



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

Maria Fernanda Zaneli Campanari

**METAGENÔMICA DA DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA EM SOLO SOB DIFERENTES**  
**MANEJOS AGRÍCOLAS E FLORESTA SEMIDECIDUAL**

**DOURADOS-MS**

**2017**





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

Maria Fernanda Zaneli Campanari

**METAGENÔMICA DA DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA EM SOLO SOB DIFERENTES**  
**MANEJOS AGRÍCOLAS E FLORESTA SEMIDECIDUAL**

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: Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá

**DOURADOS-MS**

**2017**

MARIA FERNANDA ZANELI CAMPANARI

METAGENÔMICA DA DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA EM SOLOS SOB  
DIFERENTES MANEJOS AGRÍCOLAS E FLORESTA SEMIDECIDUAL

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 26 de Janeiro de 2017

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá – Universidade Federal da Grande Dourados

---

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

---

Profa. Dra. Liliam Silvia Candido – Universidade Federal da Grande Dourados

À minha família e ao meu namorado Rafael Correia da Silva, que durante todo esse tempo foi e continua sendo a fonte da minha força, determinação e conquistas.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, por me permitir chegar até aqui e concluir mais uma fase da minha vida. E à minha família, que sempre foi o meu maior suporte e que mesmo longe nunca me faltaram.

A minha orientadora Profa. Dra. Maricy Raquel Lindenbah Bonfá e ao meu co-orientador Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira, os quais me proveram a determinação para desenvolvimento deste e dos outros trabalhos que realizamos, através de sua paciência infinita e imenso conhecimento, características dos verdadeiros mestres, que levarei para sempre.

Ao meu namorado, Rafael Correia da Silva, pelo apoio incondicional nos momentos altos e baixos (sendo as vezes mais baixos que altos), por sua paciência gigante e por tudo que sempre fez por mim, me dando carinho, tranquilidade e calma, sendo ele o responsável por me ajudar a compreender o que é a vida no seu mais belo esplendor.

Aos meus amigos que encontrei na faculdade e levarei para sempre, Mariana Neri Lucas Kurihara, Romário Oliveira de Sales, Thalles Kraus, Lucas Guarnier, Anderson Souza, que enriqueceram a experiência da graduação através da amizade.

Agradeço também aos colegas do grupo de pesquisa, em especial Lucas Guarnier, Caio Achilles, que muito me ajudaram no desenvolvimento dos trabalhos com a atrazina.

Sou eternamente grata a todos.

## RESUMO

A agricultura está associada à intensa utilização de agroquímicos, um deles sendo a atrazina, composto amplamente utilizado no Brasil, mas proibido em diversos países devido aos aspectos negativos associado à sua toxicidade e persistência no ambiente. Uma das propostas de tratamento deste composto é através da biorremediação, que versa na aplicação de micro-organismos capacitados a degradá-lo. Estes micro-organismos que ocorrem em ambientes contaminados com atrazina podem ser conhecidos e descritos pela técnica metagenômica, que consiste no sequenciamento do DNA genômico oriundo de um ambiente, independentemente de cultivo dos micro-organismos. O presente trabalho tem como objetivo identificar através de abordagem metagenômica a ocorrência de genes de degradação de atrazina em solos com diferentes coberturas vegetais. Neste trabalho foi realizado o sequenciamento através da tecnologia Illumina do DNA total de um solo sob cinco diferentes tipos de cobertura vegetal (plantio convencional; plantio direto; pastagem contínua e integração lavoura-pecuária e também de floresta semidecidual) de uma área experimental com cerca de 10 anos na região de Dourados (MS), pertencente a Embrapa Agropecuária Oeste. De 230644 *orfs* obtidas dos metagenomas sequenciados, foram alinhadas 2033 através do programa *BlastAll* contra um banco de referência de 767 genes curados de degradação de atrazina, obtidos do banco de dados secundário Uniprot. Os dados oriundos do alinhamento foram organizados contra um banco de dados SQL, que foi consultado para organização dos genes e micro-organismos obtidos. Esses dados foram exportados para o pacote de metagenômica MEGAN para geração da curva de rarefação e análise de *cluster* UPGMA. Por fim, os dados também foram importados no pacote estatístico STAMP para diferenciar os micro-organismos superabundantes nos manejos, com significância estatística, além da realização de uma análise de componentes principais. Atestou-se no presente trabalho a presença dos genes de degradação do composto, em diferentes proporções para os solos com e sem aplicação de atrazina em diferentes proporções, inclusive no solo sob floresta semidecidual, em que não há a aplicação direta do composto. Foram encontrados 56 gêneros e 178 espécies únicas de bactérias e relacionadas à degradação de atrazina, sendo 43 espécies comuns a todos os manejos. Todos os genes consultados foram encontrados em todas as amostras, exceto o gene *gatA*, exclusivo do manejo de integração lavoura-pecuária. O solo sem aplicação direta de atrazina – floresta semidecidual – apresentou gêneros superabundantes. A partir dessas informações obtidas, espera-se colaborar com futuros estudos de bioprospecção de genes com potencial aplicação na biorremediação de solos contaminados com o composto atrazina.

Palavras-chave: Agroquímicos, bioprospecção de genes, biorremediação

## ABSTRACT

Crop productivity is associated with heavy agrochemical use, one of which is atrazine, broadly applied in Brazil but prohibited in many countries due to negative connotations associated with its toxicity and persistence in the environment. One proposed method to dealing with this compound contamination is through bioremediation, which consists of directly applying microorganisms capable of degrading the compound. These microorganisms (which occur naturally in contaminated environments) can be known and described by the application of metagenomics, which consists of direct sequencing of genomic DNA from the environment and does not rely on cultivation of the microorganisms to do so. Thus, soils under four distinct managements (no management; conventional tillage; no-tillage; continuous grazing and crop-livestock integration) and of local semidecidual forest was sampled and sequenced with Illumina technology. About 240 thousand sequences were aligned with BlastAll software against a reference bank of 767 curated genes related to atrazine biodegradation, obtained from the secondary database Uniprot. The alignment output was organized in a SQL relational database, which was consulted for organizing the aligned genes and taxa. The data was then imported to a metagenomics software package, MEGAN, which generated a UPGMA cluster analysis tree. Lastly, the data was also imported in the statistical and graphical package STAMP, which is able to differentiate the superabundant microorganisms between samples, with statistical significance, and generating a principal component analysis (PCA). We were able to find the atrazine degradation genes in every sample. These genes were found in different proportions for the samples with and without the application of atrazine, including in the soil under semidecidual forest. It was possible to define 56 unique bacterial and archaeal genera and 178 species, of which 43 were found to be common to every sample. The soil without management (semidecidual forest) presented the most number of superabundant statistically significant taxa then the other four samples. Every soil contained all atrazine degradation genes in analysis, except for the gene *gatA*, which occurred only in the crop-livestock integration management sample. The semidecidual forest soil showed superabundant genera, even without history of atrazine application. From this new information, we hope to contribute to future bioprospecting studies with potential application in future studies about the bioprospection of microorganisms with potential to the bioremediation of environments contaminated with atrazine.

Keywords: Agrochemicals, gene bioprospecting, bioremediation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A molécula de atrazina. Adaptada de (BAIRD; CANN, 2012). .....	18
Figura 2. Rota de degradação da Atrazina. Adaptado de (SOLOMON; KUMAR; SATHEEJA SANTHI, 2013). .....	20
Figura 3. Curva de rarefação em relação aos genes de degradação de atrazina, gerada pelo programa MEGAN. Vermelho: floresta semidecidual; Azul claro: integração lavoura-pecuária; Verde: plantio convencional; Preto: plantio direto; Azul escuro: pastagem contínua. ....	38
Figura 4. Análise de <i>cluster</i> (UPGMA) relativa aos dados taxonômicos dos 05 solos calculada através do método de distância de Bray-Curtis. FS: Floresta semidecidual; CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: manejo de plantio direto; PC: manejo de plantio convencional. Escala: proporção de diferença entre os dados .....	39
Figura 5. Diagrama de Venn relativo às espécies de micro-organismos comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: plantio direto; PC: plantio convencional; FS: floresta semidecidual. O número ao lado das siglas significa o total de gêneros exclusivos encontrados. ....	41
Figura 6. Diagrama de Venn relativo aos gêneros de micro-organismos comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra a nível de espécie. CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: plantio direto; PC: plantio convencional; FS: floresta semidecidual. O número abaixo das siglas representa o número de espécies únicas encontradas. ....	42
Figura 07. Rotas de degradação consideradas no trabalho, encontradas no solo sob manejo de integração lavoura-pecuária. Adaptado de KEGG (KANEHISA et al., 2012) e EAWAG (GAO; ELLIS; WACKETT, 2010). Caixas: enzimas catalisadoras com seu nome; Setas: etapa da rota; Numeração: genes ubíquos ou sem sigla; Reticências: passos intermediários da rota; Círculos: substrato ou composto da reação. Em vermelho, gênero encontrado associado à enzima. ....	52
Figura 08. Abundância de micro-organismos da floresta semidecidual em relação à integração lavoura-pecuária. Azul: floresta semidecidual; Laranja: Integração lavoura-pecuária. ....	53
Figura 09. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação à plantio convencional. Azul: floresta semidecidual; Laranja: plantio convencional. ....	53
Figura 10. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação ao plantio direto. Azul: floresta semidecidual; Laranja: plantio direto. ....	54
Figura 11. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação ao manejo de pastagem contínua. Azul: floresta semidecidual; Laranja: pastagem contínua. ....	54
.....	54
Figura 12. Abundância de <i>Streptococcus</i> no solo de manejo tipo integração lavoura-pecuária em comparação ao plantio convencional. Azul: integração lavoura-pecuária; Laranja (ausente): plantio convencional. ....	54

Figura 13. Abundância de bactérias no solo de manejo tipo integração lavoura-pecuária (azul) em comparação ao plantio direto (laranja). Azul: integração lavoura-pecuária; Laranja: plantio direto.....	55
Figura 14. Abundância de <i>Klebsiella</i> no solo de manejo tipo plantio direto (em comparação ao plantio convencional. Azul: plantio convencional; Laranja: plantio direto.....	55
Figura 15. Abundância de <i>Paenibacillus</i> no solo de manejo tipo pastagem contínua em comparação ao plantio convencional. Azul (ausente): plantio convencional; Laranja: pastagem contínua. ....	55
Figura 16. Abundância de <i>Rhodococcus</i> no solo de manejo tipo plantio direto em comparação a pastagem contínua. Azul: plantio direto; Laranja: pastagem contínua.....	56
Figura 16. Análise de componentes principais (PCA), gerado pelo pacote estatístico STAMP. Preto; plantio convencional; Verde: pastagem contínua; Vermelho: integração lavoura-pecuária; Azul: plantio direto; Amarelo: floresta semidecidual. ....	57

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Genes associados à biodegradação da atrazina*, sua proteína e função correspondente. ....	34
Tabela 2. Abundância total dos genes relativos à degradação da atrazina em relação ao solo amostrado em diferentes tratamentos.....	40
Tabela 3. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo de floresta semidecidual.....	42
Tabela 4. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de pastagem contínua.....	43
Tabela 5. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de integração lavoura-pecuária. ....	44
Tabela 6. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de plantio direto .....	45
Tabela 7. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de plantio convencional. ....	46
Tabela 8. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em solo de floresta semidecidual. ....	47
Tabela 9. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de pastagem contínua .....	48
Tabela 10. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de plantio direto....	49
Tabela 11. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de integração lavoura pecuária .....	50
Tabela 12. Abundância total dos genes e micro-organismos de origens presentes em manejo de plantio convencional .....	51

## LISTA DE ABREVIACOES

16S rDNA	RNA Ribosomal 16S
ATZ	Atrazina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	<i>Brazilian Microbiome Project</i>
CSV	<i>Comma-separated values</i>
DDT	Diclorofeniltricloroetano
DNA	cido desoxirribonucleico
E-value	<i>Expectationvalue</i>
FS	Floresta semidecidual
HA	Hidroxiatrazina
HCH	Hexaclorociclohexano
LP	Integração lavoura-pecuária (manejo)
MEGAN	<i>Metagenome Analyzer</i>
MG-RAST	<i>Metagenomics Rapid Annotation Server</i>
MICCA	<i>Microbial Community Analysis</i>
NBC	<i>Naïve Bayes Classification Tool</i>
NGS	<i>Next-generation sequencing</i>
ORFs	<i>Open-reading frame</i>
PC	Plantio convencional (manejo)
PCA	<i>Principal componentanalysis</i>
PCOA	<i>Principal coordinate analysis</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PD	Plantio-direto (manejo)
PT	Pastagem contínua (manejo)
QIIME	<i>Quantitative Insights Into Microbial Ecology</i>
RDP	<i>Ribosomal Database Project</i>
RMA	<i>Read-match archive</i>
RNA	cido ribonucleico
SAM	<i>SequenceAlignment/Map</i>
SQL	<i>Structured Query Language</i>
STAMP	<i>Statistic Analysis of Taxonomic Profiles</i>
TI	Tecnologia da informação

UNIPROT *Universal ProteinResource*  
UPGMA *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*  
WGS *Whole-genome shotgun*

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	11
2.	HIPÓTESES .....	13
3.	OBJETIVOS .....	13
4.	REVISÃO DE LITERATURA .....	14
4.1.	AGROQUÍMICOS .....	14
4.2.	ATRAZINA E TOXICIDADE .....	17
4.3.	BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA E ROTAS METABÓLICAS .....	19
4.4.	BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL E BIORREMEDIAÇÃO .....	21
4.5.	BIOINFORMÁTICA: CONCEITO .....	24
4.5.1.	SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO (NGS) E ABORDAGENS “EM ESCOPETA” (WGS).....	25
4.5.2.	METAGENÔMICA – FERRAMENTA PARA ESTUDOS EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL .....	26
5.	MATERIAIS E MÉTODOS .....	32
5.1.	AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO DO DNA .....	32
5.2.	SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO (DNA) E PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS.....	33
5.3.	BANCO DE REFERÊNCIA DOS GENES DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA .....	34
5.4.	ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS .....	34
5.5.	ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	35
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	38
7.	CONCLUSÕES.....	59

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil tem sido observada uma utilização cada vez mais intensa de agrotóxicos, levando o país à primeira posição no uso destes compostos no mundo. Esses compostos sintéticos geralmente não recebem o destino final adequado, seja por irregularidade na manipulação, estoque ou pela aplicação indevida e excessiva.

Nesse contexto, muitos dados e artigos científicos discorrem sobre a atuação negativa desses compostos na lavoura, e outros estudos colaboram sobre os riscos ambientais e associados à saúde pública causadas.

O agroquímico atrazina, um herbicida amplamente utilizado no Brasil, mas já proibido em diversos países, principalmente da Europa, é relatado como tóxico não só para o homem, como também a outros seres vivos que tenham contato com este agroquímico.

Por ser um composto quimicamente sintetizado, a atrazina é considerada um xenobiótico recalcitrante, ou seja, permanece muitas vezes inalterada no ambiente por longos períodos podendo ser encontrada como poluente em solos, lençóis freáticos, rios e mares.

Em virtude da persistência desse composto no ambiente, uma das sugestões para seu tratamento no ambiente é a biorremediação. Uma técnica inserida no escopo da biotecnologia ambiental, baseada em sistemas biológicos para remediar o ambiente contaminado, visando o retorno ao seu estado inicial anterior à contaminação pelo xenobiótico.

Essa técnica tem por princípio a biodegradação, isto é, a capacidade dos micro-organismos de tornar uma molécula orgânica complexa em outra de menor nocividade, ou totalmente inofensiva. Esses micro-organismos são estimulados em laboratório ou no próprio local contaminado, e passam a remover com intenso vigor o composto-alvo.

Existem diversas abordagens de estudo para biorremediação, como a bioprospecção de micro-organismos e estudos da degradabilidade de compostos em escala laboratorial. Estudos *in situ* para monitorar a redução do composto no local além de técnicas *ex situ*, na qual o solo contaminado é tratado em outros locais.

Existe também uma abordagem de estudo mais recente, que envolve técnicas de Biologia Molecular, como sequenciamento total do DNA do ambiente (metagenômica) e uso de ferramentas de bioinformática para a análise dos dados gerados.

A partir dessa técnica, é possível verificar a presença de genes provenientes dos micro-organismos com potencial de degradação da atrazina, comparando-se a presença ou ausência das rotas metabólicas em cada um dos solos através de análises de bioinformática de dados de

sequenciamento dos solos estudados, além de gerar informações sobre quais micro-organismos degradadores são comuns ao solo em estudo sob diferentes condições de manejo, e quais são mais abundantes nestas condições.

## 2. HIPÓTESES

- $H_0$  (hipótese nula): Não existem diferenças entre as comunidades de bactérias biodegradadores de atrazina nos diferentes solos em análise;
- $H_1$  (hipótese alternativa): Existem diferenças (quantificáveis) entre as comunidades de bactérias biodegradadores de atrazina nos diferentes solos em análise.

## 3. OBJETIVOS

3.1. GERAL: Identificar através de abordagem metagenômica a ocorrência dos genes de degradação de atrazina nas diferentes amostras nos solos sob diferentes coberturas, descrevendo-se sua função e atividade com base em literatura científica;

### 3.2. ESPECÍFICOS:

- Obtenção da taxonomia dos micro-organismos e sua contribuição em relação aos genes de degradação presentes no solo em análise;
- Verificar os micro-organismos degradadores mais abundantes de cada manejo de solo em relação aos outros;
- Inferir quais micro-organismos são únicos em cada manejo de solo e quais são comuns a todos os tratamentos a nível de gênero e espécie.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

### 4.1. AGROQUÍMICOS

Ao longo dos anos, a produtividade da agricultura mundial intensificou-se, e com isso a utilização de insumos agrícolas acompanhou esse crescimento. A manutenção da competitividade da agricultura sem a ocorrência da degradação do solo é fundamental, e para isso, são utilizados os insumos agrícolas - adubos químicos, corretivos, e agrotóxicos (FAGERIA; STONE, 2006).

Os agrotóxicos, também conhecidos como agroquímicos defensivos agrícolas ou pesticidas são compostos de natureza química que têm a finalidade de exterminar pragas ou doenças que ataquem as culturas agrícolas (FERNANDES, 2014).

Os pesticidas se dividem em vários tipos, como os inseticidas, fungicidas e herbicidas, e atuam na prevenção de organismos prejudiciais à lavoura, como insetos, ácaros, ervas daninhas, micro-organismos e outras formas de vida. Esses compostos são utilizados na intenção de elevar a viabilidade econômica da produção agrícola, e, por consequência, a competitividade do setor (FERREIRA et al., 2014; VEIGA, 2007).

Entretanto, o emprego dessas substâncias requer precauções e cuidados, especialmente quanto à manipulação, estocagem e destino final, o que nem sempre é realizado com boas práticas.

Além disso, esses compostos são muitas vezes utilizados de forma inadequada, para compensar as demandas do processo produtivo como o surgimento de uma espécie-praga, tornando-se quase sempre o primeiro recurso acionado para lidar com esses organismos, mesmo que ainda não se encontrem em nível de controle, ou seja, de maneira inadequada e excessiva. Quando esses desajustes acontecem, o meio ambiente e a saúde humana e de outros animais passam a correr risco (FERREIRA et al., 2014).

A necessidade de aumento da produtividade agrícola brasileira é bem documentada a partir da década de 50, época em que se observou o início da utilização massiva dos pesticidas, que junto a outros fatores (como a promoção do uso de insumos agrícolas e equipamentos) se configurou no momento de inovações agrícolas denominados “Revolução Verde”. A nova configuração produtiva intensificou-se entre a década de 60 e 70 com o aumento considerável do consumo de insumos químicos, especialmente no Sul e Sudeste (FERREIRA et al., 2014).

Um dos principais fatores de incentivo para o uso intensivo dos agrotóxicos foi o marco regulatório que vigorou até 1989, devido ao seu caráter pouco rigoroso, que facilitou a aquisição

e a utilização desses insumos. Somente a partir desse momento, criou-se uma lei específica que regulamentaria de forma mais consciente o uso dos agroquímicos (FERREIRA et al., 2014).

