



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**

**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

Caio César Achilles do Prado

**DEGRADAÇÃO DE FIPRONIL POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE SOLO**

**DOURADOS-MS**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS**  
**CURSO DE BIOTECNOLOGIA**

Caio César Achilles do Prado

**DEGRADAÇÃO DE FIPRONIL POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE SOLO**

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

**DOURADOS-MS**

**2017**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

P896d Prado, Caio César Achilles Do  
Degradação de Fipronil por Bactérias Bioprospectadas de Solo / Caio  
César Achilles Do Prado -- Dourados: UFGD, 2017.  
68f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Maricy Raquel Lindenbáh Bonfá

TCC (Graduação em Biotecnologia) - Faculdade de Ciências  
Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados.  
Inclui bibliografia

1. metabolismo. 2. agrotóxico. 3. biodegradação. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.**

Caio César Achilles do Prado

## DEGRADAÇÃO DE FIPRONIL POR BACTÉRIAS BIOPROSPECTADAS DE SOLO

Trabalho de conclusão de curso apresentado como parte dos requisitos para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, no Curso de Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Grande Dourados.

Aprovado em 02 de Março de 2017

### BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira – Universidade Federal da Grande Dourados

---

Prof. Dr. Rômulo Penna Scorza Junior – Embrapa Agropecuária Oeste

## **DEDICATÓRIA**

Dedico esse trabalho a todos aqueles que sempre estiveram ao meu lado, momentos felizes e tristes. Dando-me força para superar e prosseguir no caminho certo. As tortuosas ruas do caminhar serviram para o maior empenho e formação de carácter pessoal. Se hoje sou o que sou, alegre, disciplinado, dedicado, sonhador, é pelo simples motivo do aprendizado que o mundo e a vida nos trás com o passar. OBRIGADO A TODOS VOCÊS, CADA PESSOINHA QUE AMO INCONDICIONALMENTE. OBRIGADO POR EXISTIREM.

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço primeiramente ao Grande Arquiteto do Universo, por sua boa vontade ao ceder para cosmo que nos cerca, uma ínfima parte de sua graça. Dando-me perseverança necessária para prosseguir no caminho que sempre almejei*

*À minha avó querida e amada, Heterly Mara Pereira Achilles, o PRINCIPAL motivo que possibilitou a realização de meus sonhos. Arcando durante os anos de minha graduação com minhas despesas mais pesadas. Se hoje consegui chegar aqui, é simplesmente porque por algum motivo, não sei o qual, O Senhor colocou anjos em lugares estratégicos de minha vida*

*À minha mãe, Ivy Soraya Achilles, aquela que se transformou numa SUPER-MÃE, apagando toda e qualquer necessidade da presença de um pai. É até meio clichê isso, mas é um amor incondicional que sinto pela senhora, mesmo eu sendo esse ogro, estúpido, sem paciência e muitas, mas muitas vezes grosso e desnecessário, posso até não transparecer, mas AMO MUITO A SENHORA*

*Ao meu padrasto Antônio Valcir, que passou a ser como um pai, participando de todos momentos importantes de meu amadurecimento*

*Aos meus familiares, tios - Igor Vinícius, Thaís Janaína Achilles Schiavinni, Igle Veridiana Achilles Versuti, Luciano Aparecido Versuti, Renan Cassius Achilles, Milton Celso Achilles Junior, Viviane Sirineu, e avô Milton Celso Achilles. Esses que apresentaram o amor incondicional que uma família deve apresentar e que dá forças*

*Aos meus MELHORES amigos de infância, Vilson Walter Schulz Junior e Hévillyn Thaís Costa Alves. As pessoinhas mais lindas desse mundo, que as considero como irmãos de outra mãe. Permanecendo sempre ao meu lado, mesmo com a distância e nada abalando nossa amizade, amo vocês!!*

*Aos amigos adquiridos na faculdade, Aniely Oliveira, Amanda Roberta, Bianca Boni Dias, Dândrea Ferrari, Flávia Stabille, Géssica Zanetti, Maria Heloíza, Maria Carolina Arruda, Maria Lorenza Leal Motta, e especialmente Lucas Pires Guarnier. Esse guri, o que falar dele... sempre tive a impressão de ser como meu irmão mais velho, dizendo várias vezes isso ao mesmo. Sempre me dando dicas, aguentando meus constantes desabafos, mal humor entre outros desafetos. As aventuras que enfrentamos nessa faculdade... nem se descreve, as horas a fio de experimentos juntos, risos, xingos, lágrimas, sentimentos. Agradeço muito a todos vocês por aturar*

*minhas “palestras aleatórias” e momentos de “inspirações”, por isso que adoro vocês povo lindo...*

*A todo corpo técnico, que apesar do cargo, não os considero como tal. Foram tantas horas de laboratório, tantos pedidos, chamadas de atenção, que o tempo nos transformou em amigos, sendo elas – Renata Araújo, Fabiane Gomes da Silva Dantas, Suéllen de Paula e Edimara Ramos*

*A todos os professores que no passar desses anos, tive oportunidade em conhece-los e aprender pelo menos um pouco de cada, não digo apenas o conteúdo, mas também o desenvolver de um singelo afeto*

*À Instituição Embrapa Agropecuária Oeste, principalmente ao pesquisador Dr. Rômulo Penna Scorza Júnior e seu técnico Paulo Henrique Vitro, pela colaboração das análises quantitativas realizadas no presente trabalho*

*Nunca poderia esquecer a pessoa responsável pela realização desse trabalho, minha “Mãe” da faculdade, orientadora Maricy Raquel Lindenbah Bonfá. Não tenho palavras suficientes para expressar o quanto sou grato à senhora, lembro como se fosse hoje, primeiro dia de aula, quando já “cerelepimpão” perguntei sua linha de pesquisa, sem nem ao menos saber o que era microbiologia. Lembro-me de iniciar o trabalho com a senhora em pleno primeiro semestre, um pouco precoce confesso, mas consegui. Foram tantos anos com a senhora ao meu lado, 3 anos para ser mais específico, muito tempo né. Cada milagre realizado para fazer pesquisa (©), mas no final tudo deu certo, assim como o bom e velho Fernando Sabino diz: “No fim tudo da certo, e se não deu certo é porque ainda não chegou ao fim”. Foram tantas provações, obstáculos e desalentos... mas fazer o que né, a vida é assim, se não arriscar e se permitir, como saber?? É profa, tudo que aprendi com a senhora levarei sempre comigo, não digo apenas a experiência, mas também o comprometimento, disciplina e ética. Agradeço a senhora por todas as oportunidades que a senhora pôde me oferecer, todos os puxões de orelha, ensinamentos e peço desculpa por qualquer coisa que tenha causado. Desejo tudo de melhor a senhora e sua família, principalmente a pequena Helena que está por vir, que possa se tornar uma mulher exemplar assim como sua mãe*

*Quero por final, agradecer a todos que estiveram ao meu lado, com meu bom humor ou não. Desejo a vocês tudo de bom, que todos os orixás levantem escudinho e tragam paz, saúde e sucesso a todos, muitos beijos de luz a todos e que Santa Cher ilumine o caminho de cada um.*

## Resumo

O fipronil é um inseticida fenilpirazol que possui ação de amplo espectro, já que apresenta ação direta nos receptores de ácido gama-aminobutírico (GABA). É bastante utilizado atualmente, devido principalmente à expansão agrícola, em lavouras de soja, cana-de-açúcar, milho entre outras culturas. Porém, este agrotóxico apresenta toxicidade a insetos não alvos como os polinizadores e também a outros animais ao longo das cadeias tróficas. Assim, o presente estudo teve como objetivo a bioprospecção de bactérias com o potencial de crescimento e degradação do fipronil como únicas fontes de carbono e nitrogênio. Desta forma, foram coletadas amostras de solos sob o cultivo de milho com histórico de aplicação do fipronil visando o isolamento de bactérias em enriquecimentos realizados em microcosmo. O isolamento resultou em isolados de bactérias Gram-positivas, esporuladas, catalase positiva e possivelmente pertencentes ao gênero *Bacillus*. O meio usado para o isolamento foi o ATZ-R (adaptado), utilizando a concentração de 600 mg.L<sup>-1</sup> de fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio. A partir de cinéticas de crescimento aeróbias foram selecionados os isolados que apresentaram melhor crescimento. A bactéria E1 foi selecionada como o melhor isolado e a partir do sequenciamento do gene RNAr 16S foi constatado que possivelmente pertença à espécie *Bacillus megaterium*. Foi realizada uma comparação com o isolado G2.8 do gênero *Enterobacter*, provavelmente pertencente à espécie *Enterobacter cloacae*. Esse isolado pertencente à coleção de isolados do Laboratório de Metagenômica-UFGD, foi isolado em solo com histórico de aplicação do fipronil. Utilizando as duas bactérias foi realizada cinética de crescimento e degradação do fipronil a 600 mg.L<sup>-1</sup>. O crescimento foi avaliado através da biomassa seca e a degradação foi analisada por meio da quantificação dos resíduos através de CG/MS, avaliando além da degradação do fipronil a formação e quantificação de seus metabólitos. Os isolados E1 e G2.8 degradaram o fipronil a uma porcentagem de 94 e 96%, respectivamente. Porém utilizando o programa estatístico GENES, não foi observada variância estatística através da ANOVA e, quando comparada com seus respectivos controles foi constatada diferença pelo teste de média DMS-t 5%. O isolado E1 apresentou formação tanto do metabólito fipronil sulfeto formado a partir de reações enzimáticas de redução quanto fipronil sulfona formada a partir de reações enzimáticas de

oxidação. Enquanto G2.8 apresentou maior formação de fipronil sulfeto. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os isolados estudados possuem uma alta eficiência de biodegradação do fipronil quando comparados aos resultados da literatura.

**Palavra chave:** metabolismo, agrotóxico, biodegradação

### **Abstract**

Fipronil is a phenylpyrazole insecticide that has a broad-spectrum action, since it has a direct action on gamma-aminobutyric acid receptors (GABA). It is widely used nowadays, mainly due to agricultural expansion, in soybean, sugarcane, corn and other crops. However, this agrototoxic shows toxicity to non-target insects such as pollinators and to other animals along the trophic chains. Thus, the present study had the objective of bioprospecting bacteria with the potential to growth and degradation of fipronil as the only sources of carbon and nitrogen. In this way, soil samples were collected under maize cultivation with a history of application of fipronil aiming the isolation of bacteria in microcosm enrichments. Isolation resulted in strains of Gram-positive, sporulated, catalase positive bacteria and possibly belonging to the genus *Bacillus*. The medium used for isolation was ATZ-R (adapted), using a fipronil concentration of 600 mg.L<sup>-1</sup>, as the sole source of carbon and nitrogen. From the aerobic growth kinetics, the isolates that showed the best growth were selected. The E1 isolate was selected as the best isolate and from the sequencing of the 16S RNAr gene it was verified that it possibly belongs to the species *Bacillus megaterium*. A comparison was made with a strain G2.8 of the genus *Enterobacter*, belong to the species *Enterobacter cloacae*. This strain also belongs to the collection of strains of the Laboratório de Metagenômica-UFGD, was isolated in soil with a history of application of fipronil. Using the two bacteria, growth and degradation kinetics of fipronil at 600 mg.L<sup>-1</sup> were performed. The growth was evaluated through the dry biomass and the degradation was analyzed by GC/MS, evaluating besides the degradation of fipronil the formation and quantification of its metabolites. Isolates E1 and G2.8 degraded fipronil at a percentage of 94 and 96%, respectively. However, using the GENES statistical program, no statistical variance was observed through ANOVA and, when compared with their respective controls, a difference was verified

by the DMS-t 5% mean test. The E1 presented formation of both the fipronil sulfide metabolite formed from enzymatic reduction reactions and fipronil sulfone formed from enzymatic oxidation reactions. The G2.8 presented higher formation of fipronil sulfide. The results obtained in this study demonstrate that the studied strains have a high biodegradation efficiency of fipronil when compared to the results of the literature.

**Keyword:** metabolism, agrochemical, biodegradation

## SUMÁRIO

1. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
1.1. Agroquímicos .....	13
1.2. Fipronil .....	16
1.3. Toxicidade do Fipronil.....	20
1.4. Biodegradação e Biorremediação do Fipronil .....	22
2. OBJETIVOS .....	25
2.1. Gerais .....	25
2.2. Específicos.....	25
3. HIPÓTESE.....	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.2. Bioprospecção de Bactérias Através de Microcosmo de Solo.....	27
4.3. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica dos Isolados .....	28
4.3.1. Caracterização morfotintorial.....	28
4.3.2. Teste de catalase .....	29
4.3.3. Teste de oxidase .....	29
4.3.4. Teste de KOH.....	30
4.4. Preservação dos Isolados em Glicerol .....	30
4.5. Reativação dos isolados .....	31
4.6. Seleção das Bactérias Isoladas através da Cinética de Crescimento em Fipronil Comercial.....	31
4.7. Avaliação do Crescimento em Fipronil Através da Medida do Peso Seco .....	32
4.7.1. Otimização do pré-inóculo com extrato de levedura.....	33
4.8. Análise de Crescimento e Degradação do Fipronil Padrão pelas isolados E1 e G2.8	34
4.8.1. Avaliação de biodegradação do fipronil por cromatografia gasosa e detecção dos metabólitos por espectrometria de massas .....	34
4.8.2. Fortificação e extração das amostras .....	35
4.9. Identificação dos isolados E1 e G2.8 Através Do Sequenciamento Do Gene RNAr 16S .....	37
4.9.1. Análises de bioinformática .....	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	40
5.1. Bioprospecção de Bactérias Através de Microcosmo de Solo .....	40
5.2. Identificação Morfotintorial e Bioquímica dos Isolados .....	40

<b>5.3. Seleção das Bactérias Isoladas Através da Cinética de Crescimento em Fipronil Comercial.....</b>	<b>42</b>
<b>5.4. Avaliação do Crescimento em fipronil através da Medida do Peso Seco .....</b>	<b>42</b>
<b>5.5. Análise de Crescimento e Degradação do Fipronil Padrão pelos isolados E1 e G2.8.....</b>	<b>44</b>
<b>5.6. Avaliação de biodegradação do fipronil por cromatografia gasosa e detecção dos metabólitos por espectrometria de massas.....</b>	<b>46</b>
<b>5.7. Identificação dos Isolados E1 e G2.8 através do Sequenciamento do Gene RNAr 16S .....</b>	<b>50</b>
<b>6. CONCLUSÃO .....</b>	<b>56</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>57</b>
<b>8. ANEXO.....</b>	<b>67</b>

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Lista de Figuras

<b>Figura 1</b> - Produção agrícola do Brasil por regiões em setembro de 2016.....	16
<b>Figura 2</b> - Molécula de fipronil .....	17
<b>Figura 3</b> - Metabólitos produzidos na degradação do fipronil.....	19
<b>Figura 4</b> - Fluxograma dos experimentos .....	27
<b>Figura 5</b> – Diferença morfológica das bactérias .....	29
<b>Figura 6</b> - Crescimento qualitativo dos isolados .....	32
<b>Figura 7</b> - Fluxograma do processo de fortificação e extração .....	36
<b>Figura 8</b> - Fluxograma da padronização de injeções com extrato ATZ-R.....	37
<b>Figura 9</b> - Crescimento por 316 horas das cepas - E1 , I3 e D1.....	43
<b>Figura 10</b> - Curva de crescimento comparativo das cepas - G2.8 e E1 .....	44
<b>Figura 11</b> - Controle biótico da cinética de comparação pelas cepas – G2.8 e E1 .....	45
<b>Figura 12</b> - Tempo de retenção do fipronil e seus metabólitos .....	47
<b>Figura 13</b> - Curva de degradação e quantificação metabólica do isolado E1.....	48
<b>Figura 14</b> - Curva de degradação do fipronil e quantificação metabólica do isolado G2.8 ...	49
<b>Figura 15</b> - Árvore filogenética do isolado E1 .....	53
<b>Figura 16</b> - Árvore filogenética do isolado G2.8 .....	54
<b>Figura 17</b> - Espectrometria de massa do fipronil.....	67
<b>Figura 18</b> - Espectrometria de massa do fipronil sulfeto .....	68
<b>Figura 19</b> - Espectrometro de massa do fipronil sulfona.....	68

### Lista de Tabelas

<b>Tabela 1</b> - Fração identificada de agrotóxicos em diversos alimentos.....	15
<b>Tabela 2</b> - Fragmentos para quantificação de metabólitos e fipronil .....	35
<b>Tabela 3</b> - Calibração da curva analítica dos fipronil seus metabólitos .....	35
<b>Tabela 4</b> - Caracterização dos isolados .....	41
<b>Tabela 5</b> - Classificação qualitativa de crescimento dos isolados .....	42
<b>Tabela 6</b> - Comparação de Cinética de Crescimento E1 e G2.8 .....	44
<b>Tabela 7</b> - Teste de análise de variância do crescimento dos isolados.....	46
<b>Tabela 8</b> – Teste de médias entre os tratamentos dos isolados e controles .....	48
<b>Tabela 9</b> - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo BLASTn do isolado E1 pelo NCBI.....	51
<b>Tabela 10</b> - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo alinhamento local do isolado E1 pelo RDP .....	52
<b>Tabela 11</b> - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo BLASTn do isolado G2.8 pelo NCBI.....	52
<b>Tabela 12</b> - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo alinhamento local do isolado G2.8 pelo RDP .....	53

## 1. REVISÃO DE LITERATURA

### 1.1. Agroquímicos

Os insumos agrícolas, como fertilizantes e agrotóxicos estão entre os componentes indispensáveis no modelo de agricultura moderna. O Brasil é o país em desenvolvimento que apresenta maiores gastos em agrotóxicos (CARNEIRO; DE ALMEIDA, 2016), sendo um dos maiores produtores agrícolas.

Agrotóxicos são definidos na legislação brasileira:

IV - agrotóxicos e afins - produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou plantadas, e de outros ecossistemas e de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento. Conforme disposto pelo Decreto nº 4074/2002 que regulamenta a Lei nº 7802/89 (Lei de Agrotóxicos). (BRASIL, 2002).

Após a Segunda Guerra Mundial, houve a descoberta de novas substâncias que atuavam no controle de pragas agrícolas (SANCHES et al., 2003). A demanda de suplementos hidráulicos e maquinários foram necessários, pelo aumento do plantio de monoculturas, dessa forma diminuindo a variabilidade e biodiversidade existente no local do plantio, ocorrendo o surgimento de pragas. A necessidade de constantes aplicações de agrotóxicos foi demandada, para assegurar um monitoramento eficiente, reduzindo perdas ao produtor (PRIMAVESI; PRIMAVESI, 2003)

Os agrotóxicos são divididos em quatro classes, de acordo com o seu grau de toxicidade (I = rótulo vermelho; II = rótulo amarelo; III = rótulo azul; IV = rótulo verde). Apresentando respectivamente I > II > III > IV em taxa correspondente a nocividade aos seres vivos (SANCHES, 2003). Os produtos I e II apresentam características recalcitrantes, tornando-se de difícil degradação (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

O mercado agrícola possui enorme importância no mundo. Produtores que antes produziam de maneira sustentável, ou seja, visando modelos que não interferiam na qualidade de vida e que fossem economicamente viáveis, mudaram para o modelo industrial, visando quantidade. A praticidade do uso de agrotóxicos e

sua eficiência denotariam menor prejuízo à produção, logo, gerariam maiores lucros ao sistema industrial (GHINI; BETTIO, 2000).

