

**Universidade de São Paulo**

Instituto de Química de São Carlos

**Luciana Teresa Dias Cappelini**

**Influência das Substâncias Húmicas na Degradação do  
Pesticida Fipronil pela bactéria *Burkholderia* sp**

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em  
acervo reservado na Biblioteca do  
IQSC-USP

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo como parte dos quesitos para obtenção do título de Doutor em Química (Química Analítica e Inorgânica).

**Orientador (a):** Dra. Eny Maria Vieira

**São Carlos**

**2013**

Até aqui viajamos juntos.  
Passaram vilas e cidades, cachoeiras e rios, bosques e  
florestas...  
Não faltaram os grandes obstáculos.  
Frequentes foram às cercas, ajudando a transpor abismos...  
As subidas e descidas foram realidade sempre presente.  
Juntos, percorremos retas, nos apoiamos nas curvas,  
descobrimos cidades...  
Chegou o momento de cada um seguir viagem sozinho...  
Que as experiências compartilhadas no percurso até aqui  
sejam a alavanca para  
alcançarmos a alegria de chegar ao destino projetado.  
A nossa saudade e a nossa esperança de um reencontro aos  
que, por vários  
motivos, nos deixaram, seguindo outros caminhos.  
O nosso agradecimento àqueles que, mesmo de fora, mas  
sempre presentes, nos  
quiseram bem e nos apoiaram nos bons e nos maus momentos.  
Dividam conosco os méritos desta conquista, porque ela  
também pertence a  
vocês. Uma despedida é necessária antes de podermos nos  
encontrar outra vez.  
Que nossas despedidas sejam um eterno reencontro.

**Autor desconhecido**

Dedico este trabalho a minha mãe, Maria Lúcia pela minha formação intelectual e moral; ao meu marido Rodrigo pelo apoio nas horas difíceis; a minha filha Laís que me deu forças para chegar até aqui; e ao meu tio Luiz Carlos que ajudou a cuidar da Laís para que eu alcançasse meu objetivo.

## **Agradecimentos**

A Deus pela força e a coragem que me deu para vencer os obstáculos.

A professora Eny, pela orientação, estímulo e principalmente confiança.

As secretárias Gislei, Veroneide e Cláudia; as secretárias da pós-graduação Andréia e Silvia, as bibliotecárias, as atendentes da portaria e as faxineiras do prédio de laboratórios.

Aos colegas de grupo: Carlos, Carolina, Daniele, Lia, Raphael, Thiago que participaram do desenvolvimento do meu trabalho.

Aos colegas que saíram do grupo: Adriana, Daniela Cordeiro, Daniele Beraldo, Gustavo.

Aos Biomics que participaram do meu trabalho: Carolina, Juliana, Juliane, Regiane.

Aos colegas que participaram de minha vida: Kátia, Amanda Silvia e Dalva.

A empresa de fertilizantes orgânicos Agrolatino pelo fornecimento das substâncias húmicas.

Ao professor André Porto por autorizar o uso do GC-MS em seu laboratório e ao técnico João Pedro Lima pelo auxílio no manuseio do equipamento.

A professora Maria Bernardete Veresche por autorizar o uso de seu laboratório de processos biológicos e a técnica Eloisa Pozzi pelo auxílio nas etapas de clonagem e sequenciamento.

A Capes pela concessão da bolsa de doutorado.

---

## Resumo

Devido à expansão da cultura canavieira, e aos altos custos dos insumos agrícolas, buscam-se novas formas de manejo do solo dentre elas o uso de substâncias húmicas. Apesar disso os produtores aliam as técnicas alternativas as tradicionais como o uso do fipronil, um inseticida fenil – pirazólico muito utilizado na cultura de cana-de-açúcar. Apesar desta prática, pouco se sabe como ocorre a degradação biótica do fipronil, fipronil-sulfeto e fipronil sulfona, quando se utiliza as substâncias húmicas como forma de adubação. Por esse motivo o objetivo deste trabalho foi avaliar a degradação biológica do fipronil quando se utiliza substâncias húmicas. Para este estudo, empregou-se um método indireto de extração de DNA do solo, onde as bactérias foram cultivadas em meio contendo apenas água estéril e fipronil e posteriormente seu DNA foi extraído, fez-se a PCR utilizando o primer 27F/1100R e o produto da PCR foi clonado e sequenciado; as bactérias identificadas estão afiliadas aos gêneros: *Clostridium* sp, *Bdellovibrio* sp, *Flavisolibacter* sp, *Burkholderia* sp e *Herbaspirillum* sp. O gênero selecionado para o estudo foi afiliada a *Burkholderia* sp, devido a seu potencial de degradação citado na literatura. Adquiriu-se uma cepa pura de *Burkholderia thailandensis* Para determinação do fipronil e seus metabólitos, fipronil sulfeto e fipronil sulfona validou-se o método QuEChERS GC- MS que resultou nas seguintes condições: limites de detecção e quantificação foram de  $0,06 \text{ mgL}^{-1}$   $0,25 \text{ mgL}^{-1}$  respectivamente, a linearidade foi de 0,99, a precisão foi em torno de 10,9 a 7,3% para o nível baixo e 1,84 a 1,24% para o nível mais alto. Calculou-se a recuperação do método de extração que variou entre 78 e 98%, Em seguida montou-se oito tratamentos os quais foram medidos a degradação do fipronil frente a utilização de SH que obteve-se o seguintes resultados: A *Burkholderia thailandensis* degradou cerca de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$  de fipronil com ou sem a presença das SH adicionada no solo de estudo; não foi possível quantificar os produtos de degradação pois ambos (fipronil sulfeto e fipronil sulfona) ficaram abaixo do LOQ do método.

Palavras – Chave: solo, DNA, degradação, *Burkholderia* sp

---

**Abstract**

Due to the expansion of sugar cane, and the high costs of agricultural inputs, currently looking up forms new of soil management among them the use of humic substances. Nevertheless producers combine traditional and alternative techniques, for example addition of fipronil to humic substances. Fipronil is an insecticide phenyl - pyrazole widely used in cane sugar cultivation . Despite this practice, few is known about a biotic degradation of the fipronil, fipronil sulfide and fipronil sulfone, when using humic substances as fertilization. Therefore the objective of this study was to evaluate the biological degradation of fipronil when it used in humic substances. For this study, we used an indirect method of DNA extraction from the soil, where bacteria were cultured in medium containing only sterile water and fipronil. After, the DNA was extracted, a PCR was performing using primer 27F/1100Rr and the PCR product was cloned and sequenced. The bacteria identified were affiliated to the genus *Clostridium* sp., *Bdellovibrio* sp., *Flavisolibacter* sp., *Burkholderia* sp. and *Herbaspirillum* sp. The gene selected for the study was affiliated with *Burkholderia* sp due to its potential degradation reported in the literature. The study strain was acquired in public banks, and was selected to *Burkholderia thailandensis*. For the determination of fipronil and its metabolites, the method QuEChERS follow by analysis with GC-MS was validated to fipronil, fipronil sulfide, and fipronil sulfone . To this method was found the follow conditions: detection and quantitation limits were 0.06 mg L<sup>-1</sup> 0.25 mgL<sup>-1</sup> respectively, the linearity was 0.99, the precision was about 10.9 to 7.3% for the lowest level and 1.84 to 1.24% for the highest level. We calculated the recovery of the extraction method which ranged between 78 and 98%. Then were assembled eight treatments, to evaluate the degradation of the fipronil and the formation of its two degradation products biotic, fipronil sulfide and fipronil sulfone, when using humic substances in fertilization. The *Burkholderia thailandensis* degraded approximately 0.75 mg L<sup>-1</sup> fipronil with or without the presence of SH in the study soil, but it was not possible to quantify the degradation products of the fipronil (fipronil sulfide and fipronil sulfone) because both were detected but cannot be quantified because their values are below the limit of quantification of the method.

Key - Words: soil, DNA, degradation, *Burkholderia* sp

---

**Lista de Figuras**

Figura 1: Distribuição da cana - de açúcar no estado de São Paulo.....	3
Figura 2: Modelo tridimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1997) para a estrutura dos ácidos húmicos. ....	5
Figura 3: Etapas da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Polymerase Chain reaction) .....	11
Figura 4: Etapas da clonagem do DNA utilizando um vetor plasmidial. ....	13
Figura 5: Rota de degradação do Fipronil com modificações.....	16
Figura 6: Mapa da região onde foi feita a coleta da amostra.....	22
Figura 7: Esquema da amostragem do solo.....	23
Figura 8: Esquema mostrando o método de extração QuEChERS.....	34
Figura 9 - Gel de eletroforese (agarose 1,4%) feito com produto da PCR utilizando DNA bruto extraído do solo sob manejo de cana-de-açúcar por meio dos métodos não comerciais e o kit de extração comercial de DNA e o primer 968 F/ GC – 1393 R .....	38
Figura 10 - Gel de eletroforese (agarose 0,8%) feito com DNA extraído das bactérias do solo sob manejo de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo apenas fipronil como única fonte de carbono e o primer 27F/1100R .....	40
Figura 11 - Gel de eletroforese (agarose 1,4 %) feito com o produto da PCR com DNA extraído das bactérias do solo sob manejo de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo apenas fipronil como única fonte de carbono e o primer 27F/1100. .	40
Figura 12: Árvore filogenética resultado da clonagem e sequenciamento das bactérias extraídas do solo .....	42
Figura 13: Tempos de retenção dos compostos em estudo, fipronil sulfeto, fipronil e fipronil sulfona. ....	45
Figura 14: Curva analítica dos compostos analisados, aplicando o método QuEChERS / GC – MS , avaliando as concentrações 0,25 a 2,75 mgL <sup>-1</sup> . ....	48
Figura 15: Cromatogramas com as áreas dos picos dos limites de quantificação do método QuEChERS / GC – MS, 0,25 mgL <sup>-1</sup> (cromatograma 1), e as áreas dos picos do fipronil e dos produtos de degradação fipronil sulfeto e fipronil sulfona do tratamento 1 (cromatograma 2).....	57

---

**Lista de Tabelas**

Tabela 1 - Características químicas do Fipronil .....	15
Tabela 2: Planejamento utilizado para a realização do teste de Youden.....	18
Tabela 3 - Constituição do meio de cultura basal Zinder.....	27
Tabela 4 - Primers utilizados para a amplificação do DNA extraído do solo por PCR. .....	29
Tabela 5 - Composição do meio LB (meio Luria – Bertami).....	31
Tabela 6: Esquema da montagem do experimento para análise da degradação bacteriana do fipronil quando se utiliza substâncias húmicas. ....	35
Tabela 7 - Absorbância e concentração do DNA extraído do solo a partir dos métodos empregados.....	36
Tabela 8: Variações dos parâmetros do método QuEChERS / GC – MS para avaliação de sua robustez.....	46
Tabela 9: Respostas obtidas no teste de robustez com a concentração de 2,5 mg L <sup>-1</sup> . .....	47
Tabela 10: Resultado da robustez segundo teste de Student variando o tempo de retenção e a área do pico.....	47
Tabela 11: Resultados obtidos no cálculo da linearidade do método analítico QuEChERS / GC – MS, para os analitos em estudo todos na faixa de 0,25 a 2,75 mgL <sup>-1</sup> . ....	48
Tabela 12: Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), para os compostos estudados.....	49
Tabela 13: Precisão do método QuEChERS / GC - MS , para os compostos analisados. ....	50
Tabela 14: Valores de exatidão intra-dia e inter-dia calculados para o método QuEChERS/ GC – MS.....	50
Tabela 15: Recuperação do método QuEChERS/ GC - MS , para os compostos analisados. ....	51
Tabela 16: Repetibilidade do método QuEChERS/ GC - MS , para os compostos analisados .....	52
Tabela 17: Análise dos macronutrientes e pH presentes no solo após o clean- up. ....	52



---

Tabela 18: Análise dos micronutrientes presentes no solo após o Clean – up. ....	53
Tabela 19: Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por <i>Burkholderia thailondensis</i> utilizando os tratamentos 1 e 5.....	54
Tabela 20: Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por <i>Burkholderia thailondensis</i> na através dos tratamentos 2,3 e 4. ....	55
Tabela 21: Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por <i>Burkholderia thailondensis</i> na através dos tratamentos 6, 7, e 8. ....	56
Tabela 22: Tabela de comparação das médias dos tratamentos utilizando o teste de Tukey de comparação de médias. ....	59

---

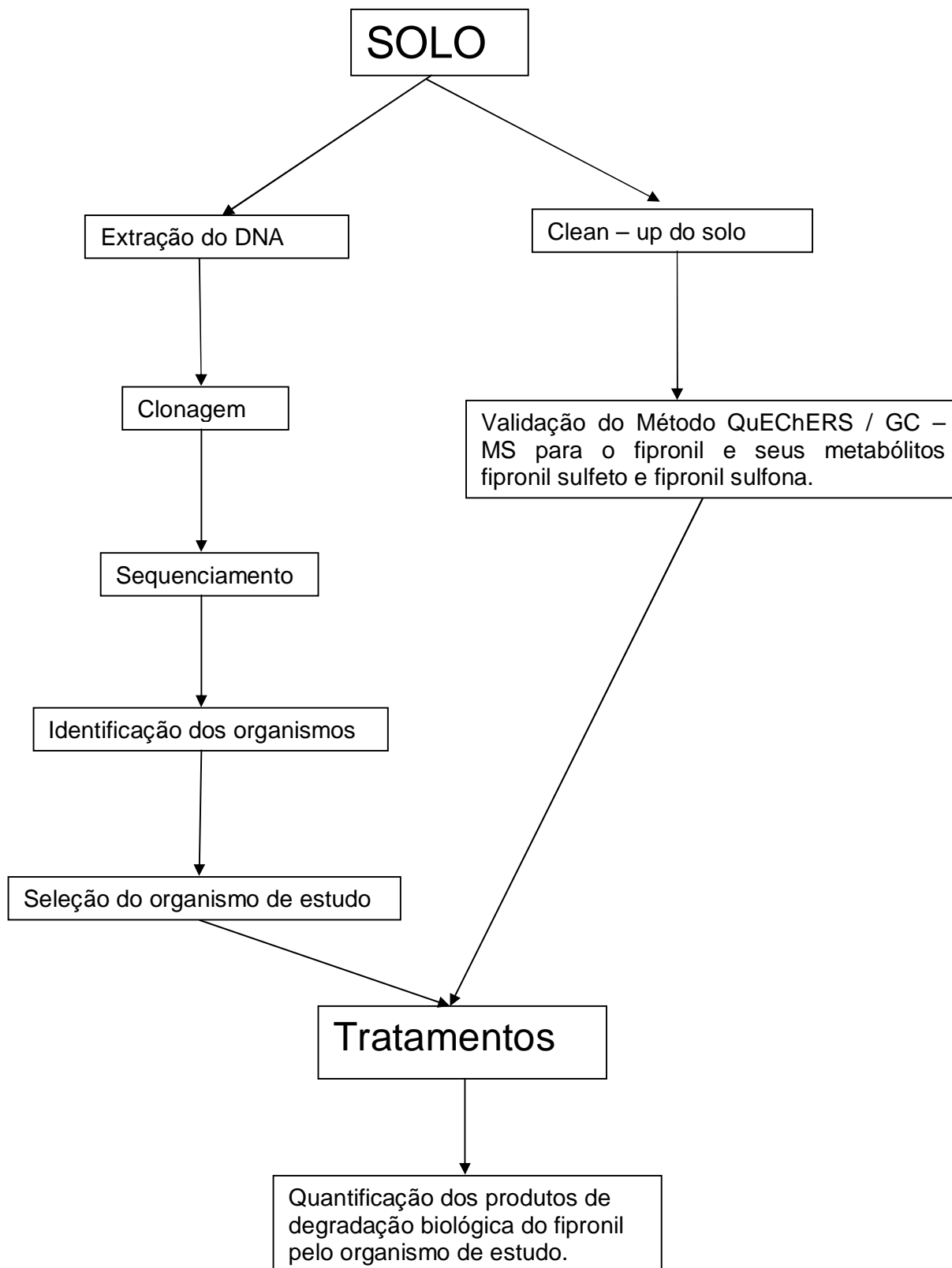
**Sumário**

Resumo .....	i
Abstract .....	ii
Lista de Figuras .....	iii
Lista de Tabelas .....	iv
Apresentação da Tese.....	viii
1. Introdução .....	1
2.Revisão da Literatura.....	3
2.1 Canas - de - açúcar .....	3
2.2 Substâncias Húmicas.....	4
2.3 Microbiologia do Solo .....	7
2.4 Isolamento e determinação dos microrganismos do solo.....	9
2.5 Fipronil e seus metabólitos .....	14
2.6 Técnicas analíticas para determinação do fipronil e seus metabólitos no solo....	16
2.7 Validação do método analítico para a determinação do fipronil e seus metabólitos no solo .....	17
2.6.1 Robustez .....	17
2.6.2 Precisão.....	19
2.6.3 Exatidão.....	19
2.6.4 Linearidade.....	19
2.6.5 Repetibilidade .....	20
2.6.6 Recuperação.....	20
2.6.7 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ).....	20
3. Objetivos .....	21
4 Materiais e Métodos .....	22
4.1 Área de Estudo .....	22
4.2 Amostragem .....	23
4.3 Técnicas propostas para extração do DNA do solo.....	23
4.3.1 Descrição da técnica proposta por Viestel.....	24
4.3.2 Descrição da técnica proposta por Selbach .....	24
4.3.3 Descrição da técnica proposta por Griffiths com modificações .....	25
4.3.4 Descrição da técnica proposta por Direito .....	26
4.4 Extração do DNA do solo utilizando o Kit comercial de extração de DNA de solo. ....	26
4.5 Isolamento de microrganismos de amostras de solo capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono.....	26
4.4 Análise das soluções contendo o DNA extraído do solo .....	27
4.5.1 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA após cada técnica de extração empregada.....	28
4.5.2 Eletroforese em gel de agarose.....	28

---

4.5.3 PCR (Reação da Cadeia Polimerase - Polymerase Chain Reaction ).....	29
4.6 Clonagem e sequenciamento do produto da PCR do DNA do solo.....	30
4.7 Seqüenciamento do material clonado a partir do DNA extraído do solo .....	31
4.8 Replicação da bactéria utilizada no experimento.....	32
4.9 Condições cromatográficas e metodologia aplicada para determinação do fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfona e fipronil sulfeto).....	32
4.9.1 Equipamento utilizado.....	32
4.9.2 Padrões e soluções de trabalho.....	33
4.9.3 Clean – up do solo para validação do método .....	33
4.9.4 Método de extração QuEChERS.....	33
4.10 Experimento para verificar a degradação do fipronil por bactérias frente a utilização de substâncias húmicas.....	34
5. Resultados e Discussão.....	36
5.1 Avaliação da eficiência das técnicas de extração do DNA do solo .....	36
5.2 Bactérias do solo que utilizam o fipronil como fonte de carbono.....	39
5.3 Clonagem e sequenciamento das bactérias do solo cultivadas em laboratório...	41
5.4 Condições cromatográficas para análise dos fipronil e seus metabólitos em amostras de solo.....	44
5.5 Clean – up das amostras de solo seguido da aplicação do método QuEChERS. ....	45
5.6 Validação do método QuEChERS/ GC - MS para determinação do fipronil e seus metabólitos fipronil sulfeto e fipronil sulfona no solo.....	45
5.6.1. Robustez .....	46
5.6.2 Linearidade.....	47
Os coeficientes de correlação (r) obtidos foram superiores a 0,99, o que indica que o detector responde bem às concentrações analisadas, sendo um método linear na faixa de concentração estudada, como pode se observar na Tabela 11 e Figura 13. E os valores estão de acordo com a literatura <sup>(98, 159)</sup> e com o INMETRO <sup>(108)</sup> que diz que os valores do coeficiente de correlação não deve ser inferiores a 0,99.....	49
5.6.3 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) .....	49
5.6.4 Precisão.....	49
5.6.5 Exatidão.....	50
5.6.6. Recuperação.....	51
5.6.7. Repetibilidade .....	51
5.7 Resultado da degradação bacteriana do fipronil com e sem a utilização de substâncias húmicas.....	52
6. Conclusões.....	60
7. Trabalhos Futuros.....	61
8. Referências.....	62

## Apresentação da Tese



## 1. Introdução

A cana-de-açúcar é considerada uma planta tropical pertencente à família das gramíneas ou poáceas, é um híbrido muito cultivado principalmente em países tropicais, sua floração se inicia no outono, e a colheita acontece na estação seca, durante um período de três a seis meses <sup>(1)</sup>. No Brasil, o plantio da cana-de-açúcar iniciou-se no estado de São Paulo, por volta de 1522, e atualmente o interior paulista responsável pelo título de maior produtor mundial de cana-de-açúcar <sup>(2)</sup>.

A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em cerca de 8 mil hectares, distribuídos em todos os estados produtores<sup>(3)</sup> e a previsão do total de cana moída na safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas, com aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas <sup>(3)</sup>.

Devido à expansão da cultura canavieira, e aos altos custos dos insumos agrícolas, buscam-se formas de manejo do solo para aumentar a produtividade aliada a qualidade ambiental. Com esse propósito, pode-se fazer uso da aplicação de material orgânico no solo, pois de acordo com conceitos recentes, o manejo eficiente da matéria orgânica do solo constitui um método efetivo para melhorar a qualidade do mesmo e conseqüentemente melhorar a produtividade agrícola <sup>(4)</sup>.

A matéria orgânica é constituída por cerca de 80% de Substâncias Húmicas (SH) <sup>(5, 6)</sup>, as quais trazem importantes benefícios para a agricultura, como o fornecimento de nutrientes, a influência na estabilidade dos agregados do solo, interferência na infiltração e retenção de água e calor, e ainda na retenção de cátions. Além disso, as SH conseguem complexar substâncias tóxicas, o que está chamando a atenção de diversos pesquisadores, devido ao grande aumento no uso desses insumos na agricultura <sup>(7, 8, 9, 10)</sup>. Um desses insumos que está merecendo destaque é a utilização do inseticida fipronil na cultura de cana-de-açúcar.

O fipronil é um inseticida fenil pirazólico, que foi registrado como pesticida em 1996 nos EUA <sup>(11, 12)</sup>. Este composto é aplicado na cultura de cana-de-açúcar, logo após o plantio ou nos sulco de plantio com a finalidade de formar uma barreira contra os insetos. A meia vida deste composto varia entre 6 a 10 meses

---

dependendo do tipo de solo em que foi aplicado <sup>(13)</sup>. A degradação do fipronil por suas diferentes rotas formam os seguintes compostos: fipronil sulfona e fipronil sulfeto via oxidação biótica – abiótica e o fipronil disulfenil, que ocorre via fotólise <sup>(14)</sup>, sendo que a degradação biótica representa a mais significativa forma de degradação do fipronil no solo <sup>(15)</sup>.

O fipronil e seus metabólitos estão sendo determinados em solo e outras matrizes, por diversos métodos citados na literatura <sup>(14, 15, 16, 17, 18)</sup>, utilizando principalmente cromatografia gasosa acoplada a diferentes detectores, como massas, captura de elétrons, nitrogênio e fósforo <sup>(19, 20, 21)</sup>.

O solo é considerado um ecossistema complexo e heterogêneo, capaz de abrigar uma imensa diversidade biológica sendo a mesma não totalmente conhecida, pois estima-se que 99% das espécies de bactérias presentes no mesmo não podem ser extraídas, isoladas e cultivadas com técnicas tradicionais usadas em laboratório <sup>(22)</sup>.

Para isso a biologia molecular tem se apresentado como uma ferramenta importante em análises da microbiota do solo. A extração do DNA microbiano do solo é a etapa mais difícil de todo o processo, pois apresenta limitações, principalmente devido a presença de compostos contaminantes, como os ácidos húmicos e proteínas, que prejudicam a análise do DNA extraído <sup>(23)</sup>.

