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa P84	-	-	-	-	-	-
P. aeruginosa P85	-	-	-	-	-	-
P. putida P70	+	-	+	-	-	+
P. putida P115	+	-	+	-	-	-
P. putida P72	+	-	-	-	+	-
P. putida P78	+	-	-	-	-	-
P. putida P37	+	-	+	-	-	+
A. xylosoxidans P79	+	+	+	-	-	-
B. cepacea P80	+	+	+	-	+	+

Como observado na Tabela 6, apenas oito bactérias testadas apresentaram o gene *atz*B. As cinco bactérias que não apresentaram o gene *atz*A, também não apresentaram os outros genes *atz*.

5.3 Detecção de plasmídios

A extração de DNA plasmidial foi realizada com todos os isolados estudados. Dentre os 123 isolados, 10 apresentaram plasmídios. Dois desses isolados, *P. aeruginosa* P59 e P86 apresentaram plasmídios com pesos moleculares similares aos plasmídios encontrados na bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP, a qual possui dois plasmídios com 35 e 8,05 MDa. A Figura 14 ilustra os plasmídios de 35 MDa e 8,25 MDa, presentes nos isolados P59 e P86, respectivamente. O isolado P59 foi obtido de solo de cana-de-açúcar e o isolado P86 de uma área de mata virgem. Ambos isolados apresentaram todos os genes de degradação da atrazina (*atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F).

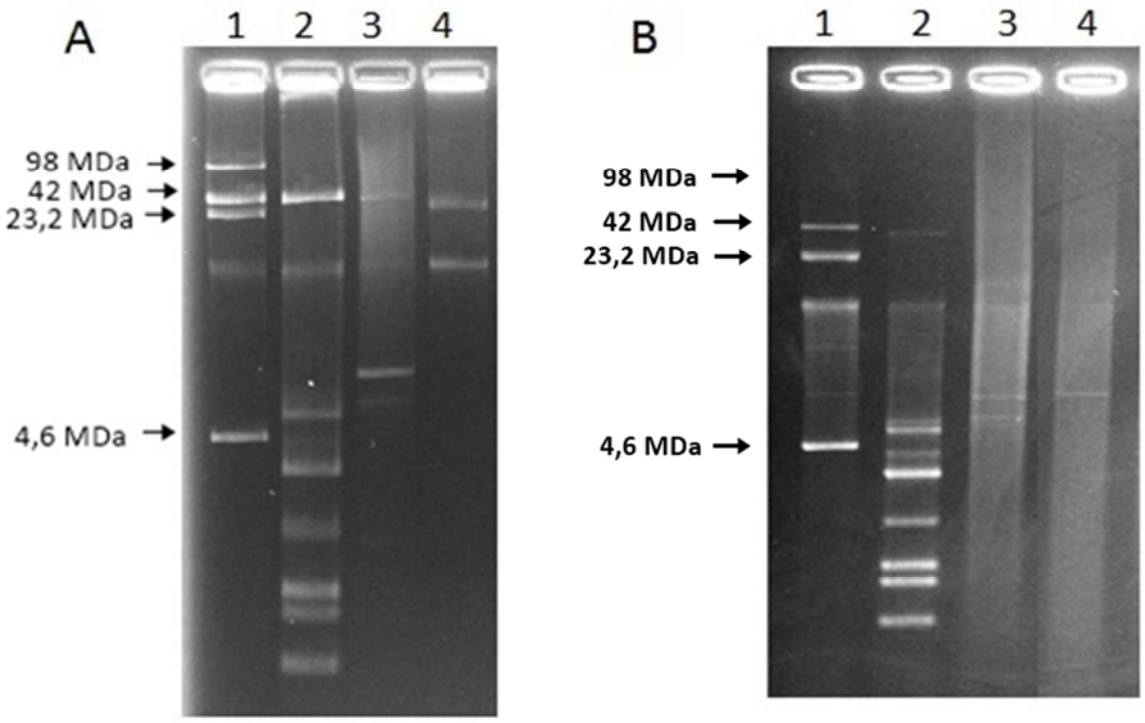

Figura 14**.** A: Perfil plasmidial em gel de agarose (0,8%) do isolado bacteriano de *P. aeruginosa* P59. 1: linhagem padrão *Escherichia coli* 39R861; 2: linhagem padrão *Escherichia coli* V517; 3: *Pseudomonas* sp. ADP; 4: *P. aeruginosa* P59. B: Perfil plasmidial em gel de agarose 0,8% do isolado bacteriano de *P. aeruginosa* P86. 1: linhagem padrão *Escherichia coli* 39R861; 2: linhagem padrão *Escherichia coli* V517; 3: *Pseudomonas* sp. ADP; 4: *P. aeruginosa* P86

Do total de 10 bactérias que apresentaram plasmídios, apenas três (P59, P86 e P34) possuem os seis genes para degradação da atrazina, e um isolado (P115) possui apenas os genes *atz*A e *atz*C. Os plasmídios detectados durante as reações de extração possuem peso

molecular entre 160 MDa e 3,24 MDa. A Tabela 7 relaciona os plasmídios detectados nos 10 isolados e os genes *atz*.

Tabela 7 – Peso molecular dos plasmídeos encontrados em 10 isolados portadores e não portadores de genes *atz* .

Isolado	***Genes atz***	***Peso molecular do plasmídio***
P59	atzA, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F	35 MDa
P86	atzA, *atz*B, *atz*C,*atz*D, *atz*E *e atz*F	8,25 MDa
P115	*atz*A *e atz*C	40,5 MDa e 3,92 MDa
P64	-	6,8 MDa
P66	-	22,6 MDa
P107	-	3,24 MDa
P101	-	160 MDa
P104	-	121 MDa
P34	atzA, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F	120 MDa
P23	-	23.8 MDa

5.4 ERIC-PCR

Os isolados selecionados para o teste de detecção dos genes *atz* foram analisados pela técnica de ERIC-PCR para avaliar a similaridade genética entre eles e para garantir o estudo de isolados bacterianos geneticamente distintos. A técnica foi aplicada apenas aos isolados bacterianos selecionados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Os dendrogramas de similaridade genética estão apresentados nas Figuras 15 e 16.

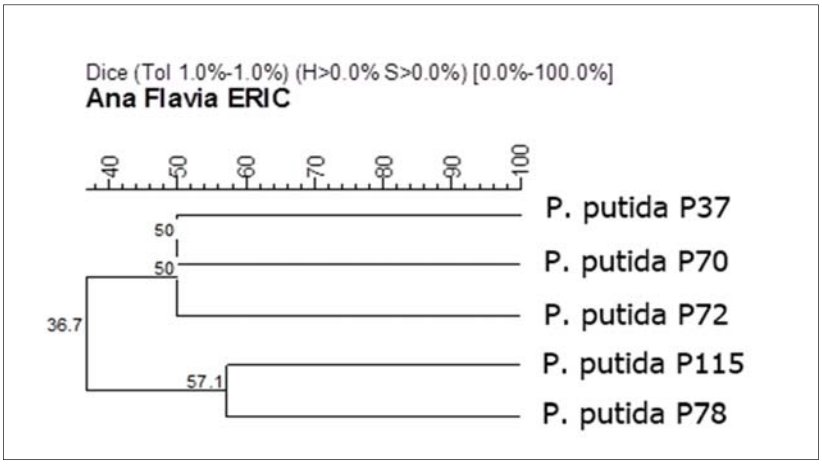

Figura 15. Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA, representando as relações genéticas entre 5 isolados de *P. putida,* com base na técnica de ERIC-PCR. A similaridade (%) entre os padrões foi calculada usando o índice de DICE.

