

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

Alisson Alves da Silva

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO  
DE ATRAZINA EM LAVOURAS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO ESTADO DO  
MATO GROSSO DO SUL**

DOURADOS

2014

ALISSON ALVES DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO  
DE ATRAZINA EM LAVOURAS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO ESTADO DO  
MATO GROSSO DO SUL**

**Trabalho de Conclusão de Curso de  
graduação apresentado para  
obtenção do grau de bacharel em  
Biotecnologia. Faculdade de  
Ciências Biológicas e ambientais.  
Universidade Federal da Grande  
Dourados. Orientador: Prof. Dr.  
Maricy Raquel Lindenbah Bonfá**

DOURADOS

2014

ALISSON ALVES DA SILVA

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS COM POTENCIAL DE DEGRADAÇÃO  
DE ATRAZINA EM LAVOURAS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO ESTADO DO  
MATO GROSSO DO SUL**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para  
obtenção do título de bacharel em biotecnologia na Universidade Federal da  
Grande Dourados, pela comissão formada por:

---

Orientador: Profa. Dra. Maricy R. L. Bonfá  
FCBA - UFGD

---

Prof. Dr. Rodrigo Matheus Pereira  
FCBA - UFGD

---

Msc. Fabiana Gomes da Silva  
FCBA-UFGD

**Dourados, 2014**

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de cursar uma faculdade e por todas as portas que ele permitiu que se abrissem para mim, por todas as forças que me foram dadas e por todas as pessoas incríveis que foram colocadas no meu caminho.

Aos meus pais, que tenho muito orgulho que tanto trabalharam e se esforçaram pra proporcionar a oportunidade de concluir a graduação. Por todo o apoio dado nos momentos de desânimo e cansaço. Aos meus irmãos Robson Alves e Anderson Alves com os quais sempre pude contar.

Aos meus avós que desde o começo da graduação me acolheram com todo o carinho e atenção do mundo, e nunca negaram ajuda, à eles um obrigado todo especial.

À minha família como um todo, por me aturar em suas casas. Aos meus tios Roberto Boico, Noeli Alves Boico e Ivanete Alves com os quais sempre pude contar. Em especial as minhas primas Anyele Alves, Camila Alves Boico, Letícia Rodrigues Alves que sempre estiveram ao meu lado por todos esses anos, obrigado pela companhia, pelas risadas e pela amizade de vocês.

Aos meus grandes amigos enviados por Deus, pois foram especialmente colocados em meu caminho pelo fato de combinarmos em quase tudo, gostos, jeitos, vontades e o melhor de tudo na simpatia e alegria de viver e por enxergarem o lado bom das coisas em diversos momentos, obrigado pelos sorrisos, e pela companhia: Ândrea Renata, Camila Dantas, Ana Paula, Jéssica Lie, Jéssica Celeste e Milena Mariano.

À terceira turma de biotecnologia, que se tornou também minha família ao longo desses quatro anos, cuja união é inquestionável.

A minha orientadora Maricy Raquel L. Bonfá, pelo conhecimento passado, pelas oportunidades que me foram dadas e por toda paciência e dedicação em ensinar, sempre buscando rotas alternativas para a resolução dos nossos problemas, sendo um exemplo de determinação e força para alcançarmos nossos objetivos.

A Gleyce Ellen de Almeida e aos meus colegas de laboratório, pelos trabalhos em conjunto.

A Universidade Federal da Grande Dourados, pelo espaço e tempo disponível para a realização do projeto e pela assistência e suporte oferecido pela universidade ao acadêmico.

**Dedico aos meus pais, que sempre se esforçaram pra dar o melhor para mim e aos meus irmãos e que se fazem presentes em minha vida independente da distância ou do tempo, torcendo pela minha vitória e acreditando em minhas conquistas.**

## RESUMO

Com o aumento no consumo de alimentos no mundo existe a necessidade de aumento no número de locais para o cultivo e produção em grande escala destes alimentos. No caso do Estado de Mato Grosso do Sul ocorre uma grande expansão canavieira, devido ao seu potencial de recursos naturais e o apoio ao setor produtivo. Além da necessidade de aumento destas áreas agrícolas, as mesmas precisam de uma produção eficiente, livre do ataque de insetos praga e ervas daninhas que danifiquem a plantação diminuindo a produção final. Neste sentido existe a necessidade da utilização de herbicidas para evitar o crescimento de ervas daninhas, estes herbicidas por sua vez são altamente poluentes ao meio ambiente, contaminando solos e águas subterrâneas. Este trabalho teve por objetivo a bioprospecção de bactérias com potencial de crescimento em atrazina, um herbicida utilizado em lavoura de cana-de-açúcar, além do estudo do metabolismo deste composto *in silico*. Foram coletadas amostras de solo de duas fazendas do Estado de Mato Grosso do Sul com histórico de uso deste herbicida. As amostras de solo coletadas foram enriquecidas com o herbicida atrazina e a partir destas amostras foram obtidos dezoito isolados bacterianos em meios de cultivo contendo 0,1% deste herbicida, dos dezoito isolados apenas onze apresentaram crescimento significativo após repiques sucessivos, com os quais realizou-se caracterização bioquímica e morfológica, e curvas de crescimento com os quatro isolados que melhor apresentaram crescimento nas placas de Petri, mensurou-se este crescimento através do aumento da absorbância a 600nm. A partir dos resultados obtidos verificou-se que a bioprospecção de bactérias em lavouras com histórico de utilização do herbicida atrazina permitem o isolamento de micro-organismos com potencial de metabolização deste xenobiótico. Em paralelo um trabalho *in silico* foi realizado através da utilização de ferramentas de bioinformática para a construção de árvores filogenéticas com o objetivo de analisar a variação de genes envolvidos na biodegradação da atrazina, onde foi possível observar esta variabilidade genética existente entre os genes, a partir de micro-organismos de diferentes filos encontrados no banco de dados da NCBI.

**Palavras-chave:** Contaminação, meio ambiente, herbicida, degradação.

## Sumário

1. INTRODUÇÃO .....	9
2. OBJETIVOS .....	12
2.1. Geral.....	12
2.2. Específicos .....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	13
3.1. Solo .....	13
3.2. Agroquímicos .....	13
3.2.1. Atrazina .....	15
3.3. Bioprospecção e biorremediação.....	16
3.4. Bioinformática.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	22
4.1. Coleta de amostras .....	22
4.2. Enriquecimento das amostras.....	22
4.3. Isolamento de micro-organismos .....	22
4.4. Caracterização pré-eliminar morfológica e bioquímica .....	24
4.4.1. Coloração de Gram.....	24
4.4.2. Catalase .....	25
4.4.3. Oxidase.....	26
4.5. Teste de crescimento .....	26
4.6. Construção de árvores filogenéticas a partir do gene da atrazine chlorohydrolase (AtzA) .....	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	29
5.1. Isolamento de bactérias .....	29
5.2. Caracterização pré-eliminar morfológica e bioquímica .....	30
5.3. Teste de crescimento dos isolados em atrazina .....	31
5.4. Árvore filogenética – gene codificador da enzima atrazine chlorohydrolase em bactérias .....	34
6. CONCLUSÃO .....	37
7. REFERÊNCIAS .....	38

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente, existe uma grande demanda por alimentos no Brasil e no mundo, surgindo assim extensas áreas agrícolas para suportar esta demanda, nessas áreas agrícolas podem surgir pragas, ervas daninhas, micro-organismos que danificam as plantações e causam prejuízos para seus produtores. Para controlar essas pragas, os produtores utilizam-se de pesticidas, que por um lado são capazes de controlar as pragas, mas por outro causam prejuízos ao ambiente.

Com a expansão agrícola observada nos últimos anos tem-se notado também um aumento no uso dos agrotóxicos que são os compostos mais amplamente encontrados em corpos hídricos superficiais e subterrâneos no mundo todo. São em sua maioria moléculas xenobióticas, ou seja, que não se encontra naturalmente no meio ambiente, incluem uma variedade de moléculas com diferentes características que resultam em distintos graus de recalcitrância (persistência ambiental) e mobilidade, além de potencial tóxico, carcinogênico, mutagênico e teratogênico, podendo ainda provocar efeitos endócrinos a diversos organismos não alvos, inclusive ao Homem (ARMAS, 2006).

No caso específico do Estado de Mato Grosso do Sul tem ocorrido uma grande expansão canavieira, devido ao seu potencial de recursos naturais e a infraestrutura moderna voltada para o apoio ao setor produtivo, que alavancam investimentos nas atividades agroindustriais e de expansão do intercâmbio comercial (GUIMARÃES et al., 2010). Porém, pesquisas sugerem uma perda na diversidade biológica, causando inclusive o aparecimento de pragas agrícolas devido tanto à prática do sistema de monoculturas quanto ao uso dos pesticidas (CYCÓN; SEGET-PIOTROWSKA, 2009).

Neste contexto, um dos herbicidas bastante utilizado em lavouras de cana-de-açúcar é a atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) faz parte da família das triazinas, intensamente utilizadas no Brasil e no mundo, sendo frequentemente detectado como o principal poluente orgânico de águas subterrâneas e superficiais em vários países (DÖRFLER et al., 1997).