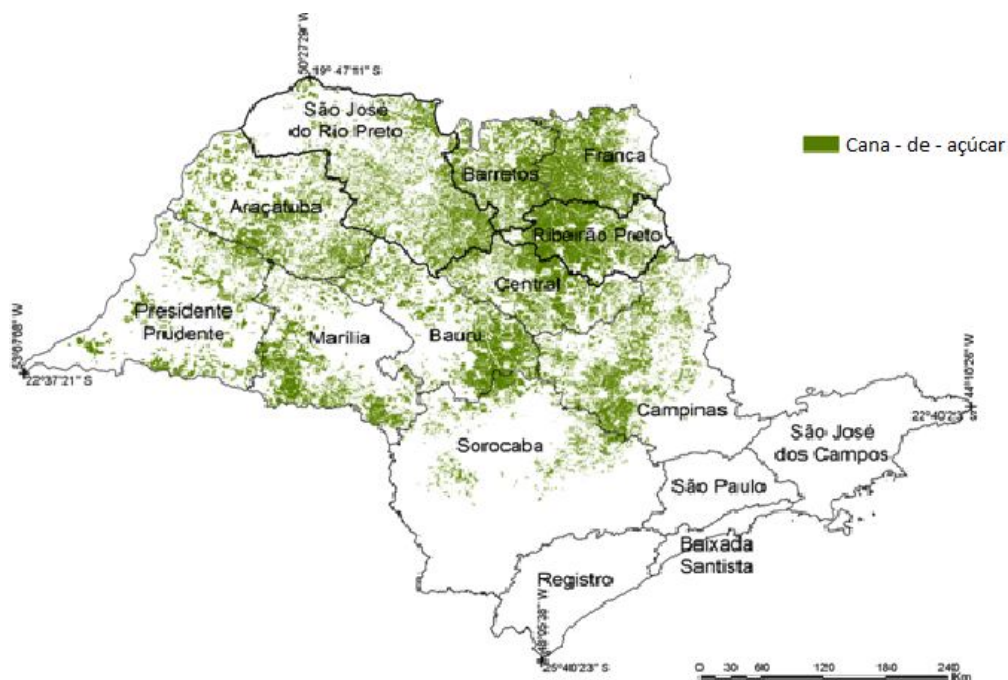
Devido ao crescente interesse em se conseguir relacionar os microrganismos do solo com os produtos de degradação do fipronil frente à utilização de substâncias húmicas na agricultura, o presente estudo tem como objetivo determinar, a partir de um solo cultivado com cana-de-açúcar bactérias que conseguem utilizar o fipronil como fonte de carbono, utilizando as técnicas da biologia molecular (extração de DNA, clonagem e sequenciamento) e fazer uso da cromatografia gasosa com detector de massas com a finalidade de verificar a degradação biológica do fipronil na presença de SH.

## 2.Revisão da Literatura

### 2.1 Canas - de - açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum*) tem a capacidade de estocar sacarose nos colmos. É uma planta tropical pertencente à família das gramíneas ou poáceas juntamente com os gêneros *Zea* (milho) e *Sorghum* (sorgo). Esta gramínea é denominada por alguns pesquisadores, como um híbrido complexo entre duas ou mais espécies do gênero *Saccharum* (*S. officinarum*, *S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense*, *S. edule* e *S. robustum*)<sup>(24)</sup>. Este híbrido é muito cultivado principalmente em países tropicais, onde se alternam as estações secas e úmidas. Sua floração se inicia no outono, e a colheita acontece na estação seca, durante um período de três a seis meses<sup>(1)</sup>.

No Brasil, o plantio da cana-de-açúcar iniciou-se em São Paulo, por volta de 1522, e atualmente é considerado o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, sendo o interior paulista responsável por essa estatística (Figura 1). Outros países também cultivam essa gramínea como Índia, Tailândia e Austrália.<sup>(2)</sup>



**Figura 1:** Distribuição da cana - de açúcar no estado de São Paulo<sup>(25)</sup>

---

A área cultivada com cana-de-açúcar que será colhida e destinada à atividade sucroalcooleira na safra 2012/13 está estimada em cerca de 8 mil hectares, distribuídos em todos os estados produtores. O estado de São Paulo é o maior produtor de cana-de-açúcar com 51,82%, seguido por Minas Gerais com 8,46%, Goiás com 8,69%, Paraná com 7,13%, Mato Grosso do Sul com 6,50%, Alagoas com 5,26% e Pernambuco com 3,63% <sup>(3)</sup>.

A previsão do total de cana-de-açúcar moída na safra 2012/13 é de 596,63 milhões de toneladas, com aumento de 6,5% em relação à safra 2011/12, que foi de 560,36 milhões de toneladas, significando que a quantidade que será moída deve ser 36,3 milhões de toneladas a mais do que na safra anterior <sup>(3)</sup>.

Com o aumento na safra de cana-de-açúcar, aumentou-se também o consumo de pesticidas, a venda desses produtos aumentaram mais de 72% entre 2006 e 2012, isso significa que a que o consumo médio de pesticidas que era pouco superior a 7 kg/ ha em 2005 passou a 10 kg/ha em 2011 ou seja um aumento de 43% . Além disso, as vendas de defensivos movimentaram quase US\$ 8,5 bilhões no Brasil em 2011 - o dobro do apurado em 2005, o que corresponde ao segundo maior mercado do mundo, atrás apenas dos Estados Unidos <sup>(26)</sup>.

Devido a essa crescente expansão da cultura canavieira, aliada a qualidade ambiental e aos altos custos dos insumos agrícolas, cada vez mais busca - se formas de manejo do solo com a finalidade de aumentar sua produtividade. Dentre as já conhecidas, pode-se ressaltar a aplicação de material orgânico na forma de adubo orgânico, pois de acordo com conceitos recentes, o manejo eficiente da matéria orgânica do solo constitui um método efetivo para melhorar a qualidade do mesmo e conseqüentemente melhorar a produtividade agrícola <sup>(4)</sup>.

## 2.2 Substâncias Húmicas

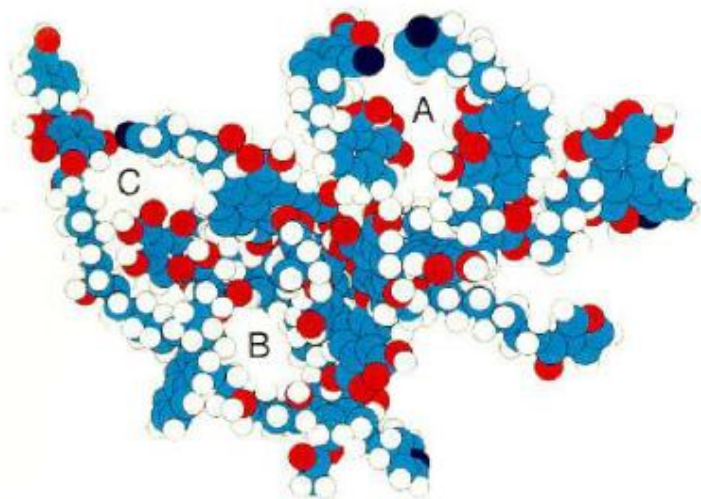
A matéria orgânica está presente em diversas partes dos ecossistemas, nos solos, sedimentos e ambientes aquáticos, apresentando diferentes estruturas e composição, bem como interação com cátions e com moléculas orgânicas <sup>(27)</sup>.

No solo considera-se matéria orgânica, todos os compostos que contenham carbono orgânico, dessa forma para melhor classificá-la, pode-se dividi-la em dois



grupos distintos, as biomoléculas (substâncias não húmicas) e as substâncias húmicas (SH). O grupo das biomoléculas é representado pelas ceras, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, já o grupo das substâncias húmicas é constituído por ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, e as huminas, <sup>(28,29)</sup>.

As SH são formadas quando substâncias que são consideradas não húmicas se degradam por ação microbiana <sup>(30)</sup>. Geralmente esses compostos formados são ricos em carbono, oxigênio e hidrogênio, podem estar ligados a grupos funcionais como OCH<sub>3</sub> (metoxilas), OH (alcoois) e COOH (carboxilas), e ainda pequenas quantidades de nitrogênio, fósforo e enxofre orgânico (Figura 2) <sup>(31)</sup>. As SH podem ser diferentes, pois, dependem da natureza das unidades que a constituem, composição das cadeias laterais e dos grupamentos funcionais <sup>(32)</sup>.



**Figura 2:** Modelo tridimensional proposto por Schulten e Schnitzer (1997) para a estrutura dos ácidos húmicos. Na representação o carbono em azul o oxigênio em vermelho o nitrogênio em preto e o hidrogênio em branco. As letras A, B e C são espaços vazios <sup>(33)</sup>.

As SH representam praticamente a totalidade da matéria orgânica do solo e pelo fato de serem muito reativas devido à natureza de seus grupos funcionais, correspondem à porção envolvida na maioria das reações químicas deste sistema <sup>(34)</sup>. Por esse motivo, as substâncias húmicas merecem destaque em muitas pesquisas, já que representam um dos principais reservatórios de carbono no solo e ainda possuem a capacidade de interagir com a atmosfera, modificando a

---

concentração de CO<sub>2</sub>.<sup>(35)</sup> Esse processo é conhecido como seqüestro de carbono e se dá quando o CO<sub>2</sub> da atmosfera é capturado pelas plantas; na presença de água, luz e minerais, e durante a fotossíntese são transformados em biomassa vegetal. Durante o processo biológico de decomposição dos vegetais por microrganismos, parte do carbono é devolvido à atmosfera na forma de CO<sub>2</sub>, parte é incorporado ao tecido microbiano e parte é convertido em húmus após a decomposição da biomassa<sup>(36)</sup>.

As SH possuem características importantes para a agricultura como, o fornecimento de nutrientes para as culturas, retenção de cátions, complexação com metais potencialmente tóxicos e com micronutrientes<sup>(7)</sup>. Além das citadas, uma outra função conhecida das SH é a sorção, que é um processo interfacial e refere-se à adesão ou atração de uma ou mais camadas iônicas ou moleculares para uma determinada superfície. A sorção de pesticidas, que por serem moléculas orgânicas nos mais variados arranjos, é bastante complexo quando se compara com a sorção de íons que servem como nutrientes para as plantas<sup>(37)</sup>.

As forças que atuam na sorção das moléculas orgânicas podem ser as mais variadas, como as ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, as forças eletrostáticas, ligações covalentes e interações hidrofóbicas, sendo que estes mecanismos podem atuar concomitantemente na sorção de uma mesma molécula. Atualmente já se conhece algumas das forças de ligação que atuam em determinadas classes de pesticidas, como exemplo os herbicidas pertencentes ao grupo das triazinas, bem como os que possuem cargas em sua estrutura, como o Paraquat e o Diquat<sup>(37)</sup>. As moléculas mais apolares, como é o caso das sulfonilúreas, apresentam interações hidrofóbicas<sup>(38)</sup>. Já as forças físicas como as de Van der Waals e as ligações de hidrogênio, estão sempre atuando sobre as moléculas, independentemente do envolvimento de outros mecanismos de ligação.

Além das interações entre as mais diferentes moléculas orgânicas, as SH influenciam na estabilidade dos agregados do solo que interferem diretamente na infiltração, retenção de água e calor e ainda na aeração do solo<sup>(7; 8; 9)</sup>. Esses fatores estão relacionados diretamente à atividade microbiana desse ecossistema. Em relação aos benefícios que as SH conferem ao solo, pode-se dizer que estas substâncias podem ser de fundamental importância na capacidade produtiva de solos agriculturáveis<sup>(7)</sup>. O aumento da demanda por mais alimentos e de melhor

---

qualidade aliado ao custo de fertilizantes e a crescente preocupação com a poluição ambiental fazem do uso de substâncias húmicas na agricultura uma opção atrativa do ponto de vista econômico, em razão da ciclagem de carbono e nutrientes.

O carbono orgânico (CO) presente na estrutura das SH afeta de forma direta a qualidade dos solos <sup>(39)</sup>, além de ser um dos componentes principais nos diversos processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem nos ecossistemas terrestres, dentre os quais se destacam: a estruturação do solo, o suprimento de nutrientes, a capacidade de troca iônica, o tamponamento do pH do solo, fonte de carbono e energia para os microrganismos do solo, redução da contaminação de águas superficiais pelo fenômeno de adsorção de poluentes, propicia a disponibilidade de ar e água às raízes das plantas e o desenvolvimento do sistema radicular devido a adsorção de nutrientes <sup>(40,41, 42)</sup>.

Apesar de conhecer as propriedades das substâncias húmicas em relação a fertilidade do solo, como já citado anteriormente, pouco se sabe sobre sua influência na microbiota do solo, principalmente frente aos pesticidas utilizados no controle de insetos, ácaros, nematóides e plantas daninhas.

### **2.3 Microbiologia do Solo**

O solo é um ecossistema altamente complexo, formado em sua maior parte por uma estrutura sólida e heterogênea, e com características físicas, químicas e biológicas distintas <sup>(43)</sup>. Deve-se considerar no solo a presença da biota, merecendo destaque a comunidades de microrganismos. Sabe-se que os microrganismos do solo são fundamentais para os processos terrestres, desempenhando papéis importantes nos ciclos biogeoquímicos, além de contribuir para a nutrição das plantas e melhoria das características químicas e físicas deste sistema <sup>(44, 22)</sup>.

Apesar da manutenção da biodiversidade estar se tornando uma preocupação geral da sociedade pelo fato das constantes agressões ao meio ambiente, as atenções estão predominantemente voltadas para as comunidades animais e vegetais, e muito pouco preocupam-se com a biodiversidade dos microrganismos <sup>(22,45)</sup>. Mas essa visão deve mudar, pois estima-se que em um grama de solo existam

---

cerca de  $4-6 \times 10^6$  células procarióticas, sendo  $10^6 - 10^8$  genomas pertencentes a diferentes espécies <sup>(46)</sup>.

O solo está deixando de ser simplesmente o local de crescimento das plantas e passando a ser visto como o habitat para uma série de microrganismos, que podem influenciar diretamente na produtividade agrícola <sup>(47)</sup>. Por esse motivo a relação entre os insumos agrícolas e os microrganismos do solo está se tornando uma importante área de estudo, que mostra como as comunidades microbianas do solo podem ser influenciadas pelo uso dos mesmos <sup>(48, 49, 50, 51)</sup>.

Dentre os insumos agrícolas em estudo o que vem merecendo é o uso dos pesticidas. Por definição, pesticidas são compostos bioativos, sendo substâncias tóxicas que influenciam direta ou indiretamente na produtividade agrícola <sup>(52, 53, 54)</sup>. Na literatura há estudos mostrando o impacto que esses compostos podem causar em organismos não alvo no solo <sup>(52, 55, 56,)</sup>, bem como mostrando que os efeitos podem ser menores ou transitórios quando os mesmos tem sua aplicação feita na dose correta <sup>(57,58)</sup>. Apesar disso, poucos trabalhos relacionam a microbiologia do solo com o uso de pesticidas e como esses microrganismos respondem às aplicações constantes desse insumo agrícola tão utilizado nas lavouras <sup>(59, 60)</sup>.

Portanto, entender como ocorrem os processos microbianos no solo é de grande importância para o manejo da produtividade agrícola; buscando atualmente buscam-se novas formas de aumentar a produção sem causar danos à biota do solo como plantio direto, manejo integrado de pragas, adição de matéria orgânica como fonte de nutrientes na solução do solo, entre outros. Quando uma dessas práticas agrícolas alternativas é aplicada ao solo, pode-se encontrar intensa atividade microbiana, quando comparado com aqueles tratados sob manejo convencional <sup>(61,62)</sup>. Quando formas alternativas de manejo de solos são empregadas, observa-se bons resultados em relação a sua microbiota, como alta capacidade de retenção de água, menor compactação e agregação física das partículas, estabilização do pH, formando assim um ambiente propício para o desenvolvimento de microrganismos, devido principalmente ao alto teor de matéria orgânica <sup>(61, 62)</sup>. Estudos mostram que existe uma estreita relação entre a matéria orgânica e a biomassa microbiana presente no solo, que quando se altera sua quantidade no solo, pode-se observar uma mudança na mesma proporção dos organismos presentes no mesmo. Portanto sugere-se essa relação seja utilizada como indicador de qualidade do solo <sup>(63, 64)</sup>.

---

Esse fato também foi observado quando utilizou-se o plantio direto e o cultivo convencional em diferentes rotações de culturas em Londrina - PR, em que pode - se observar solos submetidos ao manejo não convencional, isto é sem o uso de fertilizantes e pesticidas. Os maiores valores de biomassa microbiana foram observados no plantio não convencional quando comparados àqueles com manejo convencional <sup>(65, 66)</sup>.

Além da atividade microbiana dar manutenção ao solo e melhorar a produtividade agrícola, esta vem sendo reconhecida com uma nova função eliminar produtos químicos do ambiente <sup>(67)</sup>. Para isso os microrganismos exibem duas estratégias metabólicas, a mineralização e o cometabolismo. Na mineralização, o substrato absorvido é degradado até carbono (C), água e sais inorgânicos, e no cometabolismo, o microrganismo transforma o pesticida, sem retirar energia para o seu desenvolvimento, geralmente isso ocorre através das reações oxidativas que envolvem as enzimas do grupo das oxigenases <sup>(68)</sup>.

A degradação microbiológica pode ser dificultada em função de diversas características químicas da molécula, como as ligações do cloro, halogênios, anéis aromáticos, entre outros <sup>(69)</sup> levando dessa forma a uma menor mineralização das moléculas, devido a inibição da síntese de enzimas de microrganismos capazes de atuar na sua degradação <sup>(70)</sup>.

Devido aos fatores apresentados, o solo sobre uma perspectiva funcional é fora de questão, responsável pela sustentabilidade das outras formas de diversidade terrestre, ajudando a todos os ecossistemas, os quais incluem produção de alimentos e fibras, suplemento de água doce potável e remediação de poluentes, entre outras funções. Por esse motivo o solo está cada dia mais sendo objeto de estudo por parte de diversos pesquisadores que buscam novas alternativas para o melhor aproveitamento deste sistema tão complexo causando-lhe menos danos possível <sup>(71)</sup>.

## **2.4 Isolamento e determinação dos microrganismos do solo**

O solo contém uma ampla diversidade de microrganismos ainda não explorada. Métodos diretos para a determinação da microbiota do solo demonstram que a maior parte do microrganismos não foi isolada <sup>(72,73)</sup>. Pode-se dizer que não

---

existe um único meio de cultura capaz de reproduzir as condições de crescimento que os microrganismos encontram na natureza, principalmente um ambiente tão complexo como o solo <sup>(74)</sup>.

Métodos indiretos para a determinação quantitativa da diversidade microbiana do solo continuam sendo indispensáveis, mas não reproduzem a grande diversidade microbiana do solo <sup>(75)</sup>. Sabe-se que em um grama de solo pode haver até 10 bilhões de microrganismos, e uma quantidade imensurável de espécies <sup>(76)</sup>, além disso, menos de 1% desses microrganismos observados podem ser cultivados e caracterizados em laboratório. Devido a esse fato, o solo pode ser considerado como sendo desconhecido sob o aspecto da quantidade e da variedade de microrganismos <sup>(23)</sup>.

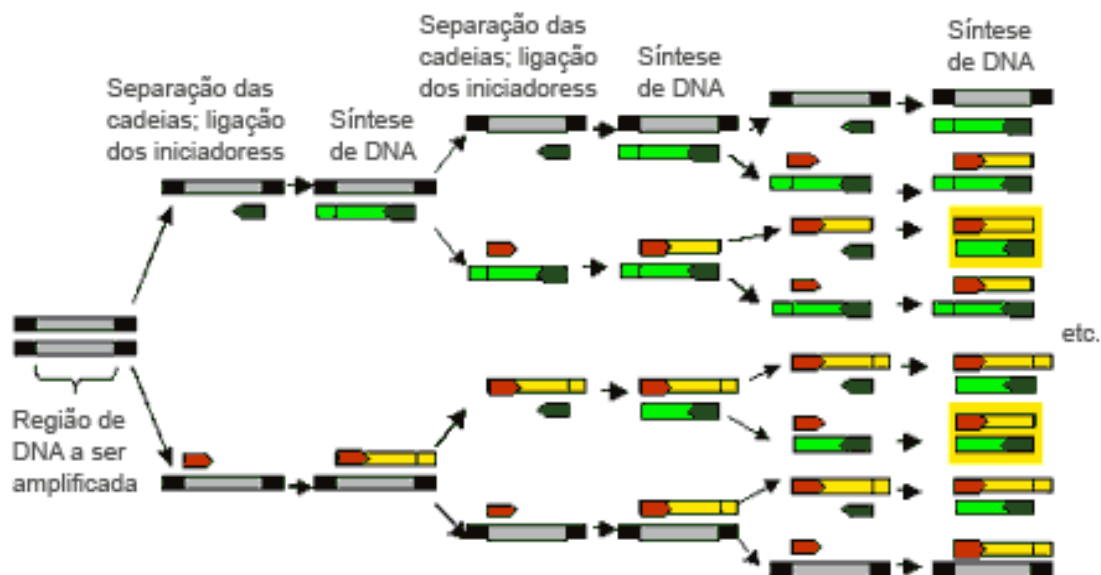
Considerando-se ainda o solo como sendo um ambiente praticamente inexplorado, apesar de muitos esforços no sentido de desenvolver novas técnicas que possibilitem seu estudo, a biologia molecular, com o isolamento e caracterização do DNA genômico e amplificação deste através de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) de genes funcionais, têm sido de grande importância em estudos de comunidades microbianas do solo. Tais técnicas ajudam a superar as limitações encontradas para a avaliação da microbiota ambiental, que são encontradas com o uso de técnicas convencionais de isolamento e cultivo em laboratório <sup>(77)</sup>.

Para se fazer a PCR, uma sequência genômica deve ser extraída do solo. Essa sequência deve ser pequena e ter uma região conservada para a maioria dos microrganismos do domínio em estudo. Essa região conservada torna possível a caracterização de espécies de forma filogenética, como é o caso da sequência 16 S do DNA ribossômico, que é uma sequência própria para estudos de procariontes <sup>(78)</sup>.

O gene 16S rDNA, é responsável por codificar os RNA ribossômicos 16S, componentes da subunidade 30S dos ribossomas, sítio de ocorrência da síntese de proteínas em todos os microrganismos. Suas sequências possuem trechos conservados, ou seja, ocorrem em quase todos os microrganismos. É possível, a partir dessas sequências, elaborar *primers* (iniciadores) chamados universais para regiões conservadas no início e no final do gene. Estes *primers* podem ser usados para amplificar via PCR as sequências internas do gene, contendo regiões variáveis

(79). Além do 16S rDNA, outros genes também são utilizados para a análise de diferentes grupos de microrganismos, como é o caso do gene 28S rDNA e 18S rDNA, aplicados na análise da comunidade de eucariontes (80).

A PCR consiste em três etapas: desnaturação, anelamento e extensão. Na desnaturação a fita dupla de DNA a ser amplificado é separada em duas fitas simples, elevando-se à temperatura entre 90 a 95 °C. A etapa seguinte é o anelamento onde bases complementares transformam fitas simples em duplas, para que isso aconteça necessita-se de *primers*; que junto com a fita simples do DNA formam um pequeno fragmento de DNA de dupla fita intacta, essa fase é feita a uma temperatura inferior a de desnaturação que é entre 45 a 70 °C. A última etapa é a de extensão, quando os *primers* encontram-se e ligam se aos segmentos complementares. A enzima DNA-Polimerase liga os nucleotídeos entre si, completando assim as fitas simples e tornando-as duplas (84), Figura 3.