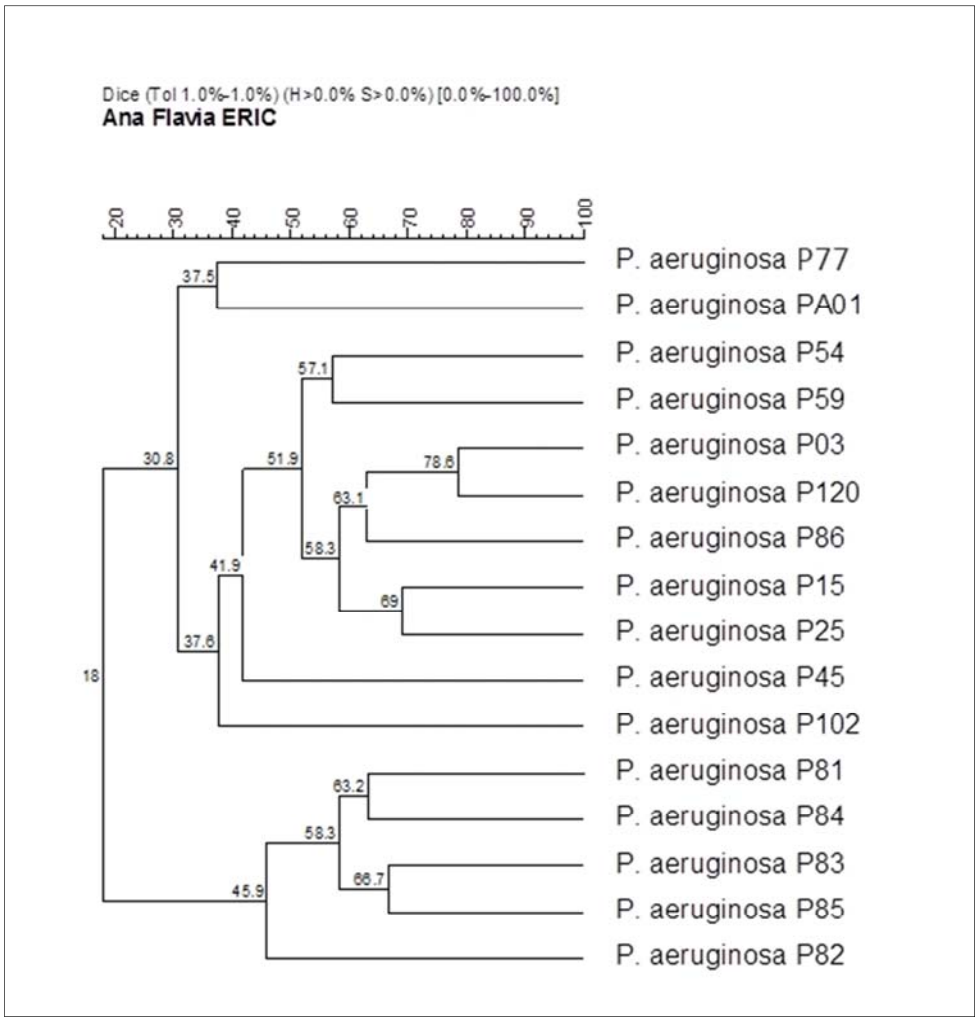

Figura 16**.** Dendrograma de similaridade genética gerado pelo método UPGMA, representando as relações genéticas entre 15 isolados de *P. aeruginosa,* com base na técnica de ERIC-PCR. A similaridade (%) entre os padrões foi calculada usando o índice de Dice. A bactéria PAO1 foi utilizada como controle no experimento.

Todos os isolados analisados por ERIC-PCR apresentaram alta diversidade genética, com similaridade abaixo de 80%, indicando que os isolados são geneticamente distintos. A maior similaridade genética encontrada no estudo foi de 78,6%, entre dois isolados de *P. aeruginosa* da região de Ribeirão Preto, São Paulo.

5.5 Teste de degradação da atrazina

5.5.1 Teste de degradação da atrazina em meio sólido

As bactérias que apresentaram todos os genes de degradação da atrazina (*P. aeruginosa* P86, *P. aeruginosa* P59, *P. aeruginosa* P120, *Rhizobium radiobacter* P34, *Cupriavidus pauculus* P69 e *B. cepacea* P87) 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 a única fonte de nitrogênio. Este teste permite detectar a capacidade das bactérias para mineralização da atrazina, ou seja, para realizar a completa degradação do referido herbicida. A interpretação do teste de degradação ocorre pela visualização de halos de degradação em torno das colônias bacterianas. A Figura 17 ilustra a bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP em meio ATZ-R após 72 horas de incubação em estufa a 30˚C, onde é possível visualizar a formação de halos, que correspondem à mineralização da atrazina.

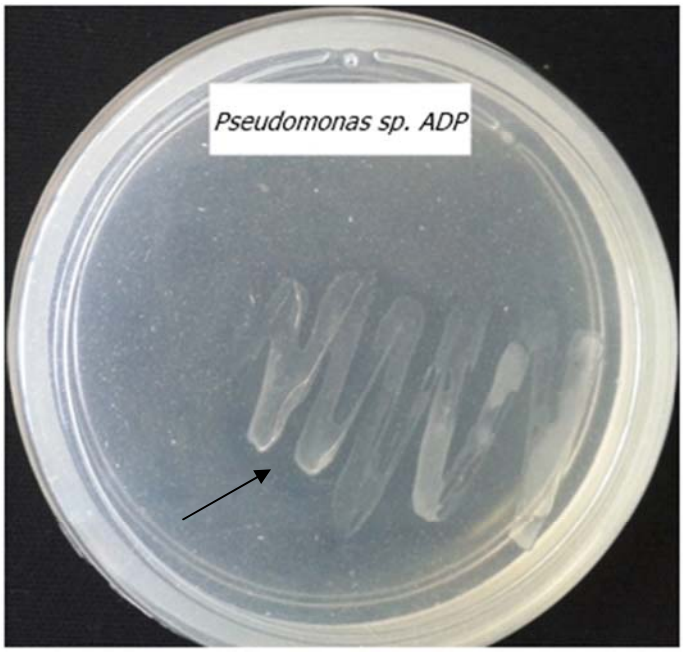

Figura 17**.** *Pseudomonas* sp. ADP em meio ATZ-R.

A Figura 18 apresenta o resultado do teste para detecção de crescimento e degradação da atrazina em meio sólido dos três isolados da espécie *P. aeruginosa* que apresentaram todos os genes de degradação da atrazina.