Devido à semelhança de muitas substâncias xenobióticas com compostos naturalmente presentes nos ambientes, estas moléculas podem ser biodegradadas. A

atividade microbiana é o fator preponderante na determinação da velocidade e extensão de degradação dos pesticidas no solo (SILVA, 2001). As condições do ambiente que favorecem o desenvolvimento microbiano no solo são as mesmas que favorecem a degradação de pesticidas: temperatura, umidade e aeração. Os micro-organismos do solo, principalmente bactérias e fungos, têm sido relatados como os principais degradadores de pesticidas (MONTEIRO, 2001).

A maioria dos agrotóxicos é transformada predominantemente por processos biológicos através de enzimas existentes em animais, plantas e micro-organismos (SEMPLE e FERMOR, 1995). As transformações bióticas dos agrotóxicos geralmente resultam na degradação da estrutura molecular em formas mais simples (CHENG, 1990).

Os micro-organismos exibem duas estratégias ecológicas para a assimilação do substrato ou metabolismo: mineralização e cometabolismo. Na primeira, o substrato absorvido é quebrado em pequenas moléculas, as quais são posteriormente metabolizadas em rotas que geram energia. Nesse caso, a biomassa microbiana aumenta às expensas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. A mineralização significa que a molécula é degradada completamente formando moléculas inorgânicas de ocorrência universal como:  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HCl}$ . Ao contrário da mineralização, no cometabolismo não há geração de energia. Os pesticidas são transformados pelas rotas metabólicas que contém enzimas com alta especificidade de substrato. O resultado é um metabólito que poderá ser degradado posteriormente ou poderá ligar-se à matriz orgânica (MONTEIRO, 2001).

Uma ferramenta importante nos estudos de genes que codificam enzimas envolvidas na biodegradação de xenobióticos é a bioinformática. Através dela podemos estudar a fundo as composições e organizações genéticas dos micro-organismos e suas variações. O banco de dados da NCBI (National Center for Biotechnology Information) nos fornece muitas informações a respeito dos organismos, como sequências de genes específicos ou genomas completos dos organismos. Estas ferramentas e informações permitem estabelecer filogenias e entender a dinâmica das comunidades microbianas, através de análises filogenéticas que demonstram a história evolutiva dos organismos. Hoje, a bioinformática tem sido utilizada em diversas áreas como a construção de banco de dados e a mineração de dados; análises de sequências; para identificar gene, prever suas funções e demonstrar relações entre genes e proteínas; prever a conformação

tridimensional das proteínas; construir árvores filogenéticas e modelos evolutivos; construir bibliotecas genômicas; estudar as funções biológicas; design de drogas entre muitas outras (SANTOS, 2010).

Levando em consideração as estratégias de degradação de pesticidas e a diversidade de micro-organismos com este potencial, os estudos nesta área são de grande importância. Os estudos de diversidade microbiana têm sido realizados baseados tanto em técnicas dependentes, quanto independentes de cultivo (WETLER-TONINI et al., 2011).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Bioprospecção e estudo do metabolismo de bactérias com potencial de degradação do pesticida atrazina utilizado em lavouras de cana-de-açúcar no Estado de Mato Grosso do Sul.

### **2.2. Específicos**

- Isolar através de métodos de cultivo bactérias capazes de crescer no pesticida atrazina como fonte de nitrogênio;
- Isolar através de métodos de cultivo bactérias capazes de crescer no pesticida atrazina em processo cometabólico, utilizando-se fontes secundárias de carbono e energia;
- Avaliar o crescimento dos isolados nos pesticidas estudados;
- Analisar a variação e a filogenia do gene codificador da enzima atrazine chlorohydrolase responsável pela degradação da atrazina.

### **3. REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1. Solo**

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

A microbiota do solo é responsável pela transformação da matéria orgânica através de reações bioquímicas, além de atuar na fixação de nitrogênio, na ciclagem de nutrientes, na desintoxicação de poluentes e na purificação do ar e da água, os quais são processos importantes para a manutenção da qualidade do solo (SILVEIRA e FREITAS, 2007).

Embora o solo seja capaz de absorver uma ampla quantidade de contaminantes sem sofrer grandes transformações, com o passar do tempo estas são quase sempre irreversíveis e os danos causados ao ambiente são de difícil recuperação (STEFFEN et al., 2011).

#### **3.2. Agroquímicos**

A Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada através do Decreto 4.074, no seu Artigo 1º, Inciso IV, define o termo agrotóxico da seguinte forma: “Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Os agrotóxicos começaram a ser usados em escala mundial após a Segunda Grande Guerra (DAMS, 2006). No Brasil, o uso de pesticidas teve um aumento considerável a partir da década de 70, quando o país adotou o pacote agrícola intitulado

"Revolução Verde", como forma de buscar o aumento imediato de produtividade (UETA et al., 2001).

O aumento da população mundial e a demanda crescente por alimentos incentivaram o agronegócio e motivaram a agricultura a implementar processos de mecanização e o emprego de agroquímicos em geral. Ao longo dos anos, a agricultura mundial cresceu em área cultivada e produtividade acompanhada pelo uso intenso de pesticidas, adubos químicos e outras substâncias sintéticas (ARMAS e MONTEIRO, 2005). Utilizam-se, por exemplo, pesticidas, que são produtos utilizados na agricultura para o controle de pragas, doenças e plantas daninhas, visando o aumento da produtividade, melhoria na qualidade do produto e a redução do trabalho e gastos, de um ponto de vista econômico, esse aumento só traz benefícios à sociedade, no entanto, o meio ambiente invariavelmente é afetado (SOUZA, 2011).

No Brasil, a expansão de área plantada de cana-de-açúcar, impulsionada pela demanda crescente do etanol como matriz energética nacional, é acompanhada pelo aumento do consumo de insumos específicos para a cultura. Os herbicidas compõem a classe de agroquímicos mais utilizados na cultura de cana-de-açúcar (ARMAS et al., 2005).

Os pesticidas podem ser classificados em função de vários aspectos que os diferenciam em classes. Por exemplo, de acordo com o tipo de peste que controlam: algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outros (USEPA, 2009). Os herbicidas são compostos orgânicos, quimicamente sintetizados, utilizados na agricultura para o controle de ervas daninhas, e, geralmente, incorporados diretamente ao solo. Nas últimas décadas o crescimento na utilização de herbicidas em solos agricultáveis brasileiros tem sido muito acentuado, principalmente devido às extensas culturas de cana-de-açúcar. Uma classe de herbicidas muito utilizados neste tipo de cultura são as s-triazinas (KHAN, 1980).

Dentre os herbicidas mais utilizados na agricultura, a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina), um herbicida da classe dos triazínicos, é usada intensivamente no controle de ervas daninhas em pré ou pós emergência, principalmente em culturas de cana-de-açúcar, milho, e soja (ANVISA).

As triazinas pertencem ao grupo de herbicidas inibidores do fotosistema II. Atuam na membrana do cloroplasto em que ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLET et al., 2004).

### 3.2.1. Atrazina

A atrazina [2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina, CAS N° 1912-24-9, pertence à classe química das triazinas, sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (COLLA et al., 2008). A atrazina é um dos herbicidas mais utilizados no Brasil e no mundo e é comumente utilizado em uma grande variedade de culturas, tais como soja, milho, sorgo e cana-de-açúcar (GAO et al., 2011). A Figura 1 apresenta a estrutura química da atrazina.

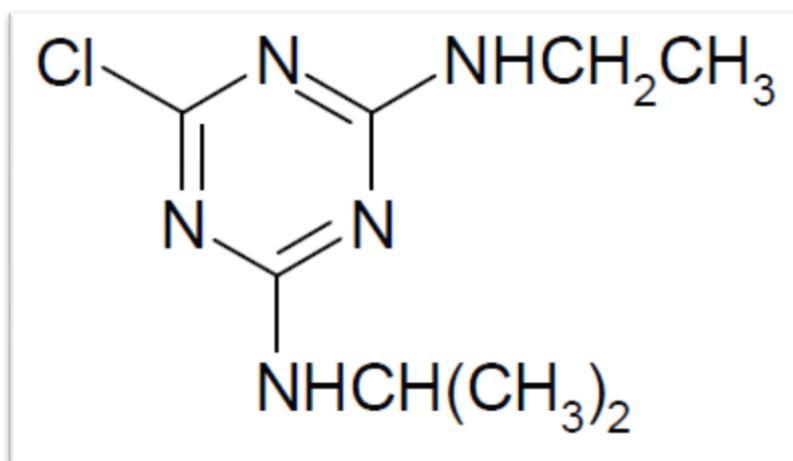


Figura 01. Estrutura química da atrazina.

A atrazina foi patenteada na Suíça em 1958 e registrada para uso comercial nos Estados Unidos em 1959 (UETA et al., 2001). Este herbicida é mundialmente utilizado, muitas vezes em combinação com outros herbicidas (CHAN e CHU, 2005).

Estudos de persistência de atrazina mostram que após anos da última aplicação deste herbicida ainda foram detectados concentrações em média quatro vezes maiores em superfície comparado a superfícies do solo (0-10 cm), indicando elevado risco de contaminação de águas subterrâneas, mesmo após 22 anos de exposição desse herbicida (JABLONOWSKI et al. 2009).