Com o surgimento dos agrotóxicos, aparecem também problemas relacionados à periodicidade de sua utilização, tornando necessário o controle de geração de resíduos (SANCHES et al., 2003). Foi a partir da década de 1990, com a reunião da Conferência das Nações Unidas (CNU) sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, conhecida como ECO-92. Que questões como os problemas gerados pelo uso de agrotóxicos, foram postas em pauta e trazidas a público para possíveis resoluções (ROEL, 2002).

Após o evento da transgenia, muitos alimentos foram melhorados e por consequência, adquiriram resistência ou tolerância a muitas pragas agrícolas (CARNEIRO et al., 2015). Mas o que se notou, é que mesmo com o avanço da ciência existe ainda assim um aumento do uso de agrotóxicos.

Dessa forma, a quantidade de subprodutos gerados no decorrer da degradação total ou parcial desses compostos químicos, traz risco à saúde dos seres vivos (MOREIRA, 2012). A contaminação ambiental por moléculas inertes e xenobióticas (sintéticas produzidas quimicamente), é observada desde o último meio século. Nota-se que a dissociação desses produtos, muitas vezes gera moléculas menores pela biosfera, sendo essas por maioria, moléculas tóxicas aos seres vivos (DOBSON et al., 1997).

Segundo o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), estima-se que um terço de todo alimento consumido pelas famílias brasileiras (Tabela 1), apresentam frações conservadas de agrotóxico (BERNA, 2016).

**Tabela 1 - Fração identificada de agrotóxicos em diversos alimentos**

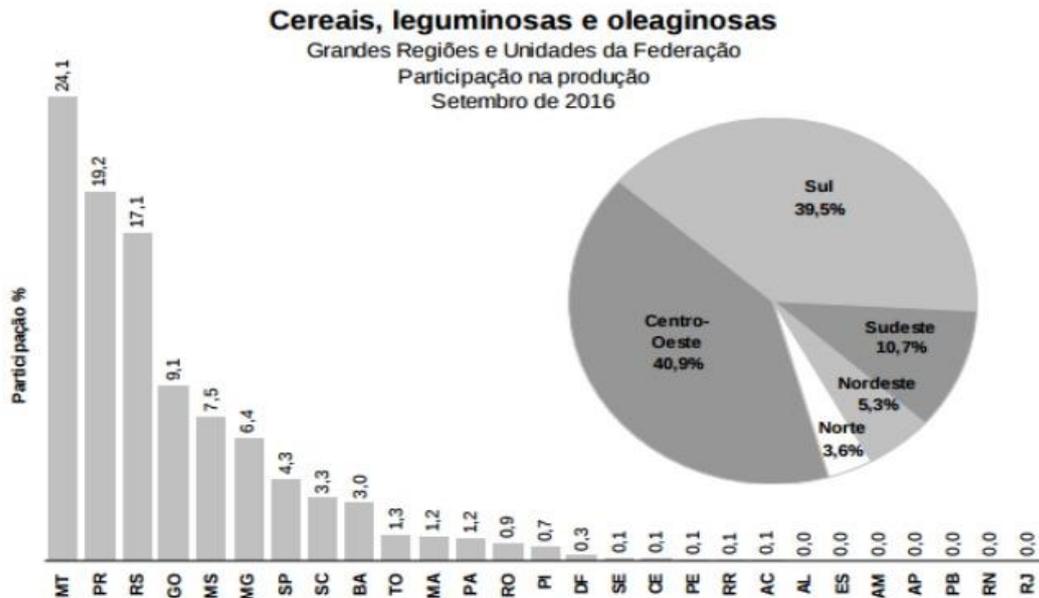
<b>Alimento</b>	<b>Fração de agrotóxico (%)</b>
Pimentão	91,8
Morango	63,4
Pepino	57,4
Alface	54,2
Cenoura	49,6
Abacaxi	32,8
Beterraba	32,6
Couve	31,9
Mamão	30,4
Tomate	16,3
Laranja	12,2
Maçã	8,9
Arroz	7,4
Feijão	6,5
Repolho	6,3
Manga	4
Cebola	3,1
Batata	0

**Fonte:** Adaptado de Copyright © 2015 REBIA

O Brasil desde 2010 ocupa o segundo lugar no ranking mundial de maior exportador agrícola segundo a Organização Mundial de Comércio (OMC), perdendo apenas para os Estados Unidos. O país tem a nona maior economia do mundo, ocupado principalmente pela sua produção agrícola, que é responsável por grande parte do PIB do país (DA REDAÇÃO, 2015).

De acordo com estudos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em 2016 a região centro-oeste, destacou-se por apresentar maior porcentagem na produção agrícola do país, representando aproximadamente 40% (Figura 1).

O estado de Mato Grosso do Sul apresenta forte produção de cana-de-açúcar desde seu crescimento em 2015 de acordo com a Empresa Brasil e Comunicação (EBC). Dessa forma, houve aumento no uso de agrotóxicos (CARNEIRO; DE ALMEIDA, 2016). O fipronil, um inseticida muito utilizado neste estado, foi um dos pesticidas que aumentaram a demanda, por apresentar boa capacidade de controle das pragas.

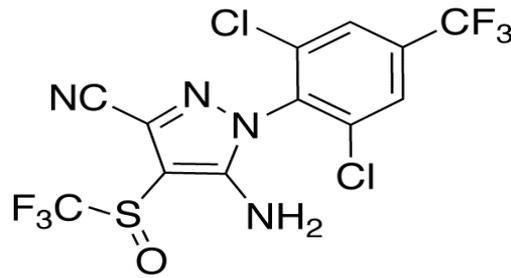


**Figura 1** - Produção agrícola do Brasil por regiões em setembro de 2016. **Fonte:** IBGE (2016).

Estudos apontam que agrotóxicos possuem capacidade de promover falência de órgãos (ALI et al., 2016) e mutagênese (EHSAN et al., 2016), dependendo muito da intensidade (concentração) e do contato com o agente (periodicidade). Dessa forma, metodologias passaram a ser criadas e estudadas, para que houvesse a diminuição dessas moléculas dispostas no meio ambiente.

## 1.2. Fipronil

O fipronil cuja fórmula molecular é representada por  $C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$ , com nome químico (RS)-5-amino-1-[2,6-dichloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-4-(trifluoromethylsulfinyl)-1H-pyrazole-3-carbonitrile (Figura 2). Apresenta-se na forma de pó à 20 °C, com peso molecular de  $437,1 \text{ g.mol}^{-1}$  e densidade  $1,477\text{-}1,626 \text{ g.mL}^{-1}$  (RAMSDORF, 2011).



**Figura 2** - Molécula de fipronil. **Fonte:** Chemical Specification of Fipronil© 2014 Toronto Research Chemicals.

Utilizado na agricultura por ser um inseticida fenilpirazólico de grande eficácia, o fipronil apresenta capacidade de atuação em vasta gama de insetos. Aplicado em muitas culturas, principalmente canaveira, esse produto tem como finalidade impedir o ataque de insetos às lavouras (CAPPELINI, 2008).

Agrotóxicos normalmente são divididos em famílias, as principais e conhecidas são: aminofosfonados (ex. glifosato), benzenaminas (ex. pendimentalina), triazinas (ex. atrazina), orfanofosforados (ex. fenitrotin) e fenilpirasoles (ex. fipronil) (COUTINHO et al., 2005).

Descoberto em 1987 pela Rhône-Poulenc Agro Company (atual Bayer Corpscience) e registrado em 1996, nos Estados Unidos (GUNASEKARA et al., 2007). O princípio ativo fipronil, desde 2003 encontra-se sobre domínio da BASF (Badische Anilin & Soda Fabrik), empresa química alemã líder no mercado dos agrotóxicos.

Embora o fipronil seja amplamente utilizado em cultivos de muitos países, ele tem seu uso proibido na Europa, como exemplo a França, Itália, Eslovênia e Alemanha. Desde 1999 obtiveram a proibição da comercialização de fipronil, isso devido ao seu alto grau de toxicidade, comprovado pelos sérios problemas causados a animais, bovinos, que após a ingestão de milho contaminado pelo inseticida, apresentaram quadro de intoxicação (GHISI et al., 2011).

É também conhecido por nomes comerciais - Regente 800 WG<sup>®</sup>, Icon<sup>®</sup>, Frontline<sup>®</sup>, Termidor<sup>®</sup> e Top Spot<sup>®</sup> (BASF, 2016). Sua classificação de fenilpirazol confere a capacidade de ação no sistema nervoso central dos insetos, principalmente em receptores do ácido gama-aminobutírico (GABA), impedindo o

fluxo correto de íons cloro, levando à morte do inseto (HAINZL; CASIDA, 1996), possuindo um grande potencial contra os insetos alvo (COLE; NICHOLSON; CASIDA, 1993).

O fipronil apresenta capacidade diferente dos organofosforados, atuantes diretos na linha colinérgica. Inseticidas esses que com o passar dos anos perderam sua efetividade, pela diversidade de espécies que apresentavam resistência (HAINZL; CASIDA, 1996).

O fipronil ganhou o mercado também com sua utilização na medicina veterinária, com o Frontline® (PEDRO, 2008). Agindo no controle e prevenção de pulgas, carrapatos e ácaros, em cães e gatos. O fipronil apresenta afinidade por compostos hidrofóbicos, dessa forma adere-se a gordura secretada pela pele e folículos, prolongando o tempo de ação (Frontline®, 2016).

O segredo do grande sucesso do fipronil dá-se ao fato de apresentar o agrupamento trifluorometilsulfonil à sua estrutura molecular (HAINZL; CASIDA, 1996). Essa estrutura é encontrada apenas no agrotóxico com base de fipronil (controlado pela BASF), possibilitando o seu bom desempenho em campo.

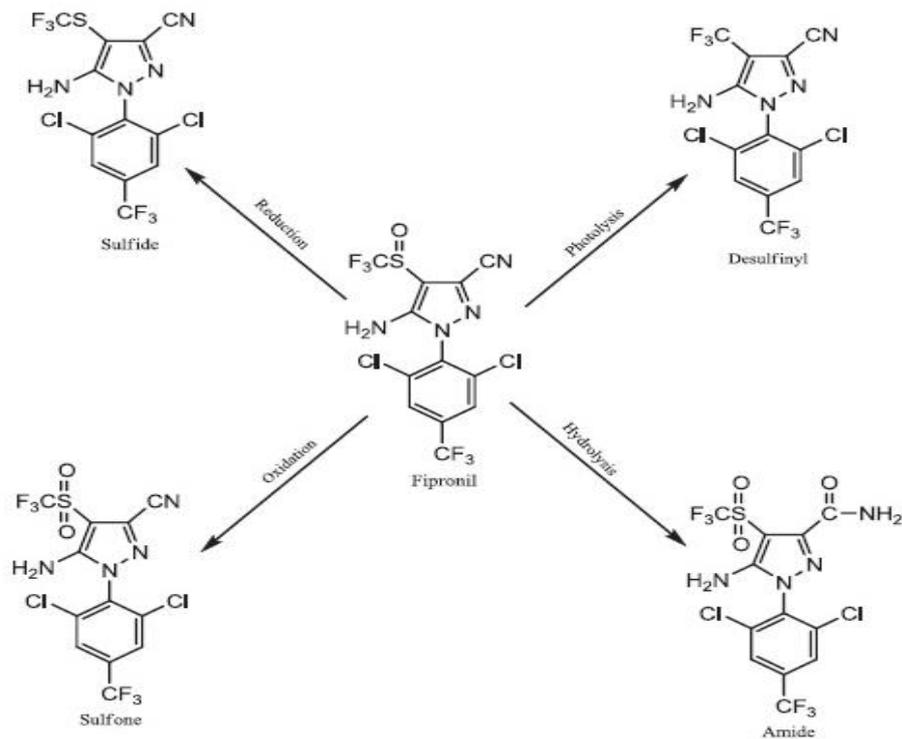
A capacidade em larga escala no ataque às pragas permite não apenas atividade em insetos, mas também agindo contra carrapatos, baratas, gafanhotos, pulga, mosquitos, tanto em sua fase larval como adulta (GUNASEKARA et al., 2007).

Estudos mostram que a degradação do fipronil em água e sedimentos em condições anaeróbicas, ocorre de forma lenta, quando presentes no meio ambiente, resultando no tempo de meia vida de até 130 dias (COUTINHO et al., 2005). O processo de sedimentação pode variar de acordo com as condições do local, por exemplo, em meio aquoso o fipronil sedimenta-se muito rápido, por apresentar pouca solubilidade (CAPPELINI, 2008).

Segundo Hidaka et al. (2015), o fipronil apresenta grande solubilidade quando em meios orgânicos. Os grupamentos de flúor, quando postos em meios orgânicos aumentam sua solubilidade, dessa forma, o uso de inúmeros solventes orgânicos como acetona, são utilizados, para melhor homogeneidade da solução.

O agrotóxico fipronil, não apresenta tamanha nocividade aos seres vivos, após a sua degradação é que se iniciam os problemas (NPTN, 2005). Uma das características de compostos fluorados é a produção de metabólitos mais tóxicos

que seu composto inicial (HIDAKA et al., 2015). A baixa tolerância à luminosidade torna o fipronil um agente fotolábil, gerando frequentemente metabólitos, sendo estes divididos em quatro moléculas principais, os processos de biodegradação são geralmente a redução gerando fipronil sulfeto e oxidação formando fipronil sulfona. A Figura 3 apresenta os metabólitos do fipronil e seus respectivos métodos de degradação (MANDAL et al., 2013).



**Figura 3** - Metabólitos produzidos na degradação do fipronil. Fonte: MANDAL et al. (2013).

O aumento do uso de fipronil deve-se, a sua capacidade de atuação em insetos que apresentam resistência a pesticidas organofosforados e piretroides (PACHECO et al., 2015). Seu uso trouxe benefícios como a diminuição no consumo de agentes organofosforados, altamente tóxico aos seres vivos (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

Porém a utilização exagerada acarretou crescentes problemas ao meio ambiente. Desse modo, vários estudos começaram a surgir, analisando e investigando melhores condições para processos de degradação desse agrotóxico (COUTINHO et al., 2005; KUMAR; SINGH; GUPTA, 2012; UNİYAL et al. 2016; DE OLIVEIRA et al., 2016).

É inegável a potencialidade do fipronil quando comparado a inseticidas organofosforados como o malation. A quantidade e concentração de uso apresentam grande divergência, segundo mostrado por Stevens, Helliwell e Warren (1998). No estudo, buscou-se comparar a efetividade do uso de fipronil no controle de larvas *Chironomus tepperi* Skuse, no estágio final, comparando com o uso de malation. Através do experimento foi possível identificar que enquanto 0,005 mg.L<sup>-1</sup> de fipronil foi usado, era preciso 0,6 mg.L<sup>-1</sup> de malation para combater as pragas. Provando a grande capacidade de atuação do fipronil, no controle contra pragas agrícola.

### **1.3. Toxicidade do Fipronil**

Animais sempre foram utilizados como parâmetro na identificação de contaminantes ambientais (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Estudos realizados com animais de pequeno porte como peixes, apresentam esses organismos como método avaliativo de impacto ambiental, por apresentarem constante contato ao agrotóxico (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). Estudos apontaram que peixes apresentam alta sensibilidade frente ao impacto ambiental, por absorver frequentemente moléculas dispostas no meio em que habitam. Tornando esses animais importantes marcadores biológicos, nas pesquisas de monitoramentos ambientais de corpos hídricos, apresentando foco nos estudos de potencial toxicológico e genotóxico de agrotóxicos (MANRIQUE et al., 2009; GHISI et al., 2011).

Diversos estudos foram realizados e, continuam sendo feitos, para se atestar os possíveis danos causados por agrotóxicos, como mutagêneses e possível falência de órgãos. Em estudos realizados na Universidade de Hokkaido, visando identificar a ação do fipronil em codornas japonesas, foi possível apresentar respostas positivas quanto à problemática. Após tratamentos realizados por gavagem, altos níveis de creatina foram identificados em testes bioquímicos, podendo indicar possível influência sobre os rins e posteriormente problemas hepáticos (ALI et al., 2016)

Em testes histológicos utilizando ratos albinos, após serem tratados com fipronil, apresentaram em tecidos da glândula tireoide, desorganização da região

folicular, região responsável pela síntese e armazenamento de hormônios. Como resultados, foi notada baixa na produção dos hormônios Triiodotironina (T3) e Tetraiodotironina ou Tiroxina (T4). Já no folículo, apresentaram-se células com núcleo picnótico, demonstrando necrose tecidual, além da degeneração mitocondrial, com a perda da crista. (EHSAN et al., 2016)

A absorção do fipronil dá-se pelo trato intestinal. O contato com o agente pode ser via contato com a pele, os olhos, via respiratória ou ingestão (NPTN, 2005). A concentração máxima do fipronil no sangue ocorre de 4 a 6 horas após sua ingestão e sua excreção ocorre principalmente pelas fezes e em menor quantidade pela urina (COUTINHO, 2005).

Como observado nos estudos de Yamamoto, Oliveira e Gaglianone (2014), animais polinizadores sofrem com as aplicações de agrotóxicos. Testes foram realizados e Tapparo (2012), estudou o impacto direto de neonicotinoide em abelhas, no cultivo de milho. Foi comprovada que o agente presente na cobertura das sementes, quando semeados ou colhidos, provocava poeira e, através dela era possível a intoxicação dos insetos.

No ano de 2015 a aplicação aérea de vários agrotóxicos foi proibida e, dentre eles estava o fipronil (FIDALGO, 2015). A prática da aplicação de agrotóxicos tornou-se ainda mais efetiva após aplicações realizadas através de aeronave. Porém, segundo Conselho Regional de Engenharia e Agronomia de Pernambuco - CREA-PE (2012) e Yamamoto, Oliveira e Gaglianone (2014), a prática ao atingir populações de animais polinizadores de culturas frutíferas, reduziram drasticamente a produção de frutos.

A ação tóxica do fipronil tanto nos carrapatos (ação deletéria em organismos alvo) quanto nos camundongos (ação citotóxica, genotóxica e mutagênica em organismos não alvo) foi comprovada (OLIVEIRA, 2010). Estudos apresentados pela Universidade de São Paulo (USP) comprovaram que o contato com agrotóxico, pode causar degenerações em mamíferos de pequeno porte (UDO, 2012).