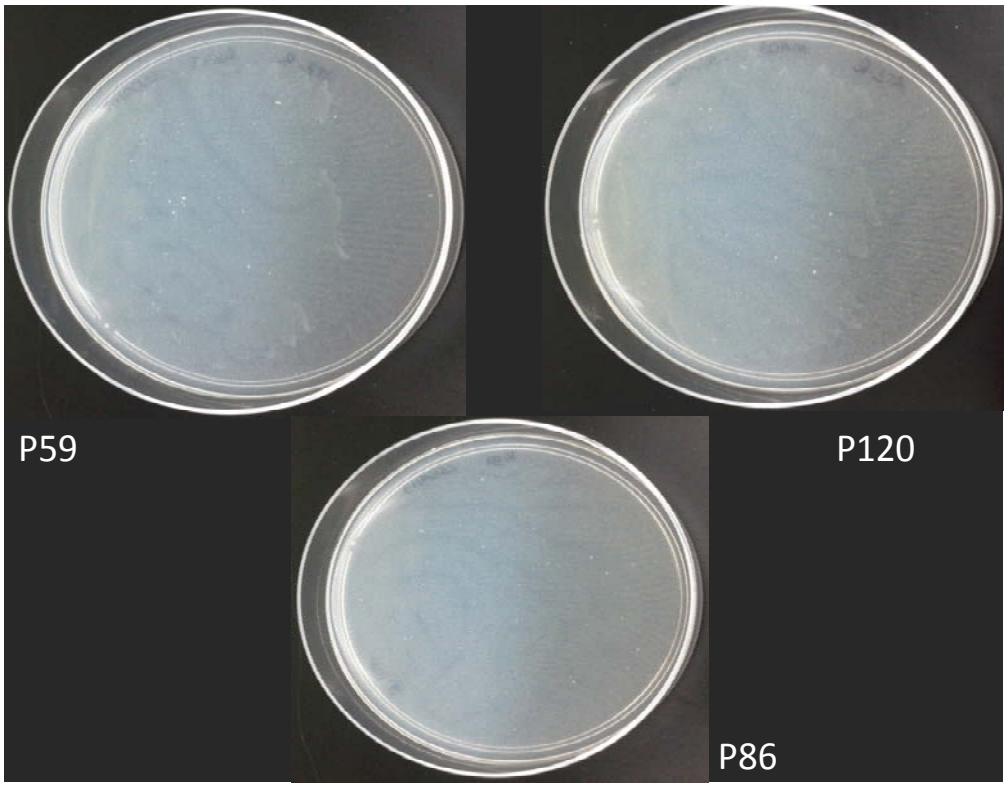

Figura 18. Teste de crescimento e degradação em meio ATZ-R. *Pseudomonas aeruginosa* P59; *Pseudomonas aeruginosa* P120; *Pseudomonas aeruginosa* P86.

Os resultados apresentados demonstram que as bactérias testadas apresentam capacidade para crescer utilizando a atrazina como fonte de nitrogênio, entretanto, não foi observada a formação de halos em torno das colônias, sugerindo que as bactérias não foram capazes de mineralizar a atrazina.

5.5.2 Teste de degradação da atrazina em meio líquido

Os isolados de *P. aeruginosa* P59 e *P. aeruginosa* P86 foram submetidos ao ensaio de degradação da atrazina em meio líquido, com o objetivo de avaliar se tais bactérias são capazes de degradar parcialmente a atrazina, visto que no teste em meio sólido havia sido observada a incapacidade para mineralização de tal herbicida, apesar de possuírem todos os genes a*tz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E *e atz*F e apresentarem plasmídios de pesos moleculares similares aos plasmídios encontrados na bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP. O resultado pode ser observado na Figura 19. A bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP foi utilizada como

controle positivo, e o meio líquido ATZ-R sem inóculo bacteriano como controle negativo. O controle negativo manteve-se constante e não foi observada diminuição dos níveis de atrazina nas amostras P59 e P86 após leitura em comprimento de onda de 225 nm.

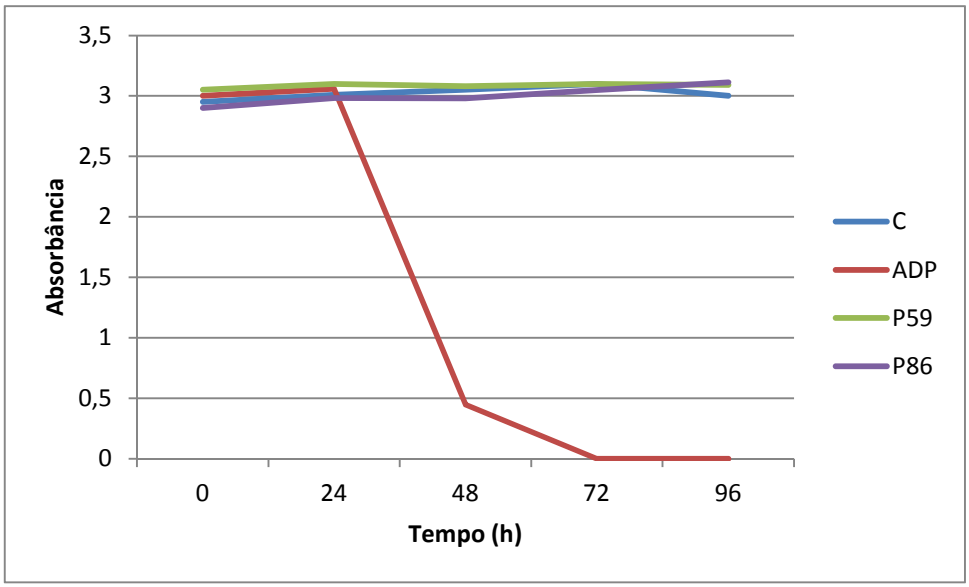

Figura 19. Avaliação da biotransformação da atrazina em meio líquido por espectrofotometria. C: controle negativo; ADP: controle positivo *(Pseudomonas* sp. ADP); P59 e P86: isolados de *P. aeruginosa*.

5.5.3 Análise por HPLC/UV

Os isolados *P. aeruginosa* P59 e *P. aeruginosa* P86 também foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC/UV) para verificar a habilidade dos isolados em degradar o herbicida atrazina. Os experimentos foram realizados em triplicata após 24 e 96 horas de incubação em meio de cultura contendo a atrazina como única fonte de nitrogênio. A curva analítica para o intervalo de concentração de 1,0 $\mu g.mL^{-1}$ a 10 $\mu g.mL^{-1}$ e com coeficiente de correlação de 0,9985 está representada na Figura 20. O resultado da análise dos isolados está apresentado na Figura 21.

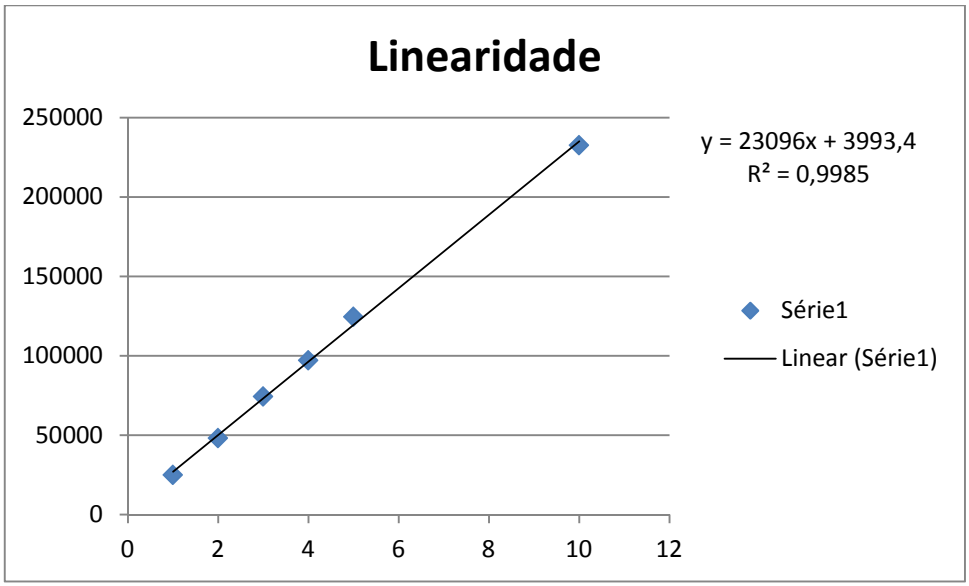

Figura 20. Curva analítica da atrazina.

Os resultados indicam que, após 24 horas de incubação do isolado P86, houve redução de 44% (*P*=0,0001) da concentração inicial da atrazina e esta se manteve inalterada após 96 horas de incubação. A bactéria controle *Pseudomonas* sp. ADP apresentou redução de 84% da atrazina após 24 horas e completa degradação da atrazina após 96 horas de incubação. Não foi observada degradação de atrazina pelo isolado P59.