Nesse contexto, o Brasil ocupa desde 2008 o primeiro lugar no *ranking* mundial do mercado de agroquímicos, pois seu crescimento foi maior que o dobro apresentado pelo mercado global, e essa colocação está intimamente associada não apenas a um aumento de produtividade agrícola, mas também às consequências negativas de uma maior presença no ambiente, especialmente à população geral que está exposta ao consumo de alimentos e água contaminada. Assim, a aplicação desses compostos e persistência no ambiente levam a ocorrência de um enorme problema de saúde pública (RIGOTTO; VASCONCELOS; ROCHA, 2014).

Apesar das vantagens produtivas associadas à aplicação sistemática dos agrotóxicos, eles trazem consigo alguns problemas ao ambiente, especialmente a contaminação a partir dos solos, pois são considerados o reservatório final desses compostos sintéticos, além de terem um papel como uma fonte de liberação de resíduos para atmosfera, lençóis freáticos, organismos vivos, e contaminação dos alimentos como: hortaliças, frutas, verduras e grãos (VIEIRA et al., 1999).

Com base nas informações relativas aos problemas ambientais, destacam-se as dificuldades na transformação do agroquímico em algo inofensivo, ressaltando o fato da persistência do mesmo no solo, ocorrendo a fixação ou adsorção, especialmente devido ao tipo de argila constituinte, e dos fatores climáticos tais como radiação, temperatura, umidade e oxigenação. A transformação dos compostos ocorre de maneira gradual, podendo ser abiótica e biótica: sendo a primeira uma alteração dos componentes químicos e físicos do ambiente; enquanto que a segunda transformação (biótica) é dependente da ação da microbiota do solo (DAMIN, 2005).

Desde sua introdução, os agrotóxicos sintéticos são causa de preocupação devido ao seu potencial impacto à saúde humana, através do consumo de alimentos e água contaminada com esses compostos. Nos Estados Unidos, metade de todos os alimentos contém a presença de ao menos um composto a níveis mensuráveis (BAIRD; CANN, 2012).

A persistência de alguns produtos químicos no ambiente é um fator determinante para caracterização do grau de poluição ambiental - característica que é associada à mobilidade e à bioacumulação do composto. As propriedades físico-químicas desses compostos, bem como a quantidade, concentrações e a frequência de uso, métodos de aplicação, características abióticas e bióticas do ambiente e as condições meteorológicas determinarão qual será o destino dos agroquímicos no meio ambiente. Portanto essa persistência pode variar de acordo com o produto e de suas eficiências dos processos físicos (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

A intensificação da preocupação se dá a partir da exploração dos efeitos tóxicos ocasionados pela exposição aguda ou crônica às substâncias, sendo que pode ocorrer por via cutânea, respiratória, digestiva - sendo esta a mais comum. As intoxicações agudas, resultante de elevada absorção das substâncias químicas, produzem reação imediata ao organismo e para esses casos, os sintomas são aparentes e reversíveis (FROST; BROWN; HARDING, 2011).

Os principais sintomas apresentados em situações de intoxicação são: cefaleia, tonturas, alterações na memória e no sono, náuseas, vômito, irritabilidade, alterações no sistema imunológico e dificuldades de concentração. Já na intoxicação crônica, que é resultante da exposição gradual ao agroquímico, não apresenta sintomas e pode ser irreversível. Posterior a uma longa exposição, podem ocorrer hemorragias, morte fetal e teratogênese, lesões cerebrais irreversíveis, esterilidade masculina, tumores malignos, dermatites e lesões hepáticas (SILVA et al., 2005).

As informações epidemiológicas de mortalidade e intoxicação estão muito aquém do ideal, especialmente nos países emergentes, devido ao menor cumprimento da legislação vigente relativa ao controle da comercialização e uso dos agrotóxicos (SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013).

Os organismos mais próximos do ambiente contaminado estão também suscetíveis à bioacumulação. Este fenômeno ocorre quando há o acúmulo de alguns poluentes, que estão presentes em pequenas quantidades no ambiente e podem ser absorvidos por organismos e acumulam-se em seus predadores, e ao longo da cadeia ocorrendo assim uma cascata trófica (STOYTCHEVA, 2011).

A intoxicação varia em relação ao posicionamento do organismo à sua rede de alimentação, ou seja, seu nível trófico. O impacto da contaminação pode alterar o comportamento e fisiologia de organismos, causando mudança na diversidade e abundâncias de espécies, ou seja, na comunidade local (BRITO et al., 2010).

Outro grupo de alta vulnerabilidade aos agrotóxicos são os trabalhadores da agricultura (geralmente, aplicadores dos compostos) e também dos moradores do entorno das áreas de produção agrícola através de micropartículas oriundas de pulverização.

Devido ao longo tempo de vida dos compostos na matriz do solo, os trabalhadores podem entrar em contato com o contaminante no processo de aragem, semeadura, irrigação, cuidados com a plantação durante o crescimento, colheita, armazenagem de produtos, embalagem, e na aplicação de produtos como fertilizantes e agrotóxicos, seja em animais ou nas plantações (SILVA et al., 2005).

Não bastando, a contaminação ainda pode se dar durante o trajeto ou em deslocamento na região de trabalho, de forma não intencional, através de ingestão, inalação ou absorção dérmica (SILVA et al., 2005).

Devido à essa exposição, é necessário um monitoramento e vigilância adicional em relação à saúde dos trabalhadores. Além disso, muitas vezes as fontes de contaminação e suas repercussões no meio ambiente que nem sempre são totalmente definidas pelo agente inicial da contaminação, uma vez que os produtos de reação ou degradação de um determinado agente pode, por sua vez, ser mais nocivo que a substância original (SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013).

Dessa forma, uma vez que os compostos são liberados no ambiente, a compreensão de seu comportamento é alvo de intenso estudo científico, pois a dispersão e degradação do composto está intimamente relacionada à composição da comunidade biológica local (RIAH et al., 2014).

#### 4.2. ATRAZINA E TOXICIDADE

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina), um herbicida integrante da família s-triazina é um composto clorado, polar, fracamente básico, moderadamente móvel, com peso molecular de 215,69 g.mol<sup>-1</sup> e altamente persistente no solo, além de ser solúvel em diferentes tipos de soluções como acetato, benzeno, clorofórmio, etanol e éter (DUTTA; SINGH, 2013).

Sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído por cloro, etilamina e isopropilamina, propriedade que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente, ou seja, mais resistente à biodegradação (COLLA; PRIMAZ; LIMA, 2008).

Este herbicida foi descoberto e patentado na Suíça em 1958, pela empresa Geigy. Destacando a sua estabilidade que pode ser explicada através da configuração eletrônica do anel heterocíclico, semelhante à do benzeno. É estável também à temperatura ambiente na faixa de pH comum aos variados ambientes. A **Figura 1** exhibe a representação estrutural da molécula de atrazina.

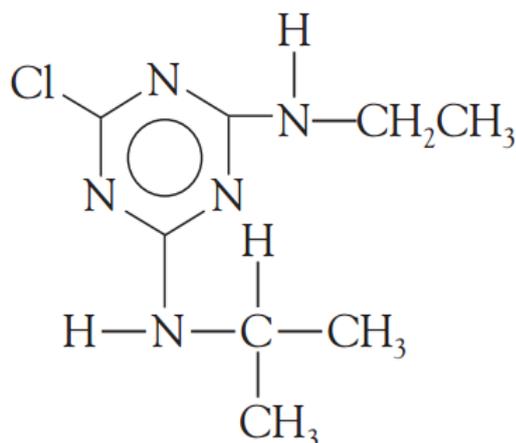


Figura 1. A molécula de atrazina. Adaptada de (BAIRD; CANN, 2012).

É classificado como um herbicida sistêmico e seletivo, sendo utilizado para controlar o surgimento de ervas daninhas de folhas largas e gramas em milho, abacaxi, cana-de-açúcar, sorgo, algodão e outras culturas (COUTINHO et al., 2005). O herbicida atrazina atua através da inibição da fotossíntese, agindo como inibidora do transporte de elétrons. Este herbicida possui efeitos mais severos como potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico, podendo ocasionar ainda efeitos endócrinos a diversos organismos não alvos, inclusive o ser humano (ARMAS, 2006).

Seu primeiro registro para uso comercial foi em 1959, nos Estados Unidos e na maioria das vezes é utilizada em conjunto com outros tipos de herbicidas – assim, é elencada como um dos herbicidas mais utilizados no mundo (CHAN; CHU, 2005; SENE et al., 2010).

A atrazina é frequentemente encontrada em ecossistemas aquáticos, devido ao seu altíssimo potencial dispersivo, causando com frequência efeitos sub-letais nos organismos aquáticos, onde pode, além disso, causar danos ao DNA do organismo aquático e imunotoxicidade.

Além disso, se acumulam no fitoplâncton, invertebrados e peixes devido às suas propriedades físicas e químicas, sendo alta a toxicidade aguda e crônica da atrazina, mesmo está sendo considerada em alguns estudos como moderadamente tóxica (BARKY et al., 2012; MIGEOT et al., 2013).

É associada a uma variedade de efeitos fisiológicos e comportamentais em várias espécies devido às suas propriedades androgênicas e anti-androgênicas. Já se observou, em aves, que o consumo de atrazina resultou em menor taxa de alimentação, menor peso corporal, lesões microscópicas em vísceras e eventualmente, morte. Assim como já se verificou efeitos mutagênicos em linfócitos e hepatócitos de camundongos e ratos (HUSSAIN et al., 2012).

Não bastando, a atrazina apresenta uma longa meia vida (de até 608 dias, em geral). Também foi considerada carcinogênica e detectado sua capacidade de modular o sistema endócrino em estágios sensíveis do processo de desenvolvimento de anfíbios (LI et al., 2014).

Estudos demonstram que o herbicida modifica a função endócrina em humanos, com efeitos estrogênicos fracos e inibição de hormônios andrógenos (MIGEOT et al., 2013). A atrazina contribui para indução da enzima aromatase, responsável pela catálise e conversão da testosterona em estrógeno, com resultante diminuição da testosterona (OLIVEIRA, 2009).

Destaca-se ainda que a atrazina é uma substância tóxica para a gestação, dado que ela possui capacidade de atravessar a placenta e afetar o crescimento fetal (FERNANDES, 2014).

#### 4.3. BIODEGRADAÇÃO DA ATRAZINA E ROTAS METABÓLICAS

Os agroquímicos 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 estas estratégias podem ser adotadas (SILVA et al., 2013).

Dentre as estratégias citadas a biodegradação da atrazina tem demonstrado resultados promissores. Este processo vem sendo estudado amplamente desde a década de 1980, e os genes responsáveis pela degradação e completa mineralização foram descobertos e as rotas metabólicas descritas.

A mineralização já se mostrou possível em condições tanto aeróbias quanto anaeróbias, sendo que vários micro-organismos são descritos como capazes de degradar o composto, por exemplo, as Gram-negativas *Pseudomonas* sp. ADP. ( $\gamma$ -proteobactéria), que são consideradas como organismo modelo para a mineralização completa da atrazina. Este micro-organismo foi isolado, originalmente, de um local intensamente contaminado por atrazina, que sugere que linhagens eficientes podem ser encontradas em solo com contaminação similar (NOUSIAINEN, 2015; STELTING et al., 2012).

A degradação da atrazina se dá em diferentes metabólitos, que variam em persistência no ambiente e toxicidade. Os metabólitos mais comuns são a hidroxiatrazina, dietilatrazina, diisopropilatrazina, dideialquilatrazina e dietilhidroxiatrazina (CAMPOS, 2009). A rota principal está representada na **Figura 2**.

A rota metabólica de degradação da atrazina, ocorre inicialmente através da presença do gene *atzA* no genoma dos micro-organismos sendo esse o gene que codifica a enzima que inicia o processo.

Essa enzima apresenta a atividade de desalogenação convertendo a atrazina em hidroxiatrazina (metabólito não-fitotóxico), constituindo o primeiro intermediário da via de degradação. Este gene pode ser localizado e identificado na reação de PCR utilizando-se um primer específico desenvolvido especialmente para o gene que codifica a enzima *atzA* (DE SOUZA et al., 1998).

Em diversos estudos envolvendo micro-organismos, a estirpe *Pseudomonas* sp. ADP é a que mais se destaca, considerada referência nos estudos das rotas de degradação da atrazina.

Essa estirpe possui os genes denominados *atzA*, *atzB*, *atzC* e *atzD*, *atzE* e *atzF* que codificam enzimas responsáveis pela degradação do composto (FANG et al., 2014). Como está exposto na **Figura 2**.

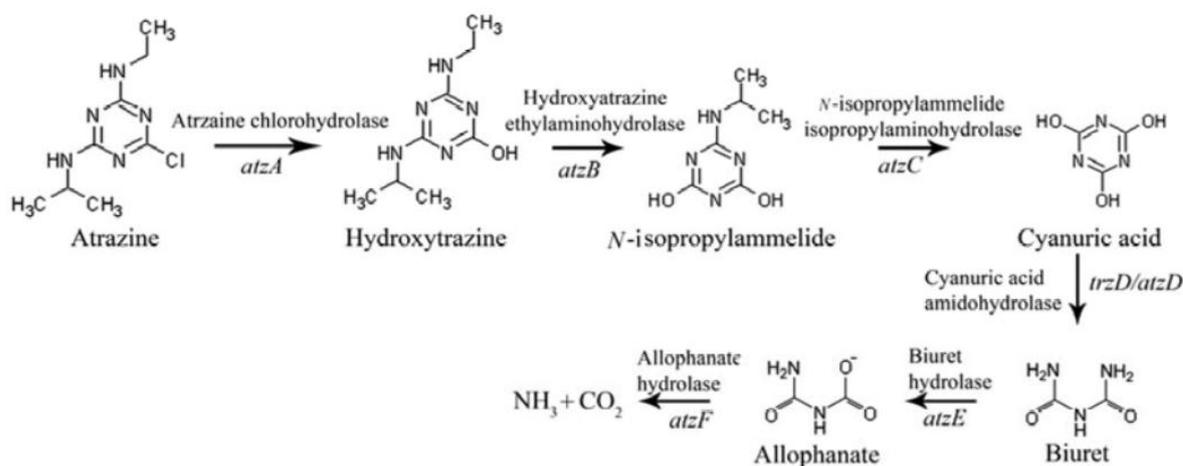


Figura 2. Rota de degradação da Atrazina. Adaptado de (SOLOMON; KUMAR; SATHEEJA SANTHI, 2013).

Na via de degradação da atrazina, o início se dá pela descoloração hidrolítica catalisada por atrazina clorohidrolase (*atzA*) e com isso produz o metabólito hidroxiatrazina (HA). A HA será então convertida em ácido cianúrico por dois passos, o primeiro codificado por *atzB* (hidroxiatrazina etilaminohidrolase) e *atzC* (N-isopropilamelida isopropilaminohidrolase) na via de degradação exibida (**figura 2**).

A organização dos genes de degradação da atrazina é bem descrita, especialmente relativa ao plasmídeo pADP-1, oriundo de bactérias do gênero *Pseudomonas*, sendo que a expressão dos genes *atzA*, *atzB* e *atzC* é constitutiva, ou seja, sempre é expressa, enquanto que os genes *atzD*, *atzE* e *atzF* são agrupados em um mesmo operador. Esses genes são relativos à

degradação do ácido cianúrico, sugerindo-se que essa conformação tenha evoluído a partir de um mecanismo seletivo de especificidade (FAN; SONG, 2014).

Posteriormente, o ácido cianúrico é metabolizado em dióxido de carbono através das reações hidrolíticas codificadas por *trzD/atzD*, *trzE*, *atzF/trzF*, o que ocorre em passos mais avançados na via de degradação (UDI KOVIC-KOLIC et al., 2010; WACKETT et al., 2002).

Verificou-se também que a proteína relativa ao gene *trzD* é um análogo metabolizador considerado mais eficiente na metabolização da atrazina, através de uma rápida conversão em ácido cianúrico catabolizante na primeira parte da via de degradação (SOLOMON; KUMAR; SATHEEJA SANTHI, 2013).

Também está envolvido na degradação o gene *trzN*, que também é considerado parte da família das amidohidrolases e atua na degradação da atrazina, possuindo, entretanto, uma diversidade maior de substratos. Por esse motivo, estima-se que este gene está se tornando mais disperso em relação ao gene *atzA* (FAN; SONG, 2014).

#### 4.4. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL E BIORREMEDIAÇÃO

Biотecnologia, um conceito que engloba biologia e tecnologia, consiste em um conjunto de teorias e técnicas sobre a utilização de seres vivos - ou parte deles - no desenvolvimento de produtos e serviços que tenham uma função econômica e social (FALEIRO; ANDRADE; JUNIOR, 2011). Desta área desenvolveram-se diversas tecnologias baseadas em processos biológicos, especialmente para os setores da agropecuária, biomedicina, bioindústria e conservação ambiental (SINGH, 2017).

Considerando-se as alternativas para a melhoria das condições dos solos contaminados, biodegradação de compostos tóxicos por micro-organismos específicos é uma delas, uma técnica associada à biotecnologia ambiental.

O crescimento da aplicação de compostos antropogênicos tóxicos e o longo histórico de péssimas práticas de disposição desses compostos levou à necessidade de novas tecnologias de remediação, onde se encaixam as técnicas da biotecnologia ambiental. Essa área engloba práticas relativas à sustentabilidade de processos através da aplicação de sistemas biológicos, possibilitando a remediação de ambientes contaminados, além de propor práticas industriais mais limpas, e tem por objetivo central a conservação, monitoramento e proteção do ambiente contaminado, além da gestão dos resíduos antrópicos (SALAR et al., 2013; SINGH, 2017).

Com a biotecnologia ambiental, permitiram-se grandes melhorias e soluções como a biorremediação, aplicando os conceitos de biodegradação resultando na mineralização de

compostos tóxicos, minimizando desta forma os danos dos resíduos gerados por atividades indústrias e agrícolas e criando alternativas de prevenção. Desta forma, a biotecnologia pode converter resíduos perigosos e contaminantes em subprodutos úteis ou mineralizá-los em metabólitos inofensivos através de comunidades microbianas e espécies de plantas (FAN; SONG, 2014).

O processo de degradação por micro-organismos com finalidade de recuperação de ambientes ou efluentes contaminados é conhecido como biorremediação, e é considerado padrão para a reabilitação de ambientes intensamente poluídos.

Essas propriedades são atribuídas graças a alta relação de custo/benefício do processo, além de ser ambientalmente atraente, dependendo-se do grau de intervenção. As bactérias podem tolerar um alto espectro de habitats contaminados, utilizando-se de rotas metabólicas altamente específicas, além de serem intensamente produtivas, isto é, serem independentes de substratos orgânicos adicionais (FAN; SONG, 2014).

Nesse contexto, evidencia-se que muitos estudos têm sido realizados em relação aos ambientes contaminados por compostos tóxicos, porém geralmente com objetivo de se monitorar a redução da contaminação e algumas vezes identificando as espécies microbianas relacionadas à degradação dos compostos (CHENG et al., 2013; DAMIN, 2005; PORTILHO, 2013). Entretanto, poucos trabalhos estudam a presença de genes relacionados à degradação dos compostos no ambiente (FINLEY; BROADBELT; HATZIMANIKATIS, 2010; SOLOMON; KUMAR; SATHEEJA SANTHI, 2013), o que é essencial ao conjunto de técnicas e práticas da biorremediação.

Esse tratamento biotecnológico que se destaca como promissor é capaz de explorar a capacidade dos micro-organismos para remover poluentes de ambientes contaminados. Destacando-se como uma técnica eficaz, minimamente perigosa, econômica, versátil e favorável ao meio ambiente (FINLEY; BROADBELT; HATZIMANIKATIS, 2010). O objetivo desta prática é a melhoria das condições de um ambiente já contaminado, garantindo-se a recuperação e adequação do ambiente a um ciclo produtivo sustentável.

Esse método consiste na modificação ou redução dos contaminantes através de decomposição, pela ação de micro-organismos que já estão no local ou pela adição de micro-organismos cultivados em laboratório.