Sabe-se que os maiores danos ocorrem principalmente em espécies aquáticas, pois o contato constante promove o bioacúmulo de fipronil nos organismos, que com o passar dos anos acabam levando a ações danosas (MANRIQUE et al., 2009). Desta forma, é possível que o uso excessivo do inseticida cause danos aos rios e mananciais, sejam pela fixação do solo, percolado até os

lençóis freáticos ou por meio de chuvas e/ou enxurradas, lixiviações, de maneira a utilizar como carreador o corpo hídrico (CAPPELINI, 2008).

Com o aumento do uso do fipronil, estudos voltados à degradação do inseticida, buscaram maximizar e facilitar a recuperação de solos e rios contaminados, utilizando a bioprospecção de bactérias biodegradadoras desse composto (KUMAR et al. 2011).

As condições do ambiente são fatores importantes para que ocorra a degradação de compostos xenobióticos como descrito por Junior e Franco (2013). Tanto na biorremediação por bioestimulação (MELO et al., 2011), quanto atenuação natural, fatores condicionados ao ambiente são importantes, desse modo, a maneira como ocorrerá a degradação do fipronil, será controlado pelos fatores ambientais, podendo variar de horas até meses, para sua degradação.

#### **1.4. Biodegradação e Biorremediação do Fipronil**

Os agrotóxicos e outras moléculas xenobióticas, podem no geral ter suas moléculas modificadas tanto por processos físicos como adsorção ou fotocatalise, químicos como oxidação e também biológicos como a biodegradação devido à semelhança dos xenobióticos a moléculas presentes na natureza. Desta forma, com a finalidade de remoção destes compostos do meio ambiente, estas estratégias podem a ser adotadas (SILVA et al., 2013).

A biodegradação do fipronil ocorre geralmente por redução ou oxidação, gerando como metabólitos o fipronil-sulfeto e fipronil-sulfona, respectivamente (TAN et al., 2008 ; MANDAL et al., 2013), como observado na Figura 3.

Poucos artigos têm relatado estudos de biodegradação do fipronil (ZHU et al., 2004; KUMAR et al. 2011; CAPPELIN, et al., 2012; KUMAR; SINGH; GUPTA, 2012; MANDAL et al., 2013; BONMATIN et al., 2015; UNİYAL et al.,2016) e, nenhum deles atestam o crescimento em fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio, em concentrações tão altas quanto no presente trabalho. Além disso, não se conhece atualmente as enzimas da rota metabólica responsáveis pela biodegradação deste composto tóxico.

Utilizada para o reparo de sistemas vivos, a biorremediação surge como aliada do meio ambiente. O manejo de moléculas até então consideradas de difícil

degradação, passa a ser estudada a fim de neutralizá-las ou torná-las menos tóxicas, ou seja, remediar o local, possibilitando a recuperação de ambientes poluídos por ações antrópica (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

As técnicas de biorremediação passaram a ser testadas, após descobertas em pesquisas, as quais visavam à degradação de hidrocarbonetos de forma natural (ATLAS, 1981). Foi a partir desse marco, que se descobriram micro-organismos presentes no próprio ambiente em questão (autóctones), com capacidade de metabolizar esses hidrocarbonetos do ambiente poluído, utilizando ele como fonte de carbono (KUMAR et al., 2011).

O processo de biorremediação dá-se por dois modelos, são eles: *in situ* ou *ex situ*, expressões originadas do latim, significando no local e fora do local, respectivamente. A escolha de qual modelo usar é dependente do impacto infligido ao local, caso o substrato não necessite ser removido do local para tratamento, então a escolha será *in situ*. Caso o substrato apresente necessidade de instalações apropriadas para o tratamento, optará por métodos *ex situ* (BOOPATHY, 2000).

A biotecnologia está intimamente ligada à biorremediação, já que através de processos biológicos, é capaz de gerar materiais biodegradáveis a partir de fontes renováveis, ajudando a diminuir impactos naturais, de maneira segura (SCHENBERG, 2010). Desde então, a biorremediação tornou-se a mais eficaz ferramenta de gestão para gerenciar o ambiente poluído e recuperar o solo contaminado (KUMAR et al., 2011).

Condições e considerações devem ser estudadas antes do processo de biorremediação. Fatores como: I) a importância de realizar esse processo; II) deve-se ter informações onde as técnicas serão aplicadas; III) condições ambientais, pois mudanças naturais, como disponibilidade nutricional e variações climáticas, afetam diretamente a ação de degradação do agente endógeno (JÚNIOR; FRANCO, 2013).

Pode-se dizer que esta técnica, baseada em estudos, não promove danos algum ao meio em que é colocado em ação, mas isso não é uma verdade. Um dos principais passos da biorremediação, obviamente é beneficiar o meio ambiente, porém para que haja bons resultados, devem-se monitorar o local, avaliando atividade microbiana, medições de níveis pluviais, temperatura, clima e estudos da própria rizosfera, além de se observar o nível de biodegradação dos compostos e os metabólitos formados (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

Neste contexto, a contaminação do solo por agrotóxicos tornou-se comum devido ao seu uso. Uma possível solução encontrada, foi utilizar micro-organismos provenientes do próprio solo contaminado (UNİYAL et al. 2016), onde naturalmente ocorre o processo de biorremediação.

Esse processo biológico consiste basicamente em bioestimular micro-organismos autóctone, específicos do local impactado. O processo de biorremediação tem por objetivo, degradar o xenobiótico em moléculas menos tóxicas ao meio, através de sua mineralização, processo que resulta em moléculas simples, como gás carbônico e água (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

Estudos mostram que a degradação do fipronil é afetada pela diversidade encontrada. Micro-organismos Gram-positivos apresentam maior resistência a substâncias tóxicas, pois possuem uma parede celular simples, porém espessa. Juntamente a sua parede celular, tem-se múltiplas camadas de peptidoglicano aproximando-se de 15 a 50 nm, responsáveis pela manutenção da célula e sua rigidez, conferindo maior resistência. Já as Gram-negativas apresentam uma parede celular complexa de aproximadamente 10 nm, todavia a parede de peptidoglicano apresenta-se em única camada, tornando-a frágil (PELCZAR; CHAN; REID, 1981).

O uso de micro-organismos vem se tornando uma ferramenta inovadora e eficaz ao meio ambiente. Este processo pode ser realizado por meio de micro-organismos isolados ou em consórcios para a degradação de contaminantes (PEREIRA; FREITAS, 2012).

Devido ao grande interesse em se conhecer a microbiologia do solo frente ao uso intensivo de pesticidas utilizados na agricultura, o presente trabalho teve como objetivo bioprospectar bactérias do solo capazes de degradar o fipronil e utilizá-lo como única fonte de carbono e nitrogênio. Trazendo maior viabilidade ao tratamento deste composto tóxico, pelo baixo custo de detoxificação do ambiente, a fim de reduzir os danos causados pelo fipronil.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Gerais**

- Bioprospectar bactérias com potencial de degradação do fipronil.

### **2.2. Específicos**

- Isolar bactérias com capacidade de degradação do fipronil, utilizando fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio em solos de cultura de milho com histórico de aplicação do fipronil;
- Identificar os micro-organismos isolados;
- Análisar e comparar a cinética de crescimento dos isolados;
- Realizar análises de degradação do fipronil através de cromatografia gasosa e identificar os metabólitos formados por espectrometria de massa.

## **3. HIPÓTESE**

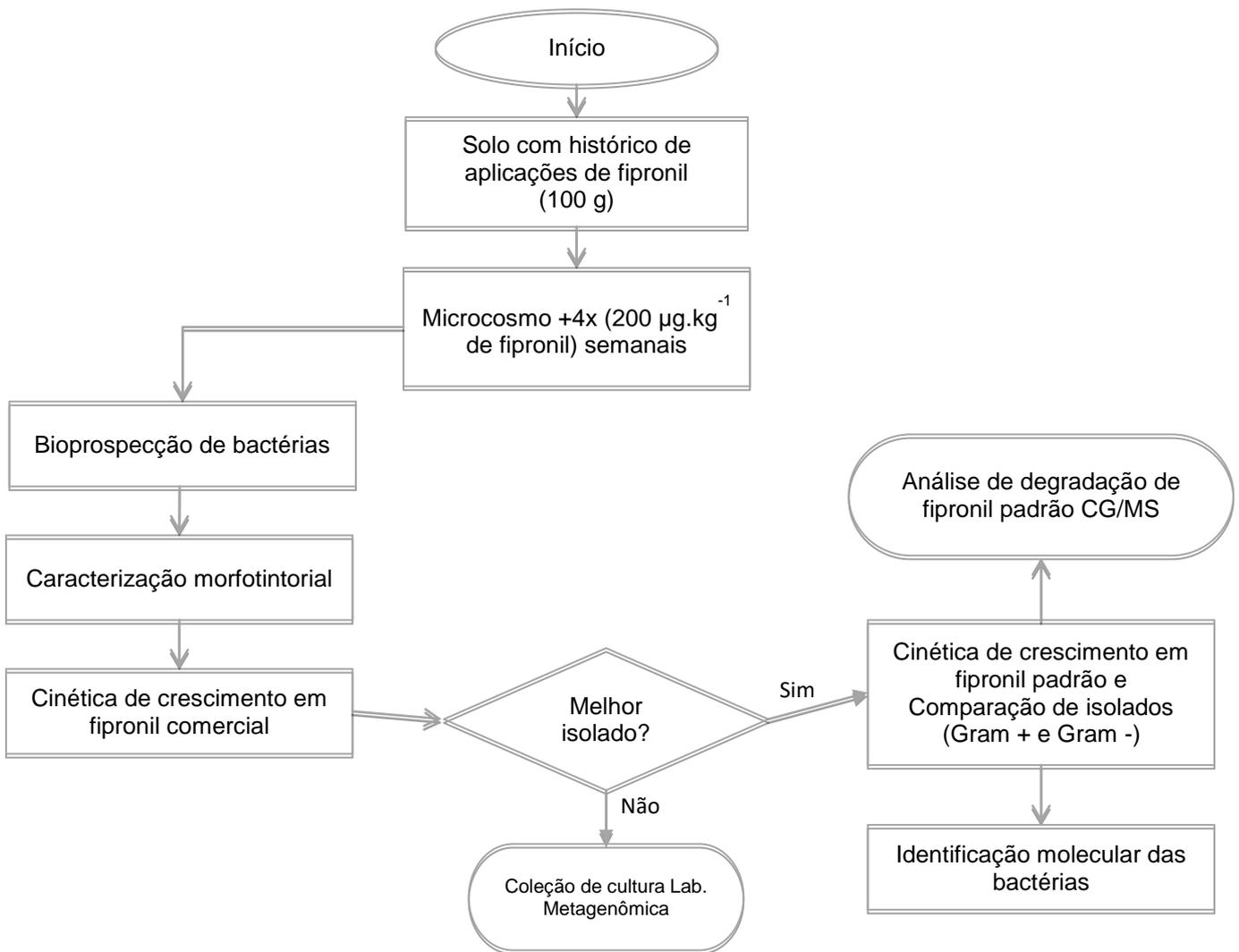
Solos de cultivo de milho previamente tratados com fipronil possuem microbiota capaz de degradá-lo como única fonte de carbono e nitrogênio.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

Os experimentos do presente trabalho seguiram o fluxograma apresentado na Figura 4.

### **4.1. Coleta de Amostras**

A bioprospecção de bactérias capazes de metabolizar fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio, foi realizada a partir amostras de solo provenientes da Fazenda Experimental da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Em outubro de 2014 foram coletadas 4 amostras de solo de 0-10 cm de profundidade com histórico de aplicação do inseticida fipronil, na Fazenda Experimental da UFGD, área de 294 ha entre as coordenadas 22° 48'53" S e 54° 44'31" e, já processadas no mesmo dia para que não houvesse a perda de viabilidade da amostra. A partir de amostras de solos, foram isolados micro-organismos com potencial para a degradação do composto fipronil, utilizando-o como única fonte de carbono e nitrogênio.



**Figura 4** - Fluxograma dos experimentos

#### 4.2. Bioprospecção de Bactérias Através de Microcosmo de Solo

O isolamento de bactérias foi realizado seguindo a metodologia de Wang et al. (2013) adaptada, que se baseia no enriquecimento em próprio solo, com histórico de aplicações do agrotóxico fipronil, umedecido a 10% com solução salina 0,9% e com adições semanais de fipronil (Regente® WG 800 BASF) a 200 mg.kg<sup>-1</sup> solo (diluído em água e esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos), por um período de 30 dias (SILVA, 2000). Após quatro semanas, 10 g de solo foram coletados do meio enriquecido e transferido para outro Erlenmeyer contendo 90 mL de solução salina 0,9% e 200 mg.L<sup>-1</sup> de fipronil. Este frasco foi então incubado em

um agitador orbital a 100 rpm 30 °C por 48 horas. Após as 48 horas, utilizando a técnica de *spread plate* (plaqueamento por superfície) as amostras foram inoculadas em placas de Petri contendo o meio ATZ-R adaptado, meio mínimo de sais descrito por Radehaus e Schimidt (1992) nas concentrações em g.L<sup>-1</sup>: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,4); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01) com pH ajustado a 6,8, 2% de ágar bacteriológico para solidificação do meio e esterilizado por autoclavagem a 121 °C por 20 minutos, utilizando-se como única fonte de carbono e nitrogênio o fipronil. Duas concentrações de fipronil foram utilizadas – uma menor, contendo 200 mg.L<sup>-1</sup> e uma de maior concentração contendo 600 mg.L<sup>-1</sup>. Foram realizadas diluições seriadas do solo em solução salina, de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-5</sup>, mas apenas as últimas três diluições foram utilizadas para o plaqueamento. A partir das diluições, realizou-se plaqueamento em triplicata, incubando-se as placas a 30 °C, até que colônias isoladas pudessem ser visualizadas. As colônias escolhidas foram de preferência as crescidas em meio de 600 mg.L<sup>-1</sup> descartando as placas de 200 mg.L<sup>-1</sup>, já que houve melhor crescimento de colônias no meio de maior concentração. As colônias foram purificadas através de estriamento por esgotamento, até o isolamento completo.

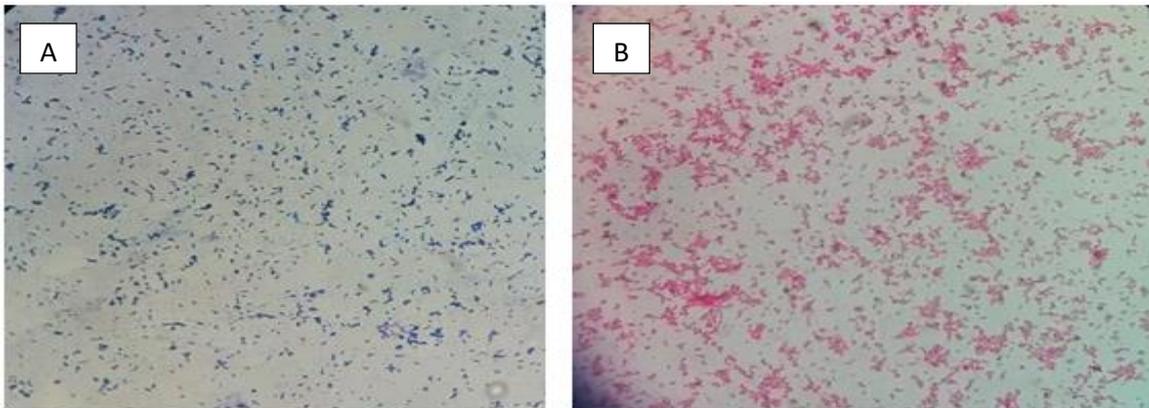
### **4.3. Caracterização Morfotintorial e Bioquímica dos Isolados**

Após o crescimento de colônias puras, foi realizada a caracterização morfotintorial e bioquímica das bactérias, por meio de coloração de Gram, testes de catalase e/ou oxidase.

#### **4.3.1. Caracterização morfotintorial**

O método de coloração de Gram foi utilizado, para que pudesse denotar as características morfológicas da bactéria. O método desenvolvido em 1884 pelo dinamarquês Hans Christian Gram constitui-se de promover a fixação de corantes nas bactérias para a diferenciação de organismos Gram-positivos e Gram-negativos (TORTORA, 2012). A diferença entre a parede celular e proporção de peptídeoglicanos, que diferenciam os organismos. Os organismos Gram-positivos por apresentarem uma estrutura mais rígida de sua parede celular pela presença de várias camadas de peptídeoglicano e ácido teocóico (TORTORA, 2012). Ao entrar

em contato com o álcool-cetona, desidrata a membrana, levando a fixação do complexo cristal violeta-iodo, adquirindo a coloração violeta-azulada (Figura 5a). Em bactérias Gram-negativas ocorre o inverso, a presença do álcool-cetona, retira estruturas lipoproteicas e polissacarídicas da membrana, dessa maneira torna frágil e permeável ao corante fucsina, adquirindo a coloração rosa-avermelhada (Figura 5b).



**Figura 5** – Diferença morfológica das bactérias. **A)** Gram-positiva; **B)** Gram-negativa.

#### 4.3.2. Teste de catalase

O teste de catalase é geralmente aplicado em bactérias Gram-positivas para poder distinguir os organismos de interesse clínico. Para esse fim, foi utilizado peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$  3%. Uma porção de inóculo, retirado de uma placa de Petri com menos de 24 horas de crescimento, foi transferido para uma lâmina, como um esfregaço, com a ajuda de uma alça de platina e sobre o esfregaço uma gota de  $H_2O_2$  3% foi adicionada. Caso houvesse a aparição de bolhas imediatas, ao ser adicionado o  $H_2O_2$  3%, seria considerado resultado positivo (provocando a oxidação da  $H_2O_2$  em  $H_2O + O_2$ ) e caso o resultado fosse negativo, nada ocorreria (ANVISA, 2016).

#### 4.3.3. Teste de oxidase

O teste de oxidase possui o objetivo de distinguir organismos Gram-negativos patogênicos de não patogênicos, realizado quando as bactérias foram previamente classificadas com Gram-negativas. Para a realização do teste utilizou-se as fitas

para determinação de oxidase (Laborclean), e seguiram-se as especificações do fabricante. Então, utilizou-se uma fita e com auxílio de uma alça de platina fez-se um esfregaço da bactéria a ser identificada na parte lilás da fita. Fez-se a leitura após alguns segundos, sendo considerada oxidase positiva o esfregaço bacteriano na fita que apresentou coloração roxa e oxidase negativa o esfregaço bacteriano que não apresentou alteração de cor.