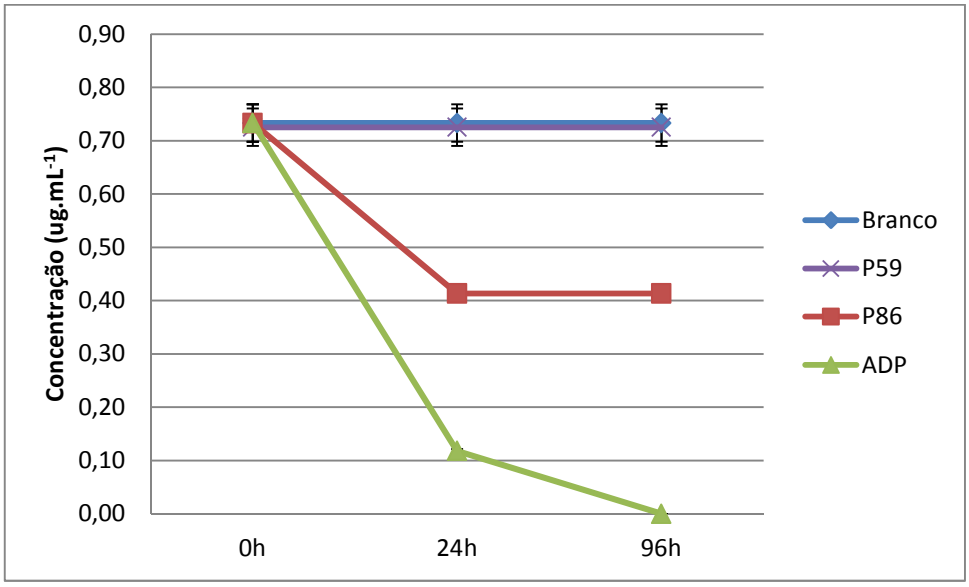

Figura 21: Teste de degradação da atrazina em meio líquido pelo método de HPLC/UV. Branco: controle negativo; P59 e P86: isolados de *P. aeruginosa;* e ADP: controle positivo.

5.6 Sequenciamento dos genes de degradação da atrazina

Os produtos de PCR da *P. aeruginosa* P59 foram sequenciados, e os resultados depositados no GeneBank como sequência parcial (KF279657, KF279658, KF279659, KF279660). As sequências dos genes *atz*A, *atz*C, *atz*E e *atz*F do isolado P59 apresentaram 100% de identidade com as sequências da *Pseudomonas* sp. ADP.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

O solo apresenta grande biodiversidade, ou seja, enorme variedade de organismos vivos, portanto, é um sistema dinâmico, heterogêneo e complexo, agregando um grande número de nichos ecológicos. As bactérias fazem parte da microfauna do solo e estima-se que existam 100 bilhões de células de 10 mil diferentes espécies (GARDI & JEFERRY, 2009), contudo, menos de 1% do total de bactérias presentes em amostras ambientais são cultiváveis. Entretanto, espécies do gênero *Pseudomonas* podem ser facilmente cultivadas em meios de cultura específicos, já que crescem em temperaturas diversas e não são exigentes na utilização de substratos para o seu crescimento (LI et al., 2013). Neste trabalho, foram isoladas 123 bactérias de amostras de solo de diferentes estados do Brasil. Dentre estas, 113 pertencem ao gênero *Pseudomonas* e 92 delas (74,8%) foram identificadas como *Pseudomonas aeruginosa*.

A contaminação do solo por agrotóxicos é um grave problema ambiental, pois leva ao seu desgaste e a perda da sua biodiversidade (CLUZEAU, et al.,2011), e além do mais, tornou-se questão de saúde pública devido aos efeitos tóxicos provocados por essas substâncias. Além disso, a presença de agrotóxicos no solo leva à contaminação de águas superficiais, subterrâneas e de consumo humano, fato que expõe a população a riscos de intoxicação (LI et al., 2007). A atrazina pode ser encontrada em mananciais e é classificada como moderadamente tóxica e potencialmente carcinogênica, além de causar distúrbios endócrinos. A principal via de degradação desse herbicida é biológica e, por este motivo, técnicas de biorremediação são alternativas viáveis na descontaminação de ambientes onde esse herbicida é detectado.

Dessa forma, e com base nos argumentos citados acima, o objetivo principal do presente trabalho foi o isolamento de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* com potencial para mineralização da atrazina e portadoras dos genes *atz*, os quais codificam enzimas específicas para o processo de modificação da molécula de atrazina no ambiente contaminado. Logo, a detecção dos genes de degradação da atrazina nos isolados bacterianos é importante para a caracterização dos microrganismos degradadores.

Até o presente estudo, não havia relato da detecção dos genes *atz* em amostras de solo brasileiro. Os genes que 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). Neste trabalho, os genes de degradação da atrazina foram isolados de bactérias provenientes

de solos de diferentes localidades do Brasil, abrangendo estados da região Norte, Sudeste, Centro-Oeste e do Distrito Federal.

Os genes *atz* foram encontrados em cinco gêneros bacterianos diferentes, incluindo *Pseudomonas, Achromobacter, Burkholderia, Cupriavidus e Rhizobium.* Dentre os gêneros bacterianos encontrados, espécies de *Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacea, Cupiavidus pauculus e Rhizobium radiobacter* exibiram potencial genético para mineralização da molécula de atrazina por possuírem todos os genes *atz* (*atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F) que participam de tal processo. Espécies de *Rhizobium*, *Achromobacter* e *Burkholderia* foram previamente relatadas como potenciais degradadoras do herbicida atrazina em consórcios bacterianos por conterem genes importantes no processo (BOUQUARD et al. 1997; SMITH et al. 2005; MARTIN-LAURENT et al. 2006; UDIKOVIÉ-KOLIÉ et al. 2010) e algumas espécies de *Rhizobium* sp. foram descritas como portadoras dos genes *atz*A *e atz*B (BOUQUARD et al. 1997).

Não há relatos de genes *atz* em bactérias do gênero *Cupriavidus* spp. O *Cupriavidus pauculus*, um microrganismo ambiental encontrado no solo e na água, é um bacilo gram-negativo móvel, catalase e oxidase positivo e não-fermentador em ágar McConkey (BALADA-LLASAT et al. 2010). Possui características bioquímicas semelhantes às *Pseudomonas*, sendo descrito como patógeno oportunista em pacientes portadores de fibrose cística (KALKA-MOLL et al. 2009; ORTEGA & BERGAL, 2011). A descrição deste microrganismo é recente e ocorreu pela primeira vez em 1987 (VANDAMME & COENYE, 2004).

Os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* que foram selecionados para a pesquisa dos genes de degradação da atrazina foram analisados pela técnica de ERIC-PCR para avaliação da similaridade genética entre eles. Existem poucos trabalhos que utilizaram a técnica ERIC-PCR para análise de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas do ambiente, especificamente a partir do solo (FUENTEFRIA et al., 2011). Neste estudo, todos os isolados analisados por ERIC-PCR apresentaram alta diversidade genética, com similaridade abaixo de 80%, indicando que os isolados são geneticamente distintos. A maior similaridade genética encontrada no estudo foi de 78,6%, entre dois isolados de *Pseudomonas aeruginosa* da região de Ribeirão Preto, São Paulo.