**Figura 3:** Etapas da PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Polymerase Chain reaction) (81).

---

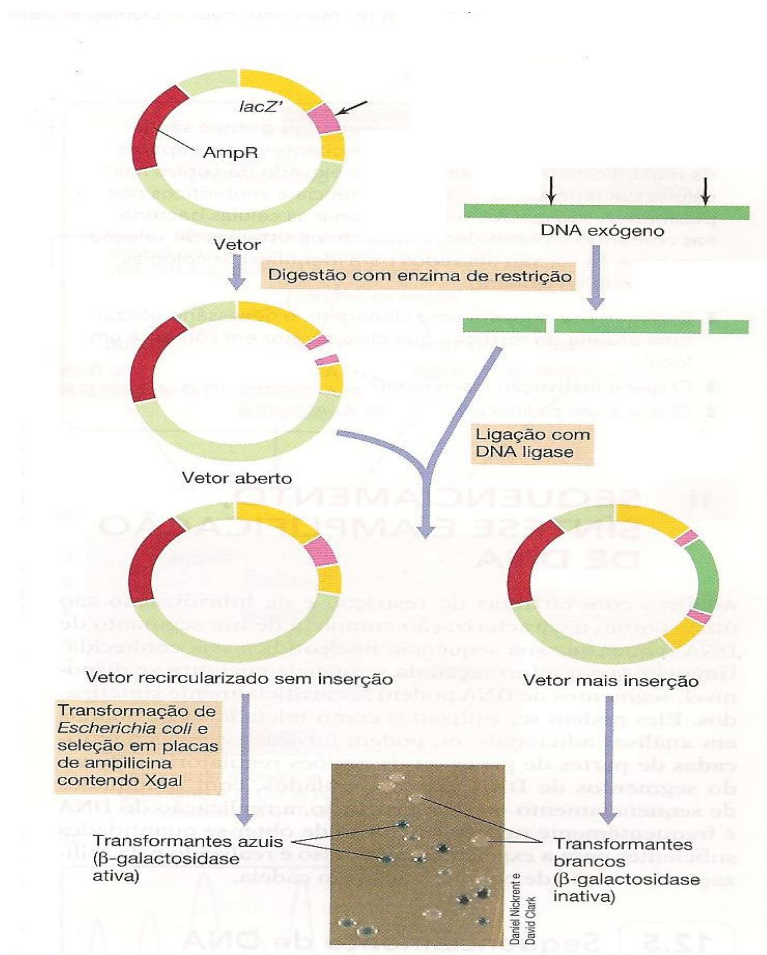
Com a finalidade de caracterizar os microrganismos presentes no solo, uma técnica muito utilizada é a do sequenciamento de DNA. Esta técnica, foi descrita primeiramente por Sanger <sup>(82)</sup>. O sequenciamento do DNA é considerado um dos feitos científicos mais importantes da ciência <sup>(83)</sup>.

O conhecimento do genoma dos mais diversos seres vivos só é possível determinando as sequências de nucleotídeos do DNA. Essas sequências são usadas para deduzir a função do gene, e a mesma é comparada com sequências de genes de função semelhante e conhecida, depositada em bancos públicos <sup>(84, 85)</sup>.

Para sequenciar um fragmento de DNA utilizando o método descrito por Sanger <sup>(82)</sup>, este fragmento precisa ser primeiramente clonado usando um vetor de clonagem, com a finalidade de originar um DNA recombinante <sup>(84, 85)</sup>.

O vetor de clonagem é na maioria das vezes uma molécula de DNA circular, que transporta o gene em estudo para o interior da célula hospedeira, geralmente uma bactéria. Este vetor possui elementos que permitem a auto-replicação do gene e ainda alguns genes marcadores como o de resistência a antibióticos que serve para a seleção das bactérias que receberam o vetor de clonagem. Na bactéria que serviu como célula hospedeira, o vetor de clonagem consegue multiplicar-se, produzindo diversas cópias idênticas de si e do fragmento de DNA ligado a ele. Após as divisões celulares das células é possível observar uma ou mais cópias da molécula de DNA recombinante. O DNA isolado pela clonagem já pode ser sequenciado <sup>(84, 85)</sup>. A Figura 4 representa as etapas da clonagem do DNA.





**Figura 4:** Etapas da clonagem do DNA utilizando um vetor plasmidial <sup>(86)</sup>.

Geralmente o DNA pode ser sequenciado utilizando procedimentos químicos, enzimáticos ou ainda o pirosequenciamento. O sequenciamento consiste em sintetizar uma fita de DNA complementar a que se deseja determinar a sequência <sup>(84, 85)</sup>.

Após a determinação da sequência de nucleotídeos de interesse (gene), ela deve ser comparada com sequências de genes depositadas em bancos públicos, que reúnem sequências já estudadas de DNA e de aminoácidos e estruturas de proteínas. Os principais bancos são, o GenBank, o EBI (European Bioinformatics Institute), o DDBJ (DNA Data Bank of Japan), o PDB (Protein Data Bank) e o RDP (ribossomal Database Project) que é específico para o 16S de procariontes. O alinhamento de sequências tem como objetivo determinar a similaridade entre duas ou mais sequências, ou a similaridade entre fragmentos das mesmas <sup>(84, 85, 87)</sup>. Essa

---

similaridade é feita por meio de programas computacionais, um dos programas mais usados é o programa BLAST, o mesmo encontra-se disponível na internet <sup>(87)</sup>.

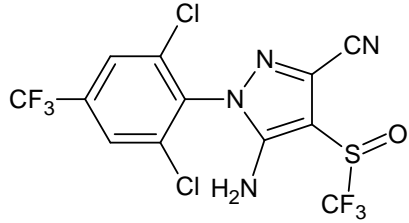
## 2.5 Fipronil e seus metabólitos

O fipronil é um inseticida fenil pirazólico, sintetizado em 1987 por Rhône – Poulenc Agro Company (atual Bayer Cropscience) o qual foi registrado como pesticida em 1996 nos EUA. Este pesticida atua no sistema nervoso central, especificamente no sistema GABA (ácido gama-aminobutírico), o qual se apresenta ativo principalmente por ingestão <sup>(88, 89)</sup>. Por esse motivo o fipronil tem sido amplamente utilizado para controle das formas adultas e larvais de insetos em diversas culturas, dentre elas a cana-de-açúcar onde esse inseticida é responsável pelo controle de formigas, cupins e larvas de coleópteros <sup>(88)</sup>.

A disseminação rápida desse inseticida deve-se ao fato de sua alta eficiência no controle de insetos resistentes a outros produtos comercializados. O composto é ingrediente ativo de diversas formulações, como Termidor®, Frontiline®, Regent®, todas pertencentes à Bayer Cropscience <sup>(90)</sup>.

No Brasil o produto Regent WG 80® começou a ser comercializado no ano 2000, na região nordeste. Este produto contém 80% do ingrediente ativo do fipronil em sua composição <sup>(11,12)</sup>. O fipronil é aplicado na cultura da cana-de-açúcar nos meses de junho e agosto, logo após o plantio ou nos sulco de plantio. Esse procedimento tem como finalidade formar na superfície do solo, uma barreira contra os insetos. A concentração recomendada desse produto pelo fabricante é de 200 a 500 g ha<sup>-1</sup> dependendo do inseto a ser controlado <sup>(11, 12)</sup>. As características químicas do fipronil são apresentadas na Tabela1.

**Tabela 1** - Características químicas do Fipronil <sup>(91)</sup>.

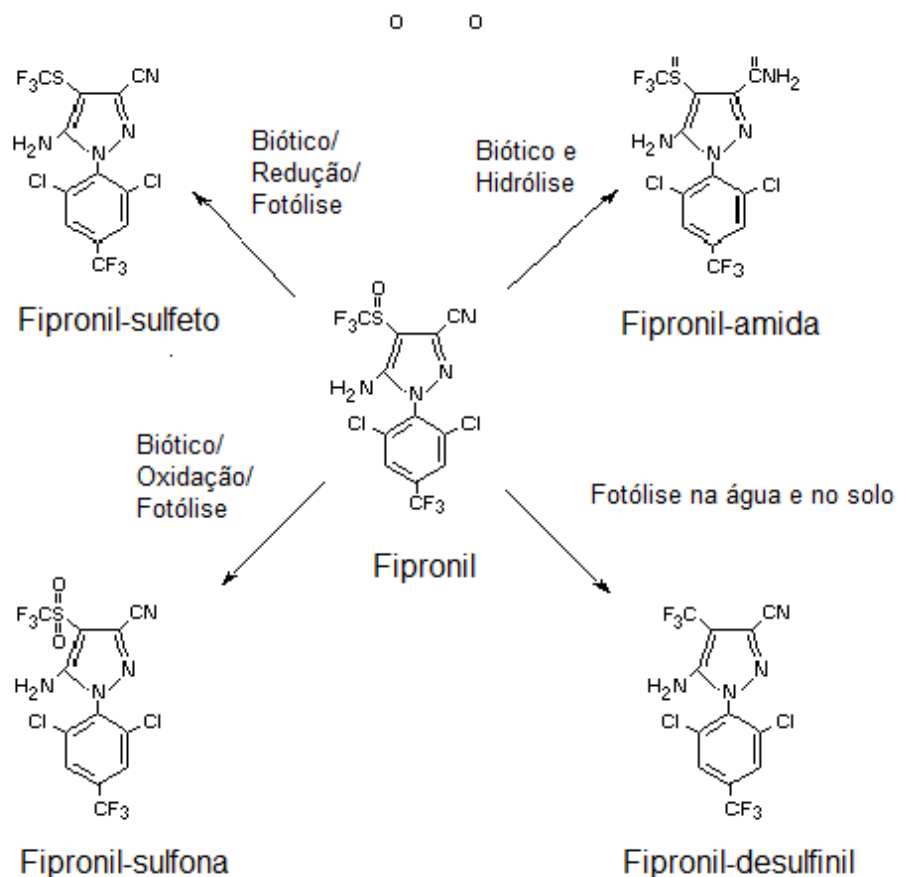
Fipronil	
Classe	Inseticida
Fórmula Molecular	C <sub>12</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>6</sub> N <sub>4</sub> OS
Número CAS (Chemical Abstracts Service)	120068-37-3
Massa Molar	437,2 g mol <sup>-1</sup>
Classe Toxicológica	II – altamente tóxico
Ponto de Ebulição	200 °C
log Low	4,0
Solubilidade a 20 °C	pH 5 = 1,9 mg L <sup>-1</sup> ; pH 9 = 2,49 mg L <sup>-1</sup>

O fipronil quando atinge o ambiente pode ser degradado por diversas vias, como hidrólise, fotólise, oxidação ou redução, resultando assim nos produtos de degradação que são: fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil desulfenil e o fipronil amida como pode ser observado na Figura 5 <sup>(92)</sup>.

A meia vida do fipronil em condições aeróbicas pode variar de 6 a 10 meses, dependendo do tipo de solo em que foi aplicado. A degradação biótica representa a mais significativa forma de degradação do fipronil no solo <sup>(14, 15)</sup>.

Os principais metabólitos do fipronil formados na lavoura são o fipronil sulfona via oxidação biótica – abiótica e o fipronil disulfenil, que ocorre via fotólise <sup>(14)</sup>. Além disso, os metabólitos do fipronil (sulfona, sulfeto e desulfenil) ainda conseguem agir no sítio receptor GABA e são biologicamente ativos como o seu precursor <sup>(15)</sup>.

Os produtos de degradação do fipronil são altamente tóxicos para invertebrados. O desulfenil é estável e ainda mais tóxico do que o fipronil, assim como o fipronil sulfona é sete vezes mais tóxico e fipronil sulfeto é duas vezes mais tóxico para invertebrados aquáticos do que o fipronil. Além disso, estudos mostraram que o desulfenil tem um potencial de bioacumulação em tecidos gordurosos <sup>(93, 94)</sup>.



**Figura 5:** Rota de degradação do Fipronil com modificações <sup>(96)</sup>.

## 2.6 Técnicas analíticas para determinação do fipronil e seus metabólitos no solo

A maioria das pesquisas envolvendo o fipronil descreve os produtos de degradação ou sua dinâmica no meio ambiente (água, solo, vegetais) e utilizam em sua grande maioria cromatografia gasosa (GC). Segundo a literatura citada, essa técnica é a mais utilizada para determinar o fipronil e seus metabólitos em que geralmente o cromatógrafo está acoplado a um detector de captura de elétrons (GC-ECD) ou a um detector de massas (GC-MS). <sup>(19, 20, 21)</sup>.

A utilização da cromatografia gasosa para a determinação do fipronil e seus metabólitos no solo pode ser encontrado em diversos estudos na literatura, dentre elas está o estudo do fipronil e seus metabólitos sob no cultivo da cana-de-açúcar <sup>(96)</sup>; o tempo de permanência do fipronil e seus metabólitos em dois diferentes tipos

de solo em condições de laboratório <sup>(97)</sup>; adsorção de diferentes pesticidas dentre eles o fipronil em diferentes tipos de solo na Índia <sup>(98)</sup>; distribuição do fipronil e seus metabólitos no solo a partir de sementes revestidas <sup>(99)</sup>

Além de uma técnica para determinação de um composto orgânico, necessita-se ainda de um método eficiente para extraí-lo da matriz. Atualmente na literatura encontram-se diversos métodos para a extração do fipronil dentre eles SPME (microextração em fase sólida - solid phase micro extraction) <sup>(14)</sup>; MSPD (dispersão da matriz em fase sólida - matrix solid phase dispersion) <sup>(15)</sup>; LLE (extração líquido líquido - liquid liquid extraction) e líquido-sólido <sup>(16)</sup>; SPE (extração em fase sólida - solid phase extraction) <sup>(17,18)</sup>.

Outro método que está sendo bastante utilizado para a determinação do fipronil é o QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe) <sup>(100)</sup>. Esse método foi utilizado para determinar resíduos de pesticidas em água e sedimento <sup>(101)</sup>, em caldo de cana <sup>(102)</sup>, de amostras de solo em lavoura de arroz irrigado <sup>(103)</sup>.

## **2.7 Validação do método analítico para a determinação do fipronil e seus metabólitos no solo**

Para se aplicar um novo método de extração que possa ser confiável, o mesmo deve passar pelo processo de validação. A validação de um método começa no planejamento da estratégia analítica e continua durante todo o seu desenvolvimento <sup>(104,108,107)</sup>

No Brasil existem duas agências credenciadoras que possuem normas para validação de métodos a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que disponibiliza a RE n° 899, de 29/ 05/2003 <sup>(104)</sup> e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) com a DOQ-CGCRE-008, de março/ 2003 <sup>(107)</sup>.

Neste estudo empregaram-se as seguintes diretrizes para validação do método: robustez, precisão, exatidão, linearidade, repetibilidade, recuperação, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) <sup>(105)</sup>.

### **2.7.1 Robustez**

A robustez mede a sensibilidade do método frente a pequenas variações <sup>(106)</sup>. Pode-se dizer que um método é robusto se o mesmo se mostrar insensível a pequenas variações que possam ocorrer durante sua execução.

Para avaliar a robustez de um método, pode-se recorrer ao teste de *Youden* <sup>(107)</sup> que também permite ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações <sup>(108)</sup>.

Para o teste da robustez foi estabelecido que as letras *A, B, C, D, E, F* e *G* são os níveis altos de sete parâmetros diferentes e que podem influenciar no resultado, já as letras *a, b, c, d, e, f* e *g* são os níveis baixos, ou seja, de menor valor nominal. Percebe-se que se trata de um planejamento fatorial  $2^7$ , tendo, portanto, 128 combinações diferentes, entretanto foi possível escolher um subconjunto de 8 dessas combinações, por isso foram feitos apenas 8 experimentos. O conjunto dessas combinações especificando os valores dos sete fatores a serem utilizados nos 8 experimentos está apresentado na Tabela 2. Os resultados das análises são designados pelas letras *s, t, u, v, w, x, y* e *z*.

**Tabela 2:** Planejamento utilizado para a realização do teste de Youden.

	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>23</b>	<b>123</b>	<b>Resultados</b>
1	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<b>s</b>
2	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	<i>D</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<b>t</b>
3	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	<i>E</i>	<i>f</i>	<i>g</i>	<b>u</b>
4	<i>A</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>F</i>	<i>G</i>	<b>v</b>
5	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	<i>d</i>	<i>e</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	<b>w</b>
6	<i>a</i>	<i>B</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	<i>E</i>	<i>f</i>	<i>G</i>	<b>x</b>
7	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>C</i>	<i>D</i>	<i>e</i>	<i>f</i>	<i>G</i>	<b>y</b>
8	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>D</i>	<i>E</i>	<i>F</i>	<i>g</i>	<b>z</b>

A significância do teste de robustez foi avaliado por meio da estimativa de variância usando o teste t com 95% de confiança <sup>(109)</sup>

### 2.7.2 Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos entre duas amostras independentes de concentrações iguais. A precisão é geralmente expressa como desvio padrão ou desvio padrão relativo <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>.

### 2.7.3 Exatidão

A exatidão de um método analítico é verificada quando são obtidos resultados muito próximos em relação ao valor verdadeiro. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença porcentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>.

$$\text{Exatidão} = \left[ 1 - \left( \frac{V_r - V_d}{V_r} \right) \right] * 100$$

$V_r$  = valor real esperado

$V_d$  = valor médio injetado

### 2.7.4 Linearidade

A linearidade é a capacidade de um método analítico de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, em uma dada faixa de concentração. A linearidade de um método pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados. <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>.

---

### 2.7.5 Repetibilidade

A repetibilidade é o grau de concordância dos resultados de medições sucessivas de uma mesma amostra, efetuadas sob as mesmas condições de medição, chamadas de condições de repetibilidade, como: mesmo procedimento de medição, mesmo observador, mesmo instrumento usado sob mesmas condições, mesmo local e repetições em curto espaço de tempo <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>

### 2.7.6 Recuperação

A recuperação dos analitos pode ser estimada pela análise de amostras fortificadas com quantidades conhecidas dos analitos de estudo. As amostras devem ser fortificadas com os analitos em pelo menos três diferentes concentrações, por exemplo, próximo ao limite de quantificação, próximo à concentração máxima permissível e em uma concentração próxima à média da faixa de uso do método. A limitação desse procedimento é a de que o analito adicionado não está necessariamente na mesma forma que se apresenta na amostra <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>.

### 2.7.7 Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração do analito presente em uma amostra, que pode ser detectado, porém não necessariamente, quantificado sob as condições experimentais estabelecidas. Existem três formas de se determinar o LOD, dentre elas, a relação sinal-ruído que é a mais utilizada, pode - se dizer então que o sinal do analito deve ser três vezes maior que o ruído (3:1).

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis, nas condições experimentais estabelecidas. Igualmente ao LOD, o LOQ é medido através da relação sinal ruído, só que na proporção 10:1, ou seja, o sinal deve ser dez vezes maior que o ruído. O LOD e o LOQ são geralmente expressos em unidades de concentração <sup>(105, 106, 107, 109)</sup>



### 3. Objetivos

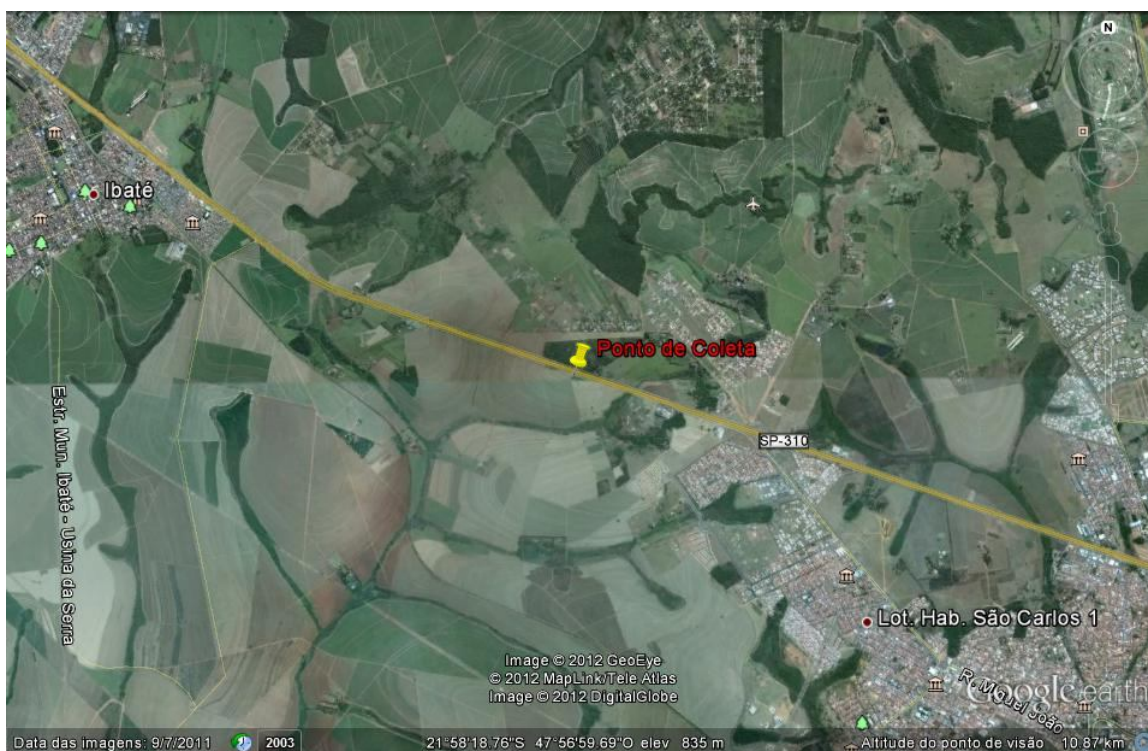
- ✓ Empregar uma técnica capaz de extrair o DNA bacteriano de um solo agriculturável.
- ✓ Identificar a partir do solo agriculturável bactérias capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono.
- ✓ Desenvolver e validar o método analítico utilizando QuEChERS e cromatografia gasosa acoplada ao detector de massas, para a análise do fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfeto e fipronil sulfona) presentes no solo.
- ✓ Identificação das bactérias presentes em solo contaminado com fipronil e a utilização de cepa microbiana adquirida em banco de cultivo, similar a identificada no solo, para ensaio de degradação de pesticida.
- ✓ Identificação das bactérias presentes em solo contaminado com fipronil e a utilização de cepa microbiana adquirida em banco de cultivo, similar a identificada no solo, para ensaio de degradação de pesticida juntamente com diferentes massas de substâncias húmicas.

## 4 Materiais e Métodos

### 4.1 Área de Estudo

Devido ao aumento do interesse em se estudar a microbiota de solos utilizados em cultivos intensivos, o solo utilizado neste estudo foi um latossolo vermelho amarelo, coletado em área agrícola com cultura de cana-de-açúcar (Figura 8), localizado na cidade de São Carlos, estado de São Paulo, a 235 km da capital, com altitude de 854 m, e coordenadas geográficas de 47° 30' - 48 ° 30' de longitude oeste e 21 °30' - 22 ° 30' de latitude sul.

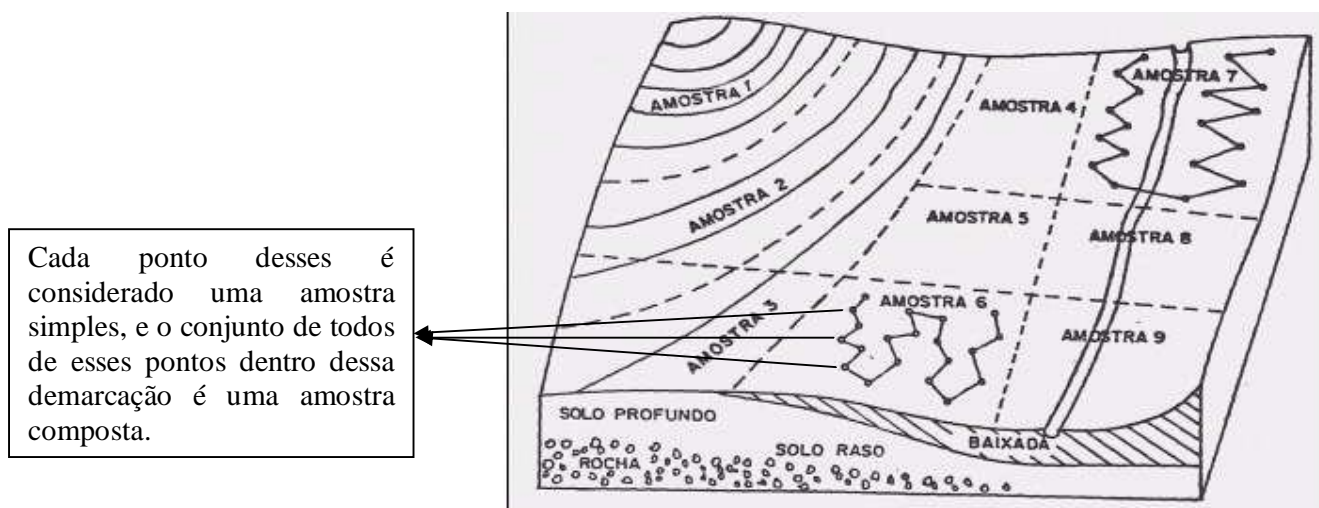
Está região apresenta cerca de 25000 hectares cultivados com cana-de-açúcar, com verão chuvoso e inverno seco, com precipitações maiores no período de dezembro a março.