O resultado ideal através da aplicação da biorremediação é que ocorra a completa degradação dos compostos contaminantes em nutrientes minerais, processo denominado de mineralização - ou, caso isso não ocorra, a diminuição das concentrações até níveis toleráveis à saúde humana e ao solo.

O objetivo dos processos de biorremediação é a normalização das condições do ambiente em relação a seu estado inicial, anterior à contaminação. Essa normalização ocorre através da intervenção antrópica intensificando a biodegradação dos compostos tóxicos, através do incentivo da atividade microbiana degradadora, que pode ocorrer por diferentes técnicas (BRITO et al., 2010; NAKAGAWA et al., 1995).

O princípio teórico da prática de biorremediação é utilização desses resíduos (que possuem alto conteúdo de carbono e às vezes, nitrogênio) como fonte de nutrientes, através da conversão destas substâncias em substâncias não-poluentes como dióxido de carbono, sais minerais e água. Assim, os compostos são aproveitados como fonte abundante de carbono para os degradadores, ocorrendo a seleção no ambiente daqueles com maior capacidade de degradação (STOYTCHEVA, 2011).

A perturbação da matriz do solo pelos agrotóxicos é impactante nos processos bioquímicos da microbiota local, que é capaz de realizar degradação e mineralização através de reações enzimáticas. Essa atividade da microbiota tem papel fundamental, além de ser um indicador natural do equilíbrio biológico, da fertilidade e poluição do solo (RIAH et al., 2014).

Uma técnica interessante para o estímulo da atividade da microbiota é o procedimento da bioestimulação, que consiste na adição de nutrientes e aceptores de elétrons ao ambiente contaminado. Pode também ser realizada a adição de micro-organismos previamente cultivados em laboratório, com intuito de transferir a informação genética destes ao ambiente - esse processo é conhecido por bioadição. Essas técnicas podem ser utilizadas conjunta ou isoladamente no processo de biorremediação (FERNANDES, 2014; SPROCATI et al., 2012).

A biorremediação possui diversas vantagens relativas à diversidade de técnicas que podem ser aplicadas dependendo-se do caso em questão. Para a escolha das técnicas ideais devem-se analisar alguns critérios como: a natureza do poluente, a composição dos nutrientes do solo-alvo, a aptidão dos micro-organismos locais em degradar substâncias orgânicas tóxicas e a extensão da área contaminada (STOYTCHEVA, 2011).

As técnicas se dividem em *ex-situ*, que implica na retirada do composto contaminante e posterior tratamento em outro local, ou *in-situ*, onde a intervenção é diretamente no local contaminado, permitindo o tratamento de regiões de maior extensão (LÜ et al., 2011).

Essas técnicas podem ser limitadas caso as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e atuação dos micro-organismos degradadores. Sendo considerada a umidade do solo como um dos fatores ambientais mais críticos para a realização da biorremediação, visto que para uma alta atividade da comunidade microbiana necessita-se de adequada disponibilidade de água (DO CARMO et al., 2013).

A temperatura também é destacada como um fator decisivo, uma vez que determina a atividade metabólica e o consumo de substrato pelos micro-organismos. A mais intensa atividade de biodegradação (ponto ótimo) ocorre para a maioria dos micro-organismos quando a faixa de temperatura está entre 25 - 35°C, sendo que temperaturas acima ou abaixo disto afetam a execução do processo (JACQUES et al., 2007).

Outro fator determinante é o pH do solo, que influencia diretamente a atividade microbiana por meio da influência dos prótons H<sup>+</sup> na permeabilidade da parede celular e na atividade enzimática e, indiretamente, pela interferência na disponibilidade de micro e macro nutrientes, destacando o carbono como um dos que mais limita o crescimento do micro-organismo (JACQUES et al., 2007).

Nesse contexto, uma das metodologias de análise utilizadas para a verificação dos micro-organismos (e, por consequência, dos genes presentes nos ambientes) é através da bioinformática.

#### 4.5. BIOINFORMÁTICA: CONCEITO

A bioinformática é uma ciência interdisciplinar que utiliza a informática, a estatística e a matemática aplicados a dados biológicos. Essa ciência é embasada nas análises quantitativas de informações relacionadas com as macromoléculas biológicas utilizando-se a tecnologia de informação (TI).

Segundo o *National Institute of Health*, NIH, bioinformática consiste em “Pesquisa, desenvolvimento ou aplicação de ferramentas computacionais e abordagens, as quais visam expandir o uso de dados biológicos, médicos, comportamentais ou de saúde incluindo aqueles para adquirir, armazenar, organizar, analisar e visualizar esses dados” (PEVSNER, 2009).

Um dos princípios que define a bioinformática é a utilização de bancos de dados e de algoritmos de computador para a análise de dados biológicos - proteínas, genes e conjunto de ácidos desoxirribonucleicos (DNA), compreendidos em um organismo, chamado de genoma (PEVSNER, 2009).

A intensidade dos avanços técnicos relativos à desempenho dos sequenciadores de nova geração permitiu análises de perfis de sistemas biológicos de forma muito efetivas em relação ao custo - o que define o momento atual da área como a era do *Big Data*, ou seja, de um volume de dados que surge com oportunidades não-precedentes (GREENE et al., 2014).

As ferramentas da bioinformática incluem programas de computadores que ajudam a propagar os mecanismos fundamentais aos problemas relacionados à biologia, estrutura e

função de macromoléculas, vias bioquímicas, processos patológicos e evolução (GREENE et al., 2014).

#### 4.5.1. SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO (NGS) E ABORDAGENS “EM ESCOPETA” (WGS)

De acordo com PEVSNER (2009), a habilidade de se sequenciar genomas inteiros e a rápida disseminação desses dados alterou fundamentalmente a natureza das investigações biológicas, com o potencial para a melhoria geral das condições da sociedade, não somente na área ambiental, mas também na compreensão, diagnóstico, prevenção e tratamento de doenças, avanços na agropecuária e entendimento da evolução em geral.

As tecnologias de sequenciamento automatizadas de nova geração se baseiam em um corpo de conhecimentos químicos, de engenharia, de *software* e de biologia molecular, e se baseiam no sequenciamento dideoxi de Sanger. Uma dessas metodologias é o sequenciamento por síntese Illumina (Solexa) que determina as sequências de nucleotídeo após uma reação da cadeia de polimerase em superfície, também conhecida como *bridge PCR* - reação de cadeia da polimerase em ponte (MASOUDI-NEJAD; NARIMANI; HOSSEINKHAN, 2013).

O sistema Illumina é considerado muito rápido em comparação a outros sistemas, gerando sequências de ao menos 150 bp (pares de bases), e estão cada vez mais disponíveis corridas de sequenciamento de até 600 bp. A abordagem Illumina elimina a necessidade de uma eletroforese em gel (que era necessária no sequenciamento de Sanger) e está isenta dos problemas de homopolímeros, que são comumente associados aos métodos de sequenciamento de nova geração. A plataforma Illumina é responsável por cerca de 80% de todos os dados de NGS (PEVSNER, 2009).

Para a realização de análises funcionais a partir de sequenciamentos, é comum a utilização da “abordagem em escopeta”, do inglês, *WGS – Whole-Genome Shotgun*. Essa abordagem consiste na clivagem do DNA genômico em tamanhos pré-determinados e subsequente clonagem em uma biblioteca, que no caso da metodologia Illumina, é a clonagem em ponte (*bridge PCR*).

O sequenciamento por WGS fornece uma visão mais ampla da comunidade permitindo dessa forma analisar melhor os níveis de diversidade filogenética, polimorfismos entre espécies, estudar o complemento genético e vias metabólicas, entre outras análises. Em alguns casos, ainda, é possível reconstruir sequências de genomas quase completos, além da descoberta de novos genes (CHEN; PACHTER, 2005).

Uma diferença que ocorre no WGS é a profundidade de leitura que se tem que tende a ser proporcional à abundância de dados, podendo desta forma separar as que possuem alta e baixa abundância. O WGS trouxe um dos resultados mais espetaculares para a bioinformática, a recuperação de genomas quase completos de ambientes sem ser necessário o cultivo em laboratório (TRINGE, 2005).

#### 4.5.2. METAGENÔMICA – FERRAMENTA PARA ESTUDOS EM BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

A metagenômica é definida como genômica independentes de cultivo de comunidades microbianas em diferentes ambientes. É uma metodologia de extrema importância já que se estima que menos de 1% dos micro-organismos presentes no ambiente terrestre são cultiváveis em laboratório (GARCÍA MARTÍN et al., 2006).

A análise das comunidades microbianas, surgiu como um campo de pesquisa em diversidade microbiana ao longo das últimas duas décadas. O destaque dessa técnica reside no fato de que o DNA microbiológico é isolado diretamente da amostra do ambiente desejado, permitindo desta forma, o acesso a toda a comunidade presente, incluindo as espécies não cultivadas em laboratório (GARCÍA MARTÍN et al., 2006).

As metodologias da metagenômica são divididas em duas abordagens principais: uma que se baseia no sequenciamento indistinto de todo o DNA de um ambiente, montando e anotando, metodologia denominada *Whole-Genome Shotgun*, WGS. E a segunda abordagem é mais específica, e consiste no sequenciamento de um gene em particular ou uma família de genes de interesse ou ainda um marcador filogenético como, por exemplo, o 16S rDNA (LAZAREVIC et al., 2012).

Também existem as abordagens de caráter funcional, nas quais as bibliotecas metagenômicas são construídas em um hospedeiro heterólogo que posteriormente é rastreado para uma atividade de interesse, como por exemplo, a expressão de uma atividade enzimática. Destacando que a metagenômica baseada na sequência funcional permite uma análise mais detalhada da estrutura e a função microbiana presente no grupo estudado (DESAI; PATHAK; MADAMWAR, 2010; SOUZA et al., 2015).

As técnicas de bioinformática, como a metagenômica permitiram, a descoberta de novas possibilidades de aplicação para a compreensão e bioprospecção de genes de degradação de compostos tóxicos aplicados em ambientes contaminados, sendo que destas, a genômica tem

um importante papel quanto ao fornecimento de dados das sequências de micro-organismos pertinentes a biorremediação (GARCÍA MARTÍN et al., 2006).

Essa ferramenta, proporcionou a descoberta de recursos biológicos aplicáveis aos processos de biorremediação, como promotores, genes e vias metabólicas de degradação, que constituem inestimáveis aplicações ambientais voltadas à biodegradação de contaminantes (DESAI; PATHAK; MADAMWAR, 2010; GARCÍA MARTÍN et al., 2006).

Em adição a isso, o desenvolvimento de tecnologias de microarranjos de DNA, permitiu aos pesquisadores de comunidades microbianas uma análise simultânea de milhares de genes filogenéticos ou funcionais para caracterização das comunidades que estão envolvidas na biorremediação (HE et al., 2007).

Outras metodologias utilizadas, desta vez com ênfase em análises funcionais de comunidades de micro-organismos em diferentes níveis são as metodologias de *RNA-seq* (sequenciamento de RNA) como a transcriptômica, sequenciamento de proteínas – proteômica, e de quantificação de metabólitos - metabolômica, sendo que a última pode prever as vias de biodegradação microbiana relativas à um ou outro composto (JENNINGS et al., 2009).

As análises de transcriptômica permitem decifrar os perfis de expressão de mRNA (RNA-mensageiro) de genes regulados ou genes retroalimentados negativamente em micro-organismos quando estes são expostos a contaminantes antropogênicos (JENNINGS et al., 2009).

Através das ferramentas de transcriptoma e metatranscriptômica visões funcionais nas atividades de comunidades microbianas são evidenciadas, estudando assim seus perfis de transcrição de mRNA (MCGRATH et al., 2008).

A proteômica proporciona o rastreamento de proteínas antropogênicas introduzidas nos micro-organismos que habitam os locais contaminados (DESAI; PATHAK; MADAMWAR, 2010). Por fim, a tecnologia de metabolômica se refere a análise de metabólitos proteicos primário e secundários produzidos por micro-organismos que estejam sob condições fisiológicas definidas (MAPELLI; OLSSON; NIELSEN, 2008).

Nos últimos anos a metagenômica tem sido fundamental para determinar novas famílias de genes e/ou micro-organismos envolvidos na biorremediação de xenobióticos. Em geral com a tecnologia das ciências “ômicas” e suas técnicas aplicadas à biorremediação e biotecnologia ambiental promoveram um avanço significativo na caracterização e monitoramento de populações microbianas que atuam na degradação e na construção de novas vias metabólicas (BAE; PARK, 2006).

No contexto dessa técnica, YERGEAU e colaboradores (2012) realizaram um trabalho em solo buscando-se os genes de degradação em um ambiente contaminado com diesel indicando que nessas regiões a biorremediação no local é o tratamento mais viável para este tipo de contaminação.

Este trabalho baseado em metagenômica para aplicações ambientais demonstrou que as bactérias conseguem degradar compostos mesmo em temperaturas extremas, como em ambientes polares. No caso, os autores fertilizaram o solo de uma região ártica com o intuito de estimular a atividade dos micro-organismos degradadores. Os autores verificaram, ainda, que a presença do poluente foi suficiente para alterar a estrutura da comunidade, especialmente quanto à intensificação da presença de genes degradantes do xenobiótico (YERGEAU et al., 2012).

Em outro trabalho relativo à compreensão da biorremediação por metagenômica, foi possível concluir que em um único evento de contaminação ambiental não ocorre a homogeneidade da comunidade microbiana. Neste trabalho, relativo a um derramamento de óleo em região marítima, determinou-se que a estrutura da comunidade é diversificada em relação à localização da mancha, pois apresentou significativa diferença quando coletada em uma área superficial da mancha em relação à uma coleta em área profunda (TECHTMANN; HAZEN, 2016).

Outro artigo que utilizou a bioinformática, a área de metagenômica em questão, buscou a abundância e diversidade de genes de biodegradação e potenciais vias de degradação para diclorodifeniltricloroetano (DDT), hexaclorociclohexano (HCH) e atrazina (ATZ) em ambiente contendo água doce e sedimentos marinhos.

E através das análises realizadas pode-se observar que a abundância e diversidade variou de acordo com a fonte e localidades das amostras. As vias de degradação do DDT e atrazina foram encontradas quase completas, quanto a do HCH foi apenas parcialmente (FANG et al., 2014).

Através da metagenômica foi possível verificar as comunidades microbianas através do acesso às composições taxonômica e funcional dos genes de uma comunidade microbiana de solos contaminados com hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), fornecendo desta forma informações sobre genes relativos à biocatálise ou enzimas potencialmente novas e as relações filogenéticas e funcionais entre elas (ZAFRA et al., 2016).

#### 4.5.3. FERRAMENTAS PARA A ANÁLISE DE DADOS METAGENÔMICOS

Um dos mecanismos mais utilizados para realizar as análises de bioinformática baseadas em alinhamento é o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), que fundamenta-se na pesquisa de similaridade entre sequências biológicas, podendo ser utilizadas sequências de nucleotídeos ou aminoácidos (KENT, 2002).

Desenvolvido por Stephen Altschul em 1990 e derivado do algoritmo Smith e Waterman (1981), que funcionava apresentando uma pontuação máxima do alinhamento para duas sequências por meio do método exaustivo, também conhecido como programação dinâmica.

Entretanto, ao contrário deste, o BLAST utiliza uma heurística baseada em “palavras” um método muito mais rápido em comparação a outros similares (KENT, 2002).

O BLAST tem por finalidade encontrar um segmento sem lacunas de alta pontuação dentre duas sequências relacionadas - sejam de nucleotídeos ou de aminoácidos. A existência de segmentos acima de um limiar determinado indica a similaridade entre os pares além do acaso, o que ajuda na diferenciação de sequências relacionadas e não relacionadas em um banco de dados (XIONG, 2006).

Para realizar as análises de sequência computacional geralmente se inicia pela classificação de sequências podendo utilizar um banco de dados como referência ou fazer uma nova classificação (*clustering*), sendo estas funções utilizadas para prever a homologia e função, reduzindo assim a redundância, gerando subconjuntos que são tratáveis para métodos computacionais, podendo dessa forma comparar dados de diferentes ambientes e quantificar a diversidade nos ecossistemas (EDGAR, 2010).

Assim, o BLAST é também utilizado como um algoritmo de busca de sequências, e ele tornou-se uma ferramenta central para a maioria dos métodos de classificação, pois apresenta uma alta velocidade e sensibilidade em seu trabalho (EDGAR, 2010).

Comparando sequências de nucleotídeos ou proteínas, o BLAST produz uma representação dos alinhamentos em gráficos de pontos (*dotplot*) apresentando combinações em diagonal ao longo da matriz com as possíveis regiões similares entre aminoácidos ou nucleotídeos, com valores correspondendo a cada unidade. Sendo que cada alinhamento é marcado e a ele é atribuído uma medida de significância estatística, denominada de medida esperada (*Expectation value, E-value*), que representa a probabilidade do alinhamento ter ocorrido ao acaso (ZVELEBIL; BAUM, 2008).

Ademais, o BLAST considera a composição de aminoácidos da sequência de entrada (*Query sequence*) no seu cálculo de significância estatística, resultando assim, na diminuição

dos falsos-positivos. Os alinhamentos que retornarem podem ser limitados por um *E-value* limite ou um intervalo (WHEELER et al., 2007).

Além disso o BLAST possui uma diversidade de outros programas, os quais incluem BLASTn, BLASTp, BLASTx, tBLASTn e tBLASTx. O primeiro, BLASTn, faz comparação de sequências de nucleotídeos contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos. O BLASTp utiliza sequências de proteínas como entrada com um banco de dados de proteínas.

O BLASTx traduz as *queries* em seis moldes ou *frames* (“quadros de leitura”) de sequências de nucleotídeos para sequências de aminoácidos e compara com um banco de dados contendo sequências de aminoácidos. O tBLASTn, por outro lado, traduz o banco de dados de nucleotídeos para seis frames para então comparar com sequências de proteínas. O tBLASTx traduz tanto as sequências de entrada quanto as do banco de dados, ambos de sequências de nucleotídeos (XIONG, 2006).

Banco de dados biológicos são onde se armazenam determinados conjuntos de sequências - sejam elas de nucleotídeos ou aminoácidos, e assim são utilizadas como referência para a comparação. Esses bancos podem ser de acesso restrito, o qual não compartilha seus conteúdos publicamente, ou livre, que permite o acesso dos dados por qualquer usuário sem ser necessário autorização.

Existem três famosos bancos de dados mundiais públicos, que trocam constantemente dados entre si: *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL, <http://www.embl.de/>), *National Center for Biotechnology Information* (GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e *DNA Databank of Japan* (DDBJ, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/>) (AMARAL; REIS; SILVA, 2007).

Com a expansão da quantidade de dados dentro dos bancos, passou a ocorrer o uso de abordagens computacionais para descobrir genes que foram ou não identificados e assim compreender suas funções, estruturas e ação em alguns processos biológicos (FANG et al., 2014).

Entre os diferentes tipos de bancos disponíveis, os bancos de proteínas se expandiram rápido devido a utilização da proteômica para estudos e suas vertentes como: expressão gênica de perfis e interações proteína-proteína. Podendo ressaltar o advento da genômica estrutural que fornece uma riqueza de dados para analisar e usar. Dentre esses diferentes tipos, existe o *Universal Protein Resource* (UNIPROT CONSORTIUM, 2007), um banco de dados online e de livre acesso o qual é administrado e organizado manualmente. O banco se divide em quatro componentes otimizados para diferentes utilizações.

O UniProt (UniProtKB – *Knowledge Base*) é uma base de dados com um ponto de acesso central para informações com referências de diversas fontes. O UniProt Archive (UniParc) que é um repositório de sequências, contendo a histórias de todas as sequências armazenadas. Clusters de Referência UniProt (UniRef) que mescla sequências estreitamente relacionadas com base na identidade de sequência para assim facilitar a pesquisa. O UniProt Metagenomic e a base de dados de sequências ambientais (UniMES) que é um repositório específico desenvolvido para a nova área de dados metagenômicos e ambientais. UniProt é considerados um banco com vasta infra-estrutura para área de bioinformática e especialização científica na *European Bioinformatics Institute* (EBI), *Protein Information Resource* (PIR) e *Instituto Suíço de Bioinformática* (SIB) (UNIPROT CONSORTIUM, 2007).