Após a aplicação, a atrazina pode-se tornar um contaminante potencial de aquíferos baseado em suas características físico-químicas, como: alto potencial de

escoamento, persistência no solo, hidrólise lenta, baixa pressão de vapor, solubilidade em água baixa a moderada, absorção moderada pela matéria orgânica e pela argila (UETA et al., 1999). No entanto a meia-vida desse herbicida é variável em função do tipo de solo e da condição climática (QUEIROZ e MONTEIRO, 2000). A mobilidade desse composto pode ser influenciada pelas condições climáticas como índice pluviométrico e temperatura, bem como as características intrínsecas do solo (CANUTO et al., 2010). Dependendo de suas características podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea (CABRERA et al., 2008).

A toxicidade potencial da atrazina tem motivado pesquisas direcionadas para a sua biorremediação. Esta técnica tem sido considerada a metodologia de escolha para a recuperação de áreas comprometidas devido ao potencial de metabolização dos microorganismos, custo relativamente baixo e reduzido impacto ambiental (RALEBITSO, 2002).

A atrazina assim como a maioria dos agrotóxicos é transformada predominantemente por processos biológicos através de enzimas existentes nos microorganismos (SEMPLE e FERMOR, 1995). As transformações bióticas dos agrotóxicos geralmente resultam na degradação da estrutura molecular em formas mais simples (CHENG, 1990).

### **3.3. Bioprospecção e biorremediação.**

A remoção e/ou degradação de diversos poluentes orgânicos xenobióticos no ambiente não é um processo simples (CARMO et al., 2013). Uma vez que a contaminação ambiental já tenha ocorrido, a prevenção de novas fontes de poluição e a remediação do ambiente contaminado tornam-se estratégias fundamentais para garantir a sustentabilidade ambiental. As técnicas de recuperação ambiental têm como objetivo a completa degradação dos poluentes, ou, pelo menos, a diminuição de sua concentração até níveis aceitáveis ou sua conversão a substâncias de menor toxicidade, reduzindo os danos ambientais e preservando a saúde humana (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997; VIDALI, 2001; CAMPOS, 2009).

A preocupação com o meio ambiente e sua degradação tem levado ao desenvolvimento de novas tecnologias, as quais promovem a recuperação ou a

remediação de áreas contaminadas com a utilização de micro-organismos, plantas ou mesmo enzimas (DAMS, 2006).

As bactérias possuem uma versatilidade muito grande no que diz respeito aos processos metabólicos e os ambientes onde vivem. Esses micro-organismos são capazes de sobreviver em condições químicas e físicas extremas, sendo possível encontrá-los nos mais variados meios. Por serem capazes de utilizar outros compostos além do oxigênio para o processo de respiração, as bactérias influenciam o comportamento de elementos químicos; como moléculas orgânicas e os metais. Assim, elas podem ser consideradas como agentes primários das mudanças geoquímicas, devido ao seu alto potencial metabólico e grande capacidade de adaptação que lhe confere uma larga e abundante distribuição (MOREIRA, 2013).

A busca de cepas microbianas capazes de degradar é fundamental para o desenvolvimento de processos de biorremediação, como ferramentas corretivas para resolver os atuais problemas do uso irracional de agrotóxicos. Numerosos estudos estão sendo realizados sobre a degradação de pesticidas por micro-organismos, estes estudos têm como objetivo isolar e caracterizar espécies microbianas com elevada capacidade de remover diferentes grupos de pesticidas (LÓPEZ et al., 2005). A biodegradação da atrazina pode variar de acordo com o tipo de solo, microbiota presente e disponibilidade de nutrientes como carbono e nitrogênio (HUNTER e SHANER, 2010).

Uma forma muito utilizada de localizar e descobrir o potencial desses micro-organismos degradadores de pesticidas é utilizando a bioprospecção, podemos destacar como vantagens da bioprospecção propiciar conhecimento da biodiversidade e seu potencial biotecnológico e fornecer substâncias importantes ao homem, através das atividades bioquímicas (FERREIRA, 2012).

A bioprospecção pode ser definida como o método ou forma de localizar, avaliar e explorar sistemática e legalmente a diversidade de vida existente em determinado local tem como objetivo principal a busca de recursos genéticos e bioquímicos para fins comerciais (FARNSWORTH, 1977; REID, 1993).

Dentro dos produtos da bioprospecção de seres vivos encontra – se a de micro-organismos com potencial biotecnológico para biorremediação. A biorremediação é definida como um processo tecnológico pelo qual sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental, reduzindo a concentração dos

poluentes a níveis considerados seguros, por meio da degradação destes compostos. Os sistemas biológicos mais utilizados na biorremediação são os microbiológicos, principalmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (ESPOSITO, 2004).

No solo, a degradação da atrazina é resultado principalmente da atividade microbiana. Uma grande variedade de micro-organismos é capaz de degradar a atrazina levando à formação e acumulação de seus metabólitos (SCHEUNERT, 1992; HICKEY et al., 1994), enquanto outros micro-organismos obtêm nutrientes e energia pela completa mineralização da atrazina a dióxido de carbono e água, incluindo diversas bactérias como espécies de *Nocardia* (TOPP et al., 2000), *Pseudomonas* (YANZE-KONTCHOU e GSCHWIND, 1994) e agrobactérias (STRUTHERS et al., 1998).

No caso da atrazina, a rota metabólica de degradação ocorre pela presença do gene *AtzA* no genoma das bactérias que codifica a enzima *AtzA* que inicia o processo, a enzima apresenta a atividade de desalogenação convertendo a atrazina em hidroxiatrazina (metabólito não-fitotóxico) (BOUNDY-MILLS et al., 1997), que é o primeiro intermediário da via de degradação (DE SOUSA, 1996). 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* (SOUZA et al., 1998).

Em estudos envolvendo bactérias, as linhagens de *Pseudomonas* sp. ADP são consideradas referências nos estudos das rotas de degradação da atrazina. Essas bactérias possuem genes denominados *atzA*, *atzB*, *atzC* e *atzD*, que codificam enzimas responsáveis pela mineralização do composto (MANDELBAUM et al., 1995; RALEBITSO et al., 2002). Conforme representado na Figura 2.

A partir dos micro-organismos selecionados pela bioprospecção, podemos biorremediar áreas contaminadas, pois a biorremediação é uma ferramenta importante na biotecnologia, pois propicia um aumento na biodegradação já existente no solo, provocando um aumento da atividade microbiana degradadora. É considerado um método natural e relativamente simples, menos agressivo e mais adequado para a manutenção do equilíbrio ecológico, além do baixo custo quando comparados às alternativas físicas e físico-químicas (BRITO, 2010).

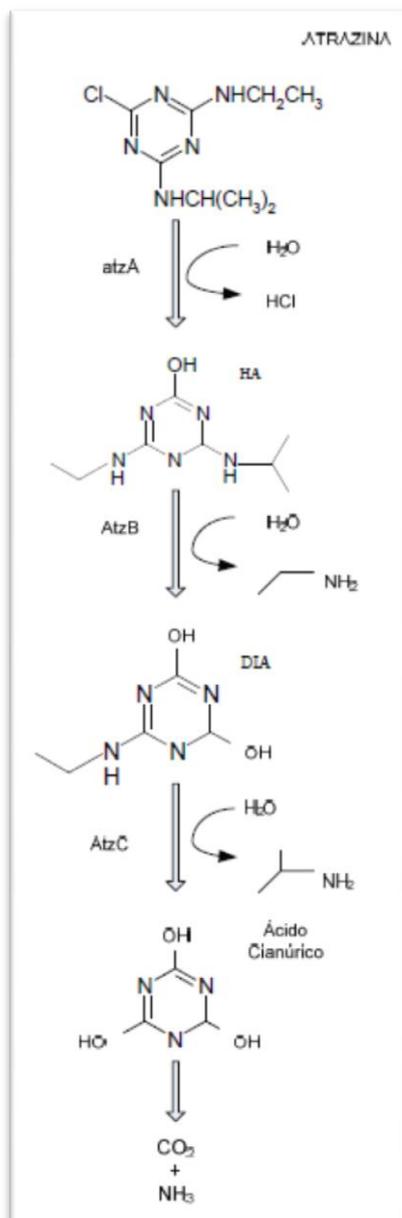


Figura 02. Rota de degradação da atrazina por bactérias.

### 3.4. Bioinformática

A bioinformática é a ciência que utiliza a informática, a estatística e a matemática aplicados à biologia molecular. O termo “Bioinformática” foi primeiramente usado por Pauline Hogeweg em 1979 para estudos de processos de informática em estudos de biologia sistematica. Desde então o seu principal uso tem sido nos ramos da genética e da genômica em especial para auxiliar no manejo da

grande quantidade de dados gerado no sequenciamento de DNA, RNA e aminoácidos (SANTOS, 2010).