#### 4.3.4. Teste de KOH

O teste de KOH é utilizado para a confirmação do teste de Gram quando a coloração vista ao microscópio não é conclusiva. Em uma lâmina é realizado um esfregaço, com células viáveis e, uma gota da solução de KOH na concentração de 3 M é adicionada sobre a lâmina, esperando-se 30 segundos. Com o auxílio de uma alça de platina homogeneizou-se a solução, caso houvesse a formação de uma mistura viscosa e pegajosa, o resultado seria adotado como Gram-negativo, mas caso não ocorresse, então seria considerado organismos Gram-positivos (PRASHANT, 2013).

#### 4.4. Preservação dos Isolados em Glicerol

Com as bactérias isoladas e caracterizadas foram preservadas em microtubos criogênicos em glicerol estéril, para uma concentração final de 20%, como realizado por Solal e colaboradores (2012). Soluções de meio de cultivo foram preparadas, nos quais além de 200 e 600 mg.L<sup>-1</sup> de fipronil foi adicionado 0,5% de glicose, adicionados em Erlenmeyers de 250 mL. Em cada Erlenmeyer foram acrescentadas biomassa dos isolados, por auxílio de uma alça de platina, os meios foram incubados no agitador orbital a 100 rpm, 30 °C, por 24 h. Os cultivos crescidos foram transferidos para microtubos criogênicos (7 para cada isolado), sendo armazenamento em freezer a - 20 °C.

#### 4.5. Reativação dos isolados

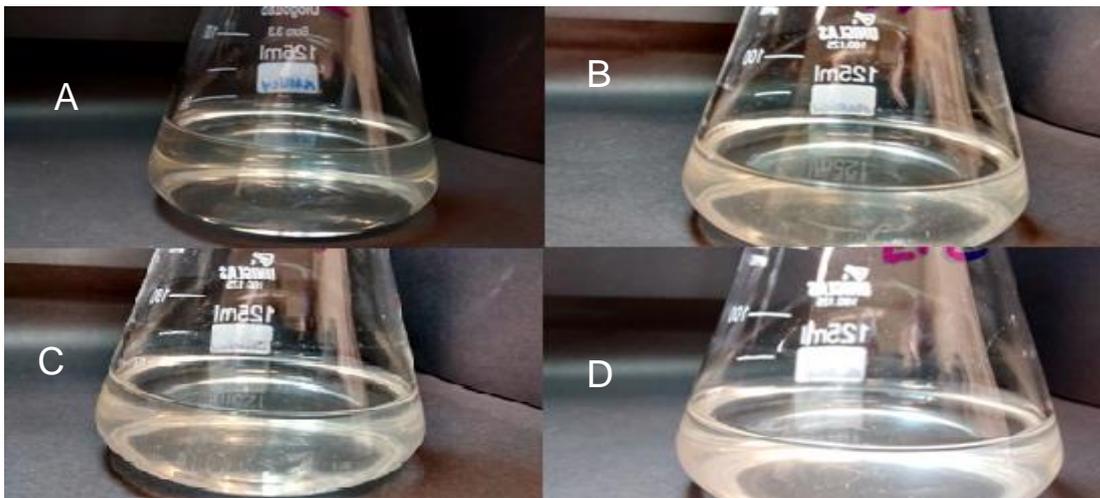
Sempre que necessário para realização de experimentos reativação das bactérias isoladas foi feitas. Dos microtubos congelados, foram retiradas alíquotas de 100  $\mu$ L foram inoculados em placas por *spread plate*, já contendo meio ATZ + glicose (0,5%) + fipronil 600  $\text{mg.L}^{-1}$  + ágar. Incubados em estufa a 30 °C no período de 2 a 3 dias. O uso de glicose foi de suma importância para a reativação do micro-organismo, já que estavam congelados, diminuindo a viabilidade de algumas células com o passar do tempo.

#### 4.6. Seleção das Bactérias Isoladas através da Cinética de Crescimento em Fipronil Comercial

Através de curvas de crescimento, foram definidos os melhores isolados, de acordo como os melhores pontos de crescimento, logo seu maior potencial de metabolização do fipronil.

Com o aparecimento de colônias na etapa de reativação das bactérias, estas foram repicadas diretamente em 6 novas placas, contendo apenas fipronil como fonte de carbono e nitrogênio e incubadas por mais 2 dias a 30 °C. Em Erlenmeyer de 125 mL contendo 60 mL meio ATZ líquido foram preparados em triplicatas, para cada isolado. Usando o meio preparado para a padronização, adicionou-se a concentração de 600  $\mu\text{g.L}^{-1}$  de fipronil. Em tubos cônicos de 50 mL com tampa de rosca e esterilizados por autoclavagem, 10 mL de meio líquido foi adicionado para padronizar o inóculo inicial com a mesma concentração de células para todos os Erlenmeyers. Usando as placas feitas em 6 replicas, foram retiradas a biomassa de todas as placas e adicionadas nos tubos, homogeneizando-os no agitador do tipo *Vortex*. Dos tubos cônicos foram retiradas a alíquota de 2 mL e adicionados em microtubos de 2 mL tipo *Eppendorf*, e levados até o espectrofotômetro, sendo feitas leituras a 600 nm, esperando-se resultados que variassem entre  $\text{OD}_{600}$  (Densidade Ótica) 0,8 a 1,0. O inóculo padronizado foi então inoculado em volumes iguais às triplicatas dos Erlenmeyers contendo o meio ATZ e mediu-se a  $\text{OD}_{600}$  inicial que deveria estar entre 0,01 e 0,02.

A partir da cinética de crescimento, foram traçadas curvas em gráficos para avaliar o desempenho dos isolados, seguindo o padrão de medições de Densidade Óptica (OD) à 600 nm. Entretanto, tais isolados apresentavam características filamentosas, inviabilizando essa aferição. Desta forma, medições qualitativas visuais foram feitas para o acompanhamento do crescimento. Assim, foram designados símbolos para diferentes tipos de crescimento: + baixo crescimento; ++ crescimento mediano; +++ crescimento ótimo; - sem crescimento; \*sem reativação da bactéria (Figura 6).



**Figura 6** - Crescimento qualitativo dos isolados. A) sem crescimento; B) baixo crescimento; C) crescimento mediano; D) crescimento ótimo.

#### **4.7. Avaliação do Crescimento em Fipronil Através da Medida do Peso Seco**

A partir dos resultados do item 4.5., foram escolhidos os isolados que apresentaram melhor crescimento qualitativo, e assim, realizado um experimento de crescimento quantitativo através da medição do peso seco.

Para o procedimento experimental foram preparados 28 Erlenmeyers de 125 mL estéreis, cada um contendo 30 mL de meio líquido ATZ-R, 16 frascos foram usados para curva de crescimento, adicionou-se então  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  de fipronil e 1 mL de inóculo, feito a partir do pré-inóculo em placas de Petri conforme descrito no item 4.5. Em 4 frascos restante foram usados para controles (controle de crescimento), 7

frascos como controles bióticos (contendo apenas inóculo) e 7 abióticos (contendo apenas fipronil), desta forma, pôde ser observado se haveria crescimento nos Erlenmeyers sem fipronil, além da verificação de algum outro tipo de degradação de fipronil, que não a biodegradação. Os Erlenmeyers foram incubados a 30 °C a 140 rpm. O experimento foi planejado de forma que duas amostras de cada isolado bacteriano fossem analisadas quanto ao peso seco nos tempos 0, 72, 120, 168, 240, 288, 336 horas.

Simultaneamente com a preparação dos Erlenmeyers do estudo de crescimento, 42 tubos cônicos com tampa de rosca de 15 mL estéreis, foram separados e levados à estufa 60 °C por um dia antes do início do experimento com objetivo de retirar qualquer umidade dos frascos. No dia seguinte, quando o processo de inoculação nos recipientes teve fim, 12 tubos foram retirados da estufa e pesados. As amostras T0-1 (tempo zero 1) e T0-2 (tempo zero 2), foram retiradas e adicionadas em 4 tubos cada, o mesmo seguiu para as amostras CA-0 (Controle Abiótico) e CB-0 (Controle Biótico), foram retiradas e colocadas em 2 tubos cada, dividindo 15 mL em cada tubo. A cada dia de amostragem os tubos foram centrifugados a 3500 rpm e 5 °C, o sobrenadante foi armazenado a - 20 °C para futuras análises cromatográficas, restando apenas a biomassa bacteriana presa ao fundo do tubo, levando os tubos à estufa 60 °C até a secagem completa da biomassa bacteriana. A partir das pesagens, foram construídas as curvas de crescimento.

#### 4.7.1. Otimização do pré-inóculo com extrato de levedura

Para o melhor desempenho e rápido crescimento em fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio, foi proposta uma etapa de pré-inóculo em meio líquido contendo extrato de levedura como fonte de nitrogênio e fipronil como fonte de carbono e nitrogênio. Em Erlenmeyer de 125 mL adicionou 24 mL de meio ATZ-R líquido, adicionando o extrato de levedura 1% acrescentando fipronil para uma concentração final de 600 mg.L<sup>-1</sup>. Após 48 horas de crescimento, foi realizada a lavagem das culturas. As amostras foram transferidas para 2 tubos cônicos com tampa de rosca de 15 mL estéreis, levados à centrifuga por um ciclo de 10 minutos a 5 °C, 3500 rpm. Após a centrifugação, descartou-se sobrenadante e, acrescentou-se

mais 5 mL de meio ATZ-R puro, homogeneizando o tubo em *Vortex*, sendo levado a centrifuga e passando pelo menos processo por 4 vezes com objetivo de se eliminar o extrato de levedura.

#### **4.8. Análise de Crescimento e Degradação do Fipronil Padrão pelas isolados E1 e G2.8**

Dois isolados previamente selecionados, um Gram-positivo isolado neste trabalho e um Gram-negativo também isolado de solo, porém em outro projeto (bioprospectado a partir de solo coletado em uma área de floresta semidecidual da Embrapa Agropecuária Oeste – Dourados, MS 22°17'06.4"S 54°48'37.5"W), foram utilizados neste experimento, com a utilização de fipronil padrão (90,2% de pureza, gentilmente cedido pela BASF).

O experimento foi conduzido utilizando o pré-inóculo feito com extrato de levedura (conforme descrito no item 4.6.1.) e o crescimento foi realizado por análise do peso seco (conforme descrito no item 4.6.) e o sobrenadante congelado a - 20 °C foi avaliado posteriormente quanto à degradação do fipronil e formação de metabólitos por cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas em parceria com a Embrapa Agropecuária Oeste, Dourados, MS.

##### **4.8.1. Avaliação de biodegradação do fipronil por cromatografia gasosa e detecção dos metabólitos por espectrometria de massas**

A partir das amostras de sobrenadante armazenadas a - 20 °C no item anterior foram realizadas análises de cromatografia gasosa e detecção por espectrometria de massas (CG-EM), para a detecção e confirmação da degradação do fipronil e seus metabólitos gerados.

Para quantificação de metabólitos de fipronil - fipronil sulfeto, fipronil sulfona, fipronil desulfenil - foi necessária à criação de uma biblioteca interna no equipamento TRACE 1300 CG/MS Thermo. Utilizando a coluna Capilar TG-1 MS (30 m x 0,25 mm x 0,50 µm) em 100% dimetilpolisiloxano, detector de Espectrometria de Massa 15Q Single Quadrupolo e injetor Splitless (280 °C fluxo de 60 mL.min<sup>-1</sup>). As condições e

trabalho do cromatógrafo foram: utilização de rampas de temperatura para seu desprendimento variando de 60-300 °C, atuando numa varredura de espectro de 50~400 m/z, utilizando como o gás de arraste de hélio 1 mL.min<sup>-1</sup>.

As amostras foram preparadas para os padrões, na concentração de 10 ng.µL<sup>-1</sup> para cada metabólito, foram separadas de acordo com os seus respectivos fragmentos, liberados durante o processo de ionização (MADSEN et al., 2002), como mostrado na Tabela 2.

**Tabela 2** - Fragmentos para quantificação de metabólitos e fipronil

Composto	Fragmentos para quantificação, confirmação e monitoramento iônico (m/z)			
	Fipronil	367	213	369
Fipronil-sulfeto	351	353	255	257
Fipronil-sulfona	383	255	285	257
Fipronil-desulfenil	388	390	333	369

Com a confecção de uma curva analítica (realizada em triplicata) foi possível a identificação das respectivas concentrações a se utilizar para cada metabólito do pesticida. As concentrações de acetona testadas foram: 100, 200, 500, 700, 1000, 1500 e 2000 pg.µL<sup>-1</sup> (Tabela 3).

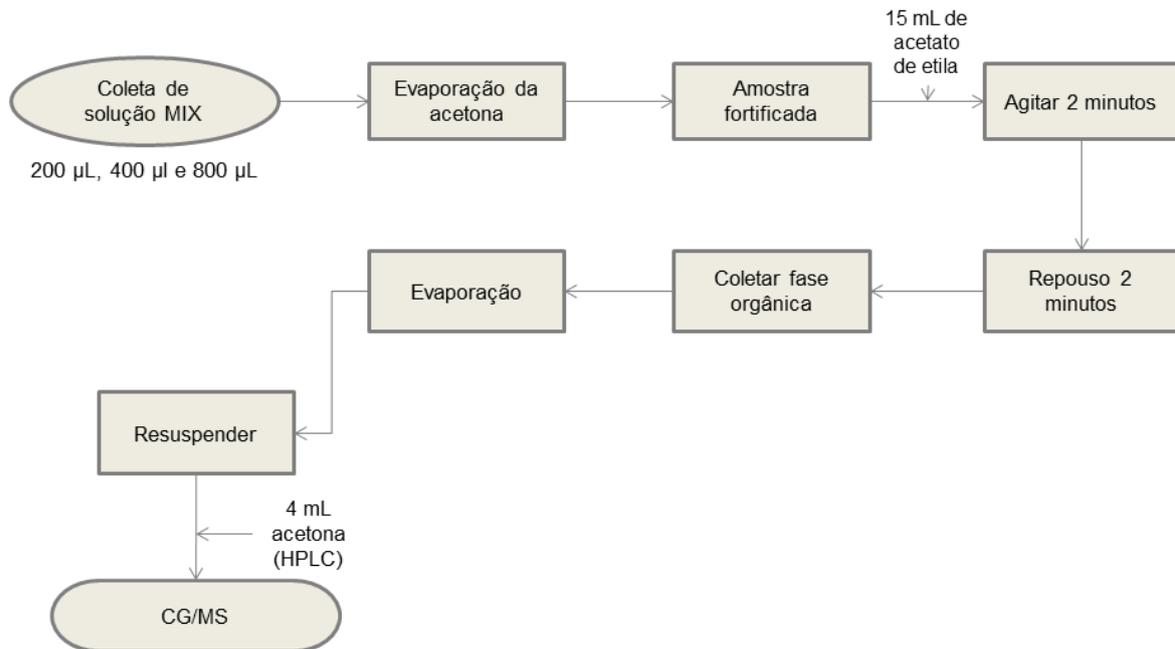
**Tabela 3** - Calibração da curva analítica dos fipronil seus metabólitos

Composto	Quantidade de Pontos	Intervalo de concentração (pg.µL <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup>
Fipronil	6	200-2000	0,9836
Firpronil-sulfeto	6	100-2000	0,9914
Fipronil-sulfona	5	500-2000	0,9902
Fipronil-disulfenil	5	500-2000	0,9969

#### 4.8.2. Fortificação e extração das amostras

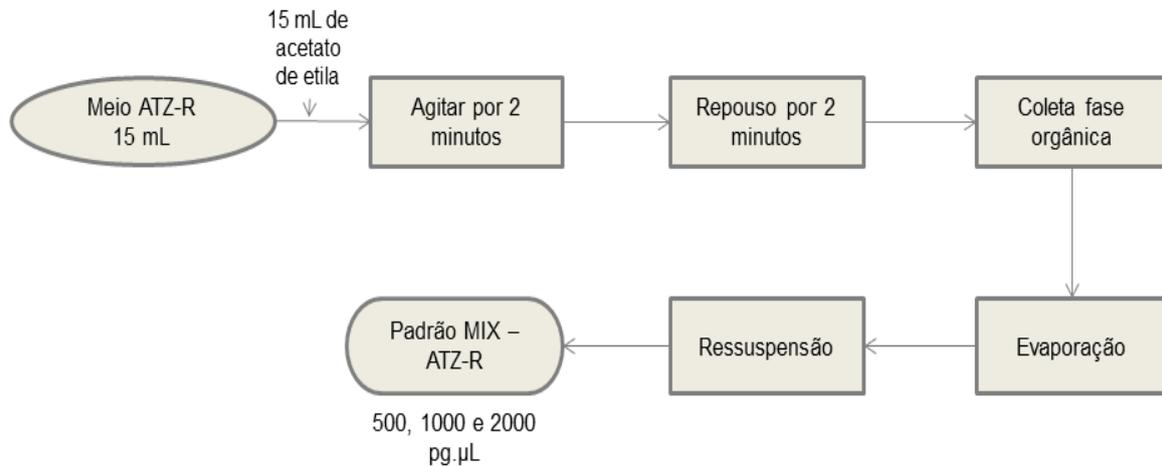
Foi preparada uma solução concentrada MIX (com todos os metabólitos) em alta concentração, 10.000 pg.µL em solvente acetona (grau HPLC). A partir do MIX, foram feitas 3 concentrações, sendo elas 500, 1000 e 2000 pg.µL<sup>-1</sup>, para a

recuperação do extrato e fipronil. Essa fortificação foi coletada com o volume de 200, 400 e 800  $\mu\text{L}$ , deixando evaporar com o auxílio de bomba de vácuo e, adicionou-se 15 mL do meio ATZ-R (em triplicata). Homogeneizou-se com o auxílio de agitadores vortex, por 2 minutos. Após a homogeneização adicionou-se 15 mL de acetato de etila, agitando novamente por 2 minutos, deixando em repouso por 2 minutos. A fase orgânica foi coletada e evaporada em rotaevaporador, terminando o processo de extração (Figura 7).



**Figura 7** - Fluxograma do processo de fortificação e extração

Com base na análise, identificou-se um aumento na recuperação das amostras de ambos os conjuntos, resultando em valores de recuperação acima de 120%. Desse modo, foi criada uma hipótese do aumento nas concentrações obtido, por meio do efeito matriz. Esse efeito tem por indicativo o erro do aparelho ao quantificar as amostras devido a fatores como composição, densidade, superfície de contato sobre o sinal analítico estudado (PINHO, 2009). Para contornar o efeito matriz, foi seguido o método de Pinho (2009) e assim foram feitas padronizações com extrato ATZ-R nas concentrações 500, 1000, 2000  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}$  (Figura 8).



**Figura 8** - Fluxograma da padronização de injeções com extrato ATZ-R

Desta forma, foram feitas novas injeções e observações de valores mais condizentes com o padrão esperado. Comparando com a ocorrência (efeito matriz) como as novas análises, comprovou-se a ocorrência de efeito matriz. A partir da padronização, foram feitas novas injeções das amostras gerando resultados melhores condizentes na concentração de 500 pg.µL (Tabela 4).