A via de degradação da atrazina é formada por seis enzimas codificadas pelos genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F. O genes *atz*A, *atz*B e *atz*C, os quais formam a fase superior da via de degradação e são expressos constitutivamente (MARTINEZ et al., 2001), não sofrem regulação por indução da atrazina ou repressão por fontes de nitrogênio

(DEVERS, et al., 2004). Entretanto, os genes *atz*D, *atz*E e *atz*F, que formam a fase inferior da via de degradação da atrazina e estão organizados em um *operon* sob a regulação do gene *atz*R, são cotranscritos em resposta à presença do ácido cianúrico e quando ocorre redução de nitrogênio (GARCÍA-GONZALES et al., 2005). Porrúa et al. (2007) identificaram e caracterizaram as sequências cis- atuantes na região promotora do *atz*R exigidas para a regulação. O sítio de ligação do *atz*R contém um forte determinante de ligação, o sítio de repressão (RBS), e um sítio de ativação (ABS), de ligação mais fraca. A integridade do sítio RBS é importante para a alta afinidade, ativação e repressão do *atz*R. A deleção do ABS reduz a afinidade do *atz*R para a região do promotor e suprime a repressão *in vivo*.

Estudos com espécies bacterianas degradadoras de atrazina revelaram que os genes a*tz*A, *atz*B *e atz*C são altamente conservados (DE SOUZA et al., 1998; SAJJAPHAN et al. 2004) e as enzimas codificadas por esses genes podem ter evoluído de membros da superfamília das amidohidrolases, já que essas enzimas possuem similaridades na estrutura e mecanismo de ação conservado (NOOR et al., 2012; UDIKOVIÉ-KOLIÉ et al., 2012). Em estudos com a bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP, Changey et al. (2011) demonstraram que sob pressão seletiva de ácido cianúrico, um metabólito intermediário da atrazina, o microrganismo perdeu um fragmento de 47 kb, onde estavam inseridos os genes *atz*A, *atz*B e *atz*C, e concluíram que essa perda foi um importante ganho de adaptação na nova população bacteriana. Os resultados da pesquisa de genes de degradação da atrazina apresentados neste trabalho condizem com a literatura e demonstram 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.

A organização dos genes *atz* parece ser variável, localizando-se mais frequentemente em grandes plasmídios, mas em algumas espécies foram associados a sequências de inserção (ROUSSEAUX et al. 2002). De fato, experimentos realizados por Devers et al. (2005) demonstraram que o plasmídio modificado ADP1::Tn5 foi transferido de uma *Agrobacterium tumefaciens* para bactérias pertencentes a microfauna do solo e que as bactérias transconjugantes adquiriram os genes *atz*A e *atz*B, os quais foram transferidos do plasmídio para o DNA cromossômico, sendo carreados via transposon.

Em estudos posteriores realizados por Devers et al. (2007), foi demonstrado o envolvimento de sequências de inserção na transferência de genes *atz* no ambiente. Os resultados do estudo indicam que a associação dos genes de degradação da atrazina com sequências de inserção podem ser uma característica comum e de grande importância na dispersão desses genes no ambiente. Além disso, os experimentos sugerem que deleções dos

genes *atz*A e *atz*B do plasmídio podem ter ocorrido devido a recombinações entre as sequências de inserção que contém os genes *atz*A e *atz*B.

No presente estudo, a maioria dos isolados (56%) selecionados para a pesquisa dos genes de degradação da atrazina apresentou um ou mais genes *atz*, contudo, a maioria deles não apresentou os seis genes (*atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F) necessários para a mineralização do herbicida. Este padrão encontrado pode indicar transferência horizontal dos genes na microbiota do solo, já que os isolados exibem genes isoladamente ou em pequenos grupos. Os isolados que não apresentaram o gene *atz*A, também não apresentaram outros genes *atz*, indicando que o início da via de degradação representada pelo gene *atz*A é essencial. Além disso, o gene *atz*B foi encontrado em apenas oito isolados dentre os 25 analisados. Esse resultado está de acordo com estudos realizados por Topp et al. (2000), que demonstraram a perda de gene *atz*B na ausência de pressão seletiva de atrazina, além de indicar que os genes *atz*A, *atz*B *e atz*C não estão agrupados e podem ser perdidos de forma independente. No presente trabalho, foram detectados plasmídios em apenas dois isolados contendo os seis genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F e em um isolado contendo os genes *atz*A e *atz*C. As bactérias P87, P120, P34 e P69 possuem todos os genes de degradação da atrazina, mas não apresentaram plasmídios. Estes resultados sugerem que, provavelmente, os genes estão inseridos no DNA cromossômico bacteriano via elementos de inserção. Outra hipótese a ser considerada é de que os plasmídios desses isolados têm alto peso molecular e, por isso, não foi possível recuperá-los com a técnica de extração utilizada.

Os estudos realizados por Devers et al. (2004) sugerem ainda que o hospedeiro pode influenciar a expressão dos genes *atz* devido a diferenças no padrão de expressão gênica encontrado entre as bactérias *Pseudomonas* sp. ADP e *Chelatobacter heinzii.* A pesquisa concluiu, ainda, que a expressão dos genes *atz* é basal e aumenta transitoriamente em resposta à atrazina, demonstrando a importância da expressão dos genes na degradação do herbicida.

No presente trabalho, os isolados P59, P86, P120, P34, P69 e P87 foram testados quanto à capacidade de degradação do herbicida atrazina em placas de meio ATZ-R contendo atrazina como única fonte de nitrogênio. Os seis isolados testados cresceram no meio, indicando capacidade para utilizar a atrazina como fonte de nitrogênio, mas não houve formação de halos em torno das colônias após 72 horas de incubação em estufa a 30˚C. Este resultado demonstra que os isolados não foram capazes de mineralizar completamente a atrazina. Os resultados encontrados sugerem várias hipóteses, entre elas, possíveis mutações nos genes *atz*, as quais promoveriam a formação de enzimas não funcionais, mutações na região de ligação do regulador *atz*R ou simplesmente baixos níveis de expressão dos genes

atz. Outra possibilidade a ser considerada é de que os isolados tem capacidade para degradar parcialmente a atrazina, ou seja, apenas alguns dos genes são funcionais, e consequentemente, ocorreria a formação de metabólitos intermediários, os quais também são insolúveis. No entanto, não foi possível detectá-los através das técnicas de análise utilizadas.

Um dos isolados do presente trabalho, *P. aeruginosa* P86, foi recuperado de solo de mata virgem da região amazônica brasileira, onde não há relatos de uso de herbicidas. Esse isolado apresentou os genes de degradação da *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F e um plasmídio de 8,25 MDa. Como na região não há pressão seletiva, os genes *atz* podem ter sofrido mutações ou apresentam baixos níveis de expressão. A detecção de genes *atz* em área de mata virgem, sem pressão seletiva do herbicida, pode ter ocorrido devido à dispersão dos genes no ambiente, mas a origem dos genes *atz* não está completamente esclarecida.

Em uma pesquisa realizada por De Souza et al. (1998), a bactéria *Pseudomonas* sp. CN1 contendo o gene *atz*A não foi capaz de crescer em meio utilizando atrazina como fonte de carbono e nitrogênio e a liberação do cloro da molécula de atrazina não foi detectada. Experimentos posteriores revelaram a presença de uma proteína truncada e não funcional, decorrente de mutações nos genes *atz* da *Pseudomonas* sp. CN1. Os dados obtidos neste estudo poderiam explicar a falha na mineralização completa da atrazina pelos microrganismos testados no presente estudo. Os genes do isolado P59 que foram sequenciados apresentaram 100% de identidade com a bactéria *Pseudomonas* sp. ADP, no entanto, as sequências são parciais e podem conter mutações nas demais regiões não sequenciadas.