Existem diversas metodologias para a análise de conjuntos de dados metagenômicos, alguns exclusivos para conjuntos de dados de sequenciamento de gene-alvo, como as *pipelines* BMP – *Brazilian Microbiome Project* (PYLRO *et al.*, 2016) e MICCA – *Microbial Community Analysis* (ALBANESE *et al.*, 2015), que são fluxogramas de trabalho para DNA ribossomal 16S, interessante para a análise de bactérias e arqueias, além de pacotes e serviços completamente online como o MG-RAST – *Metagenomics Rast Annotation Server* (GLASS *et al.*, 2010), que fornecem serviços completos de análise desde filtração e controle de qualidade dos dados até a anotação e análises estatísticas.

O programa MEGAN é uma ferramenta da metagenômica para realização de análise de dados, permitindo que se explore interativamente o conteúdo taxonômico e funcional da amostra em estudo. Ele também suporta a comparação de múltiplas amostras em níveis taxonômicos e funcionais. O programa foi originalmente publicado em Huson, e colaboradores (2007) e a versão 4 foi desenvolvida em 2011 também por Huson e outros colaboradores. Já na versão 5 do software, o mesmo é escrito em Java, e é executado em sistemas operacionais *all major*.

A entrada básica para MEGAN é um conjunto de leituras de sequenciamento e o resultado se dá em um alinhamento por pares através das leituras para um banco de dados de sequências de referência apropriadas. O MEGAN suporta vários formatos de entrada, tais como BLAST (texto, tabular e XML), SAM, RapSearch2, RDP, NBC, QIIME, bem como uma série de diferentes formatos CSV (valores separados por vírgula). Os dados processados são armazenados em um arquivo chamado RMA (arquivo de correspondência de leitura) que contém todas as leituras e correspondências em um formato compactado e indexado (HUSON; WEBER, 2013).

Os resultados das análises produzidas pelo MEGAN podem ser exportados em vários formatos CSV e todas as visualizações fornecidas pelo programa podem ser exportadas em uma ampla gama de formatos gráficos. O programa fornece ferramentas de busca para localizar táxons e genes de interesse (HUSON; WEBER, 2013).

Para validação estatística das análises de metagenômica no sentido de se calcular quais micro-organismos estão mais abundantes no ambiente em análise é utilizado o pacote STAMP, que fornece ferramentas gráficas e testes de hipótese para a análise e comparação de perfis de taxonomia e funcionalidade dos micro-organismos (PARKS et al., 2014).

Por fim, *MySQL* é um sistema de gerenciamento de banco de dados, que utiliza a linguagem de consulta estruturada relacional SQL (*Structured Query Language*) como interface. Sistemas de bancos-de-dados locais permitem uma análise sistemática de um grande conjunto de dados, e são muito comuns em análises biológicas devido à facilidade da entrada e recuperação de conjuntos detalhados de dados em estruturas sofisticadas (ZVELEBIL; BAUM, 2008).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras dos solos foram coletadas na Embrapa Agropecuária Oeste (CPAO) localizado no município de Dourados-MS (22°14' S e 54°49' W), sendo estes caracterizados como FS – floresta semidecidual (22°28'2231''S 54°81'4571''W); PD – plantio direto (22°16'53.9"S 54°48'21.2"W); LP – integração lavoura-pecuária (22°16'56.0"S 54°48'15.8"W); PC – sistema de plantio convencional (22°16'53.0"S 54°48'24.7"W) e CO (22°16'57.8"S 54°48'11.5"W) – sistema de pastagem contínua. Todos os solos foram classificados desde sua implantação como latossolo vermelho distroférrico típico, cuja textura é argilosa.

O solo FS constituído por floresta Semidecidual, que caracteriza-se por variação sazonal marcada pelas estações secas e chuvosas, com notória queda das folhas no período dos meses secos (MOREIRA, 2013).

O solo PD (S22.279410, W54.812593) é cultivado regularmente com soja durante o verão e aveia, trigo e nabo durante o inverno, em rotação de culturas.

O sistema LP é estabelecido em faixas, subdivididas em duas partes (lavoura e pecuária) de 4 hectares (ha) cada. As pastagens relativas à área de pecuária têm histórico de plantio de *Brachiaria decumbens* e ciclos de dois anos relativos à soja/aveia-preta. Houve neste solo a

aplicação direta do composto atrazina na cultura de milho, um ano antes da amostragem, na concentração de 04 l/ha.

O sistema de PC tem o solo tratado com aração e gradagem, e por fim, o sistema CO foi estabelecido em uma área de 10 ha.

A amostragem foi realizada com uma profundidade de 0 a 10 cm da superfície, e contendo 10 amostras simples para então se obter uma amostra composta que fosse representante de cada área amostrada.

Essas porções de solos foram armazenadas em sacos plásticos estéreis e mantidas sob refrigeração e transportados para a *Facility* do Laboratório Multiusuário Centralizado para Sequenciamento de DNA em Larga Escala e Análise de Expressão Gênica da UNESP de Jaboticabal (LMSEQ) UNESP Jaboticabal para realizar o sequenciamento genético.

A extração de DNA foi realizada utilizando o DNA SPIN KIT (MOBIO LABORATORIES, 2013) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente a qualidade e quantidade do DNA foram determinadas através de fluorometria *Qubit* e espectrofotometria UV-Vis *Nanodrop*.

## 5.2. SEQUENCIAMENTO DO MATERIAL GENÉTICO (DNA) E PROCESSAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

O sequenciamento do DNA foi realizado através da tecnologia Illumina. Essa metodologia é capaz de detectar quimicamente os fragmentos de DNA flanqueados por adaptadores de até centenas de pares de bases. Esses fragmentos são amplificados através de um método chamado de bridge PCR (PCR em ponte), devido ao fato de que na fase de anelamento, a extensão do produto de um primer forma uma ponte com outro primer na fita complementar. A metodologia Illumina é baseada em síntese, na qual ocorre adição de nucleotídeos fluorescentes que são detectados quimicamente.

A qualidade do sequenciamento foi aferida utilizando o programa FastQC, filtrando-se aquelas de baixa qualidade ou muito curtas através do programa *Prinseq-lite* (SCHMIEDER; EDWARDS, 2011). A identificação das regiões codificantes foi realizada através do programa *FragGeneScan* (RHO; TANG; YE, 2010), que identificou as ORFs (*open reading frames*). A montagem das sequências foi realizada através do programa IDBA-UD (PENG et al., 2012).

Como o tipo de sequenciamento que foi realizado é WGS a identificação das regiões codificantes (ORFs) é fundamental, pois utiliza-se o DNA total. Sendo assim, muito material que não é codificante (íntrons) também é sequenciado, e para a realização da filtração e

anotação das regiões codificantes (éxons) do genoma adequadamente é necessário a utilização do programa *FragGeneScan* para a identificação das ORFs.

### 5.3. BANCO DE REFERÊNCIA DOS GENES DE DEGRADAÇÃO DA ATRAZINA

As sequências dos genes de degradação da atrazina foram obtidas do banco de dados secundário UNIPROT. Foram desconsideradas sequências ubíquas, ou seja, que estariam presentes em ambientes independente da presença ou ausência do composto, a partir do trabalho de FANG e colaboradores (2015). Assim, foram obtidas 767 sequências que atenderam a esse critério, organizando-as em formato tabulado e posteriormente, convertendo-as para o formato FASTA, que é obrigatório para o restante das análises. Na **Tabela 1** podem ser encontrados os genes obtidos do repositório UNIPROT.

Tabela 1. Genes associados à biodegradação da atrazina\*, sua proteína e função correspondente.

Gene	Proteína	Função
<i>atzA</i>	Atrazina clorohidrolase	Descloração da atrazina para HA
<i>atzB</i>	Hidroxidecloroatrazina etilaminohidrolase	Catalisador da reação de desaminação de HA para N-isopropilamelida
<i>atzC</i>	N-isopropilamelida isopropilamidohidrolase	Conversão de N-isopropilamelida para ácido cianúrico e isopropilamina
<i>atzE</i>	Biureto hidrolase	Hidrolisa biureto em alofanato e amônia
<i>atzF</i>	Alofanato hidrolase	Hidrolisa alofanato em amônia e gás carbônico.
<i>ipuC</i>	Glutamato-isopropilaminaligase	Envolvida na degradação de isopropilamina, constituinte do herbicida atrazina.
<i>ipuF</i>	Gama-glutamil-L-1-hidroxiisopropilamida hidrolase	Envolvida na degradação de isopropilamina.
<i>thcE</i>	Metanol:N,N-dimetil-4-nitrosoanilina oxidoreductase	Catalisa a oxidação de metanol e formação de formaldeído. O gene é expresso durante a biodegradação de atrazina.
<i>triA</i>	Melamina deaminase	Desloca agrupamentos amina de melamina e aminoatrazina.
<i>trzD</i>	Amidohidrolase de ácido cianúrico	Cliva o anel s-triazina e ácido cianúrico, produzindo dióxido de carbono e biureto.
<i>gatA</i>	Biuretohidrolase e amidase (predita)	Mesma função de <i>atzE</i> , com redundância (amidase)

\*Extraídos do repositório UNIPROT ([www.uniprot.org](http://www.uniprot.org))

### 5.4. ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS

Foi realizada a comparação por similaridade dos quatro tipos de manejo dos solos e do solo de floresta semidecidual contra as sequências obtidas do banco UNIPROT (CONSORTIUM, 2007) utilizando o *BLASTn* pelo script *BLASTall*. O *BLASTn* compara sequências de nucleotídeos (*queries*) contra um banco de dados de sequências de nucleotídeos (AMARAL; REIS; SILVA, 2007).

Já o *BLASTall* permite realizar, em um computador local, a comparação de todas as sequências, em formato FASTA, presentes em um arquivo contra um banco de dados instalado localmente. Foram considerados resultados positivos apenas aqueles com *E-value* menor que  $1e-5$ . O *E-value* é um parâmetro utilizado no *BLAST* e mostra qual a probabilidade de um alinhamento ter ocorrido ao acaso. Quanto menor o *E-value*, menor é a probabilidade de o alinhamento ter ocorrido ao acaso, ou seja, melhor é o resultado do alinhamento.

## 5.5. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

Os resultados foram armazenados em um banco de dados construído localmente utilizando o MySQL, através do programa *phpmyadmin*, disponibilizado pelo pacote XAMPP.

Os genes encontrados foram separados de acordo com a similaridade que retornaram do BLAST em comparação com os diferentes tipos de manejo do solo. Subsequentemente, foi realizada uma detalhada busca bibliográfica sobre os resultados encontrados para a discussão dos mesmos.

Assim buscando a relação daqueles genes presentes nos diferentes tratamentos, a interferências que cada tipo de manejo possui na microbiota e as associações com os micro-organismos presentes. Para uma melhor visualização dos gêneros e micro-organismos comuns a todos os solos e exclusivos de cada solo, foi utilizado o programa InteractiVenn (HEBERLE et al., 2015).

A saída do alinhamento (BLAST) foi importada no programa MEGAN, que inclui diversos pacotes para análises de metagenômica. Assim, foram geradas as curvas de rarefação em relação aos gêneros originais e análise de *cluster* (UPGMA – *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) calculada através do método de distância de Bray-Curtis, de forma a se determinar se o número de sequências foi suficiente para capturar toda a diversidade de micro-organismos degradadores de atrazina presentes no ambiente. Na plataforma MEGAN, os dados são normalizados através do método de raiz quadrada.

Por fim, o conjunto de dados do MEGAN foi exportado no formato STAMP, um pacote estatístico para determinação dos componentes principais (PCA) através do método euclidiano de diferença entre médias (PARKS; BEIKO, 2010).



## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Das 230644 ORFs obtidas no conjunto de reads gerado pelo sequenciamento, após processamento através do algoritmo *BlastAll*, foram obtidos 2033 alinhamentos no total, referentes aos genes de degradação estudados e os micro-organismos aos quais esses genes pertencem.

A **figura 3** exibe a curva de rarefação para os táxons relativos à degradação de atrazina para as 5 amostras de solo. No eixo *x* estão dispostos o número de sequências, e no eixo *y*, o número de novos gêneros de micro-organismos.

Idealmente, o gráfico deve chegar a um platô, o que significaria que nenhum novo organismo foi encontrado, por mais sequencias que se adicione à análise. Isto se verificou na **figura 3**, exaurindo-se a diversidade de gêneros degradadores de atrazina nos ambientes em análise.

Verifica-se também por esta análise que o tratamento com a maior diversidade de micro-organismos associados à degradação de atrazina foram, em ordem crescente: pastagem convencional (CO); integração lavoura-pecuária (LP); floresta semidecidual (FS); plantio direto (PD) e plantio convencional (PC).

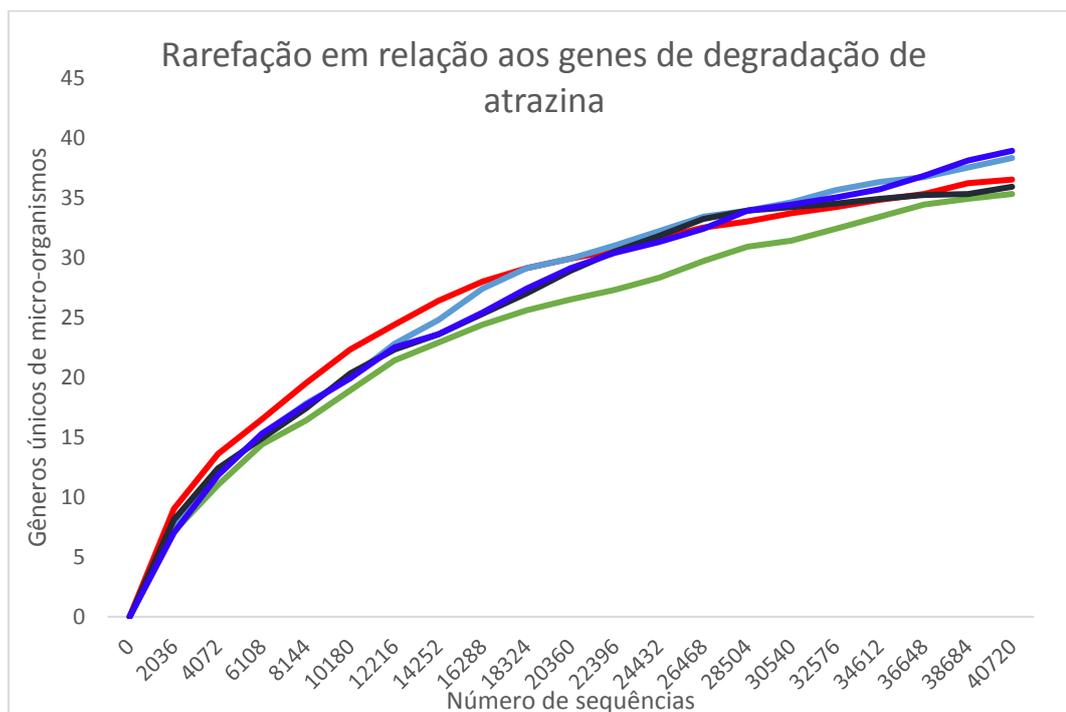


Figura 3. Curva de rarefação em relação aos genes de degradação de atrazina, gerada pelo programa MEGAN. Vermelho: floresta semidecidual; Azul claro: integração lavoura-pecuária; Verde: plantio convencional; Preto: plantio direto; Azul escuro: pastagem contínua.

A seguir, na **figura 4**, exibe-se a análise de *cluster* tipo UPGMA do conjunto de dados, agrupando-se os dados conforme sua similaridade.

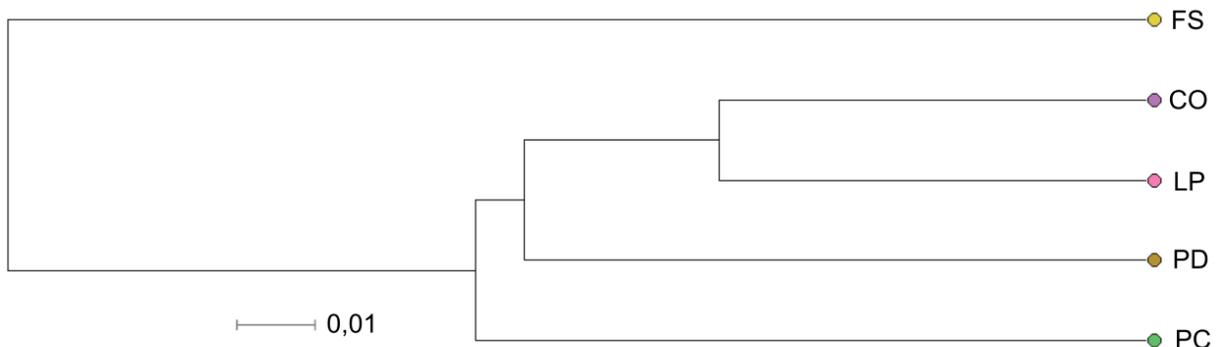


Figura 4. Análise de *cluster* (UPGMA) gerada pelo programa MEGAN relativa aos dados taxonômicos dos 05 solos calculada através do método de distância de Bray-Curtis. FS: Floresta semidecidual; CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: manejo de plantio direto; PC: manejo de plantio convencional. Escala: proporção de diferença entre os dados

Nesta análise, na qual uma ramificação maior significa uma maior dissimilaridade entre os dados, observa-se que a diversidade do manejo de floresta semidecidual (FS) é o mais distante em relação aos outros manejos. Os que se agruparam mais proximamente foram os manejos de pastagem contínua (CO) e integração lavoura-pecuária (LP), possivelmente devido à similaridade entre a cobertura vegetal (ambos se encontravam em cultivo de pastagem).

Essas tendências eram esperadas, pois a diversidade bacteriana relativa à degradação de atrazina do solo de floresta semidecidual (que não recebeu tratamento documentado do agroquímico atrazina) deve possuir um perfil mais diferenciado dos outros tratamentos, sendo que o manejo de integração lavoura pecuária recebeu o agroquímico atrazina devido à aplicação direta na plantação de milho e os demais manejos podem ter tido contato com o agroquímico por consequência da remoção da cobertura vegetal.

Embora solo de floresta semidecidual não tenha recebido voluntariamente o herbicida atrazina, sabe-se que a área, que é próxima a um rio, possui um relevo mais baixo que as áreas de plantio da Embrapa, desta forma, pode ocorrer uma lixiviação da atrazina por água da chuva.

Os resultados relativos à busca no banco de dados pela presença dos genes estão expostos na **Tabela 2**, concatenados pela natureza do tratamento ao qual o solo estava submetido.

Tabela 2. Abundância total dos genes relativos à degradação da atrazina em relação ao solo amostrado em diferentes tratamentos.

Sigla do Gene	FS	CO	PD	LP	PC	Total
<i>atzA</i>	74	100	72	113	59	418
<i>atzB</i>	13	17	12	27	9	78
<i>atzC</i>	23	30	25	30	19	127
<i>atzE</i>	77	92	67	91	62	389
<i>atzF</i>	34	43	32	42	20	171
<i>ipuC</i>	29	86	67	88	54	324
<i>ipuF</i>	5	5	7	7	8	32
<i>thcE</i>	2	8	13	6	5	34
<i>triA</i>	53	73	55	67	37	285
<i>trzD</i>	16	49	20	49	31	165
<i>gatA</i>	-	-	-	1	-	1

Legendas: floresta semidecidual (FS), pastagem contínua (CO), plantio direto (PD), integração lavoura pecuária (LP) e plantio convencional (PC).

Nos dados expostos na **Tabela 2**, *atzA* foi o gene que apresentou maior abundância nos cinco diferentes tipos de solos com o total de 418, sendo seguido pelos genes *atzE*, *ipuc*, *triA*, *atzF*, *trzD*, *atzB*, *atzC*, *thcE*, *ipuF* e por fim presente em um único tratamento o gene *gatA*, que foi encontrado no manejo de integração lavoura-pecuária.