**Tabela 4** - Média de recuperação de metabólitos das amostras analisadas

Concentração (pg. µL)	Média de recuperação (%)			
	Fipronil	Fipronil sulfeto	Fipronil sulfona	Fipronil desulfenil
500	99,8	104	100,6	128,5
1000	98,8	104,6	82,6	89
2000	119	121,6	150,6	120

#### 4.9. Identificação dos isolados E1 e G2.8 Através Do Sequenciamento Do Gene RNAr 16S

As duas bactérias utilizadas nos experimentos finais, tiveram seu DNA extraído através do método descrito por Bonatto, Breve e Tejada (2014). O pellet bacteriano foi ressuscitado em 1000 µL de solução PBS e 2 µL de EDTA. Neste foi adicionado 60 µL de SDS 10%, e misturado com leve agitação e incubado a 60°C durante 10 min, resfriado à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado

0,65 mL de fenol-clorofórmio (25:24), e agitado vigorosamente, centrifugado à 10.000 rpm durante 5 min, transferindo 500 µL da fase aquosa para outro tubo e realizado uma nova extração 500 µL fenol-clorofórmio, da fase aquosa foram retirados 500 µL e passado para um tubo novo e foi adicionado 10 µl de NaCl 5M e 300 µl de isopropanol. Foi novamente centrifugado a 10.000 rpm durante 10 min e o precipitado de ácidos nucléicos lavados com etanol 70%.

Posteriormente, foi realizado um gel de agarose 1% para verificação do produto de extração pela técnica de eletroforese e, também feita a quantificação do material com auxílio do equipamento Nanodrop.

As outras etapas para identificação como amplificação do gene mRNA 16S, purificação do DNA, amplificação e sequenciamento pelo método de Sanger, foram realizadas através da Facility do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da Unesp de Jaboticabal (LMSEQ).

Para o sequenciamento dos 1,5 kb do gene 16S rRNA dos quatro isolados, foram utilizados os primers FD1, F362, F786, F1.203 e FD1 seguindo a metodologia descrita por Castro (2015). A reação foi submetida ao termociclador seguindo desnaturação inicial a 96 °C por 2 minutos, seguido de 40 ciclos a 96°C por 10 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 min. Ao final da reação, o aparelho manteve temperatura constante de 10 °C até que as amostras fossem retiradas do aparelho e armazenadas em temperatura de 4 °C.

#### 4.9.1. Análises de bioinformática

Após o sequenciamento do gene 16S rRNA, buscou-se a existência de vetores entre as sequências pelo programa VecScreen, ferramenta do DDBJ (DNA Data Bank Japan). Posteriormente pela ferramenta CAP3, foi feito o processo de Assembly, para o DNA sequenciado, dos isolados E1 e G2.8, através do programa BioEdit 7.2.5 (HALL, 1999), procedimento realizado para remontagem da sequência total do gene.

Com a obtenção da sequência montada, utilizando a plataforma do Centro Nacional de Informação Biotecnológica (NCIB), foi feito alinhamentos de similaridade local, pela ferramenta Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), buscando as

sequências próximas à sequência de entrada. Nenhuma sequência apresentou 100% de similaridade, para ambos isolados. Dessa forma, selecionaram-se as 10 sequências de maiores scores e similaridade para o E1 e 12 sequências para o isolado G2.8, sendo essas sequências alinhadas globalmente, pelo programa Clustal Omega (SIEVERS et al., 2011).

Buscas foram feitas pelos bancos de depósito de sequências como NCBI e RDP (Ribosomal Database Project) (WANG, 2007), usando como parâmetro comparativo. Para a construção filogenética foi utilizado o programa MEGA 7.0 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) seguindo o parâmetro Kimura-2-parâmetros, pelo teste de filogenia de bootstrap, com 1000 replicações. Resultando na construção da árvore, para a E1 foi utilizado o método filogenético de Neighbor-Joining Tree e para a G2.8 utilizou-se o método filogenético de Maximum Likelihood Tree.

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **5.1. Bioprospecção de Bactérias Através de Microcosmo de Solo**

Após a incubação das placas de isolamento a 30 °C por 48 horas foi realizado o isolamento das colônias. A escolha das colônias foi realizada seguindo três parâmetros i) diferença morfológica a olho nu (quanto a cor, textura, brilho), ii) presença ou não de halos (a presença de halo indica uma possível degradação do substrato em decorrência do crescimento bacteriano) e iii) escolha de colônias isoladas (permitindo maior probabilidade de isolamento, reduzindo chances de contaminação por colônias vizinhas). As colônias foram repicadas por esgotamento, processo pelo qual se buscava a purificação da colônia desejada. Terminado o processo de purificação, que resultou em 13 isolados bacterianos, foi realizado o armazenamento em glicerol 20%, estocado em freezer – 20 °C.

### **5.2. Identificação Morfotintorial e Bioquímica dos Isolados**

Após o isolamento de bactérias de solo, prosseguiu-se com a identificação morfológica, de modo a possibilitar e facilitar a classificação dos micro-organismos.

Por se tratar de um método qualitativo, a técnica de Coloração de Gram, tem seu principal objetivo a distinção de organismos Gram-positivos e Gram-negativos. No presente estudo as 13 bactérias isoladas foram identificadas como bastonetes esporulados Gram-positivos, todos catalase positivos (Tabela 6).

**Tabela 4** - Caracterização dos isolados

ISOLADOS	MORFOLOGIA EXTERNA	GRAM	CATALASE	KOH
C-1	BE	+	+	-
C-3	BE	+	+	-
D-1	BE	+	+	-
D-3	BE	+	+	-
E-1	BE	+	+	-
G-1	BE	+	+	-
H-1	BE	+	+	-
H-3	BE	+	+	-
I-1	BE	+	+	-
I-3	BE	+	+	-
M-1	BE	+	+	-
M-3	BE	+	+	-
M-5	BE	+	+	-

BE: bastonete esporulado (-): negativo; (+): positivo

O método de microcosmo vem apresentando bons resultados, quando aplicados à busca por organismos com melhores taxas de biorremediação de solos com histórico de aplicações de fipronil (UNİYAL et al., 2016). A técnica de microcosmo é uma adaptação feita a partir do princípio de enriquecimento de Wang et al. (2013). Nesse trabalho Wang et al. (2013), descrevem um modelo de enriquecimento a partir de amostras de solo misturadas ao meio líquido MM enriquecido com 50 mg.L<sup>-1</sup> do agrotóxico, mantendo-se em agitação orbital, por um período de 7 dias. O processo perdura por 30 dias, sendo que a cada 7 dias, uma alíquota de 5 mL do primeiro/último será transferida para outros frascos Erlenmeyers e, novamente enriquecido com 50 mg.L<sup>-1</sup> do agrotóxico.

Assim como o próprio meio MM, descrito por Wang et al (2013), meios de cultivo que não apresentam fontes de carbono disponível como o meio ATZ-R ou outros meios quimicamente definidos, forçam os micro-organismos autóctones a seleção por sua adaptabilidade, desenvolvendo-se em meios tóxicos, utilizando-os como fonte de energia, como visto por Kumar, Singh e Gupta (2012) e Mandal et al. (2013).

No isolamento como discutido, foram isolados apenas bactérias Gram-positivas, devendo isso à presença de elementos que causam estresse aos micro-organismos, como metais (RABINOVITCH, 1971), efeitos extremos do meio ambiente como dessecação e oscilações de temperaturas (NICHOLSON et al., 2000).

### 5.3. Seleção das Bactérias Isoladas Através da Cinética de Crescimento em Fipronil Comercial

Após o isolamento e reativação, as bactérias isoladas foram submetidas a cinéticas de crescimento durante 6 dias (144 horas), para seleção dos melhores isolados. Vale ressaltar que algumas bactérias não cresceram após tentativas de reativação a partir do estoque de glicerol. Além disso, era esperado medir o crescimento através do aumento da absorbância a 600 nm em espectrofotômetro, porém ocorreu a formação de filamentos, dificultando a quantificação por este método. Desta forma buscando alternativas qualitativas como a classificação visual do crescimento (Tabela 5). Por meio deste experimento, foi possível identificar o melhor desempenho de 3 isolados, sendo eles E1, I3 e D1. Esses foram escolhidos para futuras análises de cinética de crescimento, buscando o de melhor desempenho.

**Tabela 5** - Classificação Qualitativa de Crescimento dos Isolados

ISOLADOS	DESEMPENHO
C-1	*
C-3	-
D-1	++
D-3	-
E-1	+++
G-1	+
H-1	*
H-3	-
I-1	-
I-3	+++
M-1	-
M-3	*
M-5	*

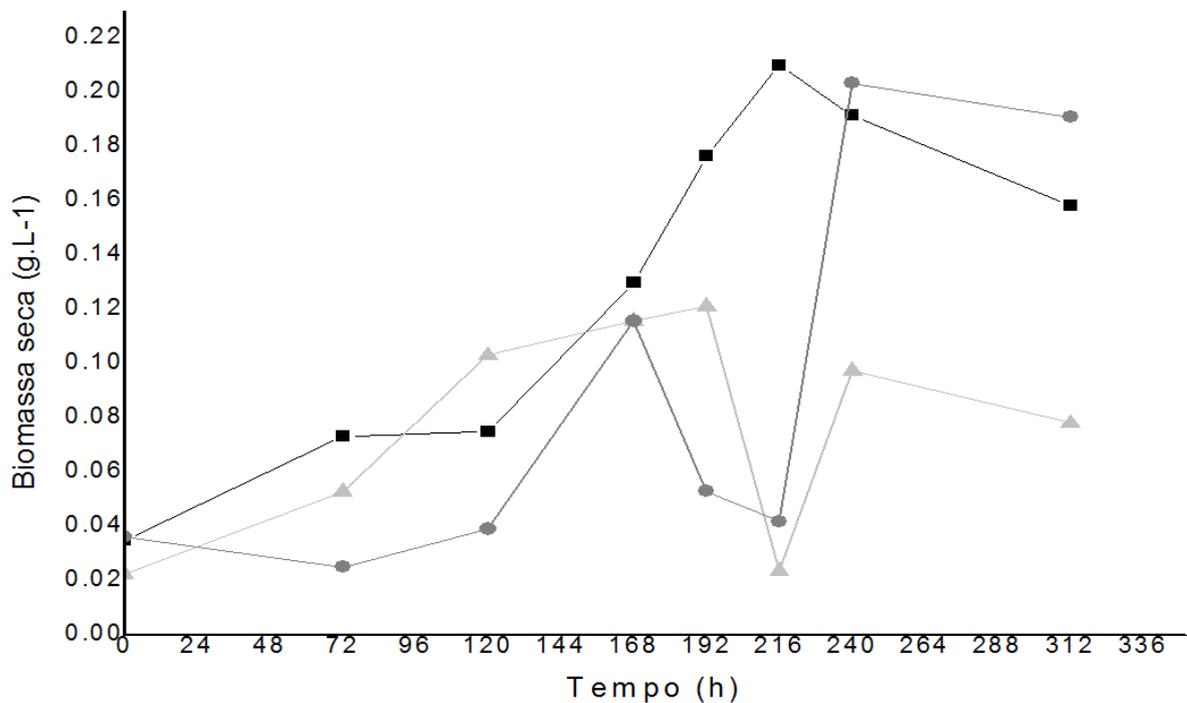
+: baixo crescimento; ++: mediano crescimento; +++: alto crescimento; -: sem crescimento; \*: sem reativação

### 5.4. Avaliação do Crescimento em fipronil através da Medida do Peso Seco

Com base nos resultados apresentados no item acima, um experimento de crescimento foi realizado entre os três isolados por 14 dias (336 horas) (Figura 9).

Estudos publicados relatam que o tempo de meia vida do fipronil quando tratado em solo sem esterilização ocorreu entre 8-10 dias em temperatura de 25 a 35 °C (ZHU et al., 2004). Dessa forma, o presente estudo utilizou também os dados publicados por Uniyal e colaboradores (2016) que isolaram *Stenotrophomonas acidaminiphyla* de solos de cultivo de milho e realizaram sua cinética no período de 14 dias.

Através da curva de crescimento o melhor desempenho dentre as bactérias foi o isolado E1. Os aspectos levados em consideração para essa seleção foram baseados em: selecionar o melhor micro-organismo que apresentasse menor tempo de adaptação (menor fase lag) e melhor crescimento (fase log). A escolha do E1 se deve ao desempenho mediano apresentado durante o período de adaptação inicial. No quesito de crescimento, o isolado D1 apresentou melhor desempenho, porém com maior tempo para adaptação.



**Figura 9** - Crescimento por 316 horas dos isolados E1(—■—), I3 (—▲—) e D1 (—●—).

### 5.5. Análise de Crescimento e Degradação do Fipronil Padrão pelos isolados E1 e G2.8

Com o isolamento completo e, seleção dos isolados com melhor potencial de crescimento e degradação do fipronil, visando um estudo comparativo, o isolado G2.8, um bastonete Gram-negativo, oxidase positiva isolado também em projeto do Laboratório de Metagenômica - UFGD, foi utilizado afim de se comparar os resultados do isolado E1, obtido no presente estudo. Estes experimentos foram realizados utilizando-se fipronil padrão (90,2%) conforme já citado na metodologia e foi utilizado o pré-inóculo líquido feito com extrato de levedura.

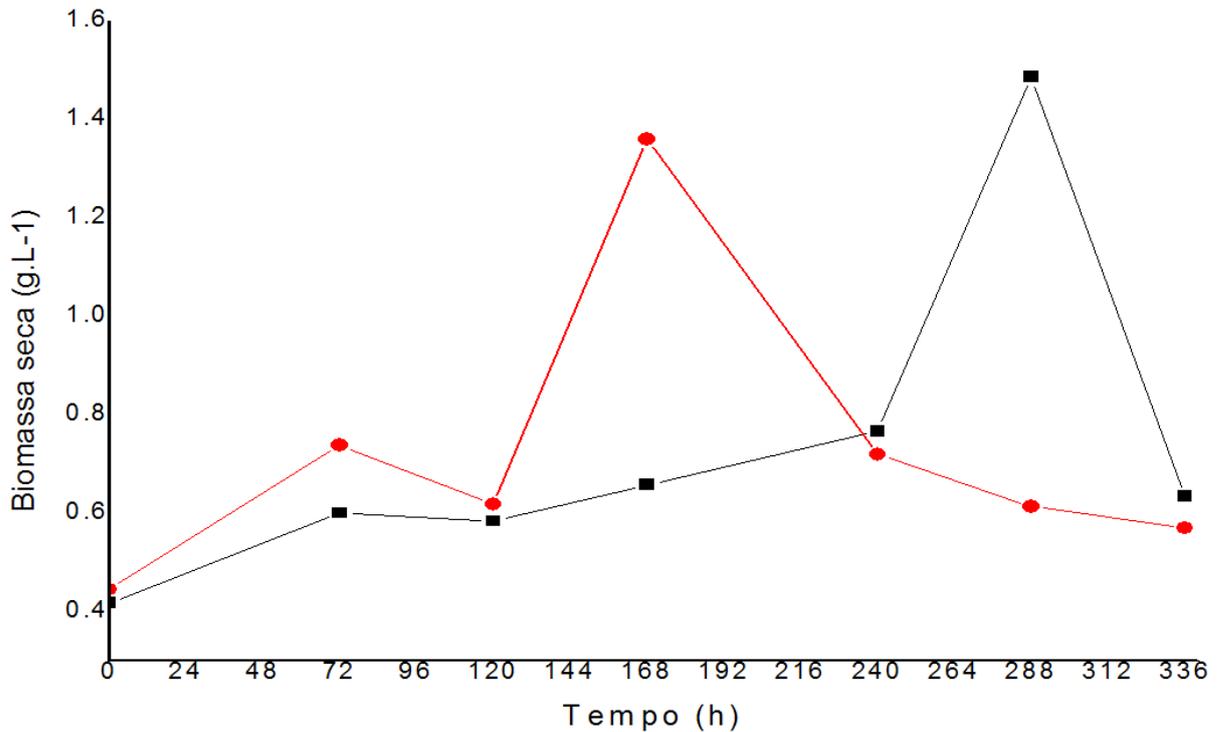
O interesse dessa comparação foi o de verificar o comportamento dos isolados (um Gram-positivo e outro Gram-negativo) em fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio, além da averiguação do nível de degradação do fipronil, já que foram coletadas amostras para análise posterior de degradação por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG – EM).

Simultaneamente à avaliação do crescimento por peso seco, das amostras foi retirada a fase orgânica e armazenada, a fim de se quantificar a degradação do fipronil, além da formação de metabólitos a partir de sua degradação. Assim como no experimento anterior, a avaliação do crescimento e degradação durou 14 dias sendo avaliadas 7 amostras nos tempos (0, 72, 120, 168, 240, 288 e 336 horas). Nestas 7 amostras foram realizadas as medidas de biomassa e também armazenado o sobrenadante para análise de degradação (Figura 10 e Tabela 6). Através da curva de crescimento foi verificado que aparentemente o isolado E1 apresentou melhor crescimento quando comparado ao isolado G2.8.

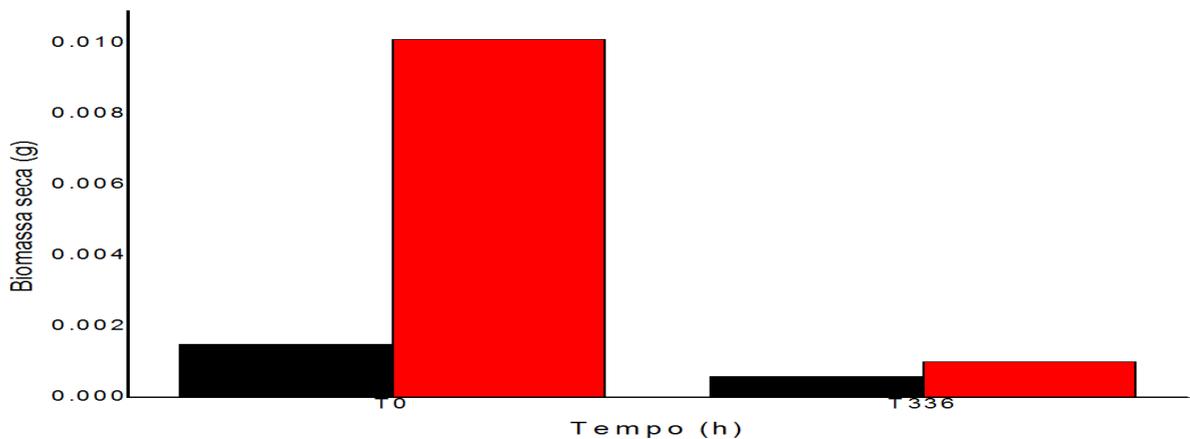
**Tabela 6** - Comparação de Cinética de Crescimento E1 e G2.8

Tempo (h)	Biomassa seca (g.L <sup>-1</sup> )	
	E1	G2.8
0	0.3666±0.012	0.5000±0.009
72	0.6000±0.005	0.7033±0.008
120	0.5833±0.002	0.6200±0.006
168	0.6566±0.009	1.1333±0.019
240	0.7666±0.009	0.6900±0.007
288	1.4866±0.027	0.6166±0.007
336	0.6333±0.004	0.5866±0.006

Os valores observados representam a média das repetições realizadas (±: erro padrão).