A filogenia é um ramo da ciência que procura estabelecer as relações evolutivas ou de parentesco presentes em um grupo de táxons. Os táxons ou as unidades taxonômicas operacionais podem ser qualquer nível taxonômico onde a história evolutiva é passível de verificação. As árvores são representações gráficas das relações entre as unidades taxonômicas. Os nós terminais das árvores filogenéticas, que se encontram nas extremidades, correspondem aos táxons, enquanto que os nós mais internos correspondem aos ancestrais comuns. A conexão de mais de três ramos a um único nó é denominada como uma politomia, e quando há três ramos conectados a um nó temos a representação de uma dicotomia. As árvores bifurcadas podem ser enraizadas ou não, ou seja, quando a árvore aponta para uma espécie ancestral comum a todo o grupo ela é tida como enraizada. A árvore sem raiz não define o caminho evolutivo, apenas agrupa os táxons relacionados. Segundo (EISEN E HANAWALT, 1999) e (PHILLIPS et al., 2000) e (VINUESA et al., 2005) é fundamental que alguns aspectos sejam considerados:

1. Uma amostra com maior número de grupos taxonômicos utilizada para inferência filogenética é melhor do que uma amostra pequena, pois reduz a probabilidade da filogenia estar sendo determinada por substituições raras que não refletem a história evolutiva;
2. Os genes homólogos parálogos, ou seja, originários de uma duplicação, podem ajudar a identificar a origem dos genes. Eles não são indicados para a reconstrução de filogenia das espécies;
3. Os genes homólogos ortólogos surgem através de um evento de especiação de maneira que os mesmos passem a ter histórias evolutivas distintas. Esses genes são indicados para a construção de filogenia de espécies;
4. Os genes homólogos xenólogos que surgem por transferência lateral são muito importantes para a compreensão da evolução dos genomas. E os genes homólogos plerólogos que surgem por conversão gênica são pouco informativos em análises filogenéticas;
5. O alinhamento das sequências é um passo fundamental para o estudo filogenético, porque ele nos permite definir as posições homólogas. Regiões homólogas neste tipo de análise significam nucleotídeos que ocupam a

mesma posição, pois eles supostamente têm um ancestral comum, porém não são necessariamente iguais. É a posição na sequência que determinará se um nucleotídeo é ou não homólogo a outro. Ou seja, assim como para caracteres morfológicos, moléculas homólogas não apresentam necessariamente a mesma função. Não se pode confundir similaridade como homologia, uma vez que similaridade é uma simples medida de semelhança entre as sequências. Enquanto que a homologia considera a ancestralidade;

6. A escolha de um modelo teórico de evolução que reflita o processo evolutivo para os dados trabalhados é um passo muito importante, pois quando inferimos uma filogenia, estamos estimando a história evolutiva baseados nas alterações das características herdadas que refletem na sequência de DNA. Estas mudanças podem ser justificadas por um modelo evolutivo que trabalha com suposições.

Antes de iniciar as análises filogenéticas é muito importante a escolha da região genômica que será utilizada. Esta região tem que fornecer informação suficiente para a que árvore filogenética seja o mais próximo possível da relação real das sequências. Para isto, dois fatores podem influenciar na escolha desta região: o tamanho da sequência e a sua diversidade genética. Uma sequência muito pequena irá fornecer pouca informação, porém, o uso de sequências muito grandes pode aumentar muito o tempo da análise. Além disto, sequências muito conservadas também não fornecem informações suficientes, enquanto uma alta diversidade pode levar um chamado ruído filogenético muito alto, não sendo possível relacionar a história evolutiva dessas sequências (SANTOS, 2010).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Coleta de amostras**

Foram realizadas coletas de solo em duas fazendas localizadas no Município de Rio Brillhante-MS, Fazenda Celeiro 21,7° S e 54,5° W, e Fazenda Vacaria 21,6° S e 54,4° W. Ambas com plantações de cana-de-açúcar e histórico de aplicação de defensivos agrícolas como herbicidas e inseticidas. Foram coletadas 4 amostras em cada fazenda aleatoriamente, com profundidade máxima de 10 cm. As amostras foram então levadas ao laboratório e armazenadas a 10°C.

### **4.2. Enriquecimento das amostras**

Após a coleta de solo, as amostras foram homogeneizadas e 2,5 g de cada amostra foram pesados totalizando 10 g de cada fazenda. As amostras foram então diluídas em 90 mL de meio líquido mínimo de sais (MSN) com as seguintes concentrações em g.l<sup>-1</sup>: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (2,4); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (2,0); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (0,1); MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01); CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,01). O pH foi ajustado a 6,5 e o meio esterilizado por autoclavagem a 121°C por 20 minutos (RADEHAUS e SCHIMIDT,1992). Este meio foi suplementado com 0,1% do herbicida atrazina diluído em água e filtrado em membrana 0,22 µm. Os frascos Erlenmeyer foram incubados a 30°C, 100 rpm por 4 dias.

### **4.3. Isolamento de micro-organismos**

Após este período 200 µL do solo enriquecido foram inoculados por espalhamento com auxílio de uma alça de Drigauski em placas de Petri contendo 0,1% de atrazina em meio MSM e em outras placas 0,1% de atrazina + 0,1% de extrato de levedura também em meio MSM. As placas foram incubadas a 30°C até que colônias fossem visualizadas (Figura 03). O Erlenmeyer contendo o meio enriquecido da Fazenda Celeiro foi inoculado em seis placas, três com o extrato de levedura e três sem a presença de extrato de levedura. O mesmo foi feito para as amostras da Fazenda Vacaria.

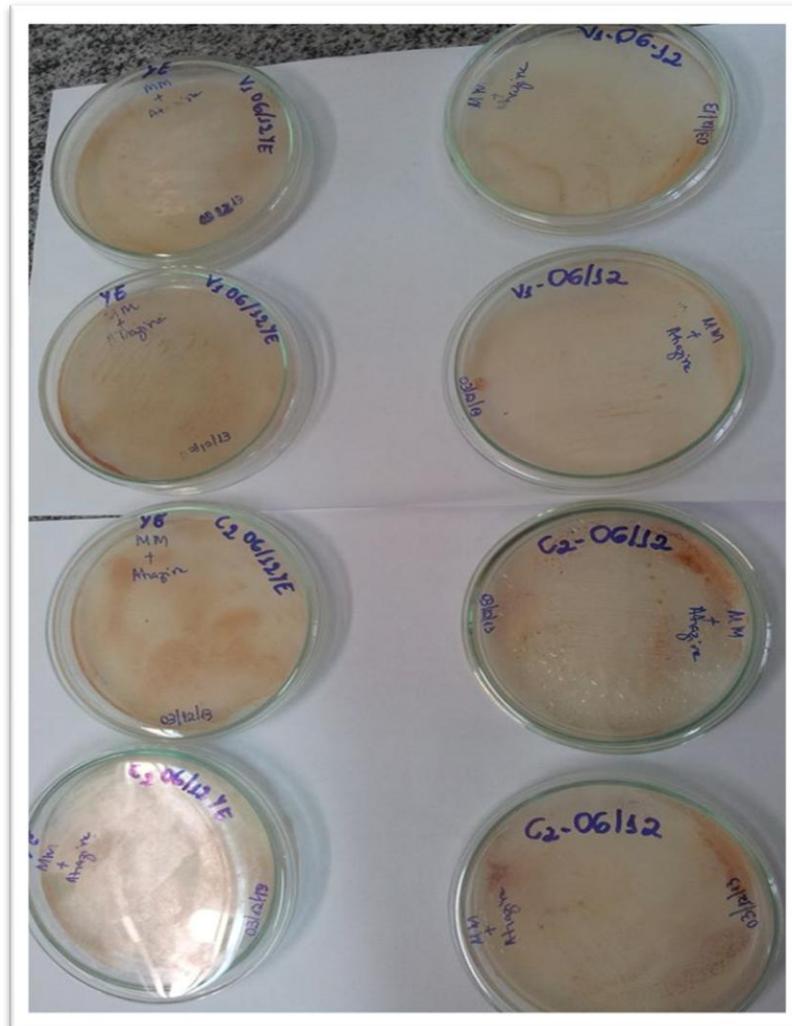


Figura 03. Inoculação com alça de Drigauski.

Após o crescimento visível das colônias, as mesmas foram repicadas e inoculadas por esgotamento, e o procedimento foi repetido até o isolamento de placas com colônias puras, sempre respeitando a composição do meio de cultivo inicial, ou seja, com ou sem presença de extrato de levedura (Figura 04). Das placas de Petri da Fazenda Vacaria sem extrato de levedura foram isoladas três colônias que receberam a identificação nas novas placas de Petri de V1, V2, V3, e das placas de Petri da Fazenda Celeiro sem extrato foram isoladas outras três colônias e identificadas como C1, C2, C3. Das placas de Petri com extrato de levedura foram isolados da Fazenda Celeiro quatro colônias sendo identificadas nas novas placas de C4, C5, C6, C7 e da Fazenda Vacaria apenas uma colônia foi isolada recebendo a identificação de V4.

Crescidas as colônias em estufa a 30°C, observou-se as mesmas para conferência de crescimento e diversidade de micro-organismos potencialmente degradadores. Nas

placas de Petri que cresceram colônias com aparente morfologia diferenciada, todas foram escolhidas para isolamento.