Os genes *atzA*, *atzB* e *atzC* são responsáveis pela remoção do cloro e dos resíduos de isopropilamida e etilamina para produzir ácido cianúrico (GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2003), sendo posteriormente convertido a  $\text{NH}_3$  e  $\text{CO}_2$  através da ação das enzimas codificada pelos genes *atzD*, *atzE*, e *atzF*, ressaltando que os gene *trzD* é análogo ao gene *atzD*.

Na **figura 5** está exposto o diagrama de Venn relativo aos gêneros de micro-organismos exclusivos de cada amostra, os comuns a toda a amostragem e os comuns entre si. Os 5 micro-organismos comuns a todos os manejos de solo são pertencentes aos gêneros: *Klebsiella*, *Amycolatopsis*, *Pseudomonas*, *Bordetellas* e *Rhodococcus*. O manejo de plantio convencional e plantio direto foram os que mais apresentaram táxons exclusivos (9 gêneros únicos cada). No diagrama, estão exibidos apenas os táxons (1 representante de cada gênero).

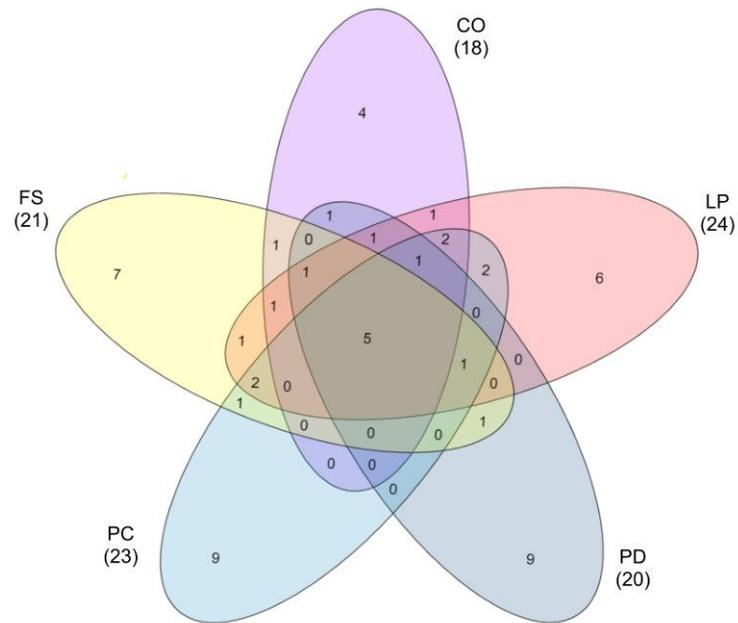


Figura 5. Diagrama de Venn relativo aos gêneros de micro-organismos comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra. CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: plantio direto; PC: plantio convencional; FS: floresta semidecidual. O número ao lado das siglas significa o total de gêneros exclusivos encontrados.

A seguir, na **figura 6**, estão exibidos os micro-organismos comuns a todas as amostras e exclusivos a todas as amostras a nível de espécie. Pode-se observar que o solo com mais espécies exclusivas foi o relativo ao manejo de integração lavoura-pecuária. Tratamento que, inclusive, compartilhou o maior número de micro-organismos comuns em relação a outra amostragem – 39 espécies em comum entre o manejo de pastagem contínua.

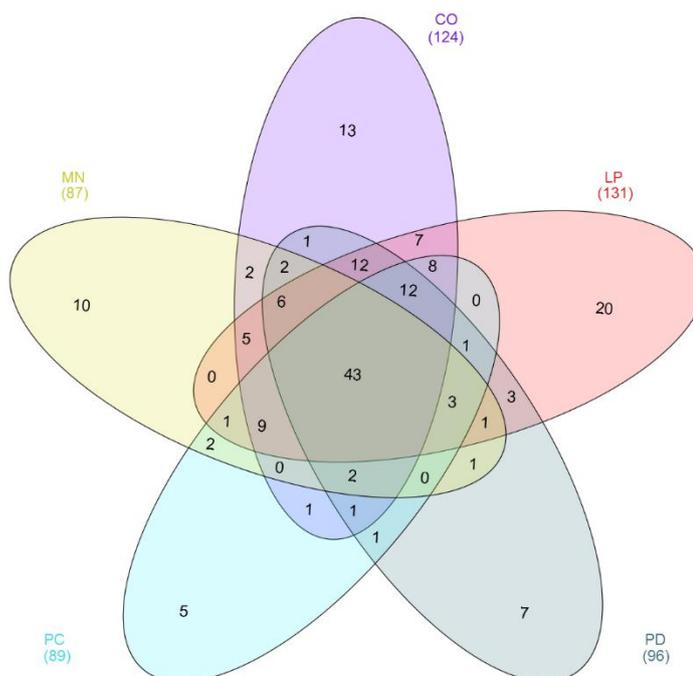


Figura 6. Diagrama de Venn relativo às espécies de micro-organismos comuns a todas as amostras e exclusivos de cada amostra a nível de espécie. CO: pastagem contínua; LP: integração lavoura-pecuária; PD: plantio direto; PC: plantio convencional; FS: floresta semidecidual. O número abaixo das siglas representa o número de espécies únicas encontradas.

A atividade de degradação de atrazina destes micro-organismos únicos está descrita nas **tabelas 3, 4, 5, 6 e 7**. Nestas tabelas, foram pesquisadas referências relativas à situação do conhecimento já publicado acerca destes micro-organismos, se já foram descritos por outros trabalhos como biodegradadores de atrazina, e, se sim, quem os descreveu ou os associou. Não foram pesquisados os micro-organismos não identificados ao menos a nível de gênero.

Na **tabela 3** estão os micro-organismos degradadores de atrazina exclusivos ao solo sob floresta semidecidual. Em levantamento de literatura, não foram encontrados dados relativos às espécies, mas micro-organismos dos gêneros *Janthino bacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* e *Herbaspirillum* já foram descritos em literatura em associação à degradação de atrazina.

Tabela 3. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo de floresta semidecidual.

Nome científico	Histórico do organismo quanto a degradação da atrazina	Referência(s)
-----------------	--	---------------

Tabela 3. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo de floresta semidecidual.

<i>Acinetobacter radioresistens</i>	Micro-organismos deste gênero (inclusive similares a <i>A. radioresistens</i> ) já descritos como degradadores de atrazina	SINGH; CAMEOTRA, ZHANG et al., 2012	SURI; 2004;
<i>Halomonas</i> sp.	Ø	Ø	
<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Gene <i>atzABC</i> já foi descrito em congêneres	JASON KRUTZ et al., 2010	
<i>Isoptericola dokdonensis</i>	Ø	Ø	
<i>Janthinobacterium</i> sp.	Congêneres ( <i>J. lividum</i> ) já foi descrita como degradadora de outra molécula s-triazínica, a terbutilazina	CARACCILO et al., 2010	
<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	Ø	Ø	
<i>Lactobacillus hilgardii</i>	Ø	Ø	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Congêneres é o micro-organismo mais caracterizado capaz de degradar atrazina	GOVANTES et al., 2010	
<i>Ralstonia solanacearum</i>	Congêneres ( <i>R. brasiliensis</i> ) já foi descrita como degradadora de atrazina	CSEHATI et al., 2012; STAMPER et al., 2002	
<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>	–	–	

Ø: Não foram encontrados dados em literatura nem para a espécie, nem para o gênero, relativos à biodegradação de atrazina ou de s-triazínicos.

Na **tabela 4**, estão dispostos os micro-organismos encontrados exclusivamente no solo sob pastagem contínua. No caso dessa amostra, a espécie *B. cepacia* já foi descrita como degradadora, enquanto as outras ou suas congêneres foram descritos ou não há relatos. Foi encontrado um micro-organismo da ordem *Rhizobiales*, que não foi identificado a um nível taxonômico mais detalhado.

Tabela 4. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de pastagem contínua.

Nome científico	Histórico do organismo quanto a degradação da atrazina	Referência(s)
<i>Acetobacter pasteurianus</i>	Ø	Ø
<i>Acinetobacter</i> sp.	Micro-organismos deste gênero já descritos como degradadores de atrazina	SINGH; CAMEOTRA, ZHANG et al., 2012
<i>Burkholderia cepacia</i>	Espécie descrita como degradadora de atrazina em cultura de cana-de-açúcar	NGIGI et al., 2012
<i>Clostridiales bacterium</i>	–	–
<i>Desulfosporosinus acididurans</i>	Ø	Ø
<i>Geobacillus</i> sp.	Ø	Ø

Tabela 4. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de pastagem contínua.

<i>Microbacterium oxydans</i>	Congênera ( <i>M. sp</i> ) já testado com sucesso para a degradação de atrazina	JIANG et al., 2008
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Congênera ( <i>M. sp.</i> ) descoberto em um biofilme com capacidade para a degradação de atrazina	SATSUMA et al., 2006
<i>Rhizobiales bacterium</i>	—	—
<i>Rhodococcus jostii</i>	Congênera ( <i>R. sp.</i> estirpe MB-P1) isolada e caracterizada como degradadora de atrazina	FAZLURRAHMAN et al., 2009
<i>Roseobacter litoralis</i>	—	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Congênera ( <i>Y. pseudotuberculosis</i> ) encontrada em um consorte de solo analisado em um estudo que associa efeitos da adição de nitrogênio na mineralização da atrazina em solo utilizado para cultura de milho.	GARCÉS; HANSEN; VAN AFFERDEN, 2007

Ø: Não foram encontrados dados em literatura nem para a espécie, nem para o gênero, relativos à biodegradação de atrazina ou de s-triazínicos.

A próxima análise, relativa à integração lavoura-pecuária, está exposta na **tabela 5**. Este foi o manejo que mais gerou dados acerca de espécies únicas degradadoras de atrazina, e diversos gêneros aqui descritos possuem dados acerca da degradação de atrazina. O micro-organismo *C. taiwanensis* era considerado como pertencente ao gênero *Ralstonia*, de acordo com STAMPER e colaboradores (2002), e assim, foram encontradas referências para tal.

Tabela 5. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de integração lavoura-pecuária.

Nome científico	Histórico do organismo quanto a degradação da atrazina	Referências
<i>Acetobacter senegalensis</i>	Ø	Ø
<i>Acinetobacter sp.</i>	Micro-organismos deste gênero já descritos como degradadores de atrazina	SINGH; SURI; CAMEOTRA, 2004; ZHANG et al., 2012
<i>Burkholderia glumae</i>	Congênera ( <i>B. cepacia</i> ) descrita como degradadora de atrazina em cultura de cana-de-açúcar	NGIGI et al., 2012
<i>Clostridium acidurici</i>	Gênero encontrado em uma análise de 16S ribossomal do DNA de solo com histórico de aplicação de atrazina	FANG et al., 2015b
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	Congênera ( <i>R. brasiliensis</i> ) já foi descrita como degradadora de atrazina.	CSERHATI et al., 2012; STAMPER et al., 2002
<i>Edwardsiella anguillarum</i>	Ø	Ø
<i>Ferriphase lusamnicola</i>	Ø	Ø

Tabela 5. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de integração lavoura-pecuária.

<i>Klebsiella variicola</i>	Ø	Ø
<i>Microbacterium foliorum</i>	Congênera ( <i>M. sp</i> ) já testado com sucesso para a degradação de atrazina	JIANG et al., 2008
<i>Paraburkholderia fungorum</i>	Ø	Ø
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Ø	Ø
<i>Pseudarthrobacter siccitolerans</i>	Ø	Ø
<i>Pseudomonas sp.</i>	Congênera é o micro-organismo mais caracterizado capaz de degradar atrazina	GOVANTES et al., 2010
<i>Ruminococcus gnavus</i>	Ø	Ø
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Micro-organismos do gênero descobertos em um solo enriquecido com atrazina e utilizados em um estudo de aplicação de biorreator para a degradação de atrazina e simazina	MACÍAS-FLORES et al., 2009
<i>Streptomyces sp.</i>	Micro-organismo do gênero ( <i>S. sp</i> ) obtido das folhas de cana-de-açúcar descrito como degradador de atrazina	MESQUINI et al., 2015
<i>Vibrio sp.</i>	Não foram encontrados relatos associando-se este gênero à degradação de atrazina, mas um estudo atestou sua resistência à toxicidade do composto	PALMA et al., 2008
<i>Xanthomonas axonopodis</i>	Ø	Ø
<i>Xanthomonas citri</i>	Ø	Ø

Ø: Não foram encontrados dados em literatura nem para a espécie, nem para o gênero, relativos à biodegradação de atrazina ou de s-triazínicos.

Na **tabela 6**, encontram-se os micro-organismos exclusivos a nível de espécie relativos ao manejo de plantio direto. Foi possível realizar a associação à biodegradação de atrazina de 04 dos organismos desta análise.

Tabela 6. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de plantio direto

Nome científico	Histórico do organismo quanto a degradação da atrazina	Referências
<i>Arthrobacter sp.</i>	Congênera ( <i>A. nicotinovorans</i> ) descrito como degradador de atrazina	AISLABIE et al., 2005
<i>Bordetella trematum</i>	Ø	Ø
<i>Burkholderia gladioli</i>	Congênera ( <i>B. cepacia</i> ) descrita como degradadora de atrazina em cultura de cana-de-açúcar	NGIGI et al., 2012
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Ø	Ø
<i>Paraglaciicola mesophila</i>	Ø	Ø

Tabela 6. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de plantio direto

<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Micro-organismos do gênero descobertos em um solo enriquecido com atrazina e utilizados em um estudo de aplicação de biorreator para a degradação de atrazina e simazina	MACÍAS-FLORES et al., 2009
<i>Streptomyces turgidiscabies</i>	Micro-organismo do gênero ( <i>S. sp</i> ) obtido das folhas de cana-de-açúcar descrito como degradador de atrazina	MESQUINI et al., 2015

Ø: Não foram encontrados dados em literatura nem para a espécie, nem para o gênero, relativos à biodegradação de atrazina ou de s-triazínicos.

Na **tabela 7**, por fim, encontram-se os micro-organismos únicos a nível de espécie relativos ao solo de plantio convencional. Não foi identificado, a nível de gênero, o micro-organismo da família *Rhodobacteraceae*. Além disso, dos gêneros e espécies aqui presentes, não foi possível realizar associações à degradação de atrazina, exceto para a já descrita *Pseudomonas*.

Tabela 7. Espécies únicas de micro-organismos degradadores de atrazina do solo sob manejo de plantio convencional.

Nome científico	Histórico do organismo quanto a degradação da atrazina	Referências
<i>Bordetella holmesii</i>	Ø	Ø
<i>Collimonas fungivorans</i>	Ø	Ø
<i>Legionella cherrii</i>	Ø	Ø
<i>Pseudomonas</i> sp. estirpe ADP	Congênera é o micro-organismo mais caracterizado capaz de degradar atrazina	GOVANTES et al., 2010
<i>Rhodobacteraceae</i> bacterium	—	—

Ø: Não foram encontrados dados em literatura nem para a espécie, nem para o gênero, relativos à biodegradação de atrazina ou de s-triazínicos.

Nas tabelas a seguir (8 a 12) encontra-se a abundância total dos genes de degradação da atrazina estudados (em número de cópias) encontradas em cada um dos solos. Para a avaliação dos genes encontrados, foi pesquisado em literatura os dados relativos a todos os micro-organismos que se apresentaram com um número mínimo total de 10 cópias do gene, através do algoritmo de alinhamento *BlastAll*.

Nesse trecho, os dados não estão normalizados, isto é, neste ponto ainda não foram realizados os tratamentos pelo pacote MEGAN – a tabela revela apenas os resultados (genes) mais proeminentes e o micro-organismo ao qual pertencem. Estão incluídas também nas próximas tabelas o *e-value*, que é a probabilidade dos alinhamentos terem ocorrido ao acaso.

Nesta análise, foram desconsiderados aqueles com probabilidade maior que 1,00E-05, considerado padrão para esse tipo de análise.

Na **tabela 8** estão dispostos os genes e os respectivos micro-organismos presentes no solo de floresta semidecidual (FS), constituída por uma vegetação pertencente ao bioma da Mata Atlântica e ocasionalmente também do Cerrado, sendo este tipo de vegetação típica do Brasil central e considerada com uma dupla estacionalidade climática: no verão chuvas intensas seguidas por um período de estiagem (PEREIRA; VENTUROLI; CARVALHO, 2011).

Tabela 8. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em solo de floresta semidecidual.

Gene	Micro-organismos	Abundância	<i>E-value</i>	Descrito...	Referência
<i>atzA</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	64	6,00E-46	Atrazina	FANG et al., 2015a
<i>atzE</i>	<i>Cupriavidus metallidurans</i>	58	2,00E-44	Agentes clorados e biureto (atrazina)	CUADRADO et al., 2010 e STAMPER et al., 2002
<i>triA</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. AD87	41	4,00E-16	Atrazina, etilbenzeno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	CHAUDHRY et al., 2013; ROMEH; HENDAWI, 2014; SHIRI, 2016.
<i>atzF</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	33	1,00E-44	Atrazina	KAFILZADEH; FARHADI, 2015
<i>ipuC</i>	<i>Agromyces</i> sp. NDB4Y10	29	1,00E-80	Biolixiviação de cobre, nylon	YASUHIRA et al., 2007 e RAMANATHAN; TING, 2015
<i>trzD</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> LC20	16	2,00E-16	Atrazina	GHRAIRI; BRAIEK; HANI, 2015
<i>atzC</i>	<i>Enterococcus faecalis</i> TX0104	16	5,00E-07	Atrazina	GRIFFITH, 2014
<i>atzE</i>	<i>Bacterium</i> sp. YEK0313	11	4,00E-42	Ø	Ø
<i>atzB</i>	<i>Amycola topsisorientalis</i>	11	3,00E-68	Atrazina e outros compostos aromáticos	BOURGUIGNON et al., 2016; CHUN et al., 1999

Abundância relativa ao número de cópias por solo. Descrito se referem àqueles micro-organismos encontrados em pesquisa de literatura como biodegradador, e de qual composto, incluindo-se a referência desta descrição. Ø: não foram encontradas referências relativas à biodegradação.

Dentre os micro-organismos mais presentes nesse solo, relativo à **Tabela 8**, destaca-se *Mycobacterium tuberculosis*, que segundo Hruska e Kaevska (2012) sua presença está relacionada a solos contaminados por hidrocarbonetos aromáticos, estudos revelam a presença de certas espécies típicas para esse tipo de ambiente (HRUSKA; KAEVSKA, 2012)

É evidente que na mata local (floresta semidecidual) não há a aplicação direta do agroquímico atrazina. Entretanto, o fenômeno de lixiviação - arraste do material da superfície do solo pela água da chuva - pode ser o responsável pela presença do composto e, por

consequência, dos genes de degradação. Esse resultado não é completamente inesperado, pois documenta-se que a microbiota de diversos ambientes em que não há ação antrópica seja capaz de degradar os compostos s-triazínicos (JASON KRUTZ et al., 2010). Adicionalmente, documenta-se que os micro-organismos degradadores de atrazina são também capazes de degradar outros metabólitos s-triazínicos (LEBARON; MCFARLAND; BURNSIDE, 2008).

Nos solos que o manejo é a pastagem contínua ou lotação contínua, é o método em que o rebanho tem acesso total à pastagem durante toda a estação de pastejo, método que é considerado o menos impactante às propriedades físicas do solo, associado a uma maior conservação dos recursos do mesmo, pois minimiza os impactos erosivos, de compactação e permite a infiltração de água no solo, o que não ocorre em áreas sem manejo adequado ou degradadas (BONO; MACEDO; TORMENA, 2013; PIRES et al., 2008). A **tabela 9** traz os dados de genes e micro-organismos encontrados neste manejo.