**Figura 6:** Mapa da região onde foi feita a coleta da amostra de solo utilizada no experimento, tanto para extração do DNA quanto para as análises cromatográficas.

## 4.2 Amostragem

A amostragem do solo foi feita no mês de novembro de 2011, em dia ensolarado. Da área de estudo foram coletadas dez amostras simples de solo na profundidade de 10 - 20 cm utilizando um trado como instrumento de coleta (amostra simples é o volume de solo coletado em um ponto da área demarcada para o estudo - Figura 9). Primeiramente, foi feita uma limpeza do solo, para a retirada dos restos de vegetais presentes na superfície do mesmo. As amostras simples da área de estudo foram misturadas e homogeneizadas em um balde, previamente limpo, formando assim uma amostra composta (amostra composta é a mistura homogênea das várias amostras simples coletadas na área demarcada para o estudo - Figura 9), a qual foi posteriormente embalada em saco plástico de cor escura e armazenada em freezer a -20°C até sua utilização.



**Figura 7:** Esquema da amostragem do solo, amostra simples e composta, em uma determinada área <sup>(110)</sup>.

## 4.3 Técnicas propostas para extração do DNA do solo

Para a extração do DNA do solo foram testadas cinco diferentes técnicas descritas na literatura: Viestel <sup>(111)</sup>, Selbach <sup>(112)</sup>, Griffith <sup>(113)</sup> com modificações, Direito

<sup>(114)</sup>, Kit Comercial (KIT). A utilização das técnicas de extração do DNA foram feitas com réplicas, as quais estão descritas a seguir.

#### **4.3.1 Descrição da técnica proposta por Viestel.**

Uma amostra de solo de 0,25 g foi misturada a 750  $\mu$ L de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 8,0, em microtubos de 1,5 mL, e agitada a 200 rpm por 10 minutos em agitador rotatório, à temperatura de 30 °C. Em seguida, foram adicionados 125  $\mu$ L de SDS 20%, sendo o conjunto homogeneizado a 200 rpm, em agitador orbital (*shaker*), por 15 minutos a 59 °C. Executou-se um ciclo de congelamento a – 20 °C por 1 hora e descongelamento em banho-maria a 60 °C por 5 minutos, para permitir a lise celular. Após esse ciclo, 125  $\mu$ L de fenol saturado com tampão Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 foram adicionados na amostra, essa mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex por 1 minuto de forma a se obter uma emulsão. A mistura foi centrifugada a 4000 x *g* por 15 minutos, e a fase aquosa separada. Foi adicionado 1 mL da mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), seguida de agitação em vórtex por 20 segundos, para formar uma emulsão, sendo em seguida centrifugada a 6000 x *g* por 10 minutos. A fase aquosa foi novamente separada e adicionado 1 mL de mistura clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), misturando-se em vórtex por 10 segundos. A mistura foi submetida à centrifugação a 4000 x *g* por 5 minutos e a fase aquosa foi coletada novamente e precipitada com etanol, sendo que as amostras foram deixadas a – 20 °C por 24 horas. O precipitado foi obtido após centrifugação a 12000 x *g* por 10 minutos. Esse precipitado foi lavado com etanol 70% gelado e seco a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C). A ressuspensão desse precipitado foi feita com 100  $\mu$ L de tampão TE (Tris - EDTA), e a solução foi armazenada a – 20 °C <sup>(112)</sup>.

#### **4.3.2 Descrição da técnica proposta por Selbach.**

Pesou-se 0,25 g de amostra de solo e a esta foram adicionados 500  $\mu$ L de tampão fosfato (120 m M, pH 8,0) sendo submetida a agitação orbital a 200 rpm durante 10 minutos. Em seguida, esse material foi centrifugado a 2.940 x *g* por 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Adicionou-se 500  $\mu$ L da solução de lise

(0,01 M Tris HCl, pH 8,0; lisozima 10 mg mL<sup>-1</sup>), contendo CaCl<sub>2</sub> (para resultar em uma concentração de Ca<sup>+2</sup> de 60 a 90% da CTC do solo medido em pH 8,0) e incubado por uma hora à 37 ° C com agitação a cada 15 minutos. No final desse período foi adicionada proteinase K, para se obter uma concentração final igual a 200 µg mL<sup>-1</sup>. A solução foi incubada sob as mesmas condições anteriores. Após a incubação, foram acrescentados 500 µL de solução de SDS (Sodium Dodecyl-Sulphate). (0,1 M Na Cl, 0,5 M Tris-HCl pH 8,0, 10% [peso/volume] SDS) e a mistura foi homogeneizada em agitador tipo vórtex durante 5 segundos e então submetida a três ciclos de congelamento (-196 °C em nitrogênio líquido) e descongelamento (a 65 °C em banho-maria). A solução foi misturada e centrifugada a 1650 x g por 10 minutos, sendo o sobrenadante transferido para um novo tubo. Foi adicionado EDTA ao sobrenadante com a finalidade de se obter uma concentração final igual a 20 mM. Para finalizar o procedimento, ao extrato de DNA foram adicionados 600µL de isopropanol, e esse volume foi incubando a -20 ° C por aproximadamente 12 horas. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 16000 x g por 5 minutos e o precipitado formado foi lavado com etanol 70% e sua ressuspensão foi feita com 100µL de tampão TE (Tris-EDTA) e estocado a -20 °C <sup>(113)</sup>.

#### **4.3.3 Descrição da técnica proposta por Griffiths com modificações**

Pesou-se 0,5 g de amostra de solo e transferiu para um tubo Falcon de 15 mL, lavou-a com 5 mL de tampão PBS (phosphate buffered saline) (1x), agitou-se no vortex, em seguida centrifugou-se a 6000 rpm por 5 a 10 min a 4° C. Descartou-se o sobrenadante; Colocou-se o tubo contendo o extrato no gelo e adicionou-se: 0,5 g de pérolas de vidro (150 - 212 µm), 1 mL de tampão PBS (1x), 1 mL de fenol tamponado (equilibrado com Tris), 1 mL de clorofórmio. Homogeneizou-se essa mistura no vortex e em seguida a mesma foi centrifugada a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. Transferiu-se aproximadamente 800 µL do sobrenadante (DNA + PBS) para o tubo eppendorf de 2 mL e acrescentou-se ± 800 µL de fenol (tamponado com Tris). Agitou-se essa mistura em vortex para formar uma emulsão e a mesma foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Transferiu - se ± 600 µL do sobrenadante para outro eppendorf e adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio. Utilizou-se

novamente o Vortex para formar uma emulsão e a mistura foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Transferiu-se  $\pm 400 \mu\text{L}$  do sobrenadante para outro eppendorf, adicionou-se o mesmo volume de clorofórmio, agitou-se a solução em Vortex para formar uma emulsão e centrifugou-se a 6000 rpm por 10 min a 4°C. Transferiu-se  $\pm 100 \mu\text{L}$  de sobrenadante para outro eppendorf que foi armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  <sup>(113)</sup>.

#### 4.3.4 Descrição da técnica proposta por Direito.

Essa técnica foi desenvolvida a partir da técnica proposta por Selbach <sup>(112)</sup> com algumas modificações:

- ✓ Adição de PVPP (polivinilpolipirrolidona) (4%) ao tampão fosfato de sódio utilizado no início da extração, seguido de agitação em vórtex por 30 segundos;
- ✓ Aumento da concentração de lisozima utilizada, de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  para  $20 \text{ mg L}^{-1}$  <sup>(115)</sup>.

#### 4.4 Extração do DNA do solo utilizando o Kit comercial de extração de DNA de solo.

Foi feita a extração do DNA diretamente do solo utilizando o kit comercial de extração de DNA de solo da NeoBio, de acordo com a técnica sugerida no manual do fabricante, a qual utilizou-se 0,25 g de solo. Neste método utilizou-se pérolas de vidro e agitação com a finalidade de lisar as células, e finalizar a purificação da amostra com filtro de resina (spin column).

#### 4.5 Isolamento de microrganismos de amostras de solo capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono (método indireto).

As amostras de solo coletadas foram utilizadas como inóculo para isolamento de microrganismos capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono. Uma amostra de 10 g de solo foram transferidas para um recipiente contendo 90 mL de água tamponada mantida sob agitação durante 1 hora a  $25^\circ\text{C}$ .

Após esse período, foram coletadas duas alíquotas de 9 mL dessa solução, as quais foram transferidas para um recipiente contendo água livre de orgânicos autoclavada e fipronil ( $1,66 \text{ mg L}^{-1}$ ) e em outro contendo o meio basal Zinder<sup>(115)</sup> (Tabela 3) mais o fipronil ( $1,66 \text{ mg L}^{-1}$ ), ambas foram colocadas em estufa a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  sem agitação.

**Tabela 3** - Constituição do meio de cultura basal Zinder.

Sais e Reagentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água utrapura
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0,5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,4 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$	0,05 g
Solução Traço de Metais	10 mL

Componentes	Quantidades – q.s.p. 1000 mL de água utrapura
Tritriplex III	4,5 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,4 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	0,17 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,1 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,19 g
$\text{NiCl}_2$	0,02 g
$\text{Na}_2\text{MoO}_4$	0,01 g

#### 4.4 Análise das soluções contendo o DNA extraído do solo

O DNA extraído em cada uma das técnicas foi analisado quanto à eficiência de extração e qualidade do material obtido. Após as extrações foram feitas três análises:

1. Leitura da absorbância a 260 nm ( $A_{260}$ ), para a quantificação do DNA, relação  $A_{260}/A_{280}$  (com presença de proteínas) e relação  $A_{260}/A_{230}$  (com presença de ácidos húmicos e fenóis);
2. Eletroforese em gel de agarose;
3. Amplificação do gene 16S do DNA extraído por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os *primers* descritos na Tabela 4.

#### 4.5.1 Determinação espectrofotométrica da concentração de DNA após cada técnica de extração empregada

As absorbâncias das soluções de DNA foram medidas em no espectrofotômetro Gene Quant marca Amershan Bioscenses, com a finalidade de quantificar o DNA em solução, através da leitura da absorbância em 260 nm. Para realização dessa medida fez-se a diluição do DNA na proporção 1/100. A pureza da amostra foi determinada através das relações ( $A_{260}/A_{230}$ ), para avaliar a pureza do DNA em relação aos ácidos húmicos e ( $A_{260}/A_{280}$ ), para avaliar a pureza desta mesma solução em relação às proteínas. Consideram-se valores adequados quando esses apresentam:

- ✓  $A_{260}/A_{230}$  (>1,7): mais puro o DNA e menor é a presença de compostos orgânicos na solução <sup>(116)</sup>;
- ✓  $A_{260}/A_{280}$  (= 2,0) mais puro o DNA e menor é a presença de proteínas na solução <sup>(116)</sup>.

#### 4.5.2 Eletroforese em gel de agarose.

Foram adicionados 5  $\mu$ L de solução contendo DNA e 2  $\mu$ L de corante Blue Green com a finalidade de corar a fita de DNA, no gel de agarose 0,8 %, em cuba Bio Rad, a 70 V e 300 mA por 40 minutos. As bandas foram observadas e fotografadas com transiluminador Eagle eye <sup>®</sup> II com iluminação ultravioleta. Foi utilizado o marcador de peso molecular de 1000 pb, marca Invitrogen <sup>®</sup>.



#### 4.5.3 PCR (Reação em Cadeia da Polimerase - Polymerase Chain Reaction )

Após a extração do DNA, empregando as diferentes técnicas seguiu-se o procedimento para que ocorresse à reação de amplificação que flanqueia a região conservada 16S rDNA. Os *primers* universais para o domínio Bactéria foram 968FGC – 1392R e 27F/1100R <sup>(117, 118)</sup> (Tabela 4).

**Tabela 4** - *Primers* utilizados para a amplificação do DNA extraído do solo por PCR.

Iniciador	Sequência	Nº de pb	Referência
968FGC	5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3' com GC clamp (5'CGCCCGGGGCGCGCCCGGGC GGGGCGGGGGCACGGGGGG-3')	424	Nielsen <sup>(117)</sup>
1392R	5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3'		
27F	5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'		
1100R	5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'	1073	Lane <sup>(118)</sup>

Para as amplificações específicas dos fragmentos do RNA r 16S, foram utilizados os reagentes do kit da Invitrogen®, descrito a seguir: 2,5 µL de tampão de reação de PCR 10 X; 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM; 0,5 µL das dNTPs 2,0 mM; 0,5 µL de cada primer; 0,25 µL de Taq DNA polimerase (5u/µL) e 2,0 µL de solução de DNA genômico. O volume de cada solução foi completado para 50 µL com água livre de orgânicos estéril. O termociclador usado foi o “Gene Amp PCR System 2400” (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, Conn.)

A programação do termociclador para a reação da PCR utilizando-se os *primers* o primer 968F/GC – 1392R: desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94 °C; 45 segundos de anelamento a 38°C e 1 minuto a 72 °C para a extensão; 5 minutos a 72 °C para a extensão e resfriamento final a 4 °C <sup>(117)</sup>

Para os *primers* 27F/1100R: desnaturação inicial 94 °C por 2 minutos; 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 69 °C e 3 minutos a 72 °C para extensão; seguido de mais 10 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94 °C; 30 segundos de anelamento a 63 °C e 3 minutos a 72 °C para extensão e resfriamento final a 4 °C <sup>(118)</sup>

O produto de PCR (5µL de DNA amplificado + 2 µL do corante Blue Green) foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1,4% a 90 V e 300 mA, por 40 minutos em cuba da BioRad. As bandas foram observadas e fotografadas em transiluminador Eagle eye ® II com iluminação ultravioleta. Para esse procedimento foi utilizado o marcador molecular de 1000 bp (Invitrogen®).

#### 4.6 Clonagem e sequenciamento do produto da PCR do DNA do solo

As amostras dos produtos da PCR (DNA do solo que foi amplificado por PCR - fragmentos do gene RNAr 16S), foram clonadas em plasmídeo *pGem* Easy Vector System I como especificado pelo fabricante (Promega®).

A etapa de adenilação foi feita pipetando-se 3 µL de DNA purificado, mais 1 µL de tampão com MgCl<sub>2</sub>, 1 µL de dATP, 1 µL de *Taq DNA* Polymerase, 4 µL de água ultra pura estéril. O material foi submetido a 70 °C por 30 minutos no termociclador.

A etapa de ligação do vetor pGEM seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante, com adição dos seguintes componentes: 5 µL – 2X tampão de ligação rápido, 1 µL de vetor *pGEM*, 2 µL do produto da PCR adenilado, 1 µL de T4 ligase, 1 µL de água ultra pura estéril. Misturou-se esses reagentes e incubou-os por uma hora a temperatura ambiente.

Fez-se a transformação de células competentes de *E. Coli* DH5α as quais foram quimicamente conservadas a -80°C. Essas células foram retiradas dessa condição e mantidas em banho de gelo por 5 minutos. O volume de 2 µL do produto da PCR adenilado foi misturado a 200 µL da cultura de *E. coli* e essa mistura foi aquecida em banho-maria a 42 °C por 50 segundos (sem agitação), posteriormente essa solução foi agitada manualmente e mantida em banho de gelo por 2 minutos. Após adicionou-se 200 µL de meio LB (meio Luria – Bertami -Tabela 5) à

temperatura ambiente, sendo a mistura incubada por 12 horas sob refrigeração a 4°C.

Foram transferidos para tubos falcon 50 mL o meio LB, 28 µL de ampicilina (0,5 g em 10 mL de água), 47 µL de IPTG (23 mg mL<sup>-1</sup>) e 64 µL de X – Gal (40mg mL<sup>-1</sup>). Esse meio foi distribuído em duas placas de Petri contendo 25 mL cada uma. Essas placas permaneceram em repouso por 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, 100 µL do produto de transformação (clones) foram adicionados nas placas as quais permaneceram encubadas a 37 °C por 12 horas.

Após a incubação, as colônias que receberam o inserto (colônias brancas) foram pinçadas e transferidas para um eppendorf de 0,5 mL e fez -se a PCR para multiplicação das fitas.

A PCR do DNA plasmidial foi feita utilizando o conjunto de *primers*: M13 forward (5'GTA AAA CGA CGG CCA G-3') e M13 reverse (5'-CAGGGAACAGCTATGAC-3'). O programa para amplificação aplicado foi: desnaturação inicial a 94 ° C por 2 minutos, 25 ciclos de 60 segundos de desnaturação a 94 °C, 60 segundos para anelamento a 55 °C e 60 segundos de extensão a 72 °C, com extensão final de 7 minutos a 72 °C, e resfriamento a 4°C.

Para se comprovar a eficiência das reações de clonagem, foi aplicada a eletroforese em gel de agarose 1,4%, nas condições descritas no item 4.4.1.

**Tabela 5** - Composição do meio LB (meio Luria – Bertami).

Nutrientes	Concentração (g L <sup>-1</sup> )
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	5
Ágar	15

#### 4.7 Sequenciamento do material clonado a partir do DNA extraído do solo

O material amplificado foi enviado para empresa de sequenciamento Magrogen, Seoul – Korea. ([www.macrogen.com](http://www.macrogen.com)). Um total de 96 clones foram enviados para o sequenciamento.

O sequenciamento dos nucleotídeos foi feito em sequenciador da marca Eppendorf ABI 3730 xl. Foram utilizados *primers* 27F forward e reverse, respectivamente.

As seqüências obtidas foram agregadas e alinhadas usando DNASTAR- Package Software (Lasergene Sequence Analysis) removendo-se o vetor e as bases com baixa qualidade. As sequências agrupadas em consenso (contigs) foram distribuídas em unidades taxonômicas operacionais (UTOs). Depois do alinhamento de no mínimo 400 pb, tais seqüências de nucleotídeos foram comparadas às seqüências do banco de dados eletrônico NCBI-database para a aproximação da identidade filogenética (similaridade de no mínimo 98%).

Para a construção da árvore filogenética foi utilizado o algoritmo de Neighbor Joining <sup>(119)</sup> do programa Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) versão 5.05 <sup>(120)</sup>, considerando-se uma distância evolutiva de 0,05 e as análises de “bootstrap” foram baseadas em 100 reamostragens.

#### **4.8 Replicação da bactéria utilizada no experimento.**

Após a identificação dos microrganismos, obtidos através da extração do DNA do solo cultivado com cana-de-açúcar, sua clonagem e posterior sequenciamento, uma cepa pura do organismo em estudo foi adquirido junto ao CBMAI (Coleção Brasileira de Micro-organismos de Ambiente e Indústria). O mesmo foi replicado em meio LB (Tabela 4) a 30°C. Para verificar o crescimento da cultura fez - se sucessivas medidas utilizando um espectrofotômetro da marca HITACHI, modelo. Z-5000 no comprimento de onda de 460 nm, até a cultura atingir a absorbância de 0,485, quando o mesmo foi inoculado no tubo falcon contendo o solo em estudo.

#### **4.9 Condições cromatográficas e metodologia aplicada para determinação do fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfona e fipronil sulfeto).**

##### **4.9.1 Equipamento utilizado**

O fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfeto e fipronil sulfona) foram analisados utilizando cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas (GC

---

– MS) ambos da marca Shimadzu (Japão) QP 2010. Os parâmetros para otimização das condições cromatográficas do método foram seguidos segundo a literatura <sup>(121)</sup>.

#### **4.9.2 Padrões e soluções de trabalho**

Os padrões analíticos do fipronil e seus metabólitos, fipronil sulfeto e fipronil sulfona, foram obtidos da empresa Accustandard, com 99% de pureza.

As soluções de trabalho dos compostos em estudo, para determinação das condições cromatográficas foram preparadas a partir das soluções estoque, nas concentrações de 300 e 60 mg L<sup>-1</sup> em acetato de etila (Merck p.a.).

#### **4.9.3 Clean – up do solo para validação do método**

O mesmo solo coletado para as análises de DNA foi submetido a um clean – up antes de iniciar o desenvolvimento e otimização do método de extração para avaliar a concentração do fipronil e seus metabólitos, fipronil sulfona e sulfeto, na matriz. Essa fase teve como finalidade eliminar qualquer interferente ou traços de fipronil que foram aplicados nesse solo em estudo e pudesse trazer qualquer interferência para o desenvolvimento do método.

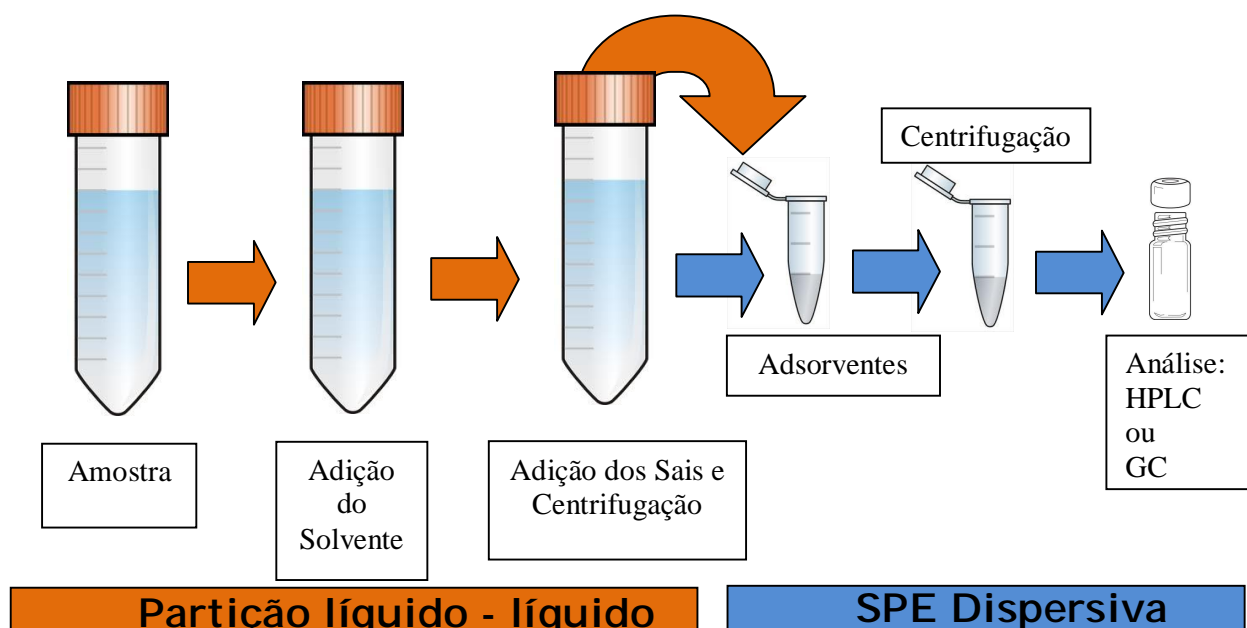
O solo foi seco, macerado em cadinho e peneirado em peneira de malha 2 mm, com a finalidade de uniformizar a amostra. Após esse procedimento foram pesados 10 g de solo e transferidos para três erlenmeyers diferentes, em seguida adicionou-se 40 mL dos seguintes solventes: acetona: hexano (1:1 v/v), metanol e acetato de etila, respectivamente. Os três recipientes contendo os solventes em estudo foram tampados e deixados em aparelho de ultrassom por 1 hora.

Após a extração ultrassônica, os extratos foram filtrados em papel de filtro qualitativos (250 g 50x50 cm), e deixados secar em vidro de relógio à temperatura ambiente (25 °C).

#### **4.9.4 Método de extração QuEChERS.**

Para fazer a extração do fipronil e seus metabólitos do solo foi empregado o método QuEChERS. Esse método vem sendo muito usado por diversos autores para determinação de diferentes compostos em matrizes sólidas, dentre elas o solo (122, 123).

Em um tubo Falcon de volume 50 mL foram adicionados 10 g de solo previamente limpo e 10 mL de acetato de etila. A mistura foi agitada em vortex. Em seguida foram adicionados 4 g de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ) e 1 g de cloreto de sódio (NaCl), para homogeneizar a solução utilizou-se o vortex. Após centrifugou-se a solução a 3000 rpm por 1 minuto. Coletou-se 1 mL do sobrenadante e transferiu-se para um eppendorf contendo 25 mg com PSA (amina primária secundária) e 150 mg de sulfato de magnésio ( $MgSO_4$ ). Essa mistura foi homogeneizada em vortex e centrifugada a 3000 rpm por 1 minuto. Coletou-se 500  $\mu$ L do sobrenadante o qual foi injetado em GC - MS (Figura 8).