**Figura 10** - Curva de crescimento comparativo dos isolados G2.8 (●) e E1 (■).



**Figura 11** - Controle biótico da cinética de comparação dos isolados G2.8 (■) e E1 (■).

Porém, quando testadas e comparadas estatisticamente - pelo programa GENES (CRUZ, 2006) -, não apresentam diferença significativa de 100% (Tabela 7). Dessa forma, demonstrado não haver diferença entre a biomassa gerada dos na cinética dos dois isolados.

**Tabela 7** - Teste de Análise de Variância do Crescimento dos Isolados (ANOVA)

<b>FV</b>	<b>GL</b>	<b>SQ</b>	<b>QM</b>	<b>F</b>	<b>Probabilidade(%)</b>
TRATAMENTOS	1	0,000002	0,000002	0,0244	100,0 ns
RESÍDUO	40	0,0039	0,000098		
TOTAL	41	0,0039			

De acordo com a literatura, estudos realizados por Kumar, Singh e Gupta (2012) e Uniyal et al. (2016), demonstrou-se que a bioprospecção de micro-organismos de locais impactados pelo inseticida, demonstraram ótimos desempenhos na degradação desses agentes.

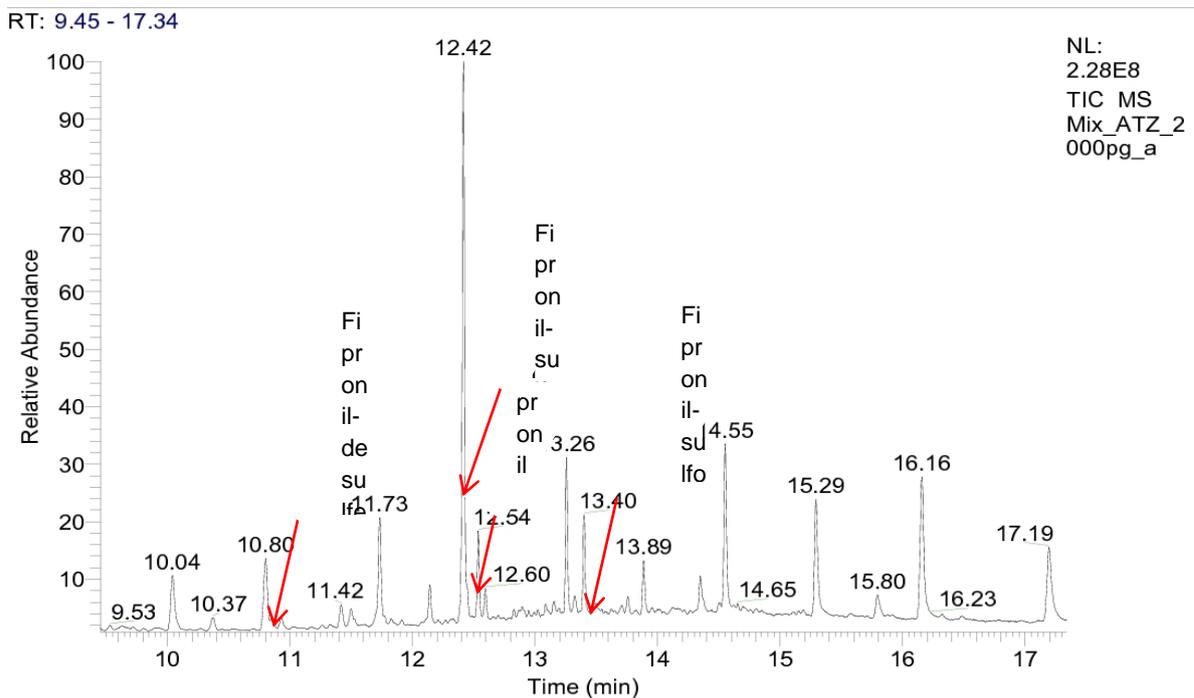
Para fins de controle do próprio experimento foram feitos controles bióticos e abióticos. O controle biótico teve como objetivo atestar que as bactérias crescem exclusivamente utilizando o fipronil como fonte de carbono e nitrogênio, dessa forma utiliza-se apenas o inóculo em meio ATZ-R sem fipronil (Figura 11). Já no controle abiótico, deseja-se saber se houve contaminação por outro micro-organismo durante o experimento e, além disso, se existe algum outro tipo de degradação que não a biológica ocorrendo no agroquímico. Desta forma, como pode ser verificado na figura 11 não houve crescimento nem no controle biótico, tampouco no controle abiótico.

### **5.6. Avaliação de biodegradação do fipronil por cromatografia gasosa e detecção dos metabólitos por espectrometria de massas**

Conforme citado no item anterior, nos 7 pontos amostrados foram realizadas análises de degradação do fipronil. A partir do sobrenadante foram realizadas injeções no cromatógrafo gasoso. Cada corrida cromatográfica durou 30 minutos (42 amostras), demonstrando o tempo de retenção dos metabólitos com o passar do tempo (minutos) - fipronil 12,55; fipronil sulfeto 12,43; fipronil sulfona 13,42; fipronil desulfenil 10,83 (Figura 12), variando a temperatura de 60 °C inicial até 300 °C final.

Com os resultados da quantificação do fipronil e seus metabólitos avaliou-se o desempenho da biodegradação quando comparada ao controle abiótico nas figuras

13 e 14 e também foi identificado os metabólitos de fipronil nas figuras 18,19 e 20 em anexo. Verificou-se uma degradação de até 94% pelo isolado E1 e de 96% pelo isolado G2.8, comprovando a capacidade de biodegradação do fipronil pelos isolados estudados, utilizando-o como única fonte de carbono e nitrogênio. Quando analisado o controle, observou-se uma média de degradação pelo próprio ambiente de 45%. Com base em pesquisas realizadas, é possível afirmar que este trabalho resultou em uma taxa de degradação (degradação química, física e biológica) ainda não publicada em nenhum estudo.



**Figura 12** - Tempo de retenção do fipronil e seus metabólitos

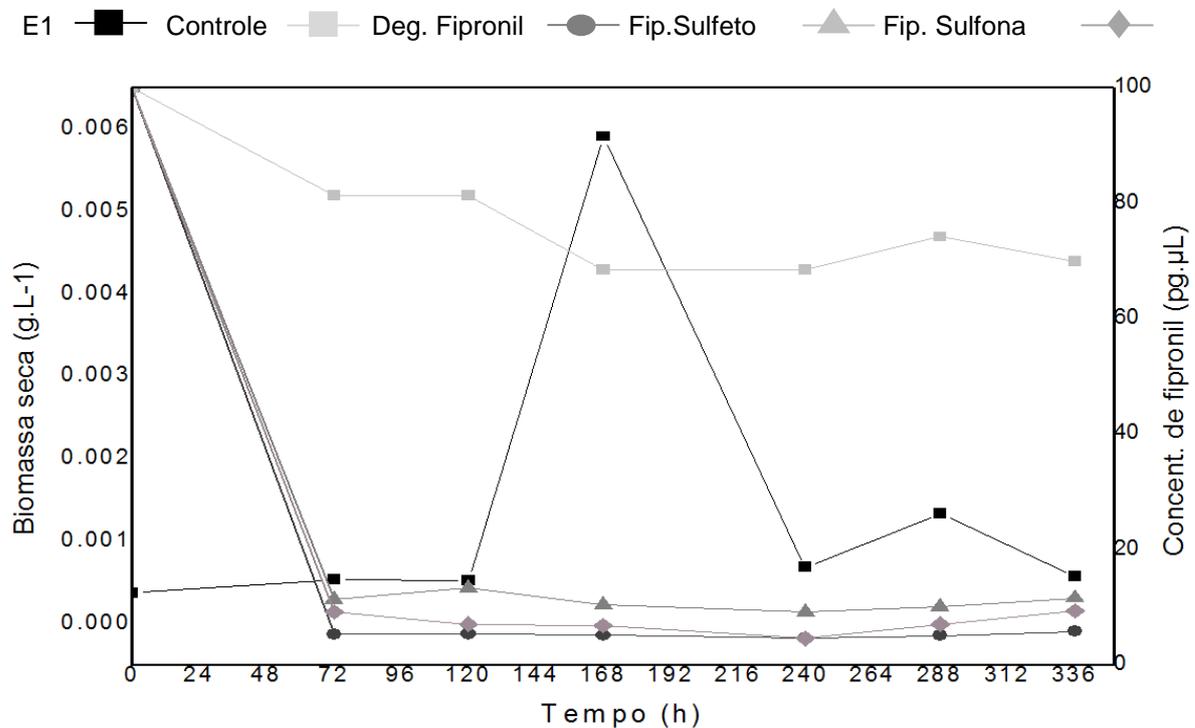
A partir das análises de cromatografia e espectrometria de massas, pode-se observar a acelerada degradação do composto fipronil pela ação das bactérias isoladas. No tempo 72 – 120 horas apresentam a maior taxa de degradação e por sua vez apresenta seu crescimento devido ao composto degradado, presumindo que os micro-organismos preferam os metabólitos do fipronil como precursor de seu crescimento ou que seus metabólitos não apresentem nocividade aos micro-organismos. Na comparação das degradações, não apresentaram nenhuma diferença estatística entre as bactérias, porém quando comparadas ao seu controle,

apresentam diferença estatística pelo teste de média de DMS-T ( $P < 0,05\%$ ) (Tabela 8). Essa diferença inexistente é atribuída ao fator da presença das bactérias contidas no meio acelerarem a biodegradação do fipronil. Quanto a não diferença entre a degradação biológica entre elas, pode-se atribuir a alta especificidade (alta concentração de fipronil) produzindo maior pressão de seleção dos micro-organismos, sobrevivendo apenas os mais aptos.

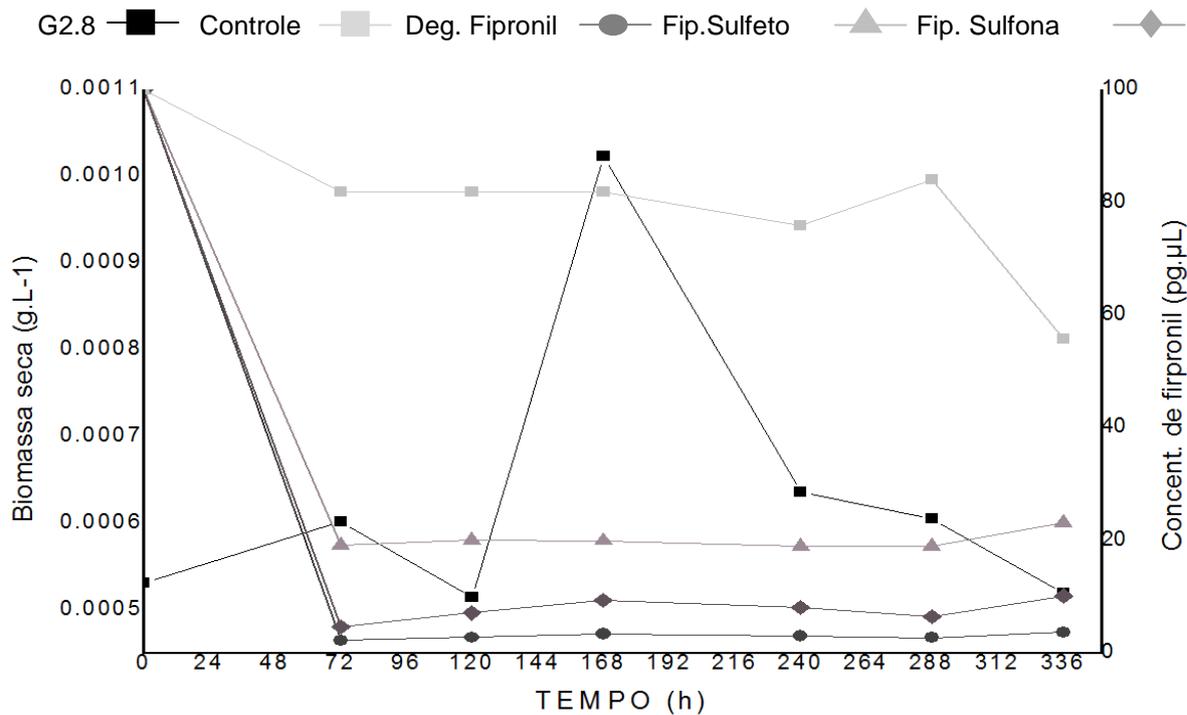
**Tabela 8** – Teste de médias DMS-T entre os tratamentos dos isolados e controles

Tratamentos	Amostras	Significância
<b>E1</b>	85700.18	73354.18286 a
	61008.18	
<b>G2.8</b>	57190.32	60031.10929 a
	62871.90	
<b>Controle E1</b>	252887.1	252887.0714 b
	288066.9	
<b>Controle G2.8</b>	288066.9	288066.8757 b
	252887.1	

Linhas com letras iguais representam médias iguais, enquanto linha com letras diferentes apresentam médias diferentes estatisticamente ( $p < 0,05$ ).



**Figura 13** - Curva de degradação e quantificação metabólica do isolado E1



**Figura 14** - Curva de degradação do fipronil e quantificação metabólica do isolado G2.8

No estudo de Mandal et al. (2013), foi verificada uma taxa de degradação de 89,3 a 98,52% no período de 35 dias utilizando uma cepa de *B. thuringiensis*, em concentração de 80 mg.kg<sup>-1</sup> de fipronil. Do mesmo modo, Kumar, Singh e Gupta (2012), ao utilizar a fortificação de 20 mg.kg<sup>-1</sup> e 80 mg.kg<sup>-1</sup>, é notado diferença quando comparado ao estudo de Mandal (2013). A concentração de 20 mg.kg<sup>-1</sup>, quando testadas com seus isolados *Paracoccus* sp. Gamma proteobacteria, apresentaram em 30 dias uma degradação de quase 50% do composto. Enquanto na concentração de 80 mg.kg<sup>-1</sup>, apresentou em aproximados 90 dias a mesma faixa de degradação apresentada por Mandal, dessa forma podendo dizer que as bactérias isoladas por Mandal, apresentaram melhor capacidade de degradação do fipronil.

Quando testado a biodegradação do fipronil, Uniyal et al. (2016) publicaram um estudo de 14 dias utilizando uma cepa de *Stenotrophomonas acidaminiphyla*, que apresentou uma taxa de degradação de 70% quando utilizado a concentração de 50 mg.L<sup>-1</sup>. Zhu et al. (2004) verificaram que em solos não estéreis a degradação do fipronil levou de 9,72 – 8-78 dias nas respectivas temperaturas de 25 e 35 °C, enquanto em solos estéreis foram de 32-34 dias, nas temperaturas de 25 e 35 °C

respectivamente, utilizando a concentração de 1 mg.L<sup>-1</sup> de fipronil. Comprovando a importância dos micro-organismos para biodegradação deste composto.

A biodegradação, quando considerada a alta concentração de fipronil utilizada no presente estudo (600 mg.L<sup>-1</sup>) e o curto período de 14 dias, pode-se afirmar que os isolados E1 e G2.8, apresentaram melhor rendimento no quesito degradação, quando comparada a qualquer trabalho publicado como visto por Kumar, Singh e Gupta (2012) , Mandal et al. (2013) e Uniyal et al. (2016).

### **5.7. Identificação dos Isolados E1 e G2.8 através do Sequenciamento do Gene RNAr 16S**

Foram usados 5 primers para o sequenciamento do isolados. A partir das sequências amplificada, foi construído pelo processo de “assembly”, a remontagem do gene 16S rRNA. Sendo utilizadas apenas as sequências que apresentaram retorno, para o isolado E1 utilizando apenas as amplificadas por 3 primers (FD1, 1203 e RD1) e isolado G2.8 apresentou aplicação pelos 5 primers (FD1, 362, 786, 1203 e RD1).

Com a sequência montada, foram feitas buscas de similaridade por alinhamento local, obtida pelo BLASTn na plataforma NCBI (Tabela 9). Quando compara a sequência E1 com as 10 mais similares ao pareamento local, identificou que a similaridade aproximou-se ao máximo de 96%. Dessa forma inviabilizando a certeza de denominação de uma espécie, porém foi notado que das 10 sequências com mais similaridade, 3 delas se tratavam de *Bacillus megaterium*, gerando a possibilidade de se tratar da mesma espécie de *Bacillus megaterium*.

Com o objetivo de comparação de BLAST, utilizando o RDP um banco de dados especializado em genes ribossomais, possibilitando melhor acurácia do alinhamento local. De mesma forma, a partir do BLASTn das sequência E1, escolheu-se os melhores resultados e mais similares (Tabela 10), construindo um comparativo dos resultados quando apresentada a sequência E1 e, novamente a espécie *Bacillus megaterium* apresentou mais frequência encontrada. Dessa forma foi determinado com os resultados comparativos do NCBI e RDP, que a espécie em questão possivelmente se trataria de *Bacillus megaterium*.

Todo procedimento realizado com o E1 foi realizado com o isolado G2.8. No comparativo de BLASTn pelo NCBI, o isolado G2.8 apresentava 99% de similaridade às 12 melhores sequências (Tabela 11). A comparação pelo NCBI tornou-se inviável pela alta variabilidade de resultados, dessa forma foi realizado o comparativo pelo RDP (Tabela 12).

Analisando-se o alinhamento local do isolado G2.8, através do banco RDP identificou-se com as sequências analisadas, uma maior similaridade com a espécie *Enterobacter cloacae*. Desta forma, sugere-se que o isolado G2.8 possa pertencer a esta espécie.

A partir da filogenia gerada dos isolados E1 (Figura 15) e G2.8 (Figura 16), foi possível afirmar certeza do gênero de cada isolado, E1 *Bacillus* e G2.8 *Enterobacter*. Não sendo possível a identificação de espécie do isolado E1, mas chegando a confirmação do G2.8 ser *Enterobacter cloacae*.