Tabela 9. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de pastagem contínua

Gene	Micro-organismos	Abundância	<i>E-value</i>	Descrito...	Referência
ipuC	<i>Roseobacter denitrificans</i>	86	1,00E-41	Atrazina (potencialmente)	SANTANA; MOURA; NOGUEIRA, 2013
atzA	<i>Microbacterium laevaniformans</i>	81	1,00E-83	Resistente ao metal cromo	HENSON et al., 2015
atzE	<i>Pantoea ananas</i>	67	5,00E-23	Atrazina e fenol	DASTAGER; DEEPA; PANDEY, 2009; MARTIN, 2006
trzD	<i>Clostridium ultunense</i>	49	7,00E-63	∅	∅
atzF	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	39	7,00E-65	Atrazina	KAFILZADEH; FARHADI, 2015
triA	<i>Paenibacillus terrae</i>	39	7,00E-50	Atrazina	SHIRI, 2016
trzA	<i>Acidobacteria bacterium</i> DSM 100886	24	4,00E-15	∅	∅
atzB	<i>Rhodococcus jostii</i> RHA1	16	1,00E-08	∅	∅
atzC	<i>Pseudomonas</i> sp. EGD-AKN5	16	1,00E-09	Atrazina	GOVANTES et al., 2010
atzC	<i>Chlamydia trachomatis</i>	12	3,00E-112	∅	∅
atzE	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	10	6,00E-42	DDT (potencial)	EEVERS et al., 2015

Abundância relativa ao número de cópias por solo. Descrito se referem àqueles micro-organismos encontrados em pesquisa de literatura como biodegradador, e de qual composto, incluindo-se a referência desta descrição. ∅: não foram encontradas referências relativas à biodegradação.

Em relação à **Tabela 9**, relativa ao manejo de pastagem contínua, o organismo: *K. pneumoniae* foi novamente encontrado, e o organismo original mais abundante encontrado pela análise é relativo ao gene *ipuC* – *Roseobacter denitrificans*.

O sistema de manejo plantio direto (dados da **tabela 10**) é tido hoje como um dos métodos mais rentáveis, pois possui algumas vantagens que o diferencia dos outros tipos de manejo como: não necessitar realizar o preparo do solo, mantendo sempre o solo com cobertura vegetal ou por resíduos de plantas, proporcionando dessa forma maior produtividade e redução de custos no momento da produção.

Essa cobertura auxilia na preservação do solo quanto a lixiviação superficial e das erosões hídricas e eólicas. E deste modo mantém as interações entre solo, água, flora, proporcionando, assim, uma diversificação na microbiota do solo local (MELLO; BRUM, 2013).

Tabela 10. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de plantio direto

Gene	Micro-organismos	Abundância	E-value	Descrito...	Referência
<i>ipuC</i>	<i>Peptococcaceae bacterium</i> CEB3	67	2,00E-81	Ø	Ø
<i>atzA</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	59	5,00E-117	Atrazina	NGIGI et al., 2012 <sup>a</sup>
<i>atzE</i>	<i>Leptolyngbyasp.</i> O-77	54	9,00E-60	Ø	Ø
<i>triA</i>	<i>Streptomyces scabiei</i>	40	3,00E-14	Agroquímicos (potencialmente)	CASTRO-SOWINSKI, 2016
<i>atzF</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	30	1,00E-69	Atrazina	KAFILZADEH; FARHADI, 2015
<i>atzC</i>	<i>Carnobacterium</i> sp.	21	6,00E-11	Ø	Ø
<i>trzD</i>	<i>Moorellamulderi</i> DSM 14980	20	6,00E-53	Atrazina	SEFFERNICK et al., 2012
<i>thcE</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	13	1,00E-21	Atrazina e outros compostos	VANCOV; JURY; VAN ZWIETEN, 2005; VANCOV et al., 2007
<i>atzB</i>	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> ATCC 11635	12	8,00E-97	Atrazina	KARNIČAR et al., 2016

Abundância relativa ao número de cópias por solo. Descrito se referem àqueles micro-organismos encontrados em pesquisa de literatura como biodegradador, e de qual composto, incluindo-se a referência desta descrição. Ø: não foram encontradas referências relativas à biodegradação.

Quanto a esse solo, reapareceram também os micro-organismos relacionados à degradação da atrazina: *K. pneumoniae* e os pertencentes ao gênero *Amycolatopsis*.

O organismo mais abundante encontrado foi *Peptococcaceae bacterium* estirpe CEB3. Esta bactéria foi obtida originalmente a partir da drenagem de efluentes ácidos obtidos de uma mina de cobre abandonada – um ambiente intensamente ácido (pH 2,5), e é considerada uma acidófila de metabolismo extremamente versátil, capaz de se utilizar de diversas fontes de nitrogênio para produção de biomassa (PETZSCH et al., 2015).

O sistema de manejo que integra lavoura com pecuária, (dados da **tabela 11**), tem por objetivo a recuperação e/ou manutenção do solo, sobretudo para melhorar suas propriedades físicas. Este tipo de sistema visa renovar as condições do solo com os micro-organismos e organismos vegetais, visando ainda uma possível recuperação de áreas que foram alteradas ou degradadas.

Valorizam-se através desse manejo os recursos naturais disponíveis, a fim de se aproveitar de itens herdados do último plantio, como forragens vegetais, e culturas que ajudem a promover a diversidade de micro-organismos no solo oferecendo assim nutrientes para a manutenção desses micro-organismos, através de forrageiras, culturas agrícolas e dejetos animais. E por fim buscar reduzir o consumo de agroquímicos e insumos agrícolas. Desta forma, mantêm-se as comunidades microbianas que estão envolvidas no processo de mineralização da matéria orgânica e com isso reduz-se a compactação do solo e outros danos como no sistema de pastagem (ASSMANN; SOARES; ASSMANN, 2008).

Tabela 11. Abundância total dos genes e micro-organismos presentes em manejo de integração lavoura pecuária

Gene	Micro-organismos	Abundância	<i>E-value</i>	Descrito...	Referência
<i>atzA</i>	<i>Paenibacillus</i> sp. AD87	88	9,00E-22	Atrazina, etilbenzeno, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos	CHAUDHRY et al., 2013; ROMEH; HENDAWI, 2014; SHIRI, 2016.
<i>ipuC</i>	<i>Burkholderia</i> CCGE1001 sp.	88	1,00E-41	Atrazina	NGIGI et al., 2012a; FANG et al., 2014
<i>atzE</i>	<i>Leptolyngbya</i> sp. O-77	62	1,00E-49	Ø	Ø
<i>trzD</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> LC20	49	5,00E-40	Atrazina	GHRAIRI; BRAIEK; HANI, 2015
<i>triA</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	42	6,00E-50	Ø (espécie)	Ø (espécie)
<i>atzF</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	40	2,00E-52	Atrazina	KAFILZADEH; FARHADI, 2015
<i>atzB</i>	<i>Cupriavidus necator</i>	25	9,00E-14	Atrazina e xenobióticos	CUADRADO et al., 2010; CSERHÁTI et al., 2012
<i>atzA</i>	<i>Achromobacter</i> sp.	21	1,00E-32	Atrazina	BELLINI et al., 2014; KAFILZADEH; FARHADI, 2015
<i>atzC</i>	<i>Listeriagrayi</i> DSM 20601	17	2,00E-07	Ø	Ø
<i>atzE</i>	<i>Bacterium</i> sp. YEK0313	16	2,00E-33	Ø	Ø
<i>triA</i>	<i>Amycolatopsis</i> sp.M39	11	3,00E-47	Atrazina e outros compostos aromáticos	BOURGUIGNON et al., 2016; CHUN et al., 1999

Abundância relativa ao número de cópias por solo. Descrito se referem àqueles micro-organismos encontrados em pesquisa de literatura como biodegradador, e de qual composto, incluindo-se a referência desta descrição. Ø: não foram encontradas referências relativas à biodegradação.

Na **tabela 11** referente ao solo de integração lavoura pecuária, reapareceram os micro-organismos *Paenibacillus* sp. AD87 e *Klebsiella pneumoniae*, e o organismo mais abundante é

*Burkholderia*, pertencente a classe das betaproteobactérias, que foi criada após a divisão do gênero *Pseudomonas*.

No sistema de plantio convencional (dados da **Tabela 12**), no qual o objetivo é fornecer ao solo condições ótimas para a germinação, emergências e o estabelecimento das novas plantas, e com isso tenta-se reduzir as plantas invasoras. Possui também como finalidade o aumento da infiltração de água no solo, de forma a diminuir as perdas de água e sedimentos por erosão a um mínimo tolerável, sendo dividido em duas etapas principais: o preparo primário e o secundário.

No preparo primário as operações realizadas são mais grosseiras como o arado e gradagem, visando afrouxar o solo, descompactando-o e assim inserindo adubos, fertilizantes, insumos e reiterando as plantas invasoras. Já na segunda etapa se faz o destorroamento e o nivelamento das camadas que foram anteriormente aradas, podendo refazer o processo de gradagem para deixar o nivelamento mais uniforme (COSTA et al., 2003).

Tabela 12. Abundância total dos genes e micro-organismos de origens presentes em manejo de plantio convencional

Gene	Micro-organismo	Abundância	E-value	Descrito	Referência
<i>ipuC</i>	<i>Polymorphum gilvum</i>	54	2,00E-39	Hidrocarbonetos aromáticos	CAI et al., 2011; NIE et al., 2012
<i>atzA</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	51	5,00E-149	Atrazina	FANG et al., 2015a
<i>atzE</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	48	9,00E-21	Ø	Ø
<i>trzD</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i> LC20	31	4,00E-36	Atrazina	GHRAIRI; BRAIEK; HANI, 2015
<i>triA</i>	<i>Rhodococcus</i> sp.AD45	25	1,00E-74	Ø	Ø
<i>atzF</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	19	2,00E-30	Atrazina	KAFILZADEH; FARHADI, 2015
<i>atzC</i>	<i>Arthrobactersp.</i> DNS10	12	9,00E-08	Atrazina	SAJJAPH et al., 2004; VILLEGAS et al., 2014

Abundância relativa ao número de cópias por solo. Descrito se referem àqueles micro-organismos encontrados em pesquisa de literatura como biodegradador, e de qual composto, incluindo-se a referência desta descrição. Ø: não foram encontradas referências relativas à biodegradação.

Na **tabela 12** referente ao manejo de plantio convencional, reapareceram os micro-organismos *Mycobacterium tuberculosis* e *Klebsiella pneumoniae* e o organismo mais abundante *Polymorphum gilvum* pertencente à classe das alfa proteobactérias.

Em seguida, expõe-se na **figura 7** as rotas de degradação de atrazina consideradas no trabalho, e os micro-organismos associados à rota encontrados no solo sob manejo de integração lavoura-pecuária.

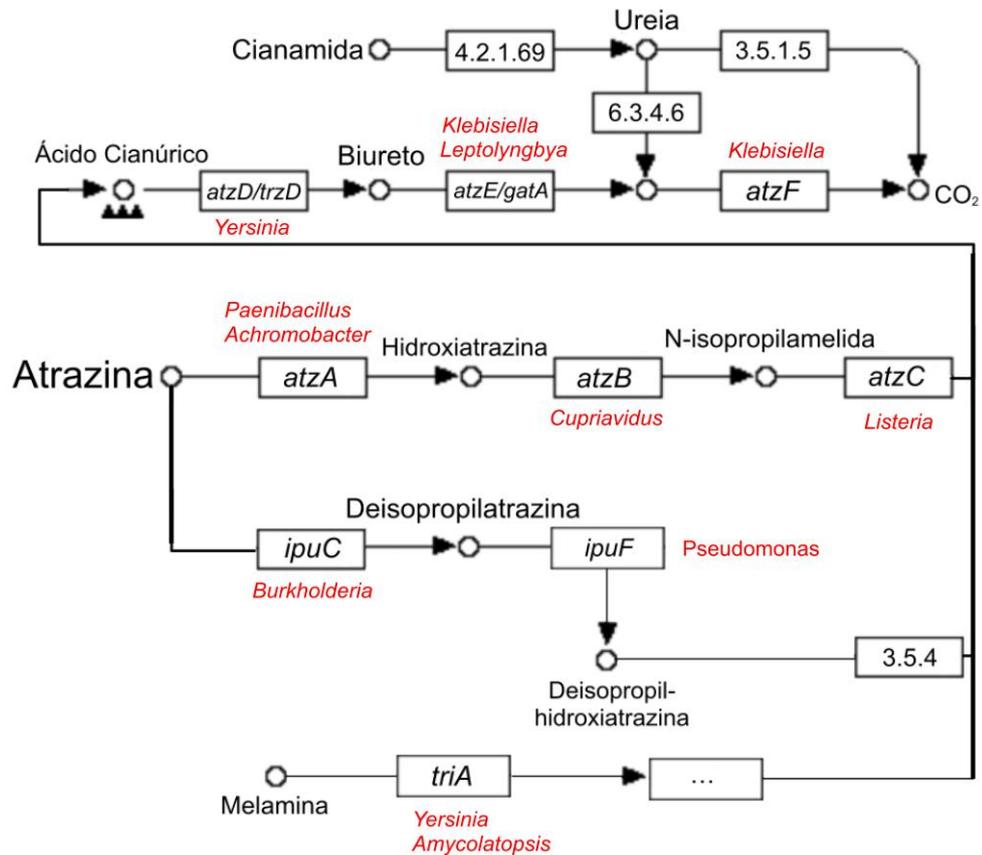


Figura 07. Rotas de degradação consideradas no trabalho, encontradas no solo sob manejo de integração lavoura-pecuária. Adaptado de KEGG (KANEHISA et al., 2012) e EAWAG (GAO; ELLIS; WACKETT, 2010). Caixas: enzimas catalisadoras com seu nome; Setas: etapa da rota; Numeração: genes ubíquos ou sem sigla; Reticências: passos intermediários da rota; Círculos: substrato ou composto da reação. Em vermelho, gênero encontrado associado à enzima.

A rota de degradação (adaptada do banco de dados KEGG) representa as enzimas buscadas no conjunto de dados. Foram selecionadas as enzimas menos ubíquas, isto é, mais específicas ao metabolismo de atrazina, especialmente *atzA*, *ipuC*, *atzB*, e *atzC*, que se encontram nos primeiros passos da cadeia metabólica da atrazina.

Os principais micro-organismos contendo gene de degradação de atrazina do solo sob manejo de integração lavoura-pecuária estão expostos em vermelho na **figura 07**. Neste solo, foi encontrada a maior diversidade de gêneros de degradação (o único que apresentou o gene *gatA*), possivelmente, pois este manejo é o que busca algum equilíbrio ao usar uma rotação entre lavoura e pecuária, tentando alcançar um equilíbrio das propriedades físicas, químicas e microbiológicas do solo.

Nas **figuras 08 à 16** estão expostos os micro-organismos superabundantes de cada amostra de solo em relação aos outros tratamentos. Não houve diferenças estatisticamente

significativas apenas para as comparações entre integração lavoura-pecuária e pastagem contínua.

Estas inferências foram geradas pelo pacote STAMP, através do teste estatístico exato de Fisher bicaudal, considerando-se como estatisticamente significativos aqueles com *P-value* inferior a 0,05.

Na **figura 08**, verifica-se que para os gêneros (*Klebsiella*, *Rhodococcus* e *Bordetella*) foram superabundantes na floresta semidecidual, e os tamanhos do efeito foram: 8,01%; 5,91% e 4,87% em relação ao manejo de integração lavoura-pecuária.

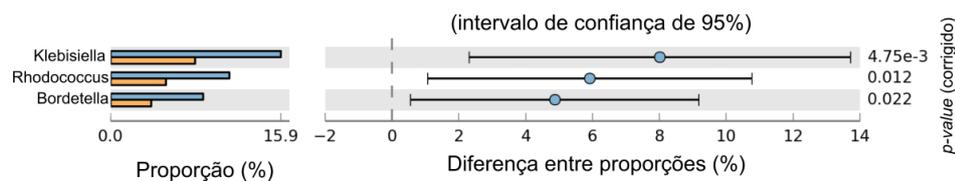


Figura 08. Abundância de micro-organismos da floresta semidecidual em relação à integração lavoura-pecuária. Azul: floresta semidecidual; Laranja: Integração lavoura-pecuária.

Na **figura 09**, observamos a relação de abundância para floresta semidecidual (em azul) em relação ao manejo de plantio convencional. Nesse caso, os micro-organismos do gênero *Klebsiella* continuaram mais abundantes na ausência de manejo (floresta semidecidual) com tamanho de efeito 11,37%. Já o plantio convencional (PC), neste caso, exibiu superabundância de bactérias da família *Peptococcaceae*, com tamanho de efeito de 4,81%.

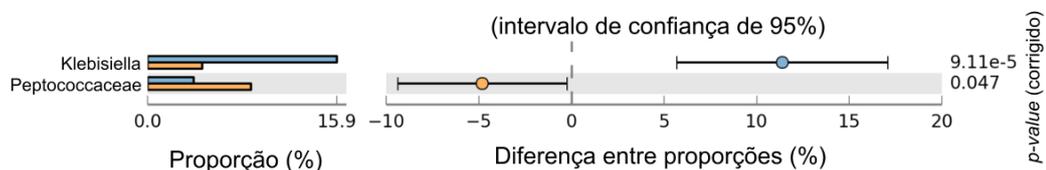


Figura 09. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação à plantio convencional. Azul: floresta semidecidual; Laranja: plantio convencional.

A seguir, na **figura 10**, estão expostas as bactérias e arqueias superabundantes em relação à floresta semidecidual (em azul) comparada ao solo sob manejo de plantio direto (em laranja). Observa-se que os representantes do gênero *Bordetella* foram super-representados no solo de floresta semidecidual, com tamanho de efeito de 5,67%; enquanto os micro-organismos do gênero *Enterobacter* e *Arthrobacter* foram mais abundantes no manejo de plantio direto, com tamanho de efeito respectivamente: 2,26% e 3,18%.

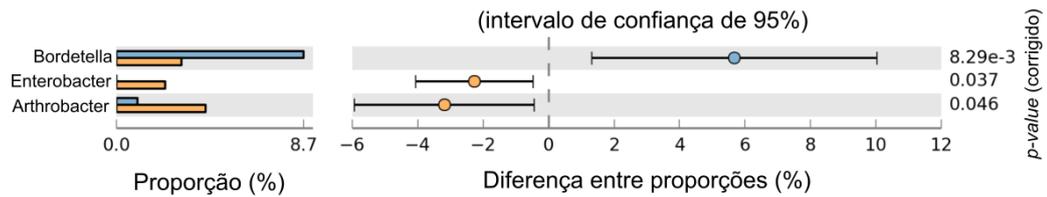


Figura 10. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação ao plantio direto. Azul: floresta semidecidual; Laranja: plantio direto.

A última comparação da floresta semidecidual está exposta na **figura 11**. Observa-se novamente uma abundância de bactérias do gênero *Klebsiella* (tamanho do efeito: 8,62%) no solo oriundo de floresta semidecidual, e também super-representação de bactérias do gênero *Rhodococcus* (tamanho do efeito: 6,50%) e *Bordetella* (tamanho do efeito: 5,17%). O manejo de plantio convencional apresentou super-representação de bactérias do gênero *Arthrobacter* (tamanho do efeito: 3,36%).

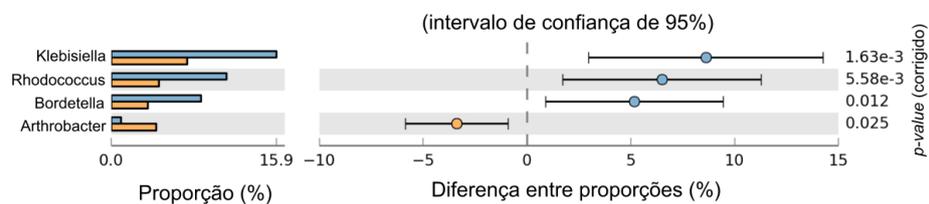


Figura 11. Abundância de bactérias do solo em floresta semidecidual em relação ao manejo de pastagem contínua. Azul: floresta semidecidual; Laranja: pastagem contínua.

A **fig. 12** exibe a única superabundância de bactérias quando são comparados os manejos de integração lavoura-pecuária e plantio convencional. Neste caso, o único micro-organismo super-representado com significância estatística foram os pertencentes ao gênero *Streptococcus*, com tamanho de efeito 1,91%.

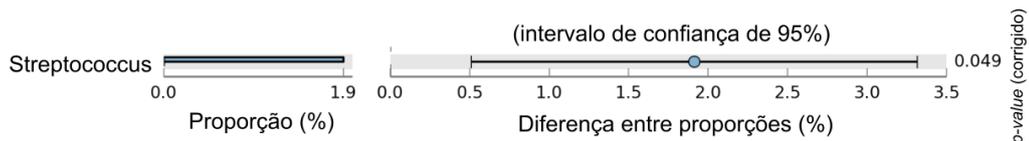


Figura 12. Abundância de *Streptococcus* no solo de manejo tipo integração lavoura-pecuária em comparação ao plantio convencional. Azul: integração lavoura-pecuária; Laranja (ausente): plantio convencional.