**Figura 8:** Esquema mostrando o método de extração QuEChERS.

#### 4.10 Experimento para verificar a degradação do fipronil por bactérias frente a utilização de substâncias húmicas.

Foram preparados experimentos com a finalidade de avaliar a degradação bacteriana do fipronil com a utilização de SH.

Para avaliar a degradação microbiana utilizou-se tubos de centrifuga (tubos falcon de 50 mL) onde foram transferidos 10 g de solo previamente limpo e autoclavado, 2,5 mg L<sup>-1</sup> de fipronil e dois volumes diferentes de solução contendo o microrganismo em estudo, 1 e 2 mL.

A degradação bacteriana quando se utiliza SH foi avaliada montando o experimento da mesma forma que o anterior, apenas adicionando 0,03, 1,0 e 1,5 g das SH aos tubos falcon (Tabela 6). As SH foram previamente irradiada no CENA (USP – Piracicaba) com raios gama de 14,5 k Gy , taxa de dose 0,36-Raio gamma a partir de uma fonte de cobalto com a finalidade de eliminar microrganismos presentes no material e que pudessem influenciar no experimento.

Todas as análises foram feitas em triplicata em incubadora B.O.D da marca COALAB, à temperatura de 30 °C, e os tubos protegidos da luz. Cada tratamento experimental foi analisado a cada 48 horas por 60 dias.

A concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup> de fipronil, foi estipulado de acordo com os valores obtidos pela curva de calibração do método QuEChERS/ GC – MS.

O efeito da degradação bacteriana do fipronil foi avaliada extraíndo o analito e os metabólitos do solo pelo método de extração QuEChERS, sendo extratos analisados por GC - MS.

**Tabela 6:** Esquema da montagem do experimento para análise da degradação bacteriana do fipronil quando se utiliza substâncias húmicas.

Solo + Fipronil	Tratamentos							
	1	2	3	4	5	6	7	8
10 g de solo + 2,5 mg L <sup>-1</sup> de fipronil	1 mL				2 mL			
	org*	org* + 0,03g de SH**	org* + 1,0 g de SH**	org* + 1,5g de SH**	org*	org* + 0,03g de SH**	org* + 1,0 g de SH**	org* + 1,5 g de SH**

\*org. - organismo; \*\*SH - Substâncias Húmicas.

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Avaliação da eficiência das técnicas de extração do DNA do solo

Com o objetivo de avaliar a pureza das amostras de DNA, utilizou-se a leitura em espectrofotômetro para calcular as relações  $A_{260}/A_{230}$  e  $A_{260}/A_{280}$  (para mensuração de ácidos húmicos e proteínas, respectivamente) e quantificação do DNA extraído, também por espectrofotometria através da leitura de absorbância em  $A_{260}$  como pode ser observado na Tabela 7:

**Tabela 7** - Absorbância e concentração do DNA extraído do solo a partir dos métodos empregados.

Métodos de extração de DNA	Concentração			
	de DNA na amostra de solo ( $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ )	$A_{260}$	Razão $A_{260}/A_{230}$ .	Razão $A_{260}/A_{280}$ .
Vestel(V)	21,5	0,0043	0,79	1,25
Selbach (S)	28,0	0,0056	0,71	1,36
Griffiths (G)	21,0	0,0042	0,60	1,38
Direito (D)	18,5	0,0037	0,50	1,13
Kit comercial (KC)	26,5	0,0053	0,68	2,44

Os resultados apresentados na Tabela 7 mostra que existe um excesso de ácidos húmicos quando se emprega técnicas não comerciais e comercial de extração de DNA do solo, pois a razão de absorbância de  $A_{260}/A_{230}$  foi inferior a 1,7 para todos o métodos testados <sup>(116, 124)</sup>.

Os mesmos resultados podem ser observados para razão  $A_{260}/A_{280}$  que devem apresentar valores superiores a 2,0, mas observou-se essa resposta apenas quando utilizou - se o kit comercial de extração de DNA de solo, que foi de 2,44 <sup>(116,124)</sup>.

Após a aplicação das técnicas propostas por Vestel, Selbach, Direito e Griffiths na extração de DNA das amostras do solo utilizou-se um *spin – column*, esse procedimento tem por finalidade retirar os interferentes da PCR como os ácidos



húmicos e as proteínas. Mesmo fazendo uso dessa ferramenta as técnicas de extração de DNA em estudo não se apresentaram eficientes para extrair o DNA do solo em análise, pois quando as medidas de absorvância foram refeitas após esse procedimento a razão  $A_{260}/A_{230}$  apresentou uma ligeira melhora, mas os valores não ultrapassaram 1,2; e o mesmo foi observado para relação  $A_{260}/A_{280}$  como valores próximos a 1,8.

A quantificação do DNA extraído do solo é ainda um tema bastante estudado e discutido, pois os métodos conhecidos ainda não apresentam boa eficiência e resultados confiáveis. De acordo com a literatura <sup>(125)</sup>, o uso da espectrofotometria para quantificação de DNA em solução é uma boa alternativa, mas apenas para soluções com alta pureza.

Além da técnica espectrofotométrica, utiliza-se também, corantes e leitura por fluorometria que estão se mostrando como uma alternativa para a quantificação de DNA em solução, porém também apresentam erros, principalmente quando o conteúdo dos pares de bases G+C da amostra é pequeno, proporcionando grande variabilidade, sendo portanto uma técnica com pouca confiabilidade <sup>(125)</sup>.

Devido à interferência causada pelos ácidos húmicos nas análises do DNA devido a absorção destes na faixa de  $A_{260}$  <sup>(126)</sup> acredita-se que para a identificação do DNA extraído do solo e para a análise de sua pureza, o melhor método é o da eletroforese em gel de agarose <sup>(126)</sup>.

Por esse motivo, aplicou-se a técnica de eletroforese em gel de agarose com a finalidade de se confirmar os resultados obtidos por espectrofotometria. Quando essa técnica foi aplicada aos diferentes métodos de extração de DNA testados, não foi possível observar as bandas de DNA no gel, isso mostrou que os métodos Vestel, Selbach, Direito e Griffiths para extração do DNA do solo em estudo não foram eficientes.

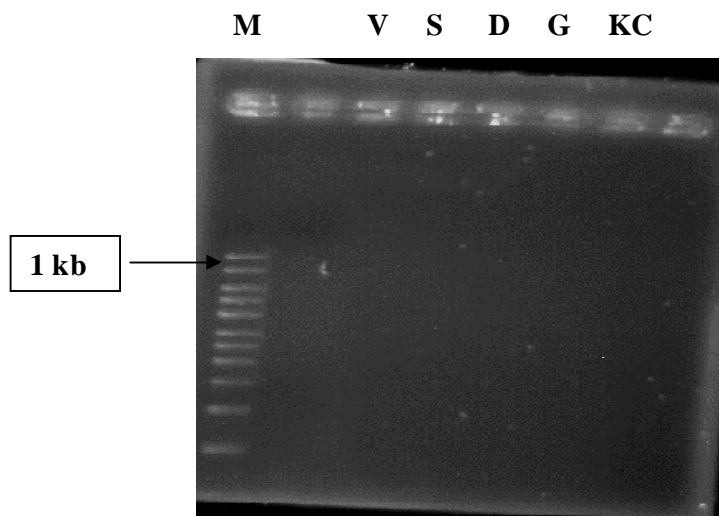
Estudos publicados na literatura relatam que os métodos de extração de DNA podem apresentar eficiências distintas quando aplicados a solos com diferentes tipos de manejo <sup>(127, 128)</sup>.

Quando se empregou o kit comercial apropriado para extração do DNA de solo, os resultados de espectrofotometria apresentaram-se semelhantes ao das técnicas não comerciais testadas. Quando foi realizada a eletroforese da mesma forma que as técnicas não comerciais, não foi possível observar as bandas de DNA

ao longo do gel, mas pode-se observar a presença do DNA no poço de aplicação. Segundo a literatura, esse fato pode ter ocorrido devido ao comprimento da fita de DNA ser longa e aplicação da corrente não ter sido eficiente para retirá-la do local de aplicação na cuba de eletroforese <sup>(129)</sup>.

Apesar dos resultados das extrações de DNA não terem sido satisfatórios, fez-se a PCR aos DNAs extraídos com as diferentes técnicas, tanto a comercial quanto as não comerciais. Para essa finalidade utilizou-se dois *primers*: 968 F/ GC – 1393 R e o 27F – 1100R.

Quando usou-se o primer 968 F/ GC – 1393 R para as reações de PCR, não observou-se bons resultados, pois durante a eletroforese as bandas de DNA não puderam ser observadas, foi possível visualizar apenas o marcador molecular de 1 kb (M) Figura 9.



**Figura 9** - Gel de eletroforese (agarose 1,4%) feito com produto da PCR utilizando DNA bruto extraído do solo sob manejo de cana-de-açúcar por meio dos métodos não comerciais e o kit de extração comercial de DNA e o *primer* 968 F/ GC – 1393 R <sup>(118)</sup>.

Avaliando os parâmetros utilizados no termociclador para esse primer (item 4.5.3), notou-se que a temperatura de anelamento utilizada encontrava-se muito baixa (38 °C), geralmente a temperatura ideal para essa fase da PCR varia de 50 a 60 °C <sup>(130)</sup>. Fez-se então um gradiente de temperatura para avaliar a possibilidade de estar havendo interferência da temperatura na replicação do DNA pela técnica da PCR.

Como o resultado anterior, não foi possível observar nenhuma banda no gel de eletroforese referente ao DNA extraído, apenas observou-se a presença da solução padrão de DNA.

Devido à falta de resposta desse primer, optou-se em utilizar para as reações de PCR o primer 27F /1100R <sup>(118)</sup>, pois esses *primers* são considerados universais e específico para o domínio Bactéria <sup>(118,131)</sup>.

As técnicas de extração de DNA não comerciais não apresentaram nenhuma resposta positiva, antes ou depois da PCR, isso pode ter acontecido, porque quando se faz extrações diretas de DNA do solo, além do DNA extrai-se também muito ácido húmico, que é um interferente da PCR <sup>(23,132)</sup>. O mesmo resultado foi observado quando aplicou - se a PCR utilizando amostras extraídas com o kit comercial.

Com o intuito de diminuir os possíveis interferentes da PCR, fez-se a diluição do DNA extraído utilizando o kit comercial. Para um volume final de 25  $\mu\text{L}$  de reação, utilizou-se 2, 4 e 8  $\mu\text{L}$  de DNA que se encontrava em uma concentração de 26,02 ng  $\mu\text{L}^{-1}$ .

Mesmo utilizando a diluição como estratégia para melhorar os resultados da PCR e conseguir visualizar o DNA no gel de agarose, não obteve - se bons resultados. Por esse motivo e, outros já mencionados anteriormente, assim sendo optou-se por mudar de estratégia para de extração do DNA do solo.

Como o objetivo da pesquisa é isolar bactérias de solo capazes de degradar o inseticida fipronil, decidiu-se cultivar as bactérias provenientes do solo sob o cultivo de cana-de-açúcar em laboratório conforme descrito no item 3.5.

## 5.2 Bactérias do solo que utilizam o fipronil como fonte de carbono

O DNA das bactérias cultivadas em meio de cultivo contendo apenas fipronil foi extraído conforme procedimento descrito por Griffiths <sup>(116)</sup>, e utilizou-se para realização da PCR o primer 27F/1100R.

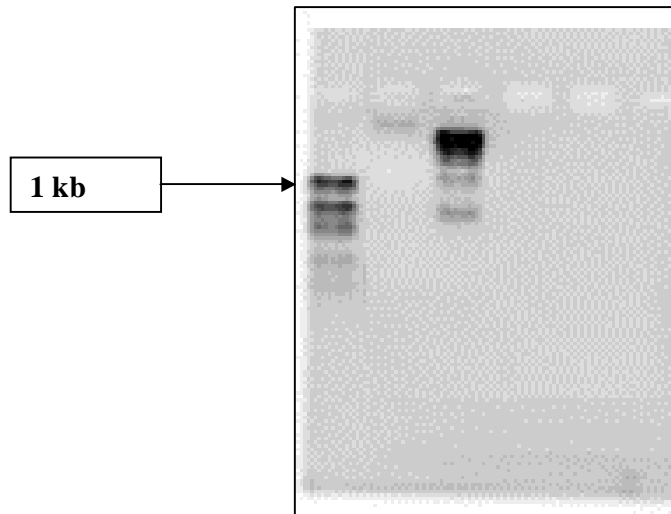
O procedimento apresentou-se eficiente na extração do DNA com razões de absorvância de:

$$\checkmark A_{260} = 0,524$$

$$\checkmark A_{280}/A_{260} = 1,88$$

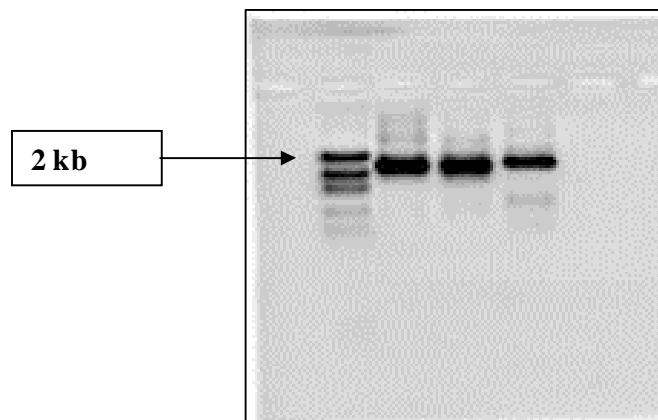
- ✓  $A_{260}/A_{230} = 0,49$
- ✓ Concentração de DNA=  $26,4 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$

Esse resultado foi confirmado com a eletroforese em gel de agarose 0,8% como pode ser visualizado na Figura 10:



**Figura 10** - Gel de eletroforese (agarose 0,8%) feito com DNA extraído das bactérias do solo sob manejo de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo apenas fipronil como única fonte de carbono e o *primer* 27F/1100R<sup>(118)</sup>.

Após essa confirmação, fez-se a PCR para amplificação dos fragmentos de DNA dos microrganismos em estudo. Esse procedimento apresentou boa resposta como pode ser observado em gel de agarose 0,8% após o procedimento com a finalidade de confirmar os resultados da reação Figura 11.

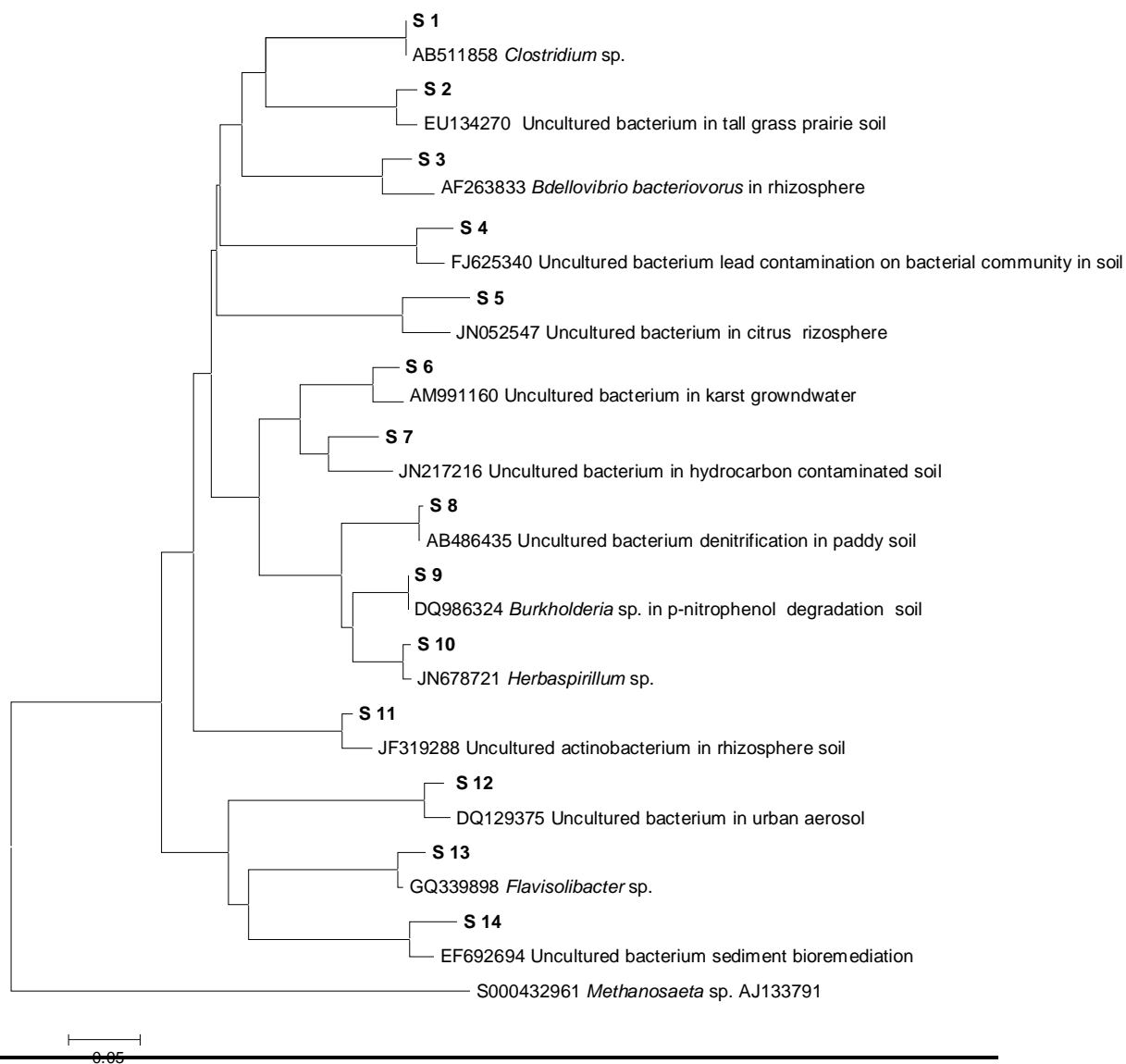


**Figura 11** - Gel de eletroforese (agarose 1,4 %) feito com o produto da PCR com DNA extraído das bactérias do solo sob manejo de cana-de-açúcar cultivadas em meio contendo apenas fipronil como única fonte de carbono e o *primer* 27F/1100R<sup>(118)</sup>.

Finalizando a etapa de extração do DNA genômico das bactérias cultivadas em laboratório procedeu-se para etapa seguinte, que foi a clonagem e o sequenciamento do produto da PCR com a intenção de verificar quais são as bactérias que possam utilizar o fipronil como fonte de carbono.

### 5.3 Clonagem e sequenciamento das bactérias do solo cultivadas em laboratório

A técnica de clonagem e sequenciamento de bactérias extraídas do solo que utilizam o fipronil como fonte de carbono mostrou-se eficiente para estimar-se as bactérias envolvidas na degradação do fipronil. As afiliações filogenéticas dessas bactérias podem ser observadas na árvore filogenética. Foram discutidas 14 sequencias de consenso (UTOs). (Figura 12).



**Figura 12:** Árvore filogenética resultado da frequência da clonagem e sequenciamento das bactérias extraídas do solo e que são capazes de utilizar o fipronil como fonte de carbono de um total de 96 clones.

Como resultados da aplicação destas técnicas, o microrganismo que apresentou uma maior frequência entre os 96 clones sequenciados, um total de 49 clones foi do gênero *Clostridium* representando na 'árvore filogenética por S1. Esse gênero é constituído de bactérias anaeróbias sendo que algumas podem ser microaerófilas, apresentam como principal característica a produção de esporos, o que os torna resistentes a condições adversas como variações de temperatura, umidade, entre outros fatores. No ambiente essa bactéria pode estar presente no solo e na água <sup>(133)</sup>.

Diversos fatores podem contribuir para a presença de *Clostridium sp* no solo, dentre eles destacam-se a sazonalidade <sup>(134)</sup>, tipo de solo <sup>(135)</sup>, águas estagnadas (acumuladas) <sup>(136)</sup>, presença ou não de microrganismos inibidores de sua atividade enzimática <sup>(137)</sup> entre outros fatores.

Além disso, segundo a literatura a bactéria afiliadas ao gênero *Clostridium* pode estar presentes em locais contaminados com hidrocarbonetos <sup>(138)</sup>, é tolerante a sistemas ácidos de drenagem de minas, (solução gerada a partir de minerais sulfetados presentes em resíduos de mineração que são oxidados em presença da água) <sup>(139)</sup>, e ainda é resistente ao butanol <sup>(140)</sup>.

Outros microrganismos encontrado no solo em estudo foi o *Bdellovibrio bacteriovorus* (2 clones) representado por S3; uma bactéria gram-negativa, pequena, no formato de vírgula e com o hábito de predação de outras bactérias, utilizando os componentes citoplasmáticos de seus hospedeiros como nutriente. Pode-se encontrar esse organismo vivendo livremente no solo e na água (inclusive marinha), e ainda a mesma só é capaz de se multiplicar no interior de outras bactérias <sup>(141)</sup>. Segundo a literatura essa bactéria foi encontrada no Canal Bristol em Cardiff na Inglaterra onde em alguns pontos é contaminado com o descarte de esgoto doméstico <sup>(142)</sup>.

Foram encontrados 19 clones afiliados ao gênero *Flavisolibacter*, um bacteroide pertencente a família *Chitinophagaceae*, não é um organismos muito facilmente

---

encontrado. Segundo a literatura, seu gênero foi encontrado nos em solos cultivados com ginseg na Korea <sup>(143)</sup> e em diversas amostras de água no sul da Suécia <sup>(144)</sup>.

Encontrou - se ainda bactérias afiliadas ao gênero *Burkholderia* (20 clones), que compreende mais de 60 espécies isoladas de diferentes nichos ecológicos, dentre eles solo, planta, água, animais entre outros, <sup>(145)</sup>. Estudos em solo e águas subterrâneas tem demonstrado o envolvimento da *Burkholderia* sp na degradação de compostos clorados a partir do isolamento deste grupo de locais contaminados e consequentes ensaios de degradação em microcosmos <sup>(146, 147)</sup>. Além disso, esse gênero é responsável pela degradação do hidrocarboneto criseno <sup>(148)</sup>. Ela foi isolada de locais contaminados com dinitrotoluenos, e foram capazes de crescer utilizando o nitrogênio e o 2,4 DNT como fonte de carbono <sup>(149)</sup>. Essas características se assemelham as encontradas no experimento desenvolvido neste estudo, pois o solo de onde esse organismos foi extraído encontrava-se sob o cultivo de cana –de-açúcar e a *Burkholderia* sp cresceu em meio contendo fipronil, e conseguir utilizá-lo como fonte de carbono.

Bactérias afiliadas ao gênero *Herbaspirillum* encontrado (2 clones) também neste estudo, é uma espécie de bactéria com forma vibrióide, que pode apresentar até três flagelos. Foi descrito pela primeira vez na década de 80, para acomodar a espécie *Herbaspirillum seropedicae* <sup>(150)</sup> a qual permaneceu, até os anos 90 como a única espécie do gênero. Está bactéria *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi reclassificada como uma nova espécie do gênero *Herbaspirillum*, *Herbaspirillum rubrisubalbicans* <sup>(151)</sup>. Uma terceira espécie, *Herbaspirillum frisingense*, foi incorporada ao gênero, baseado em dados de seqüenciamento do gene 16 S <sup>(152)</sup>. Esse gênero pertence ao grupo de bactérias diazotróficas ou seja tem a capacidade de fixar nitrogênio. Por esse motivo segundo a literatura não há relatos de sua relação com locais contaminados e sim com sua capacidade de fixar nitrogênio <sup>(153,154)</sup>.