**Tabela 9** - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo BLASTn do isolado E1 pelo NCBI

<b>Espécie</b>	<b>Query (%)</b>	<b>e-value</b>	<b>Ident (%)</b>	<b>Max score</b>
<i>Bacillus subtilis</i> strain SIV02	93	3e-170	94	608
<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L54	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus megaterium</i> strain L43	95	4e-169	93	604
<i>Bacillus megaterium</i> strain YS33	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus megaterium</i> strain ML258	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus</i> sp. A2095	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus</i> sp. NBB18	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus</i> sp. NBGD33	93	4e-169	94	604
<i>Bacillus</i> sp. ADMK5	93	2e-167	94	599
<i>Bacillus aryabhatai</i> strain L21	93	2e-167	94	604

**Tabela 10** - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo alinhamento local do isolado E1 pelo RDP

<b>Espécie</b>	<b>S<sub>ab</sub> Score</b>	<b>Ident (%)</b>	<b>UCO</b>
<i>Bacillus</i> SP	0.831	nc	1372
<i>Bacillus megaterium</i>	0.836	nc	1351
<i>Bacillus megaterium</i>	0.831	nc	1407
<i>Bacillus megaterium</i>	0.836	nc	1408
<i>Bacillus megaterium</i>	0.839	nc	1404

nc: não calculado; UCO: unique common oligomers (score)

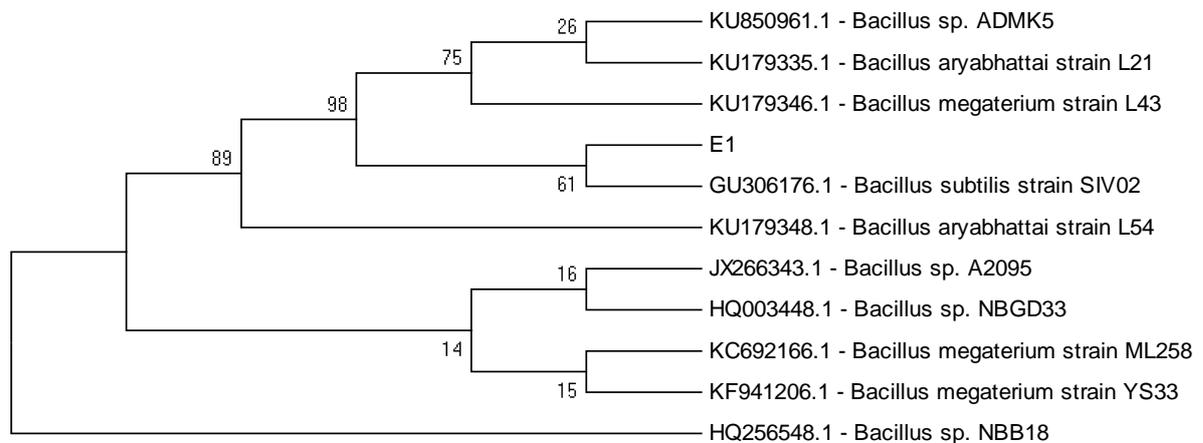
**Tabela 11** - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo BLASTn do isolado G2.8 pelo NCBI

<b>Espécie</b>	<b>Query (%)</b>	<b>e-value</b>	<b>Ident (%)</b>	<b>Max score</b>
<i>Citrobacter freundii</i> strain VTw-23	91	0.0	95	1323
<i>Enterobacter cancerogenus</i> strain SY22	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter asburiae</i> strain B01	56	0.0	99	1249
<i>Enterobacter</i> sp. ODB01	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter ludwigii</i> strain VITPSR-027	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter cloacae</i> strain M-5	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter cloacae</i> complex sp. 35734	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter asburiae</i> strain CAV1043	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter asburiae</i> strain m-4	89	0.0	99	1249
<i>Enterobacter ludwigii</i> strain IHB B 6551	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter aerogenes</i> strain P5	92	0.0	99	1249
<i>Enterobacter kobei</i> strain DSM 13645	92	0.0	99	1249

**Tabela 12** - Comparação de similaridade de sequências obtidas pelo alinhamento local do isolado G2.8 pelo RDP

Espécie	S <sub>ab</sub> Score	Ident (%)	UCO
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.890	Nc	1275
<i>Enterobacter asburiae</i>	0.893	Nc	1272
<i>Enterobacter cloacae</i>	0.890	Nc	1257
<i>Enterobacter</i> sp.	0.887	Nc	1322
<i>Enterobacter</i> sp.	0.892	Nc	1298

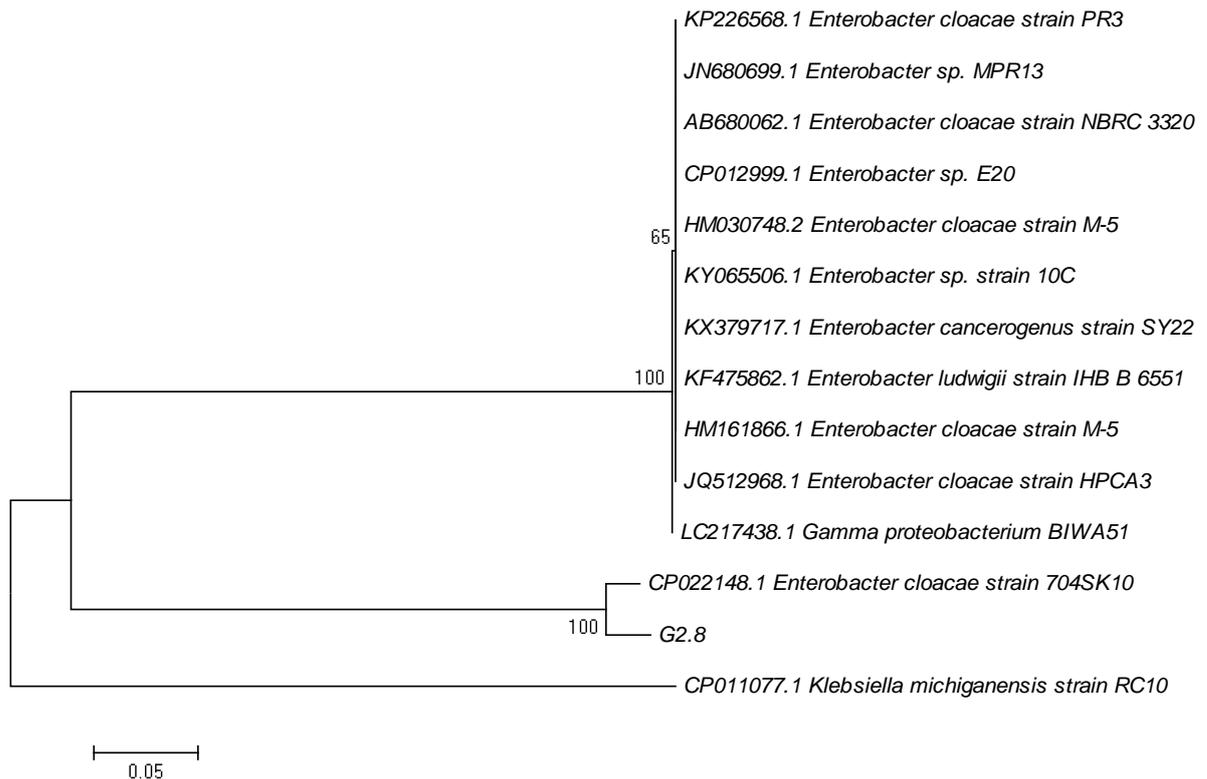
nc: não calculado; UCO: unique common oligomers (score)



**Figura 15** - Árvore filogenética do isolado E1

#### Relação Evolutiva por Neighbor-Joining

A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore de consenso bootstrap inferida de 1000 repetições é tomada para representar a história evolutiva dos taxa analisados. Os ramos correspondentes às partições reproduzidas em menos de 50% de repetições bootstrap são recolhidos. A porcentagem de árvores replicadas nas quais os taxa associados se agruparam no teste de bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método de Kimura 2-parâmetro e estão nas unidades do número de substituições de base por local. A variação de taxa entre os locais foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 11 sequências nucleotídicas. Todas as posições com lacunas e dados em falta foram eliminadas. Houve um total de 376 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7.



**Figura 16** - Árvore filogenética do isolado G2.8

#### **Análise filogenética molecular pelo método de Neighbor-Joining**

A história evolutiva foi inferida usando o método de Neighbor-Joining. A árvore ideal com a soma do comprimento do ramo = 0.93341503 é mostrada. A porcentagem de árvores replicadas em que os taxa associados agrupados no teste bootstrap (1000 repetições) são mostradas ao lado dos ramos. A árvore é desenhada para escala, com comprimentos de ramificação nas mesmas unidades que as das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método p-distance e estão nas unidades do número de diferenças de base por site. A análise envolveu 14 sequências de nucleotídeos. Todas as posições que continham lacunas e dados em falta foram eliminadas. Havia um total de 612 posições no conjunto de dados final. Análises evolutivas foram realizadas em MEGA7.

A espécie *Bacillus megaterium* é conhecida pela sua capacidade de acúmulo de biopolímeros, mais especificamente produção de ácido gama poliglutâmico (yPGA), podendo também formar estruturas denominadas “blendas” a qual é possível a produção de mais de um tipo de polímero separados, na mesma célula do micro-organismo (Guex-Holzer; TOMCSIK, 1956). Utilizada como bioinoculante de solo, atuam com capacidade de solubilização de fosfatos naturais, existentes no solo, disponibilizando à planta, maior fixação de fósforo, mecanismo esse baseado na relação sinérgica do micro-organismo e meio ambiente, potencializando a produção agrícola (RAJA et al., 2006).

No estudo de Junying et al. (2000), uma cepa de *Bacillus megaterium*, isolada de solo, apresentou capacidade na degradação do inseticida Monosultap. Um inseticida de origem chinesa, cuja principal ação é o controle insetos da ordem Lepidóptera, com efeito de contato e progressões sistêmicas (NCBI, 2008). Pelas análises, identificou-se que a proporção de degradação do composto químico estava ligada a conforme sua maior concentração inoculada, gerando maior crescimento microbiano, logo, maior biodegradação.

O gênero *Enterobacter*, pertencentes ao grupo de bastonete Gram-negativos e família *Enterobacteriaceae*, são micro-organismos com potencial patogênico, responsáveis por infecções oportunistas em imunocomprometidos. A *Enterobacter cloacae*, é uma bactérias comumente isolada em casos de infecções em seres humanos.

Além de corantes, a biodegradação de pesticidas por, *Enterobacter asburiae* JAS5 e *Enterobacter cloacae* JAS7, já foram constatadas. No estudo de Abraham, Silambarasan (2015), a biodegradação do endossulfan, um inseticida e acaricida, foram determinadas através de modelos cinéticos, curvas de degradação e do composto principal e seus metabólitos.

Dessa forma, ambos os isolados já foram descritos com potencial biorremediador de áreas impactadas por agrotóxicos.

## 6. CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, pode-se afirmar que os micro-organismos presentes no solo contaminado por fipronil, podem atribuir resultados expressivos na degradação do fipronil. No presente estudo das 13 bactérias bioprospectadas, 3 apresentaram bom potencial de crescimento em fipronil como única fonte de carbono e nitrogênio. O isolado E1 foi selecionado para estudos de degradação, juntamente com o isolado G2.8 e ambos apresentaram ótimos resultados de degradação (94-96%, respectivamente) quando comparadas com os dados da literatura. Além disso, ressalta-se que no presente trabalho o fipronil foi utilizado em alta concentração  $600 \text{ mg.L}^{-1}$  e como única fonte de carbono e nitrogênio, o que o difere de outros estudos publicados. Através dos resultados obtidos pela filogenia, possivelmente o isolado G2.8 trata-se de *Enterobacter cloacae*, e por apresentar características de patogenicidade, não seria indicada sua utilização em processos de biorremediação. Dessa forma, sugere-se que o isolado E1 possível *Bacillus megaterium* seja selecionado como melhor micro-organismo do estudo realizado para fins de biorremediação.

## 7. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J; SILAMBARASAN, S. Plant growth promoting bacteria *Enterobacter asburiae* JAS5 and *Enterobacter cloacae* JAS7 in mineralization of endosulfan.

**Applied biochemistry and biotechnology**, v. 175, n. 7, p. 3336-3348, 2015.

AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial-degradation of pesticides.

**Soil Research**, v. 33, n. 6, p. 925-942, 1995.

ALI, Sozan A. et al. Sublethal effect of fipronil exposure on liver and kidney tissues with evaluation of the recovery ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*).

**Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. Supplement 2, p. S131-S138, 2016.

ANDRADE, J. A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C.S. Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, v. 35, n. 3, p. 17-43, 2010.

ATLAS, R.M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiological reviews**, v. 45, n. 1, p. 180, 1981.

ANVISA. **Gram-positivos: módulo 4**. Disponível em:

<[http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_stre3.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_stre3.htm)>. Acesso: 11 Nov. 2016.

**BASF**. Disponível em : < <https://www.basf.com/br/pt.html>> Acesso: 03 jun. 2016.

BERNA, V. **Lista da ANVISA dos alimentos com maior nível de contaminação**.

2016. Disponível em: <<http://revista.rebia.org.br/2016/88/850-lista-da-anvisa-dos-alimentos-com-maior-nivel-de-contaminacao>> Acesso: 03 jun. 2016.

BRASIL. Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

**Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, D.F., 08 jan. 2002.

Capítulo I, art 1º, inciso IV.

BONMATIN, J.M. et al. Environmental fate and exposure; neonicotinoids and fipronil.

**Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 35-67, 2015.

BONATTO, F. A.; BREVE, H. A. M.; TEJADA, E. C. S.. COMPARAÇÃO DE PROTOCOLOS DE EXTRAÇÃO DE DNA NAS BACTÉRIAS E. COLI E

PSEUDOMONAS SPP. **Atas de Ciências da Saúde (ISSN 2448-3753)**, v. 2, n. 1, 2014.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource technology**, v. 74, n. 1, p. 63-67, 2000.

CAPELLINI, L.T.D. **Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil de água do Ribeirão Feijão – São Carlos-SP**. Dissertação apresentada ao Instituto de química de São Carlos (USP), 2008.

CARNEIRO, F. F.; DE ALMEIDA, V. E. S. Brasil é o país que mais usa agrotóxicos no mundo. **Embrapa Hortaliças** - Artigo de divulgação na mídia (INFOTECA-E), 2016.

CASTRO, R.B.R. **Potencial de solubilização de fosfato e identificação molecular de bactérias isoladas de solos sob cultivo de cana-de-açúcar – Jaboticabal-SP**. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticaba, 2015.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W.F. Phylogenetic analysis. Models and estimation procedures. **American journal of human genetics**, v. 19, n. 3 Pt 1, p. 233, 1967.

COUTINHO, C. F B et al. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente**, v. 15, p. 65-72, 2005.

COLE, L. M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J. E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 46, n. 1, p. 47-54, 1993.

CRUZ, C.D. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006

CREA-PE. **Proibido uso de Imidacloprido, Tiametoxan, Clotianidina e Fipronil via aplicação aérea**. 13 set. 2012. Disponível em :

<<http://www.creape.org.br/proibido-uso-de-imidacloprido-tiametoxan-clotianidina-e-fipronil-via-aplicacao-aerea/>>. Acesso: 30 maio 2016.

DA REDAÇÃO, AgroAnalysis-Equipe. Perspectivas agrícolas da ocde-fao-O Brasil como fornecedor de alimento para o mundo. **AgroANALYSIS**, v. 35, n. 8, p. 23-25, 2015.

DA SILVA A., GIRALDO, L. Vulnerabilidades de trabalhadores rurais frente ao uso de agrotóxicos na produção de hortaliças em região do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p. 89-98, 2012.

DE OLIVEIRA, P. R. **Avaliação dos efeitos do fipronil (ingrediente ativo do FRONTLINE®) nos ovários de carrapatos Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806)(Acari: Ixodidae) e no sangue periférico de roedores**. 2010. Tese de Doutorado. INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS.

DE OLIVEIRA SILVA, R. et al. Degradação e sorção de fipronil e atrazina em Latossolos com resíduos orgânicos da cultura de cana-de-açúcar. **Ciência Rural**, v. 46, n. 7, p. 1172-1177, 2016.

DOBSON, A.P., BRADSHAW, A.D., BAKER, A.J.M., 1997. Hopes for the Future: Restoration Ecology and Conservation Biology. **Science**, v. 277, n. 5325, p. 515-522, 1997.

EHSAN, H. A. et al. Influence of fipronil intoxication on thyroid gland ultra-structure and hepatic microsomal enzymes expression in male albino rats. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 64, n. Supplement 2, p. S79-S85, 2016

FIDALGO, M. Ibama e SDA proíbem a utilização de alguns ingredientes ativos em culturas de algodão. **Ministério da Agricultura**. Disponível em:<<http://www.agricultura.gov.br/comunicacao/noticias/2015/01/ibama-e-sda-proibem-a-utilizacao-de-alguns-ingredientes-ativos-em-culturas-de-algodao>> Acesso: 01 ago. 2016

FRONTLINE®: fipronil. São Paulo: Merial Saúde Animal Ltda. Resp.:Dr. Henry Berger de Almeida - CRMV-SP nº10.114. **Bula de remédio**. Disponível em: <<http://frontline.com.br/Downloads/bulas/Bula6.pdf>>. Acesso:31 nov. 2016

FUNDAÇÃO BRADESCO. **Acidente no município de Mariana (MG)**. Disponível em:<<http://www.eja.educacao.org.br/areadoeducador/Socializacao%20de%20Praticas%20Pedagogicas/Atualidades%20e%20Problem%C3%A1ticas%20ambientais/Acidente%20em%20Mariana.pdf>> Acesso: 02 de Nov. 2016.

GAYLARDE C. C.; BELLINASSO M. L.; MANFIO G. P. Biorremediação: Aspéctos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **BIOTECNOLOGIA CIÊNCIA & DESENVOLVIMENTO**, n.34 - janeiro/junho 2005. Disponível em: <<http://www.cocminas.com.br/arquivos/file/Biorremediacao.pdf>>. Acesso: 10 de Ago. 2016.

GHISI, N. C. et al. Evaluation of genotoxicity in Rhamdia quelen (Pisces, Siluriformes) after sub-chronic contamination with Fipronil. **Environmental monitoring and assessment**, v. 180, n. 1, p. 589-599, 2011.

GHINI, R.; BETTIOL, W.. Proteção de plantas na agricultura sustentável. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 17, n. 1, p. 61-70, 2000.

GUERX-HOLZER, S.; TOMCSIK, J. The isolation and chemical nature of capsular and cell-wall haptens in a Bacillus species. **Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 14-25, 1956.

GUNASEKARA, A. S. et al. Environmental fate and toxicology of fipronil. **Journal of Pesticide Science**, v. 32, n. 3, p. 189-199, 2007.

HAINZL, D.; CASIDA, J. E. Fipronil insecticide: novel photochemical desulfinylation with retention of neurotoxicity. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 23, p. 12764-12767, 1996.