Os isolados P59 e P86 foram testados em meio líquido ATZ-R para verificar a capacidade de degradação da atrazina. Os isolados foram incubados em meio líquido contendo 33 ppm de atrazina por até 96 horas e alíquotas de 1 mL foram coletadas a cada 24 horas para análise em espectrofotômetro. Não foi observada diminuição da concentração de atrazina nas amostras. A bactéria padrão *Pseudomonas* sp. ADP mineralizou a atrazina após 72 horas de incubação a 30˚C. Estes resultados apresentados confirmam o teste realizado em placas contendo o meio de cultura sólido ATZ-R. Após 24 e 96 horas de incubação das amostras em meio líquido ATZ-R, uma alíquota de 1 mL foi retirada para análise em HPLC/UV.

Como observado, em placas de meio sólido ATZ-R e pela leitura no espectrofotômetro, não foi observada a degradação da atrazina pelos isolados P59 e P86. Entretanto, o isolado P86 demonstrou uma taxa de degradação estatisticamente significativa

(*P*=0,0001) quando analisado por HPLC. Essa diferença de resultados apresentada pelo isolado P86 pode ser explicada devido à diferença entre as técnicas utilizadas para análise. A molécula de atrazina e outras moléculas presentes no meio líquido ATZ-R, incluindo alguns metabólitos secundários da bactéria, absorvem luz no comprimento de onda de 225 nm e, portanto, quando é realizada a leitura no espectrofotômetro neste comprimento de onda, todas essas moléculas irão absorver a luz. Se a concentração de atrazina for muito menor que a dos outros compostos, o espectrofotômetro não quantifica essa diferença, entretanto, no HPLC/UV, por ocorrer a separação dos analitos antes da leitura pelo detector, é possível determinar as suas concentrações individuais. Além disso, por ser uma técnica sensível, qualquer variação na concentração de cada composto poderá ser detectada. Como a concentração da atrazina é, provavelmente, menor que a dos outros compostos, somente ao utilizarmos a técnica HPLC/UV é que foi possível detectar uma variação em sua concentração. Isto explicaria porque foi detectada a degradação da atrazina pelo isolado P86 apenas pelo HPLC/UV.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

- Houve predomínio de isolados de *Pseudomonas aeruginosa* nas amostras de solo analisadas, em comparação às demais espécies isoladas do mesmo gênero.

- Os genes de degradação da atrazina foram detectados pela primeira vez em amostras de solo do Brasil em isolados do presente estudo. Foram detectados os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F em isolados de diferentes espécies, além de espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp.

- Os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F foram detectados em uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de solo de mata virgem, sem histórico de uso de herbicidas, da região amazônica brasileira.

- O gene *atz*B foi detectado em apenas oito isolados dentre os 25 analisados.

- Os isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas* spp. apresentaram alta variabilidade genética, pela análise por ERIC-PCR.

- A maioria dos genes *atz* detectados, aparentemente, não estão relacionados à plasmídios.

- Os isolados que apresentam os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F crescem utilizando atrazina como única fonte de nitrogênio.

- Os isolados que apresentam os genes *atz*A, *atz*B, *atz*C, *atz*D, *atz*E e *atz*F não mineralizam completamente a atrazina.

- O isolado *Pseudomonas aeruginosa* P86 é capaz de degradar parcialmente a atrazina.

PERSPECTIVAS

8. Perspectivas

Para melhor compreensão do funcionamento dos genes de degradação da atrazina nas bactérias isoladas no presente estudo, experimentos posteriores serão realizados para detecção do gene regulador *atz*R e avaliação da expressão gênica dos isolados, além de novas análises em HPLC/UV e HPLC/MS/MS para detecção e quantificação da degradação da atrazina e da formação de seus metabólitos, afim de verificar a funcionalidade dos genes *atz* encontrados. Além disso, pretende-se formar consórcios bacterianos com a utilização de mais de um isolado para obtenção da capacidade de mineralização da atrazina.

REFERÊNCIAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALISI, C., MUSELLA, R., TASSO, F., UBALDI, C., MANZO, S., 2009. 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.

ANDREU, V., PICÓ, Y., 2012. Determination of currently used pesticides in biota. Anal Bioanal Chem, 404: 2659-2681.

BALADA-LLASAT, J-M., ELKINS, C., SWYERS, L., BANNERMAN, T., PANCHOLI, P., 2010. Pseudo-Outbreak of *Cupriavidus pauculus* Infection at an Outpatient Clinic Related to Rinsing Culturette Swabs in Tap Water. Journal of Clinical Microbiology, 7: 2645–2647.

BOHN, T., COCCO, E., GOURDOL, L., GUIGNARD, C., HOFFMAN, L., 2011. Determination of atrazine and degradation products in Luxembourgish drinking water: origin and fate of potential endocrine-disrupting pesticides. Food Additives and Contaminants,28: 1041–1054.

BOUQUARD, C., OUAZZANI, J., PROMÉ, J-C., MICHEL-BRIAND, Y., PLÉSIAT, P., 1997. Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate. Applied and Environmental Microbiology, 3: 862–866.

BOTELHO, G.R., MENDONÇA-HAGLER, L.C., 2006. Fluorescent P*seudomonads* Associated with the Rhizosphere of Crops - an overview. Brazilian Journal of Microbiology, 37:401-416.

CHANGEY, F., DEVERS- LANRANI, M., ROUARD, N., MARTIN-LAURENT, F., 2011. *In vitro* evolution of an atrazine-degrading population under cyanuric acid selection pressure: Evidence for the selective loss of a 47 kb region on the plasmid ADP1 containing *atzA*, *B* and *C* genes.

CLUZEAU, D., GUERNION, M., CHAUSSOD, R., MARTIN-LAURENT, F., VILLENAVE, F., CORTET, J., RUIZ-CAMACHO, N., PERNIN, C., MATEILLE, T., PHILIPPOT, L., BELLIDO, A., ROUGÉ, L., ARROUAYS, D., BISPO, A., PÉRES, G., 2012. Integration of biodiversity in soil quality monitoring: Baselines for microbial and soil fauna parameters for different land-use types. European Journal of Soil Biology, 49: 63-72.

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

DEVERS, M. et al., 2004. Real Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. Journal of Microbiological Methods, 56: 3-15.

DEVERS, M. et al., 2005. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (*atz)* from *Agrobacterium tumefaciens* St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maizecultivated soil. Pest Management Science, 61:870–880.

DEVERS, M., AZHARI, N. E., KOLIC, N-U., MARTIN-LAURENT, F., 2007. 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.

DE VOS, D. et al., 1997. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoeletric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centers. Burns 23: 379-386.

DUNN, R., 2012. In retrospect: Silent Spring. Nature, 485: 578-579.

DUTTA, A., SINGH, N., 2013. 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.

EDRINGTON, T.C., KINTZ, E., GOLDBERG, J. B., TAMM, L. K., 2011. Structural Basis for the Interaction of Lipopolysaccharide with Outer Membrane Protein H (OprH) from *Pseudomonas aeruginosa.* The Journal of Biological Chemistry, v.286, n.45, 39211-39223.

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

FERREIRA, E.P.B., VOSS, M., SANTOS, H. P., DE-POLLI, H., NEVES, M. C. P., RUMJANEK, N. G., 2009. Diversidade de *Pseudomonas* fluorescentes em diferentes sistemas de manejo do solo e rotação de culturas. Revista Brasileira de Ciências Agrárias, 4: 140-148.

FROST, G., BROWN, T., HARDING, H. A., 2011. Mortality and cancer incidence among British agricultural pesticide users. Occupational Medicine, 61:303–310.

FUENTEFRIA, D. B., FERREIRA, A. E., CORÇÃO, G., 2011. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital wastewater and superficial water: Are they genetically related? Journal of Environmental Management, 92: 250-255.