Dentre os cinco gêneros encontrados no solo em estudo, os quais foram capazes de crescer em meio contendo fipronil, a *Burkholderia* foi nomeada o gênero de estudo para esse experimento. A escolha deste gênero deu-se pelo fato que os outros organismos encontrados no solo após a clonagem e o sequenciamento do material extraído, por motivos descritos a seguir não puderam ser utilizados. O gênero *Clostridium* é uma bactéria anaeróbia estrita, o que seria muito difícil

conseguir essas condições em laboratório <sup>(133)</sup>, no solo esse organismo pode ter essa condição gerada pelo excesso de umidade no ambiente em que vive <sup>(155)</sup>. O *Bdellovibrio bacteriovorus* e o *Herbaspirillum* são gêneros pouco associados a ambientes contaminados <sup>(142,153,154)</sup>; o gênero *Flavisolibacter* apesar de ter sido encontrada alguns autores <sup>(143,144,156)</sup> em ambientes contaminados, não foi possível obter a cepa pura deste microrganismos em locais que comercializam coleções de microrganismos.

Além desses organismos identificados, existem outros na árvore filogenética que foram encontrados em outros lugares como solos contaminados, água, raízes sedimentos, entre outros, mas que ainda não foram isolados e classificados.

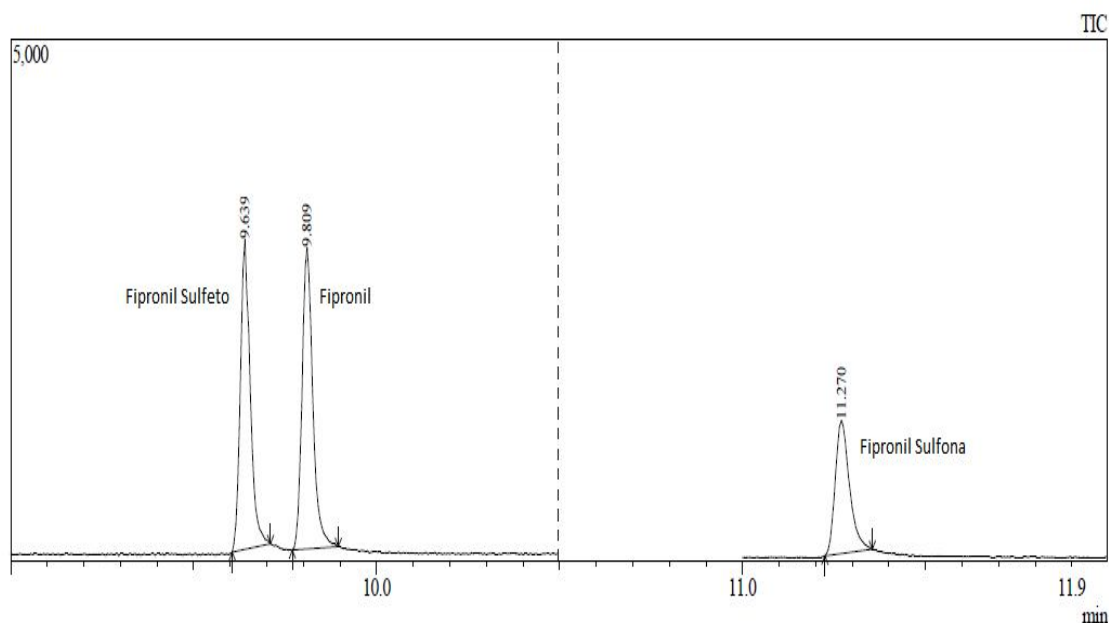
A espécie de *Burkholderia* adquirida junto ao CBMAI foi a *Burkholderia thailandenses*, que segundo especificações do laboratório, esse organismo foi isolado de um solo sob cultivo de arroz. Não existe na literatura relatos de degradação do fipronil por esse organismo.

#### **5.4 Condições cromatográficas para análise dos fipronil e seus metabólitos em amostras de solo.**

Para análise do fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfona e fipronil sulfeto) as condições cromatográficas foram: Coluna DB 5 (30m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m) temperatura do injetor 280 ° C, temperatura do detector 270 ° C, fluxo 1,3 mL  $\text{min}^{-1}$  no modo split 1/10 e volume de injeção 1  $\mu$ L. A rampa de temperatura utilizada foi 80° C por minuto com 25° C por minuto até 215 ° C, seguida de rampa com 3 ° C por minuto até 250° C.

Os íons monitorados para os compostos foram fipronil sulfeto 351, fipronil 366,95 e para o fipronil sulfona 382,95. O tempo de retenção dos respectivos analitos foi 9,6, 9,8 e 11,3 minutos perfazendo uma corrida com total de 18 minutos como pode ser observado na Figura 13.





**Figura 13:** Tempos de retenção dos compostos em estudo, fipronil sulfeto, fipronil e fipronil sulfona.

### 5.5 Clean – up das amostras de solo seguido da aplicação do método QuEChERS.

Com a finalidade de avaliar a eficiência dos solventes utilizados na limpeza do solo para se fazer a validação do método utilizando o Quechers testou-se três solventes acetona: hexano (1:1), metanol e acetato de etila. Os três solventes foram eficientes no clean – up do solo, mas optou-se por utilizar o metanol para esse procedimento, pois avaliando-se a intensidade do sinal no cromatograma quando aplicou –se o método para as análises de fipronil e seus produtos de degradação, foi o solvente que apresentou uma menor intensidade de sinal próximo aos picos dos compostos em estudo. Este fato também foi relatado na literatura quando o mesmo solvente foi utilizado para extrair diuron e seus metabólitos em solo cultivado com cana de açúcar <sup>(157)</sup>.

### 5.6 Validação do método QuEChERS/ GC - MS para determinação do fipronil e seus metabólitos fipronil sulfeto e fipronil sulfona no solo.

Os parâmetros utilizados para a validação do método foram robustez, linearidade, limite de quantificação (LQ), limite de detecção (LD), recuperação, precisão, exatidão e repetibilidade.

### 5.6.1. Robustez

Os parâmetros do método QuEChERS / GC - MS desenvolvido para a análise de do fipronil e seus metabólitos, fipronil sulfeto e fipronil sulfona foram alterados com a finalidade de verificar se o método é robusto frente a pequenas alterações. Para isso foi utilizado o teste de *Youden* <sup>(108)</sup> que tem como objetivo introduzir diversas alterações de uma só vez, de tal maneira que os efeitos das variações individuais podem ser determinados.

Os parâmetros variados no método com a finalidade de se avaliar sua robustez estão apresentados na Tabela 8. A concentração escolhida para fazer as modificações foi de 2,5 mg L<sup>-1</sup>.

**Tabela 8:** Variações dos parâmetros do método QuEChERS / GC – MS para avaliação de sua robustez.

Parâmetros Variados	Método	Variação
Acetato de Etila	A = 10 mL	a = 9,9 mL
PSA	B = 25 mg	b = 26 mg
Sulfato de magnésio	C = 4,0 g	c = 3,8 mg
Cloreto de sódio	D = 1,0 g	d = 0,9 g
Temperatura do Injetor	E = 280 °C	e = 279 °C
Temperatura do detector	F = 270 °C	f = 269 °C
Volume de injeção	G = 1 µL	g = 0,95 µL

As respostas obtidas no teste de *Youden* <sup>(108)</sup> para determinar a robustez do método desenvolvido são apresentadas na Tabela 9. Foram avaliados o tempo de retenção e a área do pico cromatográfico e pôde-se verificar que apenas esses por resultados a metodologia é robusta, uma vez que, as respostas estão com valores muito próximos.

**Tabela 9:** Respostas obtidas no teste de robustez com a concentração de 2,5 mg L<sup>-1</sup>.

Ensaio	Tempo de retenção			Área do pico		
	Fipronil	F. Sulfeto	F. Sulfona	Fipronil	F. Sulfeto	F. Sulfona
Método	9,815	9,639	11,548	46,289	63,803	45,487
1	9,802	9,599	11,539	47,115	64,667	46,189
2	9,882	9,606	11,632	45,108	64,567	45,173
3	9,818	9,720	11,735	45,916	65,432	44,989
4	9,811	9,682	11,444	44,030	62,998	45,512
5	9,852	9,756	11,842	45,765	63,502	46,128
6	9,713	9,633	11,443	45,123	63,103	47,007
7	9,724	9,614	11,341	46,497	64,098	46,765
8	9,816	9,658	11,538	45,577	65,120	44,564

De acordo com os resultados descritos na Tabela 10, e o tratamento estatístico realizado pelo teste *t*-Student, pode-se afirmar que o método é robusto, com 95% de confiança, pois não há diferença estatisticamente significativa entre as médias dos parâmetros avaliados.

**Tabela 10:** Resultado da robustez segundo teste de Student variando o tempo de retenção e a área do pico.

	t calculado		t (0,95; 6)
	Tempo de retenção	Área do pico	
<b>Fipronil</b>	0,068	0,092	
<b>Fipronil Sulfeto</b>	0,203	0,275	1,943
<b>Fipronil Sulfona</b>	0,789	0,357	

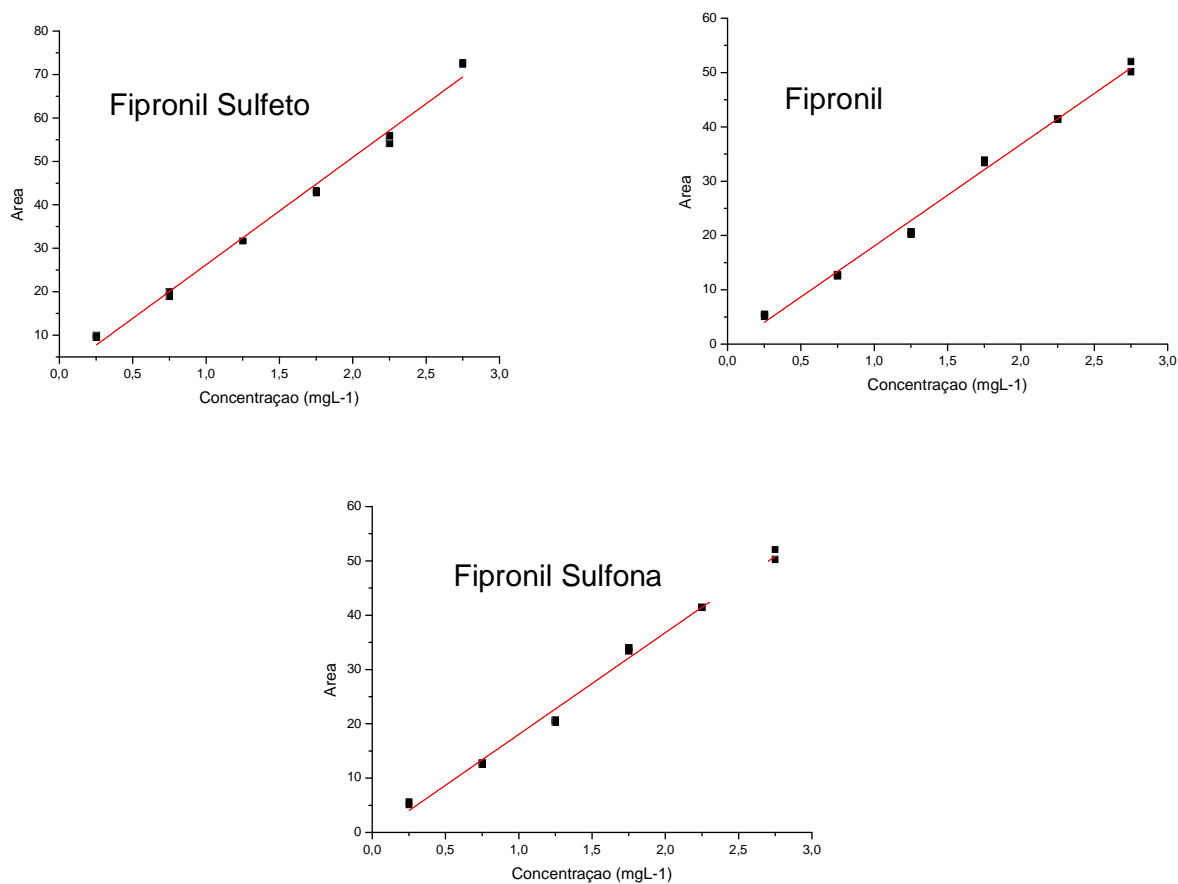
### 5.6.2 Linearidade

Para a construção da curva analítica do fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona foram escolhidas seis concentrações diferentes e extraídas conforme método QuEChERS / GC – MS. Sendo a primeira concentração o LOQ do método 0,25 mgL<sup>-1</sup> e o ponto mais alto 2,75 mgL<sup>-1</sup>.

Os gráficos com as curvas analíticas dos três compostos em estudo estão apresentadas na Figura13:

**Tabela 11:** Resultados obtidos no cálculo da linearidade do método analítico QuEChERS / GC – MS, para os analitos em estudo todos na faixa de 0,25 a 2,75 mgL<sup>-1</sup>.

Pesticidas	Equação da reta ( $y = a x + b$ )*	Coefficiente de correlação (r)
Fipronil	$y = (18,732) x + (-0,677)$	0,9923
Fipronil Sulfeto	$y = (24,704) x + (1,525)$	0,9907
Fipronil Sulfona	$y = (19,696) x + (-0,963)$	0,99121



**Figura 14:** Curva analítica dos compostos analisados, aplicando o método QuEChERS / GC – MS , avaliando as concentrações 0,25 a 2,75 mgL<sup>-1</sup>.

Os coeficientes de correlação ( $r$ ) obtidos foram superiores a 0,99, o que indica que o detector responde bem às concentrações analisadas, sendo um método linear na faixa de concentração estudada, como pode se observar na Tabela 11 e Figura 13. E os valores estão de acordo com a literatura<sup>(98, 159)</sup> e com o INMETRO<sup>(107)</sup> que diz que os valores do coeficiente de correlação não deve ser inferiores a 0,99.

### 5.6.3 Limite de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Os limites de detecção e de quantificação foram determinados conforme descrito no item 2.6.7, obtidos diminuindo-se as concentrações do fipronil e seus metabólitos fipronil sulfeto e fipronil sulfona compreendidas na faixa de  $1 \text{ mgL}^{-1}$  a  $0,06 \text{ mgL}^{-1}$ , gradativamente, considerando o sinal analítico obtido no GC - MS, para cada composto em estudo (Tabela 12)

**Tabela 12:** Limites de detecção (LOD) e limites de quantificação (LOQ), para os compostos estudados.

Pesticidas	LOD ( $\text{mgL}^{-1}$ )	LOQ ( $\text{mgL}^{-1}$ )
Fipronil	0,06	0,25
Fipronil Sulfeto	0,06	0,12
Fipronil Sulfona	0,06	0,25

Os valores de LOD e LOQ encontrados quando aplicou - se o método QuEChERS / GC-MS foram satisfatórios, para faixa de trabalho proposta para o estudo.

### 5.6.4 Precisão

A precisão foi avaliada a partir da análise cromatográfica do método QuEChERS/ GC - MS, nas concentrações de  $0,5$  e  $2,5 \text{ mgL}^{-1}$ , sendo que cada uma das amostras foram analisadas em setuplicata. O cálculo deste parâmetro foi feito a

partir dos desvios padrões relativos (DPR) dos resultados obtidos para cada extrato (Tabela 13).

**Tabela 13:** Precisão do método QuEChERS / GC - MS , para os compostos analisados.

Pesticidas	DPR Nível Baixo (%)	DPR Nível Alto (%)
<b>Fipronil</b>	10,9	1,84
<b>Fipronil Sulfeto</b>	7,3	1,28
<b>Fipronil Sulfona</b>	8,3	1,71

Os valores de precisão encontrados no experimento estão de acordo com o INMETRO <sup>(107)</sup> que diz que os valores não devem ultrapassar 20% do DPR.

### 5.6.5 Exatidão

A exatidão do método QuEChERS/ GC - MS foi avaliada a das concentrações de 0,5 e 2,5 mgL<sup>-1</sup>, sendo que cada uma das amostras foi analisada em setuplicata. O cálculo deste parâmetro foi feito a partir do item 2.6.3 e os resultados estão apresentados na Tabela 14.

**Tabela 14:** Valores de exatidão intra-dia e inter-dia calculados para o método QuEChERS/ GC – MS.

Concentração	Fipronil		Fipronil Sulfeto		Fipronil Sulfona	
	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dia	Exatidão intra-dia	Exatidão inter-dia
<b>0,5 mg L<sup>-1</sup></b>	85,4	86,9	92,3	89,3	86,6	85,1
<b>2,5 mg L<sup>-1</sup></b>	96,6	89,1	99,2	92,5	96,4	87,7

Os valores de exatidão estão de acordo com os valores estipulados pela ANVISA <sup>(105)</sup> que está entre 85 a 120%.

### 5.6.6. Recuperação

Com a finalidade de avaliar a eficiência da extração do fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona por QuEChERS, primeiramente fortificou-se o solo em estudo em dois níveis concentrações diferentes, sendo cada nível em triplicata. Em seguida os extratos foram analisados por GC/MS. Para avaliar a recuperação do método de extração em estudo, prepararam-se três extratos em branco de solo, ou seja, passou o solo sem os analitos de estudo por todo método de extração, sendo os extratos fortificados com o fipronil e seus metabólitos antes de serem analisados por GC – MS.

A partir dos resultados obtidos nas análises das amostras fortificadas antes da extração e depois da extração determinou-se a porcentagem de recuperação do método, que pode ser visto na Tabela 15. Os cálculos foram feitos em relação à área do pico referente ao analito contido na amostra fortificada antes e depois da extração por QuEChERS.

**Tabela 15:** Recuperação do método QuEChERS/ GC - MS , para os compostos analisados.

<b>Pesticidas</b>	<b>Nível Baixo (%)</b>	<b>Nível Alto (%)</b>
<b>Fipronil</b>	91	97
<b>Fipronil Sulfeto</b>	79	98
<b>Fipronil Sulfona</b>	79	97

Os valores de recuperação encontrados para as duas concentrações em estudo, estão de acordo com a literatura <sup>(158, 159)</sup>, e com os valores estipulados pelo INMETRO <sup>(107)</sup> que diz que os valores de recuperação devem estar entre 70 e 120%.

### 5.6.7. Repetibilidade

Para determinar a repetibilidade do método para cada composto foram empregadas duas concentrações 0,25 mgL<sup>-1</sup> e 2,75 mgL<sup>-1</sup> sendo os pontos mais alto e mais baixo da curva analítica, as mesmas usadas para o parâmetro de precisão. Para cada concentração foram preparadas sete amostras, as quais foram extraídas

e analisadas. Esta etapa foi realizada em outro dia, ou seja, em um dia diferente do que foi realizado a precisão.

**Tabela 16:** Repetibilidade do método QuEChERS/ GC - MS , para os compostos analisados

<b>Pesticidas</b>	<b>Nível Baixo (%)</b>	<b>Nível Alto (%)</b>
<b>Fipronil</b>	11,61	4,11
<b>Fipronil Sulfeto</b>	7,6	1,83
<b>Fipronil Sulfona</b>	7,9	3,9

Os valores de repetibilidade apresentados na Tabela 16 estão de acordo com as normas do INMETRO <sup>(107)</sup> que diz que os valores de repetibilidade devem ser inferiores a 15%.

### **5.7 Resultado da degradação bacteriana do fipronil com e sem a utilização de substâncias húmicas.**

Com a determinação do organismo de estudo a partir de um solo cultivado com cana-de-açúcar, *Burkholderia* sp, e a validação de um método analítico utilizando QuEChERS / GC – MS, para determinação do fipronil e seus metabólitos fipronil sulfeto e fipronil sulfona, que são os dois principais produtos de degradação biológica deste composto, foi possível avaliar a degradação do fipronil quando o mesmo é aplicado juntamente com SH no solo. Os tratamentos foram montados de acordo com o item 4.10.

O solo utilizado no experimento foi previamente limpo com metanol para retirar os interferentes na análise de fipronil e autoclavado para eliminar microrganismos presentes na matriz. Após o clean-up no solo de estudo o mesmo foi enviado para laboratório de solos e adubos da FCAV – UNESP – Jaboticabal para se fazer uma análise quanto a presença de minerais no solo. Como pode ser observados nas Tabelas 17 e 18 não foi possível eliminar os macro e micronutrientes, presente no solo.

**Tabela 17:** Análise dos macronutrientes e pH presentes no solo após o clean- up.

<b>pH</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>H+Al</b>	<b>SB</b>	<b>T</b>	<b>V</b>
em CaCl <sub>2</sub>	resina (mg dm <sup>3</sup> )	-----mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup> -----						%
5,7	19	0,9	15	9	20	24,9	44,9	55



**Tabela 18:** Análise dos micronutrientes presentes no solo após o Clean – up.

B	Cu	Fe	Mn	Zn	S – SO <sub>4</sub>	Al
-----mg dm <sup>3</sup> -----						mmol <sub>c</sub> dm <sup>-3</sup>
0,21	1,0	20	23,1	0,4	21	0

A partir desses dados, não pode-se afirmar com certeza, mas a *Burkholderia thailandensis* pode ter utilizado esses nutrientes presentes no solo de estudo em suas funções metabólicas, pois sabe-se que os macronutrientes são principais constituintes dos compostos orgânicos celulares perfazendo um total de 90% da composição celular, os outros 10% são compostos por micronutrientes <sup>(87)</sup>.

Outro dado importante da análise química do solo foi o resultado do pH encontrado, segundo dados enviados pelo CBMAI junto com o organismo, o pH ótimo para seu crescimento que deve ser de 5,5 a 6,0. O pH do solo mensurado após o clean – up é de 5,7. Dessa forma podemos afirmar que o pH utilizado nos tratamentos não foi um fator limitante para o crescimento do organismo (Tabela 17).

Além dos tratamentos apresentados, conduziu-se um experimento para se avaliar a degradação do fipronil sem a presença do organismo. Foram feitas apenas duas análises uma no início e outra no final do tempo de condução do mesmo. Pode-se observar uma ligeira alteração na área do fipronil, passando de 45,000 para 43,000, o que talvez possa estar dentro de um erro experimental ou degradação muito sutil que tornou - se difícil de ser quantificada. Além disso, nos cromatogramas não observou-se a formação dos picos dos metabólitos do fipronil em estudo.

A partir dos dados da análise química do solo, montou-se os tratamentos. Os tratamentos 1 e 5 foram chamados de branco, pois não aplicou-se a SH no experimento. Esse procedimento teve como objetivo avaliar o efeito da degradação da *Burkholderia thailandensis* em quantidades diferentes do organismo (1 e 2 mL respectivamente) sem a presença da SH.

Como pode - se observar na Tabela 19 a os diferentes volumes do microrganismo usado como inóculo de no experimento não apresentou diferença

nos valores das áreas do fipronil e nem nos produtos de degradação do fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona entre os dois tratamentos. Apenas pode-se observar que existe uma degradação do fipronil no tempo zero para os demais tempo de análise.

**Tabela 19:** Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por *Burkholderia thailondensis* utilizando os tratamentos 1 e 5.

Áreas dos Picos						
Tempo de Análise	Tratamento 1			Tratamento 5		
	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona
Tempo zero	0	45,874	0	0	44,009	0
1° semana	5,537	35,128	2,384	4,228	32,512	1,226
2° semana	7,518	33,085	3,388	5,113	33,420	3,458
3° semana	6,528	38,938	2,392	5,673	37,754	2,238
4° semana	4,300	37,902	1,504	6,667	35,120	1,876
5° semana	5,325	35,746	2,473	5,982	34,666	1,104
6° semana	6,239	32,836	1,530	8,307	38,103	2,681
7° semana	5,359	33,674	3,430	4,297	33,974	3,500
8° semana	4,483	34,563	1,480	4,180	32,404	2,976
<b>Médias</b>	5,661	35,234	2,323	5,556	34,744	2,382

Os tratamentos 2, 3 e 4 aos quais foi adicionado 1 mL de *Burkholderia thailondensis* e 0,03; 1,0 e 1,5 gramas respectivamente de SH, não apresentaram diferenças nas áreas dos compostos em estudo como pode – se observar na Tabela 20. Como nos tratamentos 1 e 5 observou-se apenas que existe uma degradação do fipronil no tempo zero para os demais tempo de análise.

**Tabela 20:** Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por *Burkholderia thailondensis* na através dos tratamentos 2,3 e 4.