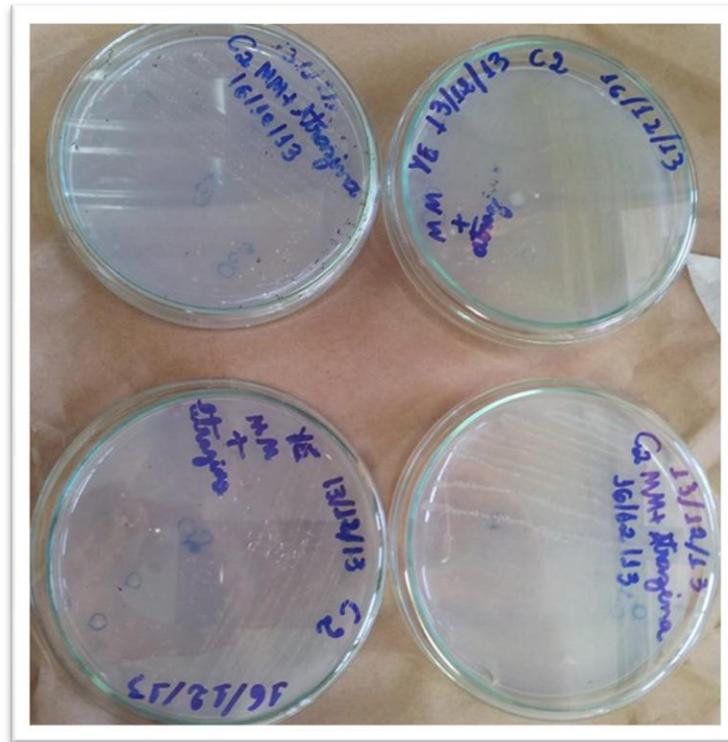


Figura 04. Colônias isoladas em placas, das quais foram feitas a seleção das colônias com aparente morfologia diferenciada.

#### **4.4. Caracterização pré-eliminar morfológica e bioquímica**

A partir dos isolados selecionados realizou-se uma caracterização pré-eliminar dos isolados. Como coloração de Gram, teste de catalase e de oxidase. Conforme descrito abaixo:

##### **4.4.1. Coloração de Gram**

A análise da morfologia dos isolados foi realizada por microscopia óptica simples, utilizando coloração de Gram. Foi realizada a técnica de coloração de Gram com as colônias bacterianas isoladas. Seguindo o procedimento descrito pelo Ministério da Saúde (1997). Fez-se um esfregaço com uma amostra da colônia bacteriana. Cobriu-se o esfregaço com cristal violeta e deixou agir por aproximadamente 1 minuto, e fez-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com lugol e deixou-se agir por aproximadamente 1 minuto, fez-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com o álcool etílico (99,5° GL), descolorando-a, até que não

desprenda mais corante, e faz-se a lavagem em um filete de água corrente. Cobriu-se a lâmina com safranina e deixa-se agir por aproximadamente 30 segundos e faz-se a lavagem com um filete de água corrente. Deixou-se secar ao ar livre, e colocou-se uma gota de óleo de imersão sobre o esfregaço; e a leitura da lâmina se deu em microscópio óptico em objetiva de imersão (100 X), sendo considerada Gram-positivas as colônias que apresentarem coloração roxa, e Gram-negativas as colônias que apresentarem coloração vermelha (Figura 05).

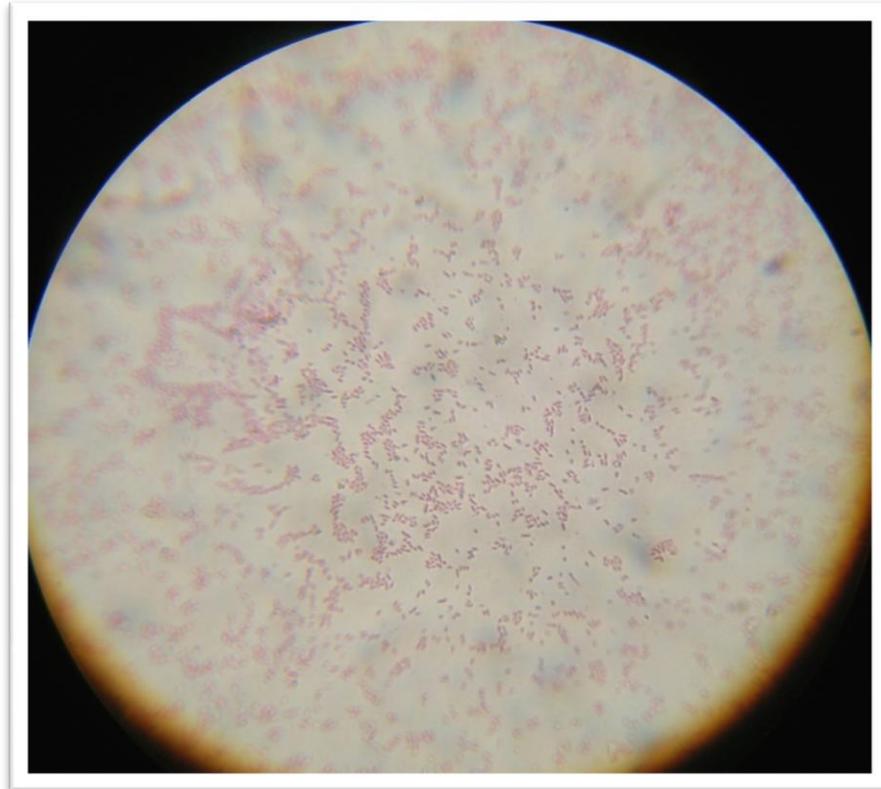


Figura 05. Teste de coloração de Gram.

#### **4.4.2. Catalase**

Inicialmente colocou-se uma gota de peróxido de hidrogênio (água oxigenada) 3% sobre uma lâmina em um tubo, e com auxílio de uma alça de platina, agregou-se a colônia em estudo na gota de peróxido de hidrogênio. Sendo considerado resultado positivo a presença imediata de bolhas (a produção de efervescência indica a conversão do  $H_2O_2$  em água e oxigênio gasoso), e resultado negativo pela ausência de bolhas ou efervescência (Figura 06).

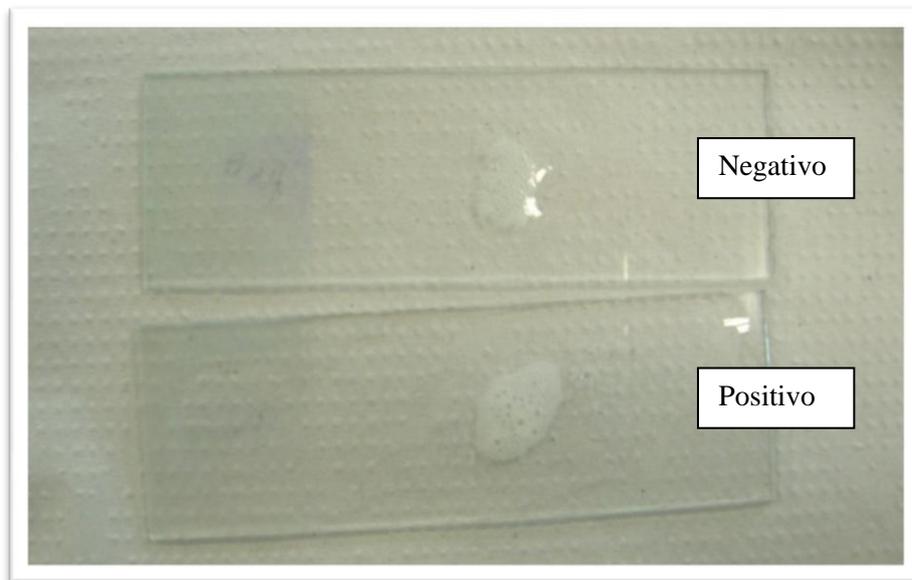


Figura 06. Teste de catalase.

#### 4.4.3. Oxidase

Para a realização do teste utilizou-se as fitas para determinação de oxidase PROBAC DO BRASIL®, e seguiu-se as especificações do fabricante. Este teste foi realizado apenas com bactérias Gram-negativas. Então, utilizou-se uma fita e com auxílio de uma alça de platina fez-se um esfregaço da bactéria a ser identificada na fita. Fez-se a leitura após alguns segundos, sendo considerada oxidase positiva o esfregaço bacteriano na fita que apresentou coloração violeta e oxidase negativa o esfregaço bacteriano que não apresentou alteração de cor (Figura 07).

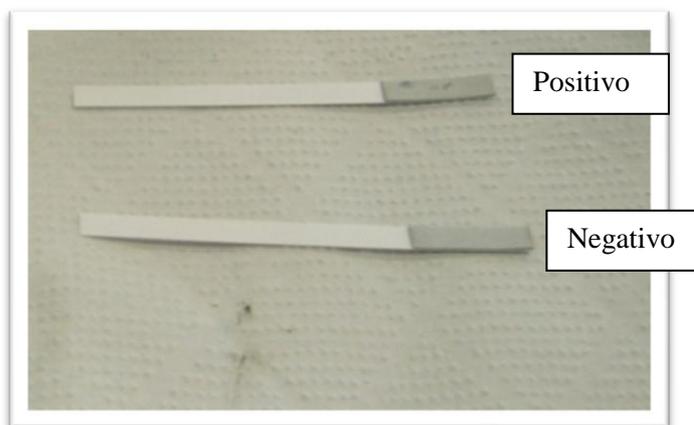


Figura 07. Teste de oxidase.