GAO, Y., FANG, J., ZHANG, J., REN, L., MAO, Y., LI, B., ZHANG, M., LIU, D., DU, M., 2011. The impact of the herbicide atrazine on growth and photosynthesis of seagrass, Zostera marina (L.), seedlings. Marine Pollution Bulletin, 62: 1628-1631.

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

GAYLARDE, C.C., BELLINASO, M. L., MANFIO, G. P., 2005. Aspectos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Xenobióticos. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, 34.

GARCÍA-GONZÁLEZ, V., GOVANTES, F., PORRÚA, O., SANTERO, E., 2005. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. Applied and Environmental Microbiology, 69: 6987-6993.

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

GÓMEZ-SAGASTI, M. T., 2012. Microbial Monitoring of the Recovery of Soil Quality During Heavy Metal Phytoremediation. Water Air Soil Pollut, 223: 3249-3262.

GROSS, H., LOPER, J.E., 2009. Genomics of secondary metabolite production by *Pseudomonas* spp. The Royal Society of Chemistry, 26: 1408-1446.

HAVLICEK, E.,2012. Soil biodiversity and bioindication: From complex thinking to simple acting. European Journal of Soil Biology, 49: 80-84.

HERNÁNDEZ, M. et al., 2008. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil os central Chile, Pseudomonas sp. MHP41. FEMS Microbiol Lett, 286: 184-190.

IMFELD, G., VUILLEUMIER, S., 2012. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. European Journal of Soil Biology, 49: 22-30.

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

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

KALKA-MOLL, W. M., LIPUMA, J. J., ACCURSO, F. J., PLUM, G., KONINGSBRUGGEN, S., VANDAMME, P., 2009. Airway Infection with a Novel Cupriavidus Species in Persons with Cystic Fibrosis. *J. Clin. Microbiol*, 47(9):3026.

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

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

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

LI, L. et al., 2013. Investigating the diversity of Pseudomonas spp. in soil using culture dependent and independent techniques. Current Microbiology, 67: 423-430.

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

LI, W., SHI, J., WANG, X., HAN, Y., TONG, W., MA, L., LIU, B., CAI, B., 2004. Complete nucleotide sequence and organization of the naphthalene catabolic plasmid pND6-1 from Pseudomonas sp. strain ND6. Gene, 336: 231-240.

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

MACÊDO, J. A. B., 2002. Introdução à Química ambiental: Química & Meio Ambiente & Sociedade. 1ª ed. Juiz de Fora/MG, CRQ-MG, 487p.

MAIA, A. A., et al. 2009. Resistência antimicrobiana de *Pseudomonas aeruginosa* isolados de pescado e de cortes e de miúdos de frango. Ciência e Tecnologia de Alimentos, 29: 114-119.

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

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.

MARTINS, V. V., PITONDO-SILVA, A., MANÇO, L. M., FALCÃO, J. P., FREITAS, S. S., SILVEIRA, W. D., STEHLING, E. G., 2013. Pathogenic potential and genetic diversity of environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. APM, *DOI: 10.1111*.

MARTINEZ, B., TOMKINGS, J., WACKETT, L. P., WING, R., SADOWSKY, M. J., 2001. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. Journal of Bacteriology, 183: 5684-5697.

MARTIN-LAURENT, F. et al., 2006. Impact of the maize rhizosphere on the genetic structure, the diversity and the atrazine-degrading gene composition of cultivable atrazine-degrading communities. Plant Soil, 282:99–115.

MIGEOT, V., ALBOUY-LLATY, M., CARLES, C., LIMOUSI, F., STREZLEC, S., DUPUIS, A., RABOUAN, S., 2013. 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.

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

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

MULBRY, W.W., ZHU, H., NOUR, S. M., TOPP, E., 2002. The triazine hydrolase gene *trzN* from Nocardioides sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. FEMS Microbiol Lett. 206:75–79.

MUKHERJEE, K. et al., 2011. Isolation of a *Pseudomonas aeruginosa* strain from soil that can degrade polyurethane diol. Biodegradation, 22:377-388.

NOOR, S., TAYLOR, M. C., RUSSELL, R. J., JERMIIN, L. S., JACKSON, C. J., OAKESHOTT, J. G., SCOTT, C., 2012. Intramolecular epistasis and the evolution of a new enzimatic function. Plos One, 7: 1-11.

ORTEGA, G. A., BERNAL, E. A., 2011. Bacteriemia asociada a catéter por *Cupriavidus pauculus*. Infectio, 15(4): 289-292

PIRNAY, J. P. et al., 2005. *Pseudomonas aeruginosa* biodiversity as reflected in a Belgian river. Environmental Microbiology, 7: 969–980.

PORRÚA, O., GARCÍA-JARAMILLO, M., SANTERO, E., GOVANTES, F., 2010. Complex interplay between the LysR-type regulator AtzR and its binding site mediates *atzDEF* activation in response to two distinct signals. Molecular Microbiology, 76: 331-347.

PULLEMAN, M., CREAMER, R., HAMER, U., HELDER, J., PELOSI, C., PERES, G., RUTGERS, M., 2012. Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services—an overview of European approaches. Current Opinion in Environmental Sustainability, 4:529–538.

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

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

ROJO, F., 2010. Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. FEMS: Microbiology Reviews, 34: 658-684.

ROUSSEAUX, S., SOULAS, G., HARTMANN, A., 2002. Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described Chelatobacter and Arthrobacter strains. FEMS Microbiology Ecology, 41: 69-75.

SADOWSKY, M. J. et al. 1998. *AtzC* is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. Journal of Bacteriology, 180:152-158.

SAGARKAR, S., MURKHERJEE, S., NOUSIAINEN, A., BJORKLOF, K., PUROHIT, H. J., JORGENSEN, K. S., KAPLEY, A., 2013. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. Environmental Pollution, 172: 108-115.

SAJJAPHAN K., SHAPIR, N., WACKETT, L. P., PALMER, M., BLACKMON, B., TOMKINS, J., SADOWSKY, M. J., 2004. *Arthrobacter aurescens* 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.

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

SENE, L., CONVERTI, A., SECCHI, G. A. R., SIMÃO, R. C. G., 2010. New aspects on atrazine biodegradation. Brazilian Archives of Biology and Technology, 53: 487-496.
SHAPIR, N. et al. 2005. Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. Journal of Bacteriology, 187: 3731–3738.

SHELLEY, L. K., ROSS, P. S., MILLER, K. M., KAUKINEN, K. H., KENNEDY, C. J., 2012. 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.

SHERCHAN, S. P., BACHOON, D. S., 2011. The presence of atrazine and atrazine-degrading bacteria in the residential, cattle farming, forested and golf course regions of Lake Oconee. Journal of Applied Microbiology, 111: 293-299.

SILVA, J.M. et al., 2005. Pesticides and work: a dangerous combination for the Brazilian agricultural worker's health. Ciência & Saúde Coletiva, 10(4): 891-903.

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

SMITH, D., ALVEY, S., CROWLEY, D. E., 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. FEMS Microbiology Ecology, 53: 256-273.

SOUZA, M. L., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P., 1996. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: Gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. Journal of Bacteriology, 178: 4894–4900.

STEFFEN, G.P.K., STEFFEN, R. B., ANTONIOLI, Z. I., 2011. Contaminação do Solo e da Água pelo Uso de Agrotóxico. Tecno-lógica, 15: 15-21.

TOPP, E., ZHU, H., NOUR, S. M., HOUOT, S., LEWIS, M., CUPPELS, D., 2000. Characterization of an atrazine-degrading Pseudaminobacter sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. Applied Environmental Microbioloy, 66(7): 2773-82.