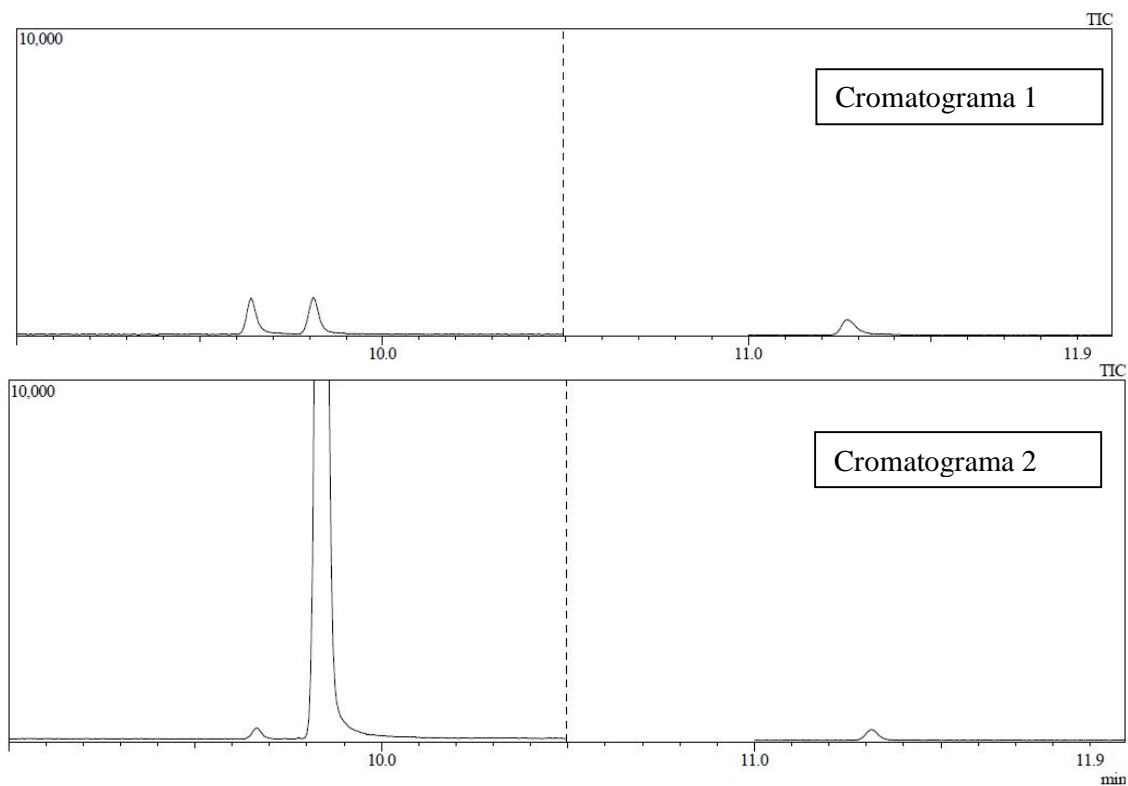
<b>Áreas dos Picos</b>									
<b>Tempo de Análise</b>	<b>Tratamento 2</b>			<b>Tratamento 3</b>			<b>Tratamento 4</b>		
	<b>Fipronil Sulfeto</b>	<b>Fipronil</b>	<b>Fipronil Sulfona</b>	<b>Fipronil Sulfeto</b>	<b>Fipronil</b>	<b>Fipronil Sulfona</b>	<b>Fipronil Sulfeto</b>	<b>Fipronil</b>	<b>Fipronil Sulfona</b>
Tempo zero	0	44,198	0	0	45,115	0	0	43,203	0
1° semana	5,427	37,057	2,482	4,463	35,675	3,480	5,518	36,011	3,375
2 ° semana	4,614	35,344	1,614	4,538	32,452	3,458	6,455	32,917	2,542
3 ° semana	3,548	36,452	3,548	4,500	32,344	3,534	4,487	34,151	1,608
4 ° semana	3,345	33,457	2,442	6,302	34,057	2,496	5,320	32,079	2,511
5 ° semana	4,391	33,752	2,504	7,193	32,992	2,585	5,508	35,465	3,528
6 ° semana	6,368	36,457	2,473	5,247	36,834	1,696	4,483	32,611	2,548
7 ° semana	5,239	34,822	3,530	3,326	35,970	2,640	3,493	34,917	3,457
8 ° semana	4,275	35,400	2,530	4,401	37,941	2,332	5,436	32,483	2,508
<b>Médias</b>	4,651	35,343	2,640	4,996	34,783	2,778	5,088	33,829	2,760

Os tratamentos 6, 7 e 8 os quais foram adicionados 2 mL de *Burkholderia thailondensis* e 0,03; 1,0 e 1,5 gramas respectivamente de SH, como pode – se observar nas Tabela 21, e como relatados nos tratamentos anteriores, não apresentaram diferenças nas áreas dos compostos em estudo. Como nos tratamentos 1,2,3, 4 e 5 observou-se apenas que existe uma degradação do fipronil no tempo zero para os demais tempo de análise.

**Tabela 21:** Áreas do fipronil e seus metabólitos para avaliar a degradação por *Burkholderia thailondensis* na através dos tratamentos 6, 7, e 8.

Tempo de Análise	Tratamento 6			Tratamento 7			Tratamento 8		
	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona
Tempo zero	0	45,628	0	0	44,916	0	0	45,264	0
1° semana	3,612	35,314	2,416	4,548	34,409	3,660	4,668	34,904	3,614
2 ° semana	6,208	35,227	2,280	3,313	35,617	2,756	5,321	35,722	2,722
3 ° semana	4,104	35,719	3,106	4,475	34,213	2,615	4,674	35,917	2,614
4 ° semana	5,677	33,416	2,549	3,621	34,769	2,431	5,415	33,614	2,677
5 ° semana	4,986	34,665	2,340	4,111	35,311	3,317	5,733	34,776	3,689
6 ° semana	3,342	33,983	1,118	5,883	35,574	3,514	4,513	36,389	2,567
7 ° semana	5,336	35,571	2,238	5,113	33,517	2,920	5,813	34,216	3,419
8 ° semana	5,433	35,313	3,320	4,967	35,413	3,092	3,790	34,802	3,336
<b>Médias</b>	4,837	34,901	2,421	4,504	34,852	3,038	4,991	35,043	3,080

A partir desses dados pode-se observar, que em todos os tratamentos os metabólitos do fipronil, o fipronil sulfeto e o fipronil sulfona, não puderam ser quantificados pelo método QuEChERS / GC – MS, pois para estes dois compostos todos os valores ficaram abaixo dos LOQ do método desenvolvido. Os valores mínimos de área para que cada composto pudesse ser quantificado deveria ser  $\pm 9,500$  para o fipronil sulfeto, e  $\pm 5,500$  para o fipronil sulfona o que corresponde a  $0,25 \text{ mg L}^{-1}$  de cada metabólito como pode ser observado na Figura 15.



**Figura 15:** Cromatogramas com as áreas dos picos dos limites de quantificação do método QuEChERS / GC – MS,  $0,25 \text{ mgL}^{-1}$  (cromatograma 1), e as áreas dos picos do fipronil e dos produtos de degradação fipronil sulfeto e fipronil sulfona do tratamento 1 (cromatograma 2).

Os valores de área do fipronil após a aplicação dos tratamentos ficaram próximos a 35,000, sendo que os mesmos medidos no tempo zero de cada

---

experimento foi aproximadamente 45,000. Colocando esses valores na equação da reta do composto pode-se observar que houve uma diminuição de  $0,75 \text{ mg L}^{-1}$ .

Esses resultados demonstram que a *Burkholderia thailondensis* foi capaz de degradar uma pequena quantidade de fipronil, mas não pode - se afirmar com certeza qual a quantidade formada de cada metabólito. A degradação biológica desse composto no solo pode ser potencializada por outros microrganismos presentes que estejam no ambiente e que também sejam capazes de realizar essa função. Além dos fatores físicos, como luz temperatura, umidade, que não foram estudados nesse experimento.

Na literatura, não há relatos sobre a degradação do fipronil por *Burkholderia thailondensis*, Alguns autores encontraram esse gênero em locais contaminados <sup>(147, 148)</sup>, e outro observou que esse gênero é capaz degradar criseno <sup>(149)</sup>. Com isso, conclui-se que bactérias desse gênero apresentam um potencial de degradação.

Além do fato da *Burkholderia thailondensis* degradar o fipronil, observou-se também que a SH não exerceu influência na degradação do mesmo, pois comparando os resultados dos tratamentos que utilizaram a SH e os que não foram adicionados este composto, não se observou diferenças significativas nos valores das áreas dos tratamentos quando suas áreas médias foram comparadas utilizando o teste Tukey de comparação das médias, Tabela 22.

**Tabela 22:** Tabela de comparação das médias dos tratamentos utilizando o teste de Tukey de comparação de médias.

Tratamentos	Médias		
	Fipronil Sulfeto	Fipronil	Fipronil Sulfona
1	5,661 (a)	35,234 (b)	2,323 (c)
2	4,651 (a)	35,343 (b)	2,640 (c)
3	4,996 (a)	34,783 (b)	2,778 (c)
4	5,088 (a)	33,829 (b)	2,760 (c)
5	5,556 (a)	34,744 (b)	2,382 (c)
6	4,837 (a)	34,901 (b)	2,421 (c)
7	4,504 (a)	34,852 (b)	3,038 (c)
8	4,991 (a)	35,043 (b)	3,080 (c)

Outro fator importante observado foi que as diferentes quantidades de SH adicionadas nas amostras do experimento, não demonstrou a capacidade de quelar o fipronil. No caso do estudo as SH apresentavam - se em estado sólido e estéril, e a mesma foi aplicada em tempo diferente a aplicação do fipronil nos tubos. Ou seja, primeiramente aplicou-se o fipronil e de cerca de 30 minutos após aplicou - se as SH. Esse dado é importante, pois na agricultura geralmente o fipronil é aplicado juntamente com a SH e a mesma se encontra em estado líquido. Muitos agricultores se queixam que as SH quelam o fipronil e o tornam inativo para o combate dos insetos, essa ação indesejada das SH traz prejuízos para a lavoura e também geram altos gastos tornando a adubação com material orgânico pouco satisfatória para grandes culturas que utilizam o fipronil.

## 6. Conclusões

- ✓ Empregando-se as técnicas de extração do DNA divulgadas na literatura, não foi possível extrair o DNA bacteriano diretamente do solo. Fez-se necessário utilizar uma técnica indireta para atingir o objetivo do estudo, como o crescimento das bactérias do solo em meio de cultura contendo o fipronil e posteriormente extrair o DNA.
- ✓ Os microrganismos identificados usando as técnicas de clonagem e seu sequenciamento afiliaram-se a cinco gêneros: *Clostridium* sp, *Bdellovibrio* sp, *Flavisolibacter* sp, *Burkholderia* sp e *Herbaspirillum* sp, das quais o gênero *Burkholderia* foi selecionada como organismo de estudo pois segundo a literatura, esse organismo tem a capacidade de degradar alguns contaminantes.
- ✓ O método QuEChERS / GC - MS desenvolvido para determinar o fipronil e seus metabólitos (fipronil sulfeto e fipronil sulfona) presentes no solo foi eficiente apenas para avaliar a degradação do fipronil, não sendo possível quantificar seus produtos de degradação.
- ✓ A *Burkholderia thailandensis* apresentou um potencial de degradação do fipronil.
- ✓ Não foi possível observar diferença significativa na degradação do fipronil entre os tratamentos do experimento.



## 7. Trabalhos Futuros

1. Avaliar a degradação biológica do fipronil utilizando outros organismos descritos na literatura, ou até identificado outros microrganismos em outras culturas onde se utiliza este pesticida.
2. Avaliar a degradação biológica do fipronil utilizando mais de um microrganismo.
3. Após o isolamento dos microrganismos do solo, ao invés de adquirir uma cepa pura, tentar isolar a partir do próprio solo de estudo o microrganismo de interesse.
4. Aplicar o método QuEChERS / GC – MS para avalia a degradação do fipronil no campo.

---

## 8. Referências

---

- 1 DIAS, A. L. **Apostila de Cana-de-açúcar**. 2009. Disponível em: <[http://www.agrocurso.com.br/pdf/Cana\\_de\\_acucar2009.pdf](http://www.agrocurso.com.br/pdf/Cana_de_acucar2009.pdf)>. Acesso em: 11 dez. 2012.
- 2 UNIÃO DA AGROINDÚSTRIA CANAVIEIRA DE SÃO PAULO (ÚNICA). 2011. **Cana-de-açúcar**. – Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/?secao=unica%20em20%acao&subsecao=cana-de-acucar>>. Acesso em: 11 dez. 2012.
- 3 COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO ( CONAB). **Cana -de açúcar Safra**. 2012. Disponível em: <[http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12\\_09\\_05\\_09\\_11\\_59\\_boletim\\_cana\\_portugues\\_-\\_agosto\\_2012\\_2o\\_lev.pdf](http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_09_05_09_11_59_boletim_cana_portugues_-_agosto_2012_2o_lev.pdf)>. Acesso em: 10 dez. 2012.
- 4 NATURAL RESOURCES CONSERVATION SERVICE -UNITED STATES ( USDA – NRSC). 2011. **Soil quality institute**. Disponível em:<<http://soil.usda.gov/sqi/>>. Acesso em: 11 dez. 2012
- 5 STEVERSON, F.J. **Humus chemistry: genesis, composition, reactions**. 2 ed New York: John Willey, 1994, 496p.
- 6 MOREIRA, F.M.S.; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. 2ª ed. Lavras: Editora UFLA, 2006. 729p.
- 7 SILVA FILHO, A. V.; SILVA, M. I. V. **Importância das substâncias húmicas para a agricultura**. 2011. Disponível em:<<http://www.emepa.org.br/anais/volume2/av209.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2012.
- 8 SANTOS, J. S. A. **Remediação de solos contaminados por agrotóxicos pelo tratamento com radiação gama**. 2009. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- 9 BAYER, C.; MIELNICZUK, J. Dinâmica e função da matéria orgânica. In: SANTOS, G. A.; SILVA, L. S.; CANELLAS, L. P.; CAMARGO, F. A. O. (Ed.). **Fundamentos de matéria orgânica do solo: ecossistemas tropicais e subtropicais**. Porto Alegre: Metrópole, 2008. cap.2, p.7-18.
- 10 OLIVEIRA, M. F. Comportamento dos herbicidas no ambiente. In: OLIVEIRA JUNIOR, R. S. **Plantas daninhas e seu manejo**. Guaíba: Agropecuária, 2001. cap. 10, p. 27-53.
- 11 BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, v.11, n. 30, p.31-46. 1997.

- 
- 12 BOBE, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M. Factors influencing the adsorption of fipronil on soil. **Journal and Food Chemistry**, v. 45, p. 4861 - 4865, 1997.
- 13 MASUTTI, C. S. M.; MERMUT, A. R. Degradation of fipronil under laboratory conditions in a tropical soil from Sirinhaém Pernambuco, Brazil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. 42, p. 33- 43, 2007.
- 14 VÍLCHEZ, J. L.; PRIETO, A.; ARAÚJO, L.; NAVALÓN, A. Determination of fipronil by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 919, p. 215- 221, 2001.
- 15 MORZYCKA, B. Simple method for the determination of trace levels of pesticides in honeybees using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **Journal of Chromatography**, v. 982, p. 267-273, 2002.
- 16 SCHLENK, D.; HUGGETT, D. B.; ALLGOOD, J.; BENNETT, E.; RIMOLDI, J.; BEELER, A. B.; BLOCK, D.; HOLDER, A. W.; HOVINGA, R.; BEDIENT, P. Toxicity of fipronil and its degradation products to *Procambarus* sp.: field and laboratory studies. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 41, p. 325-332, 2001.
- 17 NGIM, K. K.; CROSBY, D. G. Abiotic processes influencing fipronil and desethiofipronil dissipation in California, USA, rice fields. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, p. 972-977, 2001.
- 18 MADSEN, J. E.; SANDSTRON. M. W.; ZAUGG, S. D. Methods of analysis by the U. S. **Geological Survey National Water Quality Laboratory – A method supplement for the determination of fipronil and degradates in water by gas chromatography/mass spectrometry**. USGS, Colorado, 2003. Disponível em: <<http://nwql.usgs.gov/Public/pubs/OFR02-462/OFR02-462.pdf>>. Acesso em: 20 abr. de 2012.
- 19 ZAUGG, S. D.; SANDSTRON, M. W.; SMITH, S.G.; FEHLBERG, H. M.; **Methods of analysis by the U. S. geological survey national water quality laboratory – determination of pesticides in water by C-18 solid-phase extraction and capillary-column gas chromatography/mass spectrometry with selected-ion monitoring**. U.S. Geological Survey Open File Report 95-181; U.S.60 p. Disponível em: <<http://pubs.usgs.gov/of/1995/0181/report.pdf>>. Acesso em: 20 abr. de 2013.
- 20 GEERDINK, R. B.; NIESSEN, W. M. A.; BRINKMAN, U. A. T. H. Trace-level determination of pesticides in water by means of liquid and gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 970, p. 65-93, 2002.
- 21 AYANO, E.; KANAZAWA, H.; ANDO, M.; NISHIMURA, T. Determination and quantitation of sulfonylurea and urea herbicides in water samples using liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 507, p. 211 - 218, 2004.

- 
- 22 TORSVIK, V.; OVREAS, L. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 240-245, 2002.
- 23 TEBBE, C. C.; VAHJEN, W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 8, p. 2657-2665, 1993.
- 24 CHEN, J.C.P.; CHOU, C. **Cane sugar handbook**: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12nd.ed. New York: John Wiley, 1993. 947 p.
- 25 ALCÂNTARA, A. S. **Estudo feito no Inpe indica expansão da cana-de-açúcar no estado de São Paulo**. 2010. Disponível em: <<http://www.ecodebate.com.br/2010/04/29/estudo-feito-no-inpe-indica-expansao-da-cana-de-acucar-no-estado-de-sao-paulo/>>. Acesso em: 11 dez. 2012.
- 26 FREITAS JUNIOR, G. **Uso de defensivos é intensificado no Brasil**. 2012. Disponível em: <[http://www.sindag.com.br/noticia.php?News\\_ID=2278](http://www.sindag.com.br/noticia.php?News_ID=2278)>. Acesso em: 18 abr. 2013.
- 27 DICK, D. P.; MARTINAZZO, R. Matéria orgânica em ambientes terrestres e aquáticos: compartimentos, composição e reações. In: POLETO, C.; MERTEN, G. H. (Org.) **Qualidade dos sedimentos**. Porto Alegre: ABRH, 2006. cap. 4, p. 65-80.
- 28 BARRETO, A. C.; FREIRE, M. B. G. S.; NACIF, P. G. S.; ARAÚJO, Q. R.; FREIRE, F. J.; INÁCIO, E. S. B. Fracionamento químico e físico do carbono orgânico total em um solo de mata submetido a diferentes usos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, n. 5, p. 1471-1478, 1997.
- 29 BARRETO, A.C.; FREIRE, M. B. G. S.; NACIF, P. G. S.; ARAÚJO, Q. R.; FREIRE, F. F.; INÁCIO, E. S. B. Fracionamento químico e físico do carbono orgânico total em um solo de mata submetido a diferentes usos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 32, p. 1471-1478, 2008.
- 30 KONONOVA, M.M. **Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility**. 2nd english edition. Oxford: Pergamon, 1975. 544 p.
- 31 SCHMEIDE, K. S.; SACHS, M. BUBNER, T. REICH, K.H. HEISE, G. BERNHARD. Interaction of uranium(VI) with various modified and unmodified natural and synthetic humic substances studied by EXAFS and FTIR spectroscopy. **Inorganica Chimica Acta**, v. 351, p.133 - 140, 2003.
- 32 TAUKE - TOMISIELO, S. M. Microrganismos como indicadores de impactos ambientais. In: MAIA N. B. (Coord.). **Indicadores ambientais**. Sorocaba: PUC de São Paulo 1997. p.157 - 187.

- 
- 33 SCHULTEN, H. R.; SCHNITZER, M. Chemical model structures for soil organic matter and soils. **Soil Science**, v. 162, p. 115 - 130, 1997.
- 34 CANELLAS, L.P.; MENDONÇA, E.S.; DOBBSS, L.B.; BALDOTTO, M.A.; VELLOSO, A.C.X.; AMARAL-SOBRINHO, N.M.B. Reações da matéria orgânica. In: SANTOS, G.A.; SILVA, L.S.; CANELLAS, L.P.; CAMARGO, F.A.O. **Fundamentos da matéria orgânica do solo: Ecossistemas tropicais e sub-tropicais**. 2.ed. Porto Alegre: Metrópole, 2008. p.45-53.
- 35 PICCOLO, A. Atmospheric CO<sub>2</sub> and alteration of Global Climate. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 3., 1999, Santa Maria. **Anais...** Santa Maria: Imprensa Universitária, 1999. 145 p.
- 36 SEGNINI, A. **Estrutura e estabilidade da matéria orgânica em áreas com potencial de sequestro de carbono no solo**. 2007. 130f. Tese. (Doutorado em Ciências - Química Analítica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.
- 37 BHALLA, P.; HACKETT, N.M.; HART, R.G.; LIGNOWSDI, M. Imazaquin herbicide. In: SHANER, D.L.; O'CONNOR, S.L. (Ed.). **The Imidazolinone Herbicides**. Boca Raton: CRC, 1991. p. 237-245.
- 38 GROVER, R. Adsorption and desorption of urea herbicides in soils. **Canadian Journal of Soil Science**, v. 35, p. 127-135, 1975.
- 39 SANTOS, H.P.; TOMM, G.O. Disponibilidade de nutrientes e teor de matéria orgânica em função de sistemas de cultivo e de manejo de solo. **Ciência Rural**, v. 33, n. 3, p. 477- 486, 2003.
- 40 SILVA, L. M.V.; PASQUAL, A. Dinâmica e modelagem da matéria orgânica do solo com ênfase ao ecossistema tropical. **Energia na agricultura**, v.14, n. 3, p. 13 - 24, 1999.
- 41 CORREA, J.C. Efeito de sistemas de cultivo na estabilidade de agregados de um latossolo vermelho-amarelo em Querência, MT. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 203-209, 2002.
- 42 CONCEIÇÃO, P.C.; AMADO, T.J.C.; MIELNICZUK, J.; SPAGNOLLO, E. Qualidade do solo em sistemas de manejo avaliada pela dinâmica da matéria Orgânica e atributos relacionados. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 29, n. 5, p. 777-788, 2005.
- 43 NANNIPERI, P.; GRECO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biology activity in soil. In: BOLLAG, J. M.; STOTZKY, G. (Ed.) **Soil biochemistry**. New York: Marcel Decker, 1989. v. 4, p. 293-337.
-

- 
- 44 ARIAS, M. E.; GONZALEZ-PEREZ, J. A.; GONZALEZ-VILA, F. J.; BALL, A. S. Soil health-a new challenge for microbiologists and chemists. **International Microbiology**, v. 8, p.13-21, 2005.
- 45 WILSON, J. B. Shoot competition and root competition. **Journal of Applied Ecology**, v. 25, n.1, p. 279 - 296, 1988.
- 46 SLEATOR, R.D.; SHORTALL, C.; HILL, C. Metagenomics. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 361- 366, 2008.
- 47 BRUSSAARD, L.; DE RUITER, P.C.; BROWN, G.G. Soil biodiversity for agricultural sustainability. **Agriculture Ecosystems and Environment**, v. 121, p. 233–244, 2007.
- 48 DIAO, X.P.; SUN, Y.J.; SUN, Z.J.; SHEN, J.Z.; Effects of sulfamethazine on microbial activity in different types of soil. **Journal of Agro-Environment Science**, v. 24, n. 3, p. 694-699, 2005.
- 49 ENGELEM, B.; MEIKEN, K.; WINTZINGERODE, F.; HEUER, H.; MALKOMES, H. P.; BACKHAUS, H. Monitoring impact of pesticide treatment on bacterial soil communities by metabolic and genetic fingerprinting in addition to conventional testing procedures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 2814-2821, 1998.
- 50 JONSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 443-453, 2001.
- 51 TOOP, E. Bacteria in agricultural soils: diversity, role and future perspectives. **Journal of Soil Science**, v. 83, p. 303 - 309, 2003.
- 52 LO, C.C. Effect of pesticides on soil microbial community. **Journal of Environmental Sciences B**, v. 45, p. 348 - 359, 2010.
- 53 LEW, M.; SZAREK, J.; MIESZCZYNSKI, T. Effect of pesticides on soil and aquatic environmental microorganisms - a short review. **Fresenius Environmental Bulletin**. v. 18, p. 1390 - 1395, 2009.
- 54 JOERGENSEN, R.G.; EMMERLING, C. Methods for evaluating human impact on soil microorganisms based on their activity, biomass, and diversity in agricultural soils. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 169, p. 295 - 309, 2006.
- 55 BUNEMANN, E.K.; SCHWENKE, G.D.; VAN ZWIETEN, L. Impact of agricultural inputs on soil organisms - a review. **Australian Journal of Soil Research**, v. 44, p. 379 - 406, 2006.