HALL, T.A. 1999. **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT**. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

HIDAKA, H. et al. Enhanced Ga<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-photocatalyzed and photochemical degradation of the Fipronil insecticide by UVC irradiation in mixed aqueous/organic media under an inert atmosphere. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 5, p. 919-928, 2015.

IBAMA. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental**. Disponível em: <[http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade\\_Ambiental/produtos\\_agrotoxico\\_s\\_comercializados\\_brasil\\_2009.pdf](http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxico_s_comercializados_brasil_2009.pdf)>. Acesso: 21 de Ago. 2016.

IBGE. **Estatísticas da Produção Agrícola: setembro de 2016**. Disponível em: <[ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao\\_Agricola/Fasciculo\\_Indicadores\\_IBGE/estProdAgr\\_201609.pdf](ftp://ftp.ibge.gov.br/Producao_Agricola/Fasciculo_Indicadores_IBGE/estProdAgr_201609.pdf)>. Acesso: 26 de Nov. 2016.

JÚNIOR, R. P. S.; FRANCO, A. A.. A temperatura e umidade na degradação de fipronil em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1203-1209, 2013.

JUNYING, Z. et al. Degradation of monosultap by *Bacillus megaterium* LY-4 in soil. **China Environmental Science**, v. 20, n. 6, p. 511-514, 2000.

KUMAR, A. et al. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. **International journal of environmental sciences**, v. 1, n. 6, p. 1079, 2011.

KUMAR, R.; SINGH, B.; GUPTA, V. K. Biodegradation of fipronil by *Paracoccus* sp. in different types of soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 88, n. 5, p. 781-787, 2012.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, p. msw054, 2016.

MADSEN, J. F.; SANDSTROM, M. W.; ZAUGG, S. D. **Methods of analysis by the US Geological Survey National Water Quality Laboratory; a method supplement for the determination of Fipronil and degradates in water by gas chromatography/mass spectrometry**. 2002.

MANDAL, K. et al. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*.

**Ecotoxicology and environmental safety**, v. 93, p. 87-92, 2013.

MANRIQUE, G. et al. **Toxicidade aguda e risco ecotoxicológico do fipronil para o guarú (*Poecilia reticulata*) e dissipação no ambiente aquático**. 2009.

Dissertação de Mestrado. Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal.

MELO, E. G. V. de et al. **Avaliação da glicerina bruta na estimulação de bactérias hidrocarbonoclásticas para remediação de áreas contaminadas por hidrocarbonetos**. 2011. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia, Instituto de Geociências.

MIRRA, B. **Dossiê aponta Brasil como país que mais usa agrotóxicos no mundo**. Disponível em: < <http://www.ecycle.com.br/component/content/article/35-atitude/1843-dossie-abrasco-brasil-maior-consumo-agrotoxico-pesticida-herbicidas-fungicidas-inseticidas-mundo-contaminacao-doenca-populacao-leite-materno.html>> Acesso: 03 jun. 2016

MOREIRA, A. B. Biblioteca Virtual: **Centro de Documentação e Informação , Estudo da dinâmica dos agrotóxicos glifosato e fipronil e seus derivados na bacia hidrográfica do Turvo/Grande-SP**. Biblioteca Virtual FAPESP, 2012. Disponível em: <<http://www.bv.fapesp.br/pt/auxilios/30531/estudo-da-dinamica-dos-agrotoxicos-glifosato-e-fipronil-e-seus-derivados-na-bacia-hidrografica-do-tu/>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

NAMBI, Ayyanampakkam Pandurangan et al. Efficacy of a Novel Topical Combination of Fipronil 9.8% and (S)-Methoprene 8.8% against Ticks and Fleas in Naturally Infested Dogs. **Scientifica**, v. 2016, 2016.

NICHOLSON, W.L. et al. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 64, n. 3, p. 548-572, 2000.

NPTN. National Pesticide Telecommunications Network. Fipronil. Disponível em: <<http://npic.orst.edu/factsheets/fipronil.pdf>>. Acesso: 29 Nov. 2016.

ONU. **ONU: dos 7 bilhões de habitantes do mundo, 6 bi têm celulares, mas 2,5 bi não têm banheiros**. 2016. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/onu-dos-7-bilhoes-de-habitantes-do-mundo-6-bi-tem-celulares-mas-25-bi-nao-tem-banheiros/>>. Acesso: 12 jan. 2017.

**Organicsnet**. Mercado de orgânicos cresce o dobro no Brasil. **2016**. Disponível em: <<http://www.organicsnet.com.br/2016/01/mercado-de-organicos-cresce-o-dobro-no-brasil/>>. Acesso: 12 jan. 2017.

PACHECO, Z.A. D. et al. **Influência de compostos xenobiontes na densidade, diversidade e função ecológica bacteriana de degradação do agrotóxico fipronil**. 2015. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.

PEDRO, J.. **Deteção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste Allium cepa**. 2008. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; REID, R. **Microbiologia**. Sao Paulo, SP: McGraw-Hill, 1981. v.2. p. 1072.

PEREIRA, A. R. B.; DE FREITAS, D. A. F.. Uso de micro-organismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental** (Fechada para submissões por tempo indeterminado), v. 6, n. 6, p. 995-1006, 2012.

PINHO, G. P. de et al. **Efeito de componentes da matriz na análise de agrotóxicos por cromatografia gasosa**. 2009.

PRASHANT, B. K. **PROTOCOL: KOH (potassium hydroxide) test for Gram negativity in bacterial blight pathogen of Pomegranate (2013)**. Disponível em: <[http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=\\*PROTOCOL%3A+KOH+\(potassium+hydroxide\)+test+for+Gram+negativity+in+bacterial+blight+pathogen+of+Pomegranate](http://prometheuswiki.publish.csiro.au/tiki-index.php?page=*PROTOCOL%3A+KOH+(potassium+hydroxide)+test+for+Gram+negativity+in+bacterial+blight+pathogen+of+Pomegranate)> .Acesso: 07 Nov. 2016.

PRIMAVESI, O.; PRIMAVESI, A. C.. Fundamentos ecológicos para o manejo efetivo do ambiente rural nos trópicos: Educação ambiental e produtividade com qualidade ambiental. **Embrapa Pecuária Sudeste**, 2003.

**National Center for Biotechnology Information.** PubChem Compound Database; CID=23666830, 2008. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/monosultap#section=Top>>. Acesso: 26 Mar. 2017.

RABINOVITCH, L. Estudo sobre a esporulação de uma amostra de Bacillus: II- Importância dos íons Mn e Mg na indução do processo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 69, n. 2, p. 121-130, 1971.

RADEHAUS, P.M; SCHMIDT S.K.: Characterization of a novel Pseudomonas sp. That mineralizes high concentration of pentachlorofenol. **Applied and Environmental Microbiology**, v.58, p.2879-2885, 1992.

RAJA, P. et al. Impact of bio inoculants consortium on rice root exudates, biological nitrogen fixation and plant growth. **J Biol Sci**, v. 6, p. 815-823, 2006.

RAMSDORF, W.. **Avaliação da toxicidade dos compostos fipronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes**. 2011. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná.

ROEL, A. R.. A agricultura orgânica ou ecológica e a sustentabilidade da agricultura. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v. 3, n. 4, p. 57-62, 2002.

SANCHES, S. M. et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, v. 13, p. 54, 2003.

SEMADA. **Diagnóstico Socioeconômico de Mato Grosso do Sul**. 2015.

Disponível em:

<[http://www.semade.ms.gov.br/wpcontent/uploads/sites/20/2015/03/Diagnostico\\_Socioeconomico\\_de\\_MS\\_20151.pdf](http://www.semade.ms.gov.br/wpcontent/uploads/sites/20/2015/03/Diagnostico_Socioeconomico_de_MS_20151.pdf)>. Acesso: 02 jun. 2016.

SIEVERS, F. et al. Fast scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular systems biology**, v. 7, n. 1, p. 539, 2011.

SILVA, C. R. et al. Banana peel as an adsorbent for removing atrazine and ametryne from waters. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 10, p. 2358–2363, 2013.

SILVA, C. M. M. S.; ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. **Microbiologia Ambiental: manual de laboratório**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, p. 98, 2000.

SCHENBERG, A.C. G.. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudos avançados**, v. 24, n. 70, p. 07-17, 2010.

SOLAL, M. C. et al. Manutenção de microrganismos: conservação e viabilidade. **Enciclopédia Biosfera, Goiânia**, v. 8, n. 14, p. 1398-2012.

STEVENS, M. M.; HELLIWELL, S.; WARREN, G. N. Fipronil seed treatments for the control of chironomid larvae (Diptera: Chironomidae) in aerially-sown rice crops. **Field Crops Research**, v. 57, n. 2, p. 195-207, 1998.

Tan, H., et al. Biodegradation and chiral stability of fipronil in aerobic and flooded paddy soils. **Science of the total environment** v. 407.1, p.428-437, 2008.

TAPPARO, A. et al. Assessment of the environmental exposure of honeybees to particulate matter containing neonicotinoid insecticides coming from corn coated seeds. **Environmental science & technology**, v. 46, n. 5, p. 2592-2599, 2012.

TONINI, R.M.C.W.; REZENDE, C.E.; GRATIVOL, A.D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **CEP**, v. 28013, p. 602, 2010.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.967..

UDO, M.S. B.. **Avaliação dos efeitos tóxicos da exposição pré-natal ao fipronil na prole de ratas Wistar**. Tese de Doutorado, 2012. Universidade de São Paulo.

UNIYAL, S. et al. Isolation and Characterization of Fipronil Degrading Acinetobacter calcoaceticus and Acinetobacter oleivorans from Rhizospheric Zone of Zea mays. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, p. 1-6, 2016a.

UNIYAL, S. et al. Degradation of fipronil by *Stenotrophomonas acidaminiphila* isolated from rhizospheric soil of *Zea mays*. **3 Biotech**, v. 6, n. 1, p. 1-10, 2016b.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, N. P. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental toxicology and pharmacology**, v. 13, n. 2, p. 57-149, 2003.

WANG, G. et al. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide Acetamiprid by bacterium *Pigmentiphaga* sp. strain AAP-1 isolated from soil. **Bioresource technology**, v. 138, p. 359-368, 2013.

WANG, Q. et al. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. **Applied and environmental microbiology**, v. 73, n. 16, p. 5261-5267, 2007.

YAMAMOTO, M.; OLIVEIRA, P.E.; GAGLIANONE, M.C. **Uso sustentável e restauração da diversidade dos polinizadores autóctones na agricultura e nos ecossistemas relacionados: planos de manejo**. – Rio de Janeiro: Funbio, 2014. p.404.

ZHU, G. et al. Microbial degradation of fipronil in clay loam soil. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 153, n. 1-4, p. 35-44, 2004.

## 8. ANEXO

Abaixo se encontra as espectrometrias de massa dos compostos identificados e quantificados no experimento.

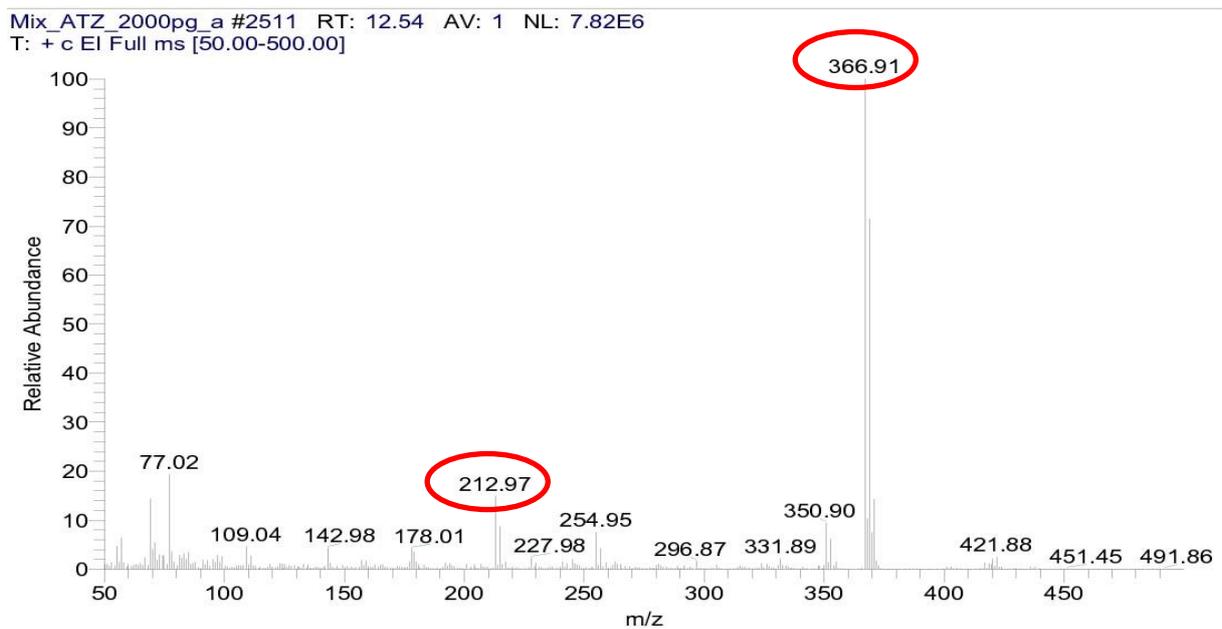
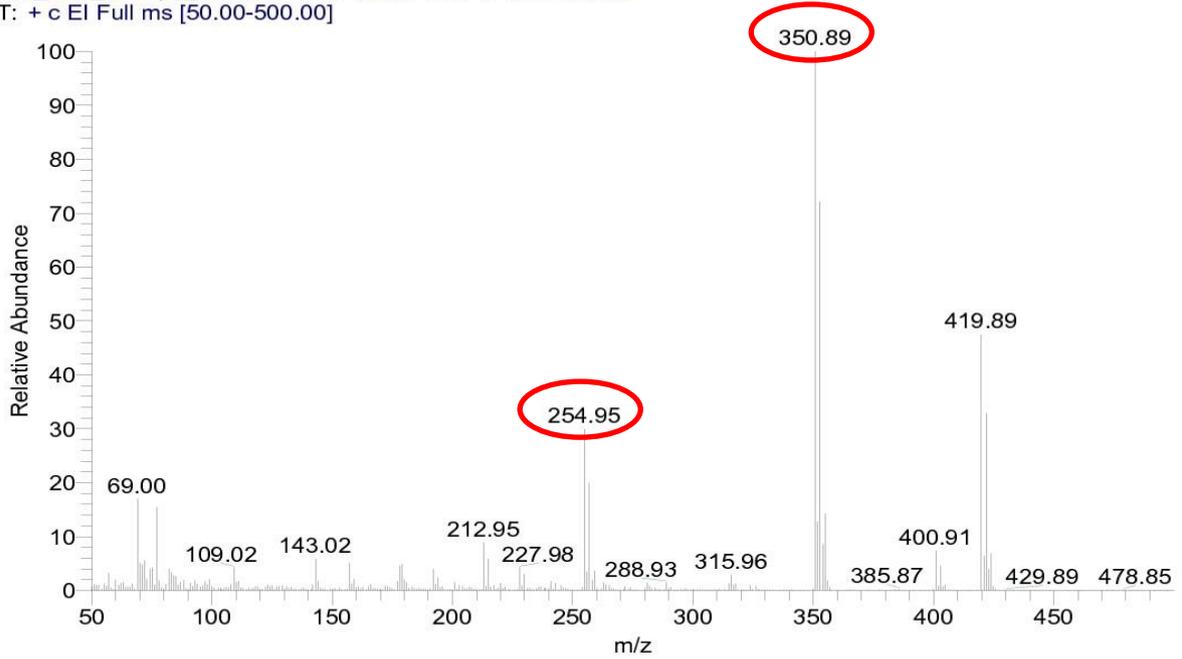


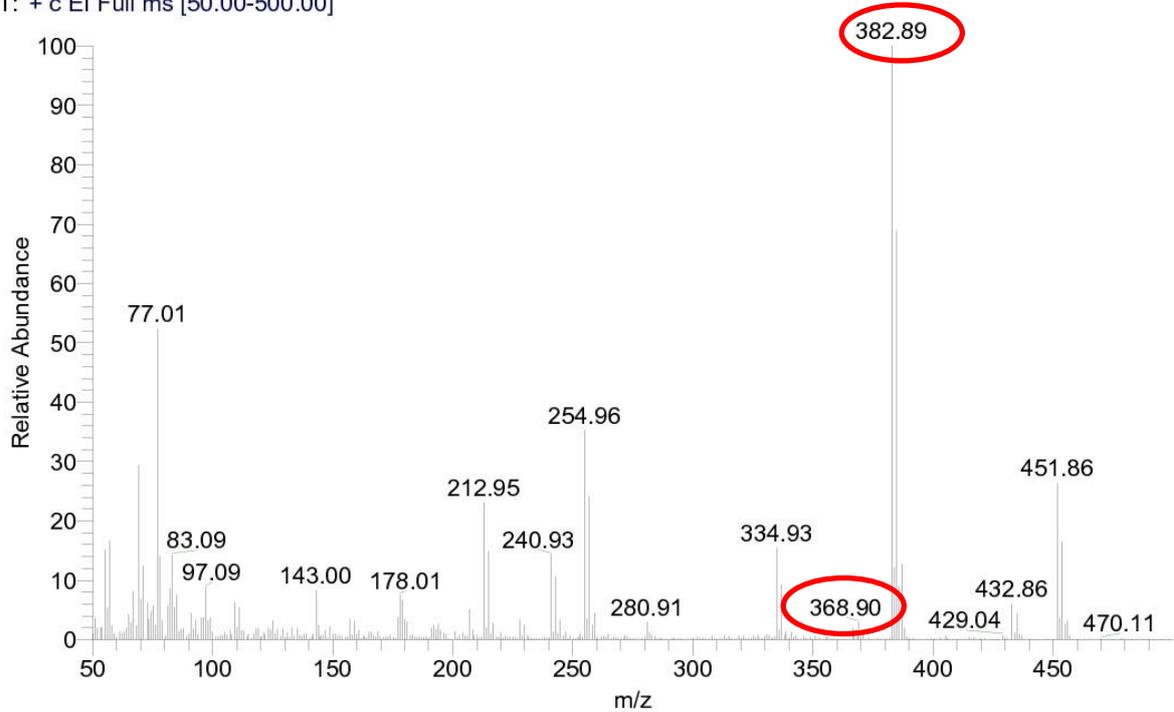
Figura 17 - Espectrometria de massa do fipronil

Mix\_ATZ\_2000pg\_a #2476 RT: 12.42 AV: 1 NL: 3.40E7  
T: + c EI Full ms [50.00-500.00]



**Figura 18** - Espectrometria de massa do fipronil sulfeto

Mix\_ATZ\_2000pg\_a #2765 RT: 13.40 AV: 1 NL: 5.04E6  
T: + c EI Full ms [50.00-500.00]



**Figura 19** – Espectrômetro de massa do fipronil sulfona