UDIKOVIÉ-KOLIÉ, K., HRSAK, D., DEVERS, M., KLEPAC-CERAJ, M., PETRIC, I., MARTIN-LAURENT, F., 2010. Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. Journal of Applied Microbiology, 109:1364-5072.

UDIKOVIÉ-KOLIÉ, N., SCOTT, C., MARTIN-LAURENT, F., 2012. Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. Appl Microbiol Biotechnol, 96:1175–1189.

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

VANDAMME, P.; COENYE, T., 2004. Taxonomy of the genus Cupriavidus: a tale of lost and found. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 2285–2289.

VAN MANSFELD, R., JONGERDEN, I., BOOTSMA, M., BUITING, A., BONTEN, M., WILLENS, R., 2010. The Population Genetics of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Different Patient Populations Exhibits High-Level Host Specificity. PloS One, v.5.

VERSALOVIC, T. et al., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids, 19: 6823–6831.

VIBBER, L.L., PRESSLER, M. J., COLORES, G. M., 2007. Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil. Microbiol Biotechnol, 75:921–928.

VIVES-FLORÉZ, M., GARNICA, D., 2006. Comparison of virulence between clinical and environmental *Pseudomonas aeruginosa* isolates. International Microbiology, 9: 247-252.

WACKETT, L.P., SADOWSKY, M. J., MARTINEZ, B., SHAPIR, N., 2002. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. Microbiol Biotechnol, 58: 39-45.

WOLF, P., ELSASSER-BEILE, U., 2008. *Pseudomonas* exotoxin A: From virulence factor to anti-cancer agent. International Journal of Medical Microbiology, 299: 161-176.

ZHAO, S. H. et al., 2013. Sub-acute exposure to the herbicide atrazine suppresses cell immune functions in adolescent mice. Bioscience Trends, 7(4): 193-201.

ZILLI, J. E., RUMJANEK, N. G., XAVIER, G. R., COUTINHO, H. L. C., NEVES, M. C. P., 2003. Diversidade Microbiana como Indicador de Qualidade do Solo. Cadernos de Ciência e Tecnologia, 20: 391-411.

APÊNDICE

Tabela 8- Bactérias isolados de amostras de solo de diferentes regiões do Brasil.

Isolado	***Identificação***	***Cultura***	***Origem***	***atzA***
P01	*P. putida*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	-
P02	*P. putida*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	-
P03	*P. aeruginosa*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	+
P04	*P. aeruginosa*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	+
P05	*P. aeruginosa*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	-
P06	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	+
P07	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	+
P08	*P. aeruginosa*	Milho	IAC - Ribeirão Preto	-
P09	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P10	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P11	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P12	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P13	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P14	*P. aeruginosa*	Sorgo	IAC - Ribeirão Preto	-
P15	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	IAC - Ribeirão Preto	+
P16	*P. fluorescens*	Cana-de-açúcar	IAC - Ribeirão Preto	-
P17	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	IAC - Ribeirão Preto	-
P18	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	IAC - Ribeirão Preto	+
P19	*P. putida*	Cana-de-açúcar	IAC - Ribeirão Preto	-
P20	*P. aeruginosa*	Café	IAC - Ribeirão Preto	-
P21	*Cupriavidus pauculus*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P22	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P23	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P24	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P25	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P26	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P27	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P28	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P29	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P30	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P31	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P32	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P33	*P. putida*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P34	*Rhizobium radiobacter*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P35	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P36	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P37	*P. putida*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+

P38	*P. aeruginosa*	Desconhecida	Desconhecido	-
P39	*P. aeruginosa*	Citrus	Itápolis/SP	-
P40	*P. aeruginosa*	Desconhecida	Desconhecido	-
P41	*P. aeruginosa*	Desconhecida	Desconhecido	-
P42	*P. aeruginosa*	Café	Tabatinga/SP	-
P43	*P. aeruginosa*	Eucalipto	Formosa/GO	-
P44	*P. aeruginosa*	Milho Selvagem	São Francisco de Sales/MG	-
P45	*P. aeruginosa*	Pastagem	São Pedro do Boaçuí/MG	+
P46	*P. aeruginosa*	Soja	Santa Juliana/MG	-
P47	*P. aeruginosa*	Café novo	São Sebastião do Paraíso/MG	-
P48	*P. aeruginosa*	Café Rubi	São Sebastião do Paraíso/MG	-
P49	*P. aeruginosa*	Cana/Capim	São Carlos/SP	+
P50	*P. aeruginosa*	Cana/Capim	São Carlos/SP	+
P51	*P. aeruginosa*	Café	Pedregulho/SP	+
P52	*P. aeruginosa*	Café	Pedregulho/SP	+
P53	*P. aeruginosa*	Café	Cajuru/SP	+
P54	*P. aeruginosa*	Café	Cajuru/SP	+
P55	*P. aeruginosa*	Desconhecida	Desconhecido	-
P56	*P. aeruginosa*	Café	Franca/SP	+
P57	*P. putida*	Café	Franca/SP	+
P58	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	Nuporanga/SP	+
P59	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	Nuporanga/SP	+
P60	*P. aeruginosa*	Milho	Cássia dos Coqueiros/SP	-
P61	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	Guariba/SP	-
P62	*P. putida*	Cana-de-açúcar	São Sebastião do Paraíso/MG	-
P63	*P. putida*	Cana-de-açúcar	São Sebastião do Paraíso/MG	-
P64	*Burkholderia cepacea*	Amendoim	Cafelândia/SP	-
P65	*P. putida*	Café	Brodowski/SP	-
P66	*P. putida*	Milho	Tiros/MG	-
P67	*P. putida*	Graviola	Brasília/DF	+
P68	*P. aeruginosa*	Acerola	Brasília/DF	+
P69	*Cupriavidus pauculus*	Citrus	Brasília/DF	+
P70	*P. putida*	Banana	Brasília/DF	+
P71	*P. aeruginosa*	Beterraba	Manaus/AM	+
P72	*P. putida*	Salsinha	Manaus/AM	+

P73	*Achromobacter Xylosoxidans*	Mamão	Manaus/AM	+
P74	*P. aeruginosa*	Mamão	Manaus/AM	-
P75	*Achromobacter xylosoxidans*	Cana-de-açúcar	Porto Velho/RO	-
P76	*Achromobacter xylosoxidans*	Braquiaria	Porto Velho/RO	-
P77	*P. aeruginosa*	Braquiaria	Porto Velho/RO	+
P78	*P. putida*	Café	Serra do Salitre/MG	+
P79	*Achromobacter xylosoxidans*	Soja	Prata/MG	+
P80	*Burkholderia cepacea*	Soja	Prata/MG	+
P81	*P. aeruginosa*	Milho	Chapadão do Sul/MS	-
P82	*P. aeruginosa*	Girassol	Chapadão do Sul/MS	-
P83	*P. aeruginosa*	Milho	Teresina/PI	-
P84	*P. aeruginosa*	Milho	Maringá/PR	-
P85	*P. aeruginosa*	Solo nativo de reserva nacional	Alto Paraíso/GO	-
P86	*P. aeruginosa*	Mata virgem	Manaus/AM	+
P87	*Burkholderia cepacea*	Pimenta	Manaus/AM	+
P88	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P89	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P90	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P91	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P92	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P93	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P94	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P95	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P96	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P97	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P98	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P99	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P100	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P101	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P102	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P103	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P104	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	-
P105	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P106	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P107	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-

P108	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P109	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P110	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P111	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P112	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P113	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P114	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P115	*P. putida*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P116	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P117	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	-
P118	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P119	*P. aeruginosa*	Cana-de-açúcar	FE - Ribeirão Preto	+
P120	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P121	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P122	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+
P123	*P. aeruginosa*	Milho	FE - Ribeirão Preto	+