- 
- 56 JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C.S. V.; TORSVIK, J. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils - a review. **Biology and Fertility of Soils**, v. 33, p. 443 - 453, 2001.
- 57 KALAM, A.; TAH, J.; MUKHERJEE, A.K. Pesticide effects on microbial population and soil enzyme activities during vermicomposting of agricultural waste. **Journal of Environmental Biology**, v. 25, p. 201 - 208, 2004.
- 58 GEVAO, B.; SEMPLE, K.T.; JONES, K.C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environmental Pollution**, v.108, 3 - 14, 2000.
- 59 IMFELD, G.; VUILLEUMIER, S. Measuring the effects of pesticides on bacterial communities in soil: A critical review. **European Journal of Soil Biology**, v.49, p. 22 -30, 2012.
- 60 YEN, J.H.; CHANG, J.S.; HUANG, P.J.; WANG, Y.S. Effects of fungicides triadimefon and propiconazole on soil bacterial communities. **Journal of Environmental Science and Health B**, v. 44, p. 681 - 689, 2009.
- 61 SMITH, J. L.; PAUL, E. A. The significance of soil microbial biomass estimations. **Soil Biochemistry**, v. 6, p. 357- 396, 1990.
- 62 GUNAPALA, N.; SCOW, K. M. Dynamics of soil microbial biomass and activity in conventional and organic farming systems. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, p. 805-816, 1998.
- 63 ROSCOE, R; BODDEY, R. M.; SALTON, J. C. Sistemas de Manejo e matéria orgânica do solo. In. ROSCOE, R.; MERCANTE, F. B.; SALTON, J. C. **Dinâmica da matéria orgânica do solo em sistemas conservacionistas.**: modelagem matemáticas e métodos auxiliares. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2006, p. 17-42.
- 64 TÓTOLA, M. R.; CHAER, G. M. Microrganismos e processos microbiológicos do solo como indicadores de qualidade dos solos. In: ALVARES, V.H. ; SHAEFER, C.E.G.R.; BARROS, N. F.; MELLO, J.W.V.; COSTA, L. M. (Ed.). **Tópicos em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do solo, 2002. v. 2, p. 195 - 276.
- 65 BALOTA, E. L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D. S.; HUNGRIA, M. Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 22, p. 641-649, 1998.
- 66 LUNDQUIST, E. J.; SCOW, K. M.; JACKSON, L. E.; UESUGI, S. L.; JOHNSON, C. R. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input, and organic farming systems to a wet/dry cycle. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 31, p.1661-1675, 1999.
-

- 
- 67 LICHTENSTEIN, E.P., SCHULTZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorus insecticides in soils, with special emphases on parathion. **Journal of Economic Entomology**, v. 57, p. 618-627, 1964.
- 68 MELO, I. S. **Biorremediação**. 2012. Disponível em: <[http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura\\_e\\_meio\\_ambiente/arvore/CONTAG01\\_68\\_410200710544.html](http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_68_410200710544.html)>. Acesso em: 19 fev. 2013.
- 69 MONTEIRO, R.T.R. Degradação de pesticidas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariuna: EMBRAPA, CNPMA, 1998. p.107-124.
- 70 MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícola e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 341-360.
- 71 CRAWFORD, J. W.; HARRIS, J. A.; RITZ, K.; YOUNG, I. M. Towards in evolutionary ecology of life in soil. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 4, p. 81-87, 2004.
- 72 FAEGRI, A.; TORSVIK, V. L.; GOKSOYR, J. Bacterial and fungal activities in soil: separation of bacteria and fungi by a rapid fractionated centrifugation technique. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 9, n. 2, p.105-112, 1977.
- 73 HOLBEN, W. E. Isolation and purification of bacterial community DNA from environmental samples. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCNERLEY, M. J.; STETZEN-BACH, L. D.; WATER, M. W. (Ed.). **Manual of environmental microbiology**. Washington: American Society for Microbiology, 1997. p. 431-436.
- 74 ROSZAK, D. B.; GRIMES, D. J.; COLWELL, R. R. Viable but non recoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 334-338, 1985.
- 75 ROOSE-AMSALEG, C. L.; GARNIER-SILLAM, E.; HARRY, M. Extraction and purification of microbial DNA from soil and sediment samples. **Applied Soil Ecology**, v. 18, p. 47-60, 2001.
- 76 ROSELLÓ-MORA, R.; AMANN, R. The species concept for prokaryotes. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 39-67, 2001.
- 77 MOREIRA, F. M. S.; SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. Lavras: Ed. UFLA, 2002. 626p.
- 78 OROS-SICHLER M., COSTA R., HEUER H., SMALLA K. Molecular fingerprinting techniques to analyze soil microbial communities. In: ELSAS J.D., JANSSON J.K., TREVORS J.T. **Modern soil microbiology**. 2. ed. Madison: CRC, 2006. cap. 14, p. 355–386.



- 
- 79 NAKATSU, C. H.; TORSVIK, V.; OVREÅS, L. Soil community analysis using DGGE of 16S rDNA Polymerase Chain Reaction Products. **Soil Science Society American Journal**, v. 64, p.1328-1388, 2000.
- 80 SIGLER, W.V.; TURCO, R.F. The impact of chlorothalonil application on soil bacterial and fungal populations as assessed by denaturing gradient gel electrophoresis. **Applied Soil Ecology**, v. 21, p. 107-118, 2002.
- 81 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR). **Amplificação de DNA in vitro**. 2005. Disponível em:< <http://www.e-escola.pt/topico.asp?hid=339>>. Acesso em: 22 fev. 2013.
- 82 SANGER, F. NICKLEN, S. COULSON, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- 83 MARDIS, R. E. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends in Genetics**. v. 24, p. 133-141, 2007. Disponível em: <[http://www.cs.brown.edu/courses/cs296-5/Fall2011/Papers/Mardis\\_NGST.pdf](http://www.cs.brown.edu/courses/cs296-5/Fall2011/Papers/Mardis_NGST.pdf)>. Acesso em: 10 abr. 2012.
- 84 LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L. E COX, M.M. **Princípios de bioquímica**. 3 ed. São Paulo: SARVIER, 2002. 975p.
- 85 ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; ROBERTS, K.; LEWIS, J.; WALTER, P.; RAFF, M. **Biologia molecular da célula**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1549 p.
- 86 MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de brock**. 10. ed. São Paulo: Prentice Hall. 2004.608 p.
- 87 PROSDOCIMI, F.; CERQUEIRA, G.C.; BINNECK, E.; SILVA, A.F.; REIS, A.N.; JUNQUEIRA, A.C.M.; SANTOS, A.C.F.; NBANI, A.; WUST, C.I.; FILHO, F.C.; KESSEDJIAN, J.L.; PETRETSKI, J.H.; CAMARGO, L.P.; FERREIRA, R.G.M.; LIMA, R.P.; PEREIRA, R.M.; JARDIM, S.; SAMPAIO, V.S. E FLATSCHART, A.V.F. Bioinformática: manual do usuário. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 12-25, 2002.
- 88 BOARETTO, M.A.C.; FORTI, L.C. Perspectivas no controle de formigas cortadeiras. **Série Técnica IPEF**, v.11, n. 30, p.31-46. 1997.
- 89 BOBE, A.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M. Factors influencing the adsorption of fipronil on soil. **Journal and Food Chemistry**, v. 45, p. 4861 - 4865, 1997.
- 90 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Consulta Pública número 107 de 09/11/2007**. Disponível em:< [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 14 abr. 2012.

- 
- 91 THE PESTICIDE Manual. 12. ed. Bath: British Crop Protection Council, 2000. 1250 p.
- 92 CARBONI, E.; SILVAGNI, A.; VALENTINI, V.; DI, C. G. Effect of amphetamine, cocaine and depolarization by high potassium on extracellular dopamine in the nucleus accumbens shell of SHR rats. An in vivo microdialysis study. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 27, p. 653– 659, 2003.
- 93 DEMCHECK, D.K., AND SKROBIALOWSKI, S.C. **Fipronil and degradation products in the rice-producing areas of the Mermentau River Basin, Louisiana, February-September 2000**: U.S. Geological Survey Fact Sheet FS-010-03. 2003. Disponível em: <<http://la.water.usgs.gov/publications/pdfs/FS-010-03.pdf>>. Acesso em: 30 maio 2012.
- 94 CONNELLY, M.J. Wideband semiconductor optical amplifier steady-state numerical model. **IEEE Journal of Quantum Electronics**, v. 37, p. 439-447, 2001.
- 95 PEI, Z.; LU, Y.; LIU, B.; GAN, J. J. Dynamics of fipronil residue in vegetable-field ecosystem. **Chemosphere**, v. 57, p. 1691-1696, 2004.
- 96 MANDAL, K., SINGH, B. Dissipation of fipronil granule formulation in sugarcane field soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 88, p. 142-147, 2013.
- 97 MANDAL, K.; SINGH, B. Persistence of fipronil and its metabolites in sandy loam and clay loam soils under laboratory conditions. **Chemosphere**, 2013. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0045653513000027/1-s2.0-S0045653513000027-main.pdf?\\_tid=2b7023dc-a701-11e28b250000aacb35f&acdnat=1366163604\\_b27987fe36c6f01669cef44a7f8f3c4f](http://ac.els-cdn.com/S0045653513000027/1-s2.0-S0045653513000027-main.pdf?_tid=2b7023dc-a701-11e28b250000aacb35f&acdnat=1366163604_b27987fe36c6f01669cef44a7f8f3c4f)> Acesso em: 04 abr. 2013.
- 98 KODEŠOVÁ, R.; KOČÁREK, M.; KODEŠ, V.; DRÁBEK, O.; KOZÁK, J.; HEJTMÁNKOVÁ, K. Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n.1, p. 540-550, 2011.
- 99 RAVETON, M.; AAJOU D. A.; WILLISON, J.; CHERIFI, M.; TISSUT, M.; RAVANEL, P. Soil distribution of fipronil and its metabolites originating from a seed-coated formulation. **Chemosphere**, v. 69, n. 7, p. 1124-1129, 2007.
- 100 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. **Journal of AOAC International**, v. 83, p. 412 -431, 2003.
- 101 BRONDI, S.H.G.; MACEDO, A.N.; VICENTE, G.H.L.; NOGUEIRA, A.R.A. Evaluation of the QuEChERS method and gas chromatography-mass spectrometry for the analysis pesticide residues in water and sediment. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 86, p. 18–22, 2011.

---

102 SAMPAIO, M.R.F. **Otimização e validação de métodos empregando QuEChERS modificado LC – DAD e LC – ESI – MS / MS para determinação de agrotóxicos em derivados da cana-de-açúcar.** 2011. 121f. Dissertação (Mestrado em Química Tecnológica e Ambiental) – Universidade Federal do Rio Grande, Rio Grande, 2011.

103 MARTINS, G. L. **Determinação de resíduos de pesticidas em solo de lavoura de arroz irrigado empregando QuChers modificado e LC – MS / MS.** 2010. 149f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica ) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2010.

104 Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RE nº 899 de 29/05/2003. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 02 mar. 2013.

105 LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)** . São Carlos: RiMa, 2004. 93p.

106 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos.** DOQ-CGCRE-008. 2003. Disponível em:  
<[http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_02.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_02.pdf)>. Acesso em 15 abr. 2013.

107 YOUNG, W. J.; STEINER, E. H. **Statistical manual of the association of official analytical chemists.** Arlington: AOAC, 1975. 88 p.

108 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

109 SANTANA, A.K.M.; NUNES, L.C.C.; MEDEIROS, F.P.M.; SILVA, M.J.; LAVRA, Z.M.M. ROLIM-NETO, P.J. Otimização e validação do método analítico volumétrico para quantificação do carbonato de cálcio. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, n. 2, p.177-183, 2007.

110 COELHO, A. M.; FRANÇA, G. E.; PITTA, G. V. E.; ALVES, V. M. C. **Amostragem de solos:** A base para aplicação de corretivos e fertilizantes. 2006. Disponível em:  
<[http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho\\_2ed/feramostra.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho_2ed/feramostra.htm)>. Acesso em: 25 fev. 2013.

111 VIESTEL, M. A. D. **Método rápido de extração de DNA em solos tropicais.** 1995.90f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1995.

---

112 SELBACH, P. A. **Optimization of a DNA extraction procedure for phylogenetic probe analysis of soil microbial communities**. 1998. 254f. Thesis (Ph.D) - University of Wisconsin, Madison, 1998.

113 GRIFFITHS, B. S.; RITZ, K.; BARDGETT, R.D.; COOK, R.; CHRISTENSEN, S.; EKELUND, F.; SORENSEN, S. J.; BÅÅTH, E. ; BLOEM, J. ; DE RUITER, P. C. ; DOLFING, J. ; NICOLARDOT. Ecosystem response of pasture soil communities to fumigation-induced microbial diversity reductions: an examination of the biodiversity–ecosystem function relationship. **Oikos**, v. 90, n. 2, p. 274–294, 2000.

114 DIREITO, I. C. N.; SANTOS, S. T.; BALDANI, J. I.; TEIXEIRA, K. R. S. Otimização da técnica de extração de DNA de amostras de solo e da amplificação parcial dos genes nifH para avaliação de populações de bactérias diazotróficas. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 28. 2001, Londrina. **Livro de resumos...** Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2001. p. 72.

115 ZINDER, S.H.; CARDWELL, S.C.; ANGUISH, T.; KOCH, M. Methanogenesis in a thermophilic (58° C) anaerobic digester *Methanotrix* sp as an important acetoclastic methanogen. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, p. 796 – 807, 1984.

116 CULLEN, D. W.; HIRSCH, P. R. Simple and rapid method for direct extraction of microbial DNA from soil for PCR. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 30, n. 8/9, p. 983-993, 1998.

117 NIELSEN, A. T.; LIU, W. T.; FILIPE, C.; GRADY, L.; MOLIN, S.; STAHL, D. A. Identification of a novel group of bacteria in sludge from a deteriorated biological phosphorus removal reactor. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 1251–1258, 1999.

118 LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT E.; GOODFELLOW, M. (Ed.), **Nucleic acids techniques in bacterial systematic**. New York: John Wiley, 1991. p. 115–175.

119 SAITOU, N.; NEI, M. The Neighbor-Joining method—a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 406–425, 1987.

120 TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular Biology and Evolution**, v. 28, n.10, p. 2731 - 2739, 2011.

121 KURZ, M. H. S. **Estudo de métodos empregando extração em fase sólida e análise por HPLC – DAD e GC – ECD para determinação de resíduos de pesticidas em águas e a degradação a campo**. 2007. 161f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2007.

122 ROUVIÈRE F., BULETÉ, A.; CREN-OLIVÉ, C.; ARNAUDGUILHEM, C. Multiresidue analysis of aromatic organochlorines in soil by gas chromatography-

---

mass spectrometry and QuEChERS extraction based on water/dichloromethane partitioning. Comparison with accelerated solvent extraction. **Talanta**, v. 93, p. 336-344, 2012.

123 BRAGANÇA, I.; PLÁCIDO, A.; PAÍGA, P.; DOMINGUES, V. F.; DELERUE-MATOS, C. QuEChERS : A new sample preparation approach for the determination of ibuprofen and its metabolites in soils. **Science of The Total Environment**, v. 433, p. 281-289, 2012.

124 ROH, C.; VILLATTE, F.; KIM, B.G.; SCHMID, R.D. Comparative Study of methods for extraction and purification of environmental DNA from soil and sludge samples. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 134 p. 97-112, 2006.

125 DE MEY, M.; LEQUEUX, G.; MAERTENS, J.; DE MAESENEIRE, S.; SOETAERT, W.; VANDAMME, E. Comparison of DNA and RNA quantification methods suitable for parameter estimation in metabolic modeling of microorganisms. **Analytical Biochemistry**, v. 353, n. 2, p.198-203, 2006.

126 HE, J. **Molecular biological studies of soil microbial communities under different management practices in forest ecosystems of Queensland**. 2004. 161f. Thesis (MSc.) - Griffith University, Queensland, 2004.

127 ZHOU, J.; TIEDJE, J. M. Gene transfer from a bacterium injected into an aquifer to an indigenous bacterium. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 613-618, 1995.

128 LLOYDE-JONES, G.; HUNTER, D. W. F. Comparison of rapid DNA extraction methods applied to contrasting New Zealand soils. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 33, p. 2053- 2059, 2001.

129 CORRÊA, E. M.; POSSIK, P. A. **A análise de DNA por eletroforese**. 2008. Disponível em: < <http://www.ciencianews.com.br/siteDNA/testesgeneticos.pdf> >. Acesso em: 20 maio 2012.

130 SANSOLANI, C. P. **Desenvolvimento Caracterização e Mapeamento de microssatélites de terra de pentanucleotídeos em *Eucalyptus sp.*** 2008. 114f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

131 TURNER, S.; PRYER, K.M.; MIAO, V.P.W.; PALMER, J.D. Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 46, p. 327 - 338, 1999.

132 TSAI, Y. L.; OLSON, B. H. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 57, n. 4, p. 1070-1074, 1991.

- 
- 133 STERNE, M.; BATTY, I. **Pathogenic clostridia**. London: Butleworths, 1975. 144p.
- 134 SANDLER, R.J.; ROCKE, T.S.; SAMUEL, M.D.; YUILL, T.M. Seasonal prevalence of *Clostridium botulinum* type C in sediments of northern California wetland. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 29, n. 4, p. 533-539, 1993.
- 135 LEITÃO, M. F. F.; DELAZARI, J. *Clostridium botulinum* em solo no Estado de São Paulo. **Instituto Tecnologia Alimentar**, v. 13, p. 75 - 82, 1983.
- 136 LANGENEGGER, J.; DOBEREINER, J. Botulismo enzótico em búfalos no Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 8, p. 37-42, 1988.
- 137 GRAHAM, J.M. Inhibition of *Clostridium botulinum* type C by bacteria isolated from mud. **Journal Applied Bacteriology**. v. 45, n. 2, p. 205-211, 1978.
- 138 BASTIDA, F.; NICOLAS, C.; MORENO, J. L.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Tracing changes in the microbial community of a hydrocarbon-polluted soil by culture-dependent proteomics. **Pedosphere**, v. 20, n. 4, p. 479 - 485, 2010.
- 139 LU, J.; CHEN, T.; WUA, J.; WILSON, P. C.; XIANGYANG, H.; JIAZHONG, Q. Valuable metal recovery during the bioremediation of acidic mine drainage using sulfate reducing straw bioremediation system. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 223, p. 3049 - 3055, 2011.
- 140 BORDEN, J.R; PAPOUTSAKIS, E.T. Dynamics of genomic-library enrichment and identification of solvent tolerance genes for *Clostridium acetobutylicum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3061-3068, 2007.
- 141 HAMPTON, T. Researchers eye “predatory” bacterium for novel antimicrobial strategies. **The journal of the American Medical Association**, v. 291 ,n. 10, p. 1188-1189, 2004
- 142 FRY, J.C.; STAPLES, D.G. The occurrence and role of *Bdellovibrio bacteriovorus* in a polluted river. **Water Research**, v. 8, n. 12, p. 1029-1035, 1974.
- 143 YOON, M. H.; IM, W.T. *Flavisolibacter ginsengiterrae* gen. nov., sp. nov. and *Flavisolibacter ginsengisoli* sp. nov., isolated from ginseng cultivating soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 57, p. 1834 - 1839, 2007.
- 144 KAMPFER, P.; LODDERS, N.; FALSEN, E. *Hydrotalea flava* gen. nov., sp. nov., a new member of the phylum Bacteroidetes and allocation of the genera *Chitinophaga*, *Sediminibacterium*, *Lacibacter*, *Flaviumibacter*, *Flavisolibacter*, *Niabella*, *Niastella*, *Segetibacter*, *Parasegetibacter*, *Terrimonas*, *Ferruginibacter*,

---

Filimonas and Hydrotalea to the family Chitinophagaceae fam. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v 61, p. 518–523, 2011.

145 VIAL, L.; CHAPALAIN, A.; GROLEAU, M. C.; DEZIÉL, E. The various lifestyles of the *Burkholderia cepacia* complex species: a tribute adaptation. **Environmental Microbiology**, v. 13, n.1, p. 1-12, 2011.

146 VOGT, C.; ALFREIDER, A.; LORBEER, H. Bioremediation of chlorobenzene – contaminated ground water in an in situ reactor mediated by hydrogen peroxide. **Journal of Contaminant Hydrobiology**, v. 68, p. 121 -141, 2004.

147 YANG, C.; LIU, N.; GUO, X.; QIAO, C. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos – degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, p. 118 - 125, 2006.

148 CERNIGLIA, C.E. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Biodegradation**, v. 3, p. 351-368, 1992.

149 HAIGLER, B. E.; WALLANCE, W. H.; SAPAIN, J. C. Biodegradation of 2 nitrotoluene by *pseudomonas* sp. JS42. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, p. 3466 – 3469, 1994.

150 BALDANI, J. I.; BALDANI, V. L. D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. sp. nov., a root associated nitrogen-fixing bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 36, p. 86-93, 1986.

151 BALDANI, J. I.; POT, B.; KIRCHHOF, G.; FALSEN, E.; BALDANI, V. L. D.; OLIVARES, F. L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; HARTMANN, A.; GILLIS, M.; DÖBEREINER, J. Emended description of *Herbaspirillum*; inclusion of [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans*, a mild plant pathogen, as *Herbaspirillum rubrisubalbicans* comb. nov.; and classification of a group of clinical isolates (EF Group 1) as species 3. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 46, p. 802-810, 1996.

152 KIRCHHOF, G.; ECKERT, B.; STOFFELS, M.; BALDANI, J. I.; REIS, V. M.; HARTMANN, A. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new bacterial species occurring in C4-energy plants. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 157-168, 2001.

153 YANG, L.; WANG, Y.; SONG, J.; ZHAO, W.; HE, X.; CHEN, J.; XIAO, M. Promotion of plant growth and in situ degradation of phenol by an engineered *Pseudomonas fluorescens* strain in different contaminated environments **Soil Biology and Biochemistry**, v.43, n. 5, p. 915-922, 2011.

154 PARIONA-LLANOS, R.; FERRARA, F. I. S.; GONZALES, H. H. S.; BARBOSA, H. R. Influence of organic fertilization on the number of culturable diazotrophic

---

endophytic bacteria isolated from sugarcane. **European Journal of Soil Biology**, v. 46, n. 6, p. 387-393, 2010.

155 ALEXANDER, M. **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley, 1977. p.16-72.

156 CALIZ, J.; VILA, X.; MARTÍ, E.; SIERRA, J.; NORDGREN, J.; LINDGREN, P.E.; BAÑERAS, L.; MONTSERRAT, G. The microbiota of an unpolluted calcareous soil faces up chlorophenols: Evidences of resistant strains with potential for bioremediation. **Chemosphere**, v. 83, n. 2, , p. 104-116, 2011.

157 MELLO, P. C. M.; LOBO, I.; YABE, M. J. S. Otimização de um método de extração ultrassônica e análise por CLAE para determinação de Diuron e seus metabólitos em solo de cultivo de cana-de-açúcar. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 30, n. 2, p. 107-116, 2009.

157 SMALLING, K. L.; KUIVILA, K. M. Multi-residue method for the analysis of 85 current-use and legacy pesticides in bed and suspended sediments. **Journal of Chromatography A**, v. 1210, n. 1, p. 8-18, 2008.