Por sua vez, a **figura 13** exibe as bactérias superabundantes quando se compara o solo sob manejo de integração lavoura-pecuária e o solo sob manejo de plantio direto. Os micro-organismos do gênero *Yersinia* foram mais abundantes para o primeiro (tamanho do efeito:

5,24%) enquanto os micro-organismos do gênero *Rhodococcus* foram mais abundantes para o último (tamanho do efeito: 4,62%).

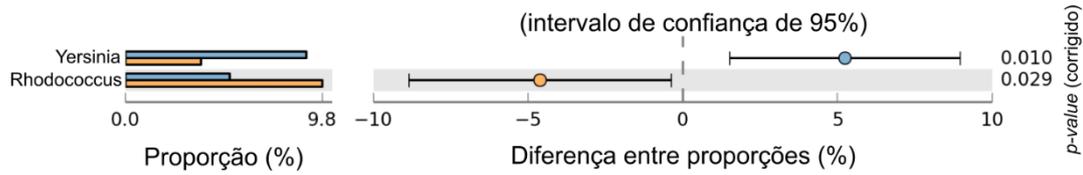


Figura 13. Abundância de bactérias no solo de manejo tipo integração lavoura-pecuária (azul) em comparação ao plantio direto (laranja). Azul: integração lavoura-pecuária; Laranja: plantio direto.

Na **figura 14**, observa-se a superabundância de *Klebsiella* presentes no manejo de plantio direto, em relação ao manejo de plantio convencional (tamanho do efeito: 5,24%).

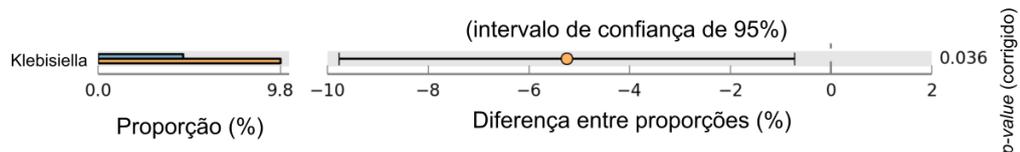


Figura 14. Abundância de *Klebsiella* no solo de manejo tipo plantio direto (em comparação ao plantio convencional). Azul: plantio convencional; Laranja: plantio direto.

Na **figura 15**, observa-se a superabundância de *Paenibacillus* presentes no manejo de pastagem contínua em relação ao manejo de plantio convencional (tamanho do efeito: 2,16%).

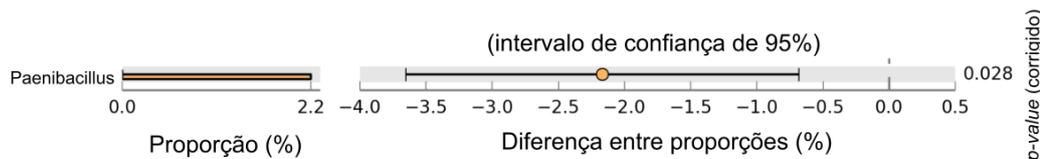


Figura 15. Abundância de *Paenibacillus* no solo de manejo tipo pastagem contínua em comparação ao plantio convencional. Azul (ausente): plantio convencional; Laranja: pastagem contínua.

Por fim, na **figura 16**, os últimos micro-organismos superabundantes da análise são pertencentes ao gênero *Rhodococcus*, e foram super-representados no solo sob manejo de plantio direto em comparação ao solo sob pastagem contínua, com tamanho de efeito de 5,2%.

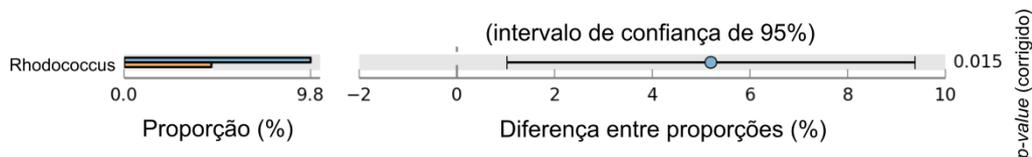


Figura 16. Abundância de *Rhodococcus* no solo de manejo tipo plantio direto em comparação a pastagem contínua. Azul: plantio direto; Laranja: pastagem contínua.

Nas análises de floresta semidecidual (FS, figuras 8, 9, 10 e 11) o gênero *Klebsiella* foi predominante na floresta semidecidual, exceto para plantio direto (PD), que não apresentou diferenças significativas.

Este gênero também foi superabundante em plantio direto (PD) em relação ao plantio convencional (PC). O gênero se associa comumente a ambientes com presença de material lenhoso, e já foi descrito em ambientes florestais associado à degradação desses compostos (BERGEY, 2005).

Ainda para floresta semidecidual (FS), *Bordetella* foi mais abundante em relação ao manejo de integração lavoura-pecuária (LP), plantio direto (PD) e pastagem contínua (CO) e *Rhodococcus* foi predominante em relação à pastagem contínua (CO) e à integração lavoura-pecuária (LP).

Micro-organismos do gênero *Arthrobacter* foram mais abundantes em pastagem contínua (CO) e plantio direto (PD) quando comparados à floresta semidecidual (FS).

Estirpes deste gênero com metabolismo comprovado de degradação da atrazina já foram isoladas a partir de chernossolos com cultivares de milho (ZHANG et al., 2011) e também em cultivares com histórico de aplicação de atrazina de mais de 20 anos de aplicação do composto (WANG; XIE, 2012), o que é consistente com nossas observações de que este micro-organismo é mais abundante em solo utilizado para cultivo.

Também foram mais abundantes no manejo de plantio direto (PD) em relação à floresta semidecidual (FS) os micro-organismos da família *Peptococcaceae*, anaeróbios estritos isolados comumente a partir de humanos, mas também de solos e sedimentos (BERGEY, 2009).

A maior presença de superabundantes nesse solo é consistente com o conhecimento de que a comunidade de micro-organismos de regiões de ambientes nativos (como floresta semidecidual, FS) possuem uma maior abundância de organismos menos diversos, que predominam nestes ambientes (MENDES et al., 2015).

Os micro-organismos do gênero *Klebsiella* foram mais abundantes também em PD quando comparado ao PC. Já foi observado por CAROLINI e colaboradores (2015) que solos

sob plantio convencional apresentam mais sequências relativas ao metabolismo de compostos aromáticos, o que foi o oposto do observado no presente trabalho.

A ausência de diferenças significativas entre os tratamentos de pastagem contínua (CO) e integração lavoura-pecuária (LP) pode ocorrer devido à similaridade desses tratamentos (ambos possuem pastagens), sendo necessário um número maior de amostras sequenciadas, o que traria mais poder resolutivo à análise.

A **figura 16**, apresenta a análise de componentes principais, demonstrando-se que para os três primeiros componentes principais.

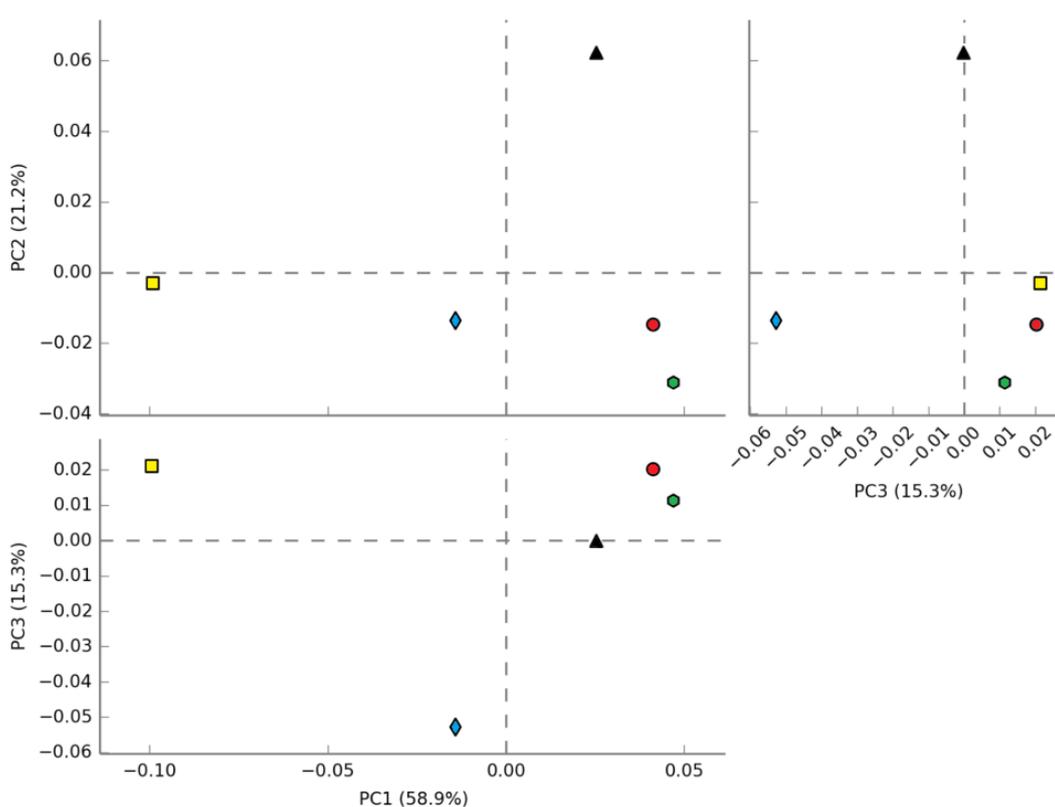


Figura 16. Análise de componentes principais (PCA), gerado pelo pacote estatístico STAMP. Preto; plantio convencional; Verde: pastagem contínua; Vermelho: integração lavoura-pecuária; Azul: plantio direto; Amarelo: floresta semidecidual.

Os tratamentos LP (vermelho) e CO (pastagem contínua) também se mantêm proximamente relacionados nesta outra análise, possivelmente devido à presença de cultivo de pastagem em ambos os tratamentos, repetindo-se o resultado obtido na análise de *cluster* (UPGMA).

Os que mais se diferenciaram em relação aos dois primeiros componentes principais (PC1 x PC2) foram os manejos de PC (plantio convencional) e FS (floresta semidecidual), possivelmente devido a intensa diferença entre o ambiente nativo e a presença de cultivo.

## 7. CONCLUSÕES

- Foram encontrados 56 gêneros únicos de bactérias e arqueias degradadoras do composto atrazina, divididos em 178 espécies e destas, 43 foram comuns a todos os manejos e 135 espécies diferentes entre os solos (rejeitando-se a hipótese  $H_0$  e aceitando-se a hipótese alternativa  $H_1$ );
- Em todos os tratamentos, verificou-se a presença de todos os genes de degradação pesquisados, exceto o gene *gatA*, exclusivo do solo sob manejo de integração lavoura-pecuária;
- Análise de PCA revelou uma similaridade entre os dados relativos ao manejo de integração lavoura-pecuária (LP) e pastagem contínua (CO), enquanto os dados relativos ao plantio convencional (PC) e floresta semidecidual (FS) se demonstraram os mais divergentes em relação à amostragem. Essa análise foi reforçada por uma análise de *cluster* (UPGMA);
- Foram encontrados micro-organismos degradadores de atrazina e 03 gêneros superabundantes no solo de floresta semidecidual (FS), apesar da ausência de aplicação direta de atrazina.
- Para o solo de plantio direto, foi encontrada superabundância de 04 gêneros, contrariando a literatura de que degradadores de aromáticos estariam mais presentes em plantio convencional (PC).
- O sistema de integração lavoura-pecuária (LP) e o de pastagem contínua (CO) apresentaram dois gêneros superabundantes cada, e não apresentaram gêneros superabundantes entre si, sugerindo que ou não houve diferença entre o solo para as amostras, similaridade reforçada pela análise de PCA.
- O solo de plantio convencional (PC) exibiu apenas um micro-organismos superabundante, considerando-se assim o menos atraente para a biodegradação de atrazina.
- Os dados sugerem que o solo em floresta semidecidual (FS) e os considerados mais sustentáveis (PD e LP) são os que, de fato, possuem a maior diversidade e abundância de genes relativos à biodegradação.

A partir dessas informações, espera-se colaborar com futuros estudos de bioprospecção de micro-organismos com aplicações potenciais na biorremediação de solos contaminados com o composto atrazina.



## 8. REFERÊNCIAS

- AISLABIE, J. et al. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 52, n. 2, p. 279–286, abr. 2005.
- ALBANESE, Davide et al. MICCA: a complete and accurate software for taxonomic profiling of metagenomic data. **Scientific reports**, v. 5, p. 9743, 2015.
- AMARAL, A. M.; REIS, M. S.; SILVA, F. R. O programa BLAST : guia prático de utilização. **Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia**, p. 24, 2007.
- ARMAS, E. D. **Biogeoquímica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar ( Saccharum spp.) na sub-bacia do rio Corumbataí**. Piracicaba: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações, 2006.
- ASSMANN, A. L.; SOARES, A. B.; ASSMANN, T. S. **Integração lavoura-pecuária para a agricultura familiar**, 2008.
- BAE, J. W.; PARK, Y. H. Homogeneous versus heterogeneous probes for microbial ecological microarrays. **Trends in Biotechnology**, v. 24, n. 7, p. 318–323, 2006.
- BAIRD, C.; CANN, M. **Environmental Chemistry**. New York, NY: W. H. Freeman and Company, 2012.
- BARKY, F. A. et al. Influence of Atrazine and Roundup pesticides on biochemical and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* snails. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 104, n. 1, p. 9–18, 2012.
- BELLINI, M. I. et al. Bacterial consortia from raw water and sludges from water potabilization plants are able to degrade atrazine. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 90, p. 131–139, 2014.
- BERGEY, D. H. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Proteobacteria**. New York, NY: v. 2, 2009.
- BERGEY, D. H. **Bergey's manual of systematic bacteriology: The Firmicutes**. New York, NY. v. 3, 2011.
- BHARDWAJ, P. et al. Mapping atrazine and phenol degradation genes in *Pseudomonas* sp. EGD-AKN5. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 125–134, 2015.
- BONO, J. A. M.; MACEDO, M. C. M.; TORMENA, C. A. Qualidade física do solo em um latossolo vermelho da região sudoeste dos cerrados sob diferentes sistemas de uso e manejo. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 37, n. 3, p. 743–753, 2013.
- BOUNDY-MILLS, K. L.; SOUZA, M. L. D. E.; MANDELBAUM, R. T. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp . strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway . The *atzB* Gene of *Pseudomonas* sp . Strain ADP Encodes the Second Enzyme of a Novel Atrazine Degradation Pathway †. v. 63, n. 3, p. 916–923, 1997.
- BOURGUIGNON, N. et al. Insights into the degradation capacities of *Amycolatopsis tucumanensis* DSM 45259 guided by microarray data. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 12, p. 201, 2016.

BRITO, G. C. B. et al. A importância da bioprospecção de micro-organismos em áreas contaminadas com produtos derivados do petróleo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 3, n. 3, p. 291–310, 2010.

BROCHIER-ARMANET, C.; MOREIRA, D. **Environmental Microbiology: Fundamentals and Applications**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015.

CAI, M. et al. *Rubrimonas shengliensis* sp. nov. and *Polymorphum gilvum* gen. nov., sp. nov., novel members of Alphaproteobacteria from crude oil contaminated saline soil. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 321–327, 2011.

CAMPOS, M. M. DE C. Estudo da remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela cianobactéria *Microcystis Novacekii* em condições de cultivo. **Ciências Farmacêuticas**, 2009.

CARACCILO, A. B. et al. The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine: Terbuthylazine biodegradation in groundwater. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 127–136, jan. 2010.

CASTRO-SOWINSKI, S. **Microbial Models: From Environmental to Industrial Sustainability - Google Books**. 1st. ed. Singapore: [s.n.].

CHAN, K. H.; CHU, W. Effect of humic acid on the photolysis of the pesticide atrazine in a surfactant-aided soil-washing system in acidic condition. **Water Research**, v. 39, n. 10, p. 2154–2166, 2005.

CHAUDHRY, V. et al. Insights from the draft genome of *Paenibacillus lentimorbus* NRRL B-30488, a promising plant growth promoting bacterium. **Journal of Biotechnology**, v. 168, n. 4, p. 737–738, 2013.

CHEN, K.; PACHTER, L. Bioinformatics for whole-genome shotgun sequencing of microbial communities. **PLoS Computational Biology**, v. 1, n. 2, p. 0106–0112, 2005.

CHENG, X.-Y. et al. Metagenomic analysis of the pinewood nematode microbiome reveals a symbiotic relationship critical for xenobiotics degradation. **Scientific reports**, v. 3, p. 1869, 2013.

CHUN, J. et al. *Amycolatopsis thermoflava*. n. 1 999, p. 1369–1373, 1999.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M. Isolation and screening of fungi to bioremediation from triazine herbicide contaminated soil. **Ciencia e ...**, v. 32, p. 809–813, 2008.

CONSORTIUM, T. U. The Universal Protein Resource (UniProt). **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. Database, p. D193–D197, 3 jan. 2007.

COSTA, F. S. et al. Propriedades físicas de um Latossolo Bruno afetadas pelos sistemas plantio direto e preparo convencional. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 27, n. 3, p. 527–535, 2003.

COUTINHO, CLÁUDIA F. B. et al. Pesticidas: Mecanismo De Ação, Degradação E Toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 15, n. November, 2005.

CSERHÁTI, M. et al. De novo genome project of *Cupriavidus basilensis* OR16. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2109–2110, 2012.

CSERHATI, M. et al. De Novo Genome Project of *Cupriavidus basilensis* OR16. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 8, p. 2109–2110, 15 abr. 2012.

CUADRADO, V. et al. *Cupriavidus pampae* sp. nov., a novel herbicide-degrading bacterium isolated from agricultural soil. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 11, p. 2606–2612, 2010.

- DAMIN, V. Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida 14 c-diuron em dois latossolos tratados com lodo de esgoto. p. 1–83, 2005.
- DASTAGER, S.; DEEPA, C. K.; PANDEY, A. Isolation and characterization of high-strength phenol-degrading novel bacterium of the *Pantoea* genus. **Bioremediation Journal**, v. 13, n. 4, p. 171–179, 2009.
- DE SOUZA, M. L. et al. The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1951–1954, 1998.
- DESAI, C.; PATHAK, H.; MADAMWAR, D. Advances in molecular and “-omics” technologies to gauge microbial communities and bioremediation at xenobiotic/anthropogen contaminated sites. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 6, p. 1558–1569, 2010.
- DIAS, R. L. et al. Hydrocarbon removal and bacterial community structure in on-site biostimulated biopile systems designed for bioremediation of diesel-contaminated Antarctic soil. **Polar Biology**, v. 38, n. 5, p. 677–687, 2014.
- DO CARMO, D. A. et al. Environmental behavior and toxicity of herbicides atrazine and simazine. **Ambiente e Agua - An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v. 8, n. 1, p. 445–458, 30 abr. 2013.
- DUTTA, A.; SINGH, N. Atrazine and its metabolites degradation in mineral salts medium and soil using an enrichment culture. **Environmental monitoring and assessment**, v. 188, n. 3, p. 142, 2013.
- EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.
- EEVERS, N. et al. Draft Genome Sequence of *Methylobacterium radiotolerans*, a DDE-Degrading and Plant Growth-Promoting Strain Isolated from *Cucurbita pepo*. **Genome Announcements**, v. 3, n. 3, p. e00488-15, 2015.
- FAGERIA, N. K.; STONE, L. F. Qualidade do solo e meio ambiente. p. 35, 2006.
- FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M. DE; JUNIOR, F. B. D. R. **Biotecnologia - estado da arte e aplicações na agropecuária**. 1. ed. Planaltina: E, 2011.
- FAN, X.; SONG, F. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. **Journal of Soils and Sediments**, p. 1727–1737, 2014.
- FANG, H. et al. Metagenomic analysis reveals potential biodegradation pathways of persistent pesticides in freshwater and marine sediments. **Science of the Total Environment**, v. 470–471, p. 983–992, 2014.
- FANG, H. et al. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 457–465, 2015a.
- FANG, H. et al. Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. **Journal of Hazardous Materials**, v. 286, p. 457–465, abr. 2015b.
- FAZLURRAHMAN et al. Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus* sp. strain MB-P1 from contaminated soil. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 6, p. 721–729, dez. 2009.