#### 4.5. Teste de crescimento

Foram realizadas curvas de crescimento em triplicata utilizando-se as concentrações médias de aplicação dos pesticidas. Sempre respeitando a composição do

meio de cultivo inicial, ou seja, com ou sem presença de 0,1% de extrato de levedura, usado para possibilitar um aumento de biomassa inicial. As curvas de crescimento foram construídas em 60 mL de meio MSM líquido em Erlenmeyer de 250 mL, mantido em Shaker a 150 rpm em uma temperatura de 30°C, através da medida da densidade óptica em espectrofotômetro a 600 nm (Figura 08). Em cabine de segurança biológica foram retiradas amostras em horários estabelecidos para medição da densidade óptica, os tempos foram zero horas, cinco horas, dezenove horas e vinte e quatro horas de incubação, iniciando-se do tempo zero, até que os cultivos entrassem em fase de morte celular. Para este teste foram escolhidas duas cepas que cresceram na presença de extrato de levedura + herbicida e duas cepas que cresceram sem o extrato de levedura. As cepas escolhidas para este teste foram P3.C3.1.R1 (YE), P5.C5.1.R1(YE), P1.C1.1.R1, P6.C6.1.R2.



Figura 08. Teste de crescimento dos isolados.

#### 4.6. Construção de árvores filogenéticas a partir do gene da *atrazine chlorohydrolase* (AtzA)

Sequências do gene codificador da enzima AtzA, responsável pela degradação inicial da atrazina de 9 bactérias foram recuperadas dos bancos (NCBI) de dados (tabela 01) no dia vinte e três de outubro de 2014 e alinhadas no programa CLUSTAL X (THOMPSON et al., 1994), editadas no BIOEDIT (HALL, 1999) e as análises filogenéticas foram conduzidas utilizando o programa MEGA versão 4 (KUMAR et al., 2004). A matriz de distância evolutiva foi calculada com o modelo de Kimura (KIMURA, 1980) e a construção da árvore filogenética a partir das distâncias evolutivas foi feita pelo método de *Neighbor-Joining* (SAITOU; NEI, 1987), com valores de *bootstrap* calculados a partir de 1.000 re-amostragens (FELSENSTEIN, 1985).

Tabela 1. Espécies gene AtzA

Bactérias	Accession number
<i>Aminobacter aminovorans</i> Sal B	HQ400757.1
<i>Aminobacter aminovorans</i> Sal 1-3	HQ400756.1
<i>Herbaspirillum</i> SP	DQ089655.2
<i>Beta proteobacterium</i> CDB21	AB194097.1
<i>Comamonas</i> SP. A2	GQ325256.1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> R23	KF279657.1
<i>Pseudomonas</i> SP. Ak_AAN5	HE716863.1
<i>Pseudomonas</i> ADP	U55933.1
<i>Arthrobacter</i> SP. AD1	AF543694.1
<i>Rhodococcus corallinus</i>	L16534.1

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Isolamento de bactérias

Foram isoladas nove linhagens que apresentaram crescimento significativo em extrato de levedura e nove que cresceram sem presença do extrato, totalizando dezoito isolados, aparentemente com morfologia diferente. Realizou-se o repique das dezoito colônias em duplicata. As cepas receberam a nomenclatura apresentada na tabela 2, de acordo com a fazenda de origem Celeiro (C), Vacaria (V), placa de Petri de origem (p), colônia (c) e repetição (r), presença ou ausência de extrato de levedura (YE). E a numeração de acordo com a quantidade de placas e colônias.

Tabela 2. Nomenclatura dos isolados

<b>Com Extrato de Levedura</b>	<b>Nomenclatura Rep 01</b>	<b>Nomenclatura Rep 02</b>
C7	P1.C1.1.R1	P1.C1.1.R2
	P1.C1.2.R1	P1.C1.2.R2
C6	P2.C2.1.R1	P2.C2.1.R2
C4	P3.C3.1.R1	P3.C3.1.R2
V5	P4.C4.1.R1	P4.C4.1.R2
C5	P5.C5.1.R1	P5.C5.1.R2
V4	P6.C6.1.R1	P6.C6.1.R2
	P6.C6.2.R1	P6.C6.2.R2
	P6.C6.3.R1	P6.C6.3.R2
<b>Sem extrato de levedura</b>	<b>Nomenclatura Rep 01</b>	<b>Nomenclatura Rep 02</b>
V1	P1.C1.1.R1	P1.C1.1.R2
C3	P2.C2.1.R1	P2.C2.1.R2
	P2.C2.2.R1	P2.C2.2.R2
V2	P3.C3.1.R1	P3.C3.1.R2
	P3.C3.2.R1	P3.C3.2.R2
V3	P4.C4.1.R1	P4.C4.1.R2
	P4.C4.2.R1	P4.C4.2.R2
C2	P5.C5.1.R1	P5.C5.1.R2
C1	P6.C6.1.R1	P6.C6.1.R2

## 5.2. Caracterização pré-eliminar morfológica e bioquímica

O teste de catalase foi feito apenas em bactérias Gram positivas e o de oxidase nas Gram negativas, já que a presença da enzima catalase diferencia grupos dentro das bactérias Gram positivas e a presença da enzima oxidase diferencia membros do grupo das Gram negativas. Para a visualização da forma das bactérias foi utilizado o microscópio com objetiva de aumento de 100 ×, resultando em um aumento de 1000 ×. Das dezoito cepas isoladas apenas onze com crescimento significativo foram viáveis para a realização dos testes, já que as demais não apresentaram crescimento significativo após repiques sucessivos. As duplicatas selecionadas para os testes foram: P1.C1.1.R1; P1.C1.1.R1(YE); P2.C2.1.R1(YE); P3.C3.1.R1(YE); P4.C4.1.R2(YE); P4.C4.1.R1(YE); P5.C5.1.R1(YE); P6.C6.1.R2; P6.C6.1.R2(YE); P6.C6.2.R1(YE); P6.C6.3.R1(YE).

Com os resultados obtidos pelos testes de identificação bioquímica na tabela 3 podemos observar que a maioria das cepas isoladas das duas fazendas são Gram positivas, sendo apenas três bactérias Gram negativa. Em relação à forma foram isolados tanto bastonetes quanto esferas.

Tabela 3. Resultado identificação

Placas	Gram	Catalase	Oxidase	Forma	Selecionadas para teste de crescimento
<b>P1.C1.1-R1</b>	<b>(-)</b>		<b>(-)</b>	<b>bastonetes</b>	<b>*</b>
<b>P6.C6.1.R2</b>	<b>(-)</b>		<b>(+)</b>	<b>bastonetes</b>	<b>*</b>
P6.C6.3.R1 YE	(+)	(+)		bastonetes	
P6.C6.1-R2 YE	(+)	(+)		esferas	
P6.C6.2.R1 YE	(+)	(+)		esferas	
P1.C1.1.R1YE	(+)	(+)		bastonetes	
P2.C2.1.R1 YE	(+)	(+)		esferas	
P4.C4.1.R1 YE	(+)	(+)		bastonetes	
<b>P5.C5.1.R1 YE</b>	<b>(-)</b>		<b>(+)</b>	<b>Bastonetes</b>	<b>*</b>
P4.C4.1.R2 YE	(+)	(+)		bastonetes	
<b>P3.C3.1.R1 YE</b>	<b>(+)</b>	<b>(+)</b>		<b>bastonetes</b>	<b>*</b>

Segundo (CHEN et al., 2004, THAKUR et al., 2002), muitas das bactérias que possuem capacidade de degradar compostos aromáticos são Gram negativas, sendo que

a melhor representante desta classe é da família Pseudomonadaceae. A *Pseudomonas* sp. ADP é uma das bactérias que possui ótima capacidade de degradação do herbicida atrazina já que possui a rota de degradação completa deste composto (FERNANDES, 2014). Diversas espécies pertencentes ao gênero *Pseudomonas* e outros gêneros relacionados (*Sphingomonas*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, etc) têm sido identificados como tendo ampla capacidade de degradação de compostos aromáticos. Segundo (FERNANDES, 2014) o qual isolou bactérias de solo do gênero *Pseudomonas*, relata que Gram negativas se destacam por sua versatilidade e são conhecidas pelas suas atividades metabólicas que permitem que algumas cresçam em condições extremas de limitação de nutrientes. No presente trabalho as bactérias bioprospectadas do solo, com capacidade de degradação e desenvolvimento em meio ao herbicida atrazina foram identificadas pelos testes bioquímicos tanto como Gram positivas (oito isolados), quanto Gram negativas (três isolados). Segundo (ROUSSEAU, 2001) durante seus estudos encontrou bactérias Gram positivas envolvidas no processo de biodegradação da atrazina em solos Franceses.

### **5.3. Teste de crescimento dos isolados em atrazina**

A curva de crescimento padrão de bactérias é composta por quatro fases de crescimento distintas: fase de arranque, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio. A partir do momento no qual um micro-organismo é inoculado em um meio de cultura estéril, geralmente o crescimento não se inicia de imediato. Esta fase, conhecida como fase *lag* ou de arranque, ocorre pela necessidade das células se adaptarem ao novo meio, até que possam dar início ao seu desenvolvimento (BROCK; BROCK, 1978). Já na fase logarítmica ou de crescimento exponencial, o número de células bacterianas aumenta em progressão geométrica na medida em que o tempo cresce em progressão aritmética. Na fase estacionária ou de equilíbrio, a contagem de micro-organismos viáveis permanece constante em seu valor máximo, já que o número de bactérias neoformadas é compensado pelo daquelas que começam a morrer. E, por último, segue a fase de declínio ou morte das bactérias (BIER, 1977; TORTORA, 2005).