- FERNANDES, A. F. T. Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp . envolvidas na biodegradação da atrazina. Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp . envolvidas na biodegradação da atrazina. p. 67, 2014.
- FERREIRA, J. V. R. et al. Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura. **Cadernos UniFOA**, n. 24, p. 85–94, 2014.
- FINLEY, S. D.; BROADBELT, L. J.; HATZIMANIKATIS, V. In silico feasibility of novel biodegradation pathways for 1,2,4-trichlorobenzene. **BMC systems biology**, v. 4, n. 7, p. 1–14, 2010.
- FROST, G.; BROWN, T.; HARDING, A-H. Mortality and cancer incidence among British agricultural pesticide users. **Occupational medicine (Oxford, England)**, v. 61, n. 5, p. 303–310, 2011.
- GAO, J.; ELLIS, L. B. M.; WACKETT, L. P. The University of Minnesota Biocatalysis/Biodegradation Database: improving public access. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database, p. D488–D491, 1 jan. 2010.
- GARCÉS, R. A. G.; HANSEN, A. M.; VAN AFFERDEN, M. Mineralization of atrazine in agricultural soil: inhibition by nitrogen. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 26, n. 5, p. 844–850, 2007.
- GARCÍA MARTÍN, H. et al. Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1263–1269, 2006.
- GARCÍA-GONZÁLEZ, V. et al. Nitrogen Control of Atrazine Utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 12, p. 6987–6993, 2003.
- GLASS, Elizabeth M. et al. Using the metagenomics RAST server (MG-RAST) for analyzing shotgun metagenomes. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2010, n. 1, p. pdb. prot 5368, 2010.
- GHRAIRI, T.; BRAIEK, O. BEN; HANI, K. Detection and characterization of a bacteriocin, putadycin T01, produced by *Pseudomonas putida* isolated from hot spring water. **Apmis**, v. 123, n. 3, p. 260–268, 2015.
- GOVANTES, F. et al. Regulation of the atrazine-degradative genes in *Pseudomonas* sp. strain ADP: Regulation of atrazine biodegradation. **FEMS Microbiology Letters**, v. 310, n. 1, p. 1–8, 15 abr. 2010.
- GREENE, C. S. et al. Big data bioinformatics. **Journal of Cellular Physiology**, v. 229, n. 12, p. 1896–1900, 2014.
- GRIFFITH, M. M. **Isolation and Identification of Possible Atrazine Degraders from Middle Tennessee Soils By**. [s.l: s.n.].
- HE, Z. et al. GeoChip: a comprehensive microarray for investigating biogeochemical, ecological and environmental processes. **The ISME Journal**, v. 1, p. 67–77, 2007.
- HEBERLE, H. et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 169, 2015.
- HENSON, M. W. et al. Metabolic and genomic analysis elucidates strain-level variation in *Microbacterium* spp. isolated from chromate contaminated sediment. **PeerJ**, v. 3, p. e1395, 2015.
- HOLLAND, P. M. et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' and 3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. August, p. 7276–7280, 1991.

- HRUSKA, K.; KAEVSKA, M. Mycobacteria in water, soil, plants and air: A review. **Veterinarni Medicina**, v. 57, n. 12, p. 623–679, 2012.
- HUANG, S. et al. First Complete Genome Sequence of a Subdivision 6 *Acidobacterium* Strain. **Genome Announcements**, v. 4, n. 3, p. e00469-16, 2016.
- HUSON, D. H.; WEBER, N. **Microbial community analysis using MEGAN**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2013. v. 531
- HUSSAIN, R. et al. Cellular and biochemical effects induced by atrazine on blood of male Japanese quail (*Coturnix japonica*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 103, n. 1, p. 38–42, 2012.
- JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 1192–1201, 2007.
- JASON KRUTZ, L. et al. Agronomic and environmental implications of enhanced s-triazine degradation. **Pest Management Science**, v. 66, n. 5, p. 461–481, maio 2010.
- JENNINGS, L. K. et al. Proteomic and transcriptomic analyses reveal genes upregulated by cis-Dichloroethene in *Polaromonas* sp. strain JS666. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 11, p. 3733–3744, 2009.
- JIANG, Z. et al. **Isolation and identification of two high effective atrazine degrading microbe**. 2008 2nd International Conference on Bioinformatics and Biomedical Engineering. **Anais...IEEE**, 2008
- JOSEPH, S. J. et al. Population genomics of chlamydia trachomatis: Insights on drift, selection, recombination, and population structure. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 12, p. 3933–3946, 2012.
- KAFILZADEH, F.; FARHADI, N. Molecular identification and resistance investigation of atrazine degrading bacteria in the sediments of Karun River, Ahvaz, Iran. **Microbiology**, v. 84, n. 4, p. 531–537, 2015.
- KANEHISA, M. et al. KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D109–D114, 1 jan. 2012.
- KARNIČAR, K. et al. Integrated omics approaches provide strategies for rapid erythromycin yield increase in *Saccharopolyspora erythraea*. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 93, 2016.
- KENT, W. J. BLAT — The BLAST -Like Alignment Tool. **Genome Research**, v. 12, p. 656–664, 2002.
- KOUTSOTOLI, A D. et al. Inductive effects of environmental concentration of atrazine on *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. **Folia microbiologica**, v. 50, n. 4, p. 283–7, 2005.
- KREUTZ, L. C. et al. Exposure to sublethal concentration of glyphosate or atrazine-based herbicides alters the phagocytic function and increases the susceptibility of silver catfish fingerlings (*Rhamdia quelen*) to *Aeromonas hydrophila* challenge. **Fish and Shellfish Immunology**, v. 29, n. 4, p. 694–697, 2010.
- LAZAREVIC, V. et al. Analysis of the salivary microbiome using culture-independent techniques. **Journal of Clinical Bioinformatics**, v. 2, n. 1, p. 4, 2012.
- LEBARON, H. M.; MCFARLAND, J. E.; BURNSIDE, O. C. **The Triazine Herbicides**. San Diego, CA: Elsevier, 2008.

- LEBLANC, J. C.; GONÇALVES, E. R.; MOHN, W. W. Global response to desiccation stress in the soil actinomycete *Rhodococcus jostii* RHA1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 9, p. 2627–2636, 2008.
- LI, J. et al. Hydrolysis reaction mechanism in atrazine metabolism and prediction of its metabolites toxicities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 21, p. 4852–4863, 2014.
- LÜ, J. et al. Bioremediation: The new directions of oil spill cleanup. **Middle-East Journal of Scientific ...**, v. 7, n. 5, p. 738–740, 2011.
- MACÍAS-FLORES, A. et al. Atrazine biodegradation by a bacterial community immobilized in two types of packed-bed biofilm reactors. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, n. 12, p. 2195–2204, dez. 2009.
- MANZOOR, S. et al. Draft Genome Sequence of *Clostridium ultunense* Strain Esp, a Syntrophic Acetate-Oxidizing Bacterium. **Genome announcements**, v. 1, n. 2, p. e0010713, 2013.
- MAPELLI, V.; OLSSON, L.; NIELSEN, J. Metabolic footprinting in microbiology: methods and applications in functional genomics and biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 9, p. 490–497, 2008.
- MARTIN, E. C. Cultivation of Phylogenetically Diverse and Metabolically Novel Atrazine Degrading Soil Bacteria using Bio-Sep® Beads. 2006.
- MASOUDI-NEJAD, A.; NARIMANI, Z.; HOSSEINKHAN, N. **Next Generation Sequencing and Sequence Assembly**. 1. ed. New York, NY: Springer New York, 2013. v. 4
- MCGRATH, K. C. et al. Isolation and analysis of mRNA from environmental microbial communities. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, n. 2, p. 172–176, 2008.
- MELLO, E. S. DE; BRUM, A. L. O direito ao desenvolvimento e a produção local: O plantio direto da soja como uma alternativa de desenvolvimento econômico. v. 1, 2013.
- MENDES, L. W. et al. Soil-Borne Microbiome: Linking Diversity to Function. **Microbial Ecology**, p. 255–265, 2015.
- MESQUINI, J. A. et al. Detoxification of Atrazine by Endophytic *Streptomyces* sp. Isolated from Sugarcane and Detection of Nontoxic Metabolite. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 803–809, dez. 2015.
- MIGEOT, V. et al. Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: A historic cohort study. **Environmental Research**, v. 122, p. 58–64, 2013.
- MOBIO LABORATORIES. **POWER SOIL DNA Isolation Kit** MOBIO Laboratories, , 2013.
- MONARD, C. et al. Estimating the biodegradation of pesticide in soils by monitoring pesticide-degrading gene expression. **Biodegradation**, v. 24, n. 2, p. 203–213, 2013.
- MOREIRA, A. Composição florística e estrutura da comunidade arbórea de um fragmento de Floresta Estacional Semidecidual em Coqueiral, MG, Brasil. **Revista Brasileira de ...**, v. 11, n. 1, p. 43–51, 2013.
- MUNRO, A. W.; GIRVAN, H. M.; MCLEAN, K. J. Variations on a (t)heme - novel mechanisms, redox partners and catalytic functions in the cytochrome P450 superfamily. **Natural Product Reports**, v. 24, n. 3, p. 585–609, 2007.

- NAGY, I. et al. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (S-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain NI86/21. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, n. 5, p. 2056–2060, 1995.
- NAKAGAWA, L. et al. Comportamento da atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 471–476, 1995.
- NGIGI, A. N. et al. Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. **J Environ Sci Health B**, v. 47, n. 8, p. 769–778, 2012a.
- NGIGI, A. N. et al. Biodegradation of s-triazine herbicide atrazine by *Enterobacter cloacae* and *Burkholderia cepacia* sp. from long-term treated sugarcane-cultivated soils in Kenya. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 47, n. 8, p. 769–778, set. 2012b.
- NIE, Y. et al. The genome sequence of polymorphum gilvum SL003B-26A1 T reveals its genetic basis for crude oil degradation and adaptation to the saline soil. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- NOUSIAINEN, A. **Application of genomic tools in bioremediation of atrazine contaminated soil and groundwater**. [s.l: s.n.].
- OLIVEIRA, J. L. DA M. **Comportamento do dicofol e da atrazina nos processos de tratamento de esgoto por lodo ativado e de pós-tratamento de lodo por biodigestores anaeróbios**. Rio de Janeiro: UFRJ, 2009.
- PALMA, P. et al. Acute Toxicity of Atrazine, Endosulfan Sulphate and Chlorpyrifos to *Vibrio fischeri*, *Thamnocephalus platyurus* and *Daphnia magna*, Relative to Their Concentrations in Surface Waters from the Alentejo Region of Portugal. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, n. 5, p. 485–489, nov. 2008.
- PARKS, D. H. et al. STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. **Bioinformatics**, v. 30, n. 21, p. 3123–3124, 2014.
- PARKS, D. H.; BEIKO, R. G. Identifying biologically relevant differences between metagenomic communities. **Bioinformatics**, v. 26, n. 6, p. 715–721, 2010.
- PENG, Y. et al. IDBA-UD: A de novo assembler for single-cell and metagenomic sequencing data with highly uneven depth. **Bioinformatics**, v. 28, n. 11, p. 1420–1428, 2012.
- PEREIRA, B. A. DA S.; VENTUROLI, F.; CARVALHO, F. A. Florestas Estacionais No Cerrado: Uma Visão Geral. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 41, n. 3, p. 446–455, 2011.
- PETZSCH, P. et al. Genome sequence of the acidophilic sulfate-reducing \*Peptococcaceae\* strain CEB3. **Genome Announcements**, v. 3, n. 4, p. e00886-15, 2015.
- PEVSNER, J. **Bioinformatics and Functional Genomics**. Singapore: John Wiley & Sons Inc, 2009. v. 1
- PIRES, R. et al. Manejo de plantas de cobertura antecessoras à cultura da soja em plantio direto. **Revista Ceres**, v. 55, n. 2, p. 94–101, 2008.
- PORTILHO, I. I. R. **Degradação de agrotóxicos em solos sob diferentes sistemas de manejo com a atividade microbiana**. Dourados, MS: Editora UEMS, 2013.
- PYLRO, Victor Satler et al. Brazilian microbiome project: revealing the unexplored microbial diversity—challenges and prospects. **Microbial ecology**, v. 67, n. 2, p. 237–241, 2014.

- RAMANATHAN, T.; TING, Y. P. Selective Copper Bioleaching by Pure and Mixed Cultures of Alkaliphilic Bacteria Isolated from a Fly Ash Landfill Site. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 226, n. 11, 2015.
- RAMETTE, A. Multivariate analyses in microbial ecology. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 62, n. 2, p. 142–160, 2007.
- RHO, M.; TANG, H.; YE, Y. FragGeneScan: Predicting genes in short and error-prone reads. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 20, p. 1–12, 2010.
- RIAH, W. et al. Effects of pesticides on soil enzymes: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 12, n. 2, p. 257–273, 2014.
- RIBAS, P. P. P.; MATSUMURA, A. T. S. A. A química dos agrotóxicos : impacto sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato, Novo Hamburgo**, v. 10, n. 14, p. 149–158, 2009.
- RIGOTTO, R. M.; VASCONCELOS, D. P. E.; ROCHA, M. M. Uso de agrotóxicos no Brasil e problemas para a saúde pública. **Caderno de Saúde Pública**, v. 30, n. 7, p. 1–3, 2014.
- ROMEY, A. A.; HENDAWI, M. Y. Bioremediation of certain organophosphorus pesticides by two biofertilizers, *Paenibacillus* (*Bacillus*) *polymyxa* (Prazmowski) and *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck). **Journal of Agricultural Science and Technology**, v. 16, n. 2, p. 265–276, 2014.
- ROSENBERG, E. et al. (EDS.). **The Prokaryotes: Gammaproteobacteria**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- SAJJAPH, K. et al. *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 7, p. 4402–4407, 2004.
- SALAR, R. K. et al. (EDS.). **Biotechnology: Prospects and Applications**. New Delhi: Springer India, 2013.
- SANTANA, V. S.; MOURA, M. C. P.; NOGUEIRA, F. F. E. Mortalidade por intoxicação ocupacional relacionada a agrotóxicos, 2000-2009, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 47, n. 3, p. 598–606, 2013.
- SATSUMA, K. et al. Characterization of a *Nocardioide*-based, atrazine-mineralizing microbial colony isolated from Japanese riverbed sediment. **Journal of Pesticide Science**, v. 31, n. 4, p. 420–423, 2006.
- SCHMIEDER, R.; EDWARDS, R. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. **Bioinformatics**, v. 27, n. 6, p. 863–864, 2011.
- SEFFERNICK, J. L. et al. Defining sequence space and reaction products within the cyanuric acid hydrolase (*AtzD*)/barbiturase protein family. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 17, p. 4579–4588, 2012.
- SENE, L. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487–496, 2010.
- SHI, G. et al. Complete genome sequence and comparative genome analysis of a new special *Yersinia enterocolitica*. **Archives of Microbiology**, v. 198, n. 7, p. 673–687, 2016.
- SHIRI, M. A. Isolation of Atrazine Degrading Bacteria in Semi-Salinity Medium. v. 4, n. 3, 2016.

- 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, J. M. DA et al. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 10, n. 4, p. 891–903, 2005.
- SINGH, D. P. et al. Evaluation of toxicological impact of cartap hydrochloride on some physiological activities of a non-heterocystous cyanobacterium *Leptolyngbya foveolarum*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 110, n. 1, p. 63–70, 2014.
- SINGH, P.; SURI, C. ; CAMEOTRA, S. S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 317, n. 3, p. 697–702, maio 2004.
- SINGH, R. L. (ED.). **Principles and Applications of Environmental Biotechnology for a Sustainable Future**. [s.l.] Springer Science, 2017.
- SOLOMON, R. D. J.; KUMAR, A.; SATHEEJA SANTHI, V. Atrazine biodegradation efficiency, metabolite detection, and *trzD* gene expression by enrichment bacterial cultures from agricultural soil. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 14, n. 12, p. 1162–72, 2013.
- SOUZA, R. C. et al. Metagenomic analysis reveals microbial functional redundancies and specificities in a soil under different tillage and crop-management regimes. **Applied Soil Ecology**, v. 86, p. 106–112, 2015.
- SPROCATI, A. R. et al. Effectiveness of a microbial formula, as a bioaugmentation agent, tailored for bioremediation of diesel oil and heavy metal co-contaminated soil. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 11, p. 1649–1655, 2012.
- STAMPER, D. M. et al. *Ralstonia basiliensis* M91-3, a denitrifying soil bacterium capable of using s-triazines as nitrogen sources. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 12, p. 1089–1098, 2002.
- STELTING, S. et al. Immobilization of *Pseudomonas* sp. strain ADP: A stable inoculant for the bioremediation of atrazine. **Applied Clay Science**, v. 64, p. 90–93, 2012.
- STOYTCHIEVA, M. **Pesticides in the modern world – pests control and pesticides exposure**. [s.l.: s.n.].
- SWISSA, N. et al. Biofilter based on a biofilm immobilized on geo-textile sheets for rapid atrazine biodegradation. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 105, p. 146–152, 2015.
- TECHTMANN, S. M.; HAZEN, T. C. Metagenomic applications in environmental monitoring and bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, p. 1–10, 2016.
- TRINGE, S. G. Comparative Metagenomics of Microbial Communities. **Science**, v. 308, n. 5721, p. 554–557, 22 abr. 2005.
- TUBEA, B.; HAWXBY, K.; MEHTA, R. The effects of nutrient, pH and herbicide levels on algal growth. **Hydrobiologia**, v. 79, n. 3, p. 221–227, 1981.
- UDI KOVIC-KOLIC, N. et al. Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 1, p. 355–367, 2010.
- VANCOV, T. et al. Enhancing cell survival of atrazine degrading *Rhodococcus erythropolis* NI86/21 cells encapsulated in alginate beads. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 212–220, 2007.

- VANCOV, T.; JURY, K.; VAN ZWIETEN, L. Atrazine degradation by encapsulated *Rhodococcus erythropolis* NI86/21. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 767–775, 2005.
- VEIGA, M. M. Agrotóxicos: eficiência econômica e injustiça socioambiental. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 145–152, 2007.
- VIEIRA, E. M. et al. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4d) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 305–308, 1999.
- VILLEGAS, L. B. et al. Bioremediation in Latin America. **Bioremediation in Latin America: Current Research and Perspectives**, p. 135–148, 2014.
- WACKETT, L. et al. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: From enzymes to field studies. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, n. 1, p. 39–45, 2002.
- WANG, Q.; XIE, S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 71, p. 61–66, 2012.
- WHEELER, D. L. et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. SUPPL. 1, p. 5–12, 2007.
- XIONG, J. **Essential bioinformatics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.
- YASUHIRA, K. et al. Genetic organization of nylon-oligomer-degrading enzymes from alkalophilic bacterium, *Agromyces* sp. KY5R. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 104, n. 6, p. 521–4, 2007.
- YERGEAU, E. et al. Metagenomic analysis of the bioremediation of diesel-contaminated canadian high arctic soils. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.
- ZAFRA, G. et al. Comparative metagenomic analysis of PAH degradation in soil by a mixed microbial consortium. **Journal of Hazardous Materials**, n. 55, p. 1–9, 2016.
- ZHANG, Y. et al. Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 65, n. 8, p. 1140–1144, 2011.
- ZHANG, Y. et al. Optimization of Fermentation Medium for the Production of Atrazine Degrading Strain *Acinetobacter* sp. DNS 3 2 by Statistical Analysis System. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, p. 1–7, 2012.
- ZVELEBIL, M.; BAUM, J. O. **Understanding Bioinformatics**. New York, NY: Taylor & Francis Group, 2008.