Vários estudos realizados utilizaram a densidade óptica para monitoramento do crescimento de bactérias (SANTOS et al. 2013; SUMARES, 2012; CAMPOS, 2009; TORTORA, 2005). Para os testes de crescimento, os resultados estão apresentados na

figura 09, e o aumento da absorbância a 600 nm foi utilizado para monitorar o crescimento das bactérias estudadas.

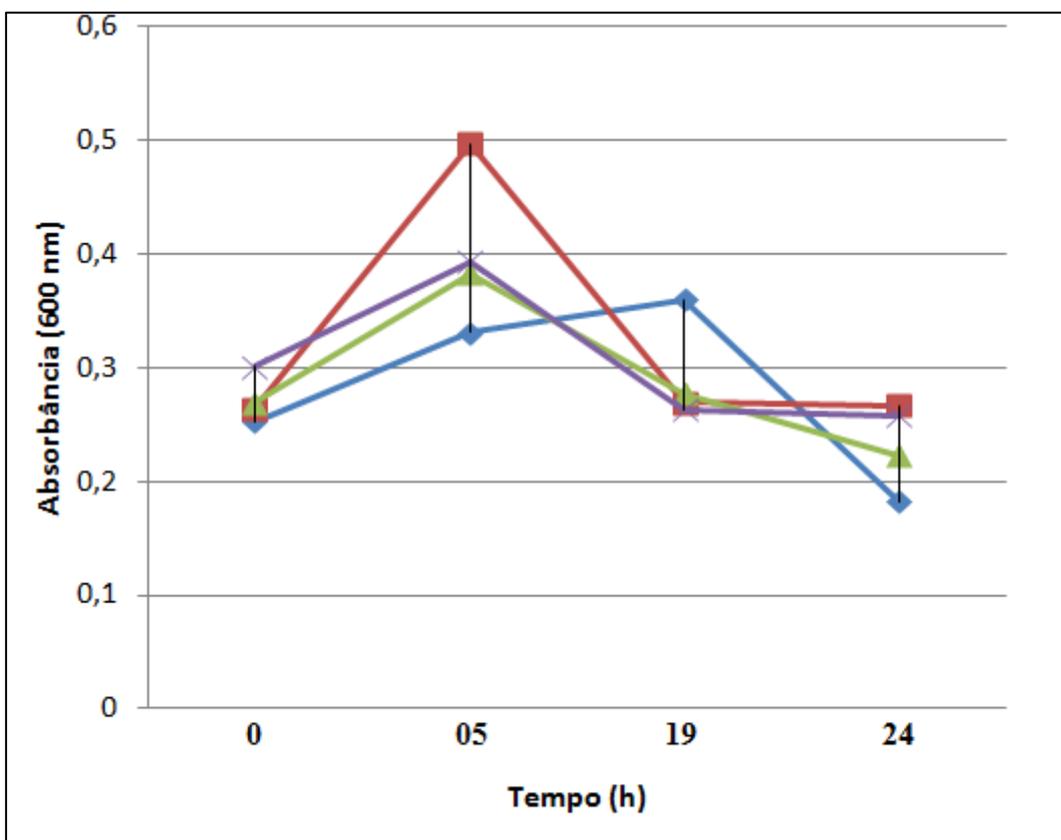


Figura 09. Curva de crescimento dos isolados, absorvância (600 nm). ▲ P1.C1.1.R1 ◆ P3.C3.1.R1 (YE) ■ P5.C5.1.R1(YE) × P6.C6.1.R2

A cepa P3.C3.1.R1 (YE) apresentou seu pico máximo de crescimento em 19 horas de incubação em agitador orbital a 150 rpm, entrando em fase de declínio a partir de então. Já as cepas P5.C5.1.R1(YE), P1.C1.1.R1, P6.C6.1.R2, tiveram seu pico máximo de crescimento em cinco horas de incubação, atingindo a fase de declínio logo após esse período.

A toxicidade potencial da atrazina tem motivado pesquisas direcionadas para a sua biorremediação. Esta técnica tem sido considerada a metodologia de escolha para a recuperação de áreas comprometidas devido ao potencial de metabolização dos micro-organismos, custo relativamente baixo e reduzido impacto ambiental (RALEBITSO, et al., 2002).

Autores relatam que os micro-organismos obtêm nutrientes e energia pela completa mineralização da atrazina a dióxido de carbono e água, incluindo diversas bactérias como espécies de *Nocardia* (TOPP et al., 2000), *Pseudomonas* (YANZE-KONTCHOU e GSCHWIND, 1994) e agrobactérias (STRUTHERS et al., 1998). O Nitrogênio resultante do metabolismo da atrazina serve como fonte de nitrogênio para bactérias de solo (DUTTA e SINGH, 2013).

Outros autores (FERNANDES, 2014; ROUSSEAU, 2001; CAI, 2003) que realizaram o teste de crescimento verificaram que tanto bactérias Gram positivas como Gram negativas são capazes de crescerem em meio a atrazina. Segundo (CAI, 2003), durante seus estudos encontrou uma cepa de bactéria Gram positiva que apresentou taxa de crescimento duas vezes mais rápido que uma cepa de *Pseudomonas* ADP, utilizando atrazina como única fonte de nitrogênio e citrato de sódio como fonte de carbono.

No presente estudo a cepa que apresentou melhor crescimento foi a cepa Gram negativa P5.C5.1.R1(YE). Segundo a literatura (FERNANDES, 2014; YANZE-KONTCHOU e GSCHWIND, 1994) as cepas mais encontradas para degradar a atrazina são do gênero *Pseudomonas*. Porém já foi relatado (DONNELLY et al. 1993) a capacidade de actinomicetos em crescer e degradar atrazina e outros herbicidas, a cepa P3.C3.1.R1 (YE) possui aparência morfológica em placa de Petri semelhante a de actinomicetos, porém para a confirmação da mesma necessita-se de uma identificação mais completa.

A cepa P5.C5.1.R1(YE), é a Gram negativa que melhor cresceu na presença do herbicida, pois apresentou o valor de OD mais alto que as demais cepas analisadas. De acordo com a literatura, bactérias Gram negativas são melhores degradadoras de xenobióticos, devido a sua diversidade metabólica. Castillo et al. (2011) isolaram a bactéria Gram negativa *Azobacter* sp. em solos de plantações de café tratados com endossulfan com grande potencial de degradar o inseticida. Podemos associar o bom crescimento do isolado P5.C5.1.R1(YE), também ao fato de utilizar o extrato de levedura como fonte de carbono. As bactérias Gram positivas demoram mais para se adaptar à presença do herbicida, porém são mais resistentes que as Gram negativas, devido à presença de uma parede celular relativamente espessa e capacidade para formar endósporos, as bactérias Gram positivas são consideradas tolerantes a estresse (HUANG et al., 2009). A cepa P3.C3.1.R1 (YE) Gram positiva foi a que melhor resistiu a presença do herbicida totalizando um período de dezenove horas de incubação, também favorecida pela presença do extrato de levedura como fonte de carbono.

#### 5.4. Árvore filogenética – gene codificador da enzima atrazine chlorohydrolase em bactérias

Sequências do gene responsável pela síntese da enzima atrazine chlorohydrolase (gene AtzA) de nove bactérias foram utilizados para verificar a variação na constituição do gene em diferentes filos bacterianos. Através dos resultados obteve-se a árvore filogenética apresentada na figura 10.

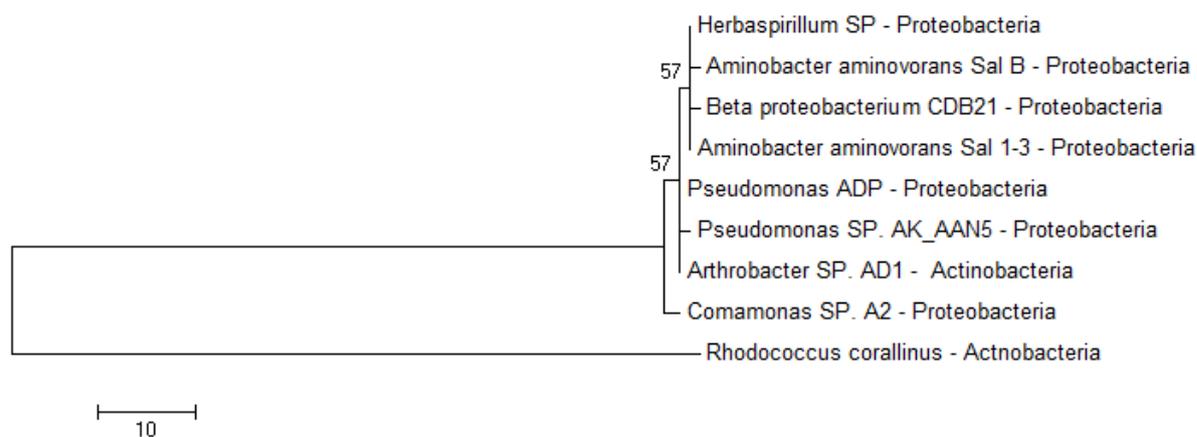


Figura 10. Árvore filogenética (atz), Mega 4, usando o modelo de Kimura, método de *Neighbor-Joining* com *bootstrap* de 1000 re-amostragens.

Pode-se verificar dentre as bactérias analisadas que *Aminobacter aminovorans* Sal B, *Aminobacter aminovorans* Sal 1-3, *Herbaspirillum* SP, *Beta proteobacterium* CDB21, *Comamonas* SP. A2, *Pseudomonas* sp. Ak\_AAN5, *Pseudomonas* ADP, pertencentes ao filo Proteobacteria com exceção da *Arthrobacter* SP. AD1 que segundo a análise feita apresenta similaridade com as demais bactérias do filo Proteobacteria, porém pertence ao filo Actinobacteria, todas constituem um grupo de taxa descendente de um único ancestral comum, apresentando pouca variação no gene produtor da enzima atrazine chlorohydrolase enquanto que a bactéria *Rhodococcus corallinus* pertencente ao filo Actinobacteria surge de um ramo diferente na árvore apresentando, portanto, maior variação na constituição do gene produtor da enzima atrazine chlorohydrolase em relação às demais bactérias analisadas.

Os estudos em biotecnologia, que fazem uso de ferramentas em bioinformática tem se tornado cada vez mais comum, já que estas ferramentas permitem estabelecer filogenias e entender a dinâmica das comunidades microbianas, através de análises filogenéticas que demonstram a história evolutiva dos organismos (SANTOS, 2010).

As espécies analisadas neste trabalho *in silico* já tiveram sua atividade de biodegradação da atrazina comprovada, *Aminobacter* (ROUSSEAU, 2001), *Herbaspirillum* (SEFFERNICK, 2007), *Beta proteobacterium* (IWASAKI et al. , 2007), *Comamonas* (YANG et al., 2010), *Pseudomonas* (MANDELBAUM, 1995; FERNANDES, 2014), *Arthrobacter* (ROUSSEAU, 2001), *Rhodococcus* (BEHKI, 1993). Desta forma o trabalho desenvolvido *in silico* reflete o trabalho realizado em bancada. O trabalho *in silico* foi feito para posterior comparação com as bactérias isoladas, quanto a presença do gene *atzA* e identificação por 16S, utilizando primers adquiridos no Institute Sigma-Aldrich Brasil LTDA.

Além da análise acima apresentada, foi também realizado dois PCRs virtuais para verificar se as sequências de *primers* obtidas amplificariam o gene das bactérias isoladas de diferente filós – Proteobacteria e Actinobacteria.

Realizou-se o PCR virtual no site do NCBI (Primer-Blast) com a sequência FASTA da bactéria *Pseudomonas* ADP, pertencente ao filo Proteobacteria (Gram negativas), utilizando os *primers* desenhados para o gene *AtzA* cuja sequência são, Forward CCATGTGAACCAGATCCT e Reverse TGAAGCGTCCACATTACC (DE SOUZA et al., 1998). Como resultado foram amplificados o gene *atzA* de dezesseis bactérias registradas no banco de dados do NCBI, todas pertencentes ao filo Proteobacteria, com exceção da *Arthrobacter* SP. AD1 (filo Actinobacteria), que também divergiu na análise da árvore filogenética. Os números de acesso dos resultados são HQ400757.1, HQ400756.1, HQ400755.1, HQ400754.1, HQ400753.1, HQ400752.1, HQ400751.1, HQ400750.1, HQ400749.1, HQ400748.1, DQ089655.2, AF543694.1, U66917.2, AB194097.1, AF312304.1, U55933.1.

Um segundo PCR virtual foi realizado utilizando a sequência FASTA da bactéria *Rhodococcus corallinus*, pertencente ao filo Actinobacteria (Gram positivas), com a mesma sequência de *primers*. Nenhum resultado foi encontrado no banco de dados, deixando em evidência que a utilização deste par de *primer* para amplificação do gene *atzA* em bactérias de outros filós e de parede celular Gram positiva, em análise de PCR em laboratório provavelmente não resultaria em ampliações devido a maior variação na constituição do gene produtor da enzima atrazine chlorohydrolase em relação às demais bactérias analisadas.

Muitas bactérias Gram negativas possuem o gene *atzA* já descritos e identificados em banco de dados, mas o mesmo não ocorre para bactérias Gram positivas, sendo a continuidade deste trabalho bastante promissora, já que foram bioprospectadas de solo com histórico de aplicação da atrazina bactérias Gram positivas.

## 6. CONCLUSÃO

- Com os resultados obtidos podemos observar que em amostras de solo com histórico de aplicação de atrazina houve sucesso na bioprospecção de bactérias com potencial de degradação deste herbicida;
- Pode-se verificar que a atrazina representou uma fonte de nitrogênio e aparentemente carbono (nas amostras sem adição de extrato de levedura) para os micro-organismos presentes no meio;
- Os estudos *in silico*, utilizando-se ferramentas de bioinformática demonstram que para a enzima atrazine chlorohydrolase houve diversidade na constituição de genes que codificam a enzima, variando de uma espécie para outra e que, além disso, trabalhos reportam que os gêneros estudados *in silico* também apresentaram potencial de degradação da atrazina em experimentos laboratoriais. De modo geral o gene *atzA* das bactérias analisadas pertencentes ao filo Proteobacteria possuem uma composição diferente do gene *atzA* das bactérias pertencentes ao filo Actinobacteria.

## 7. REFERÊNCIAS

ARMAS, E. D., MONTEIRO, R. T. R., AMÂNCIO, A. V., CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.

ARMAS, E. D. Biogeodinâmica de herbicidas utilizados em cana-de-açúcar *Saccharum spp* na sub-bacia do rio Corumbataí. Tese de doutorado apresentada a ESALQ/USP, 186 p, 2006.

Banco de Dados NCBI. Acesso em: 23 de Outubro de 2014  
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>.

BEHKI, R. TOPP, E. DICK, W. GERMON, P. Metabolismo do herbicida atrazina por cepas *Rhodococcus*. *Applied and Environmental Microbiology* 59 , 1955 - 1959 . 1993.

BIER, O. *Bacteriologia e microbiologia*. 18.ed. São Paulo: Melhoramentos, 1056p. 1977.

BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. Healthy Environments for Healthy People: Bioremediation Today and Tomorrow. *Environmental Health Perspectives* , v. 105, suppl. 1, p. 5-20, Feb. 1997.

BONFÁ, M.R.L. et al. Phenol degradation by halophilic bacteria isolated from hypersaline environments. *Biodegradation*, v. 24, n. 5, p. 699-709, 2013.

BOUNDY-MILLS, K., DE SOUZA, M., MANDELBAUM, R.T., WACKETT, L.P., E SADOWSKY, M.J. 1997. The *atzB* Gene of *Pseudomonas sp.* Strain ADP Encodes the Second Enzyme of a Novel Atrazine Degradation Pathway. *Appl. Environ. Microb.* 63: 916–923., 1997.

BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de Julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos de embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras

providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, 1989.  
Disponível em [www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br). Acesso em: 30/09/2014.

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

BROCK, T.D.; BROCK, K.M. Basic microbiology with applications. 2.ed. Englewood Cliffs: Prentice Hall, 608p. 1978.

CABRERA. L.; COSTA, F.P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação das águas por pesticidas na região sul do Estado do RS. Revista: Química Nova, Vol. 31, No. 8, 1982-1986, 2008.

CAI, B., HAN, Y. LIU, B., REN, Y. E JIANG, S. Isolamento e caracterização de uma bactéria atrazina-degradantes de águas residuais industriais na China. Letras em Microbiologia Aplicada, 36: 272-276. doi: 10,1046 / j.1472-765X.2003.01307.x. 2003.

CAMPOS, M. M. C. Estudo da remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela cianobactéria *Microcystis novacekii* em condições de cultivo. Dissertação (Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas) Belo Horizonte, MG – UFMG, 93p. 2009.

CANUTO, T. G.; GAMA, A. F.; BARRETO, F. M. de S.; ALENCAR NETO, M. da F. A. Estimativa do risco potencial de contaminação por pesticidas de águas superficiais e subterrâneas do município de Tianguá-CE, com aplicação do método de GOSS e índice de GUS, In: Congresso brasileiro de águas subterrâneas. São Luis. Anais. p. 01-20. 2010.

CARMO, D. A.; CARMO, A. P. B.; PIRES, J. M. B.; OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. Ambi-Agua, Taubaté, v. 8, n. 1, p. 133-143, 2013.

CASTILLO, J. M.; CASAS, J.; ROMERO, E. Isolation of an endosulfan-degradin bacterium from a coffee farm soil; Persistence and inhibitory effect on its biological functions. Science of the Total Environment, v. 412-413, p. 20-27, 2011.

CHAN, K. H.; CHU, W. Effect of humic acid on the photolysis of the pesticide atrazine in a surfactant-aded soil-washing system in acidic condition. *Water Research*, [S.l.], v. 39, p. 2154-2166, 2005.

CHEN W.M.; Chang J.S.; Wu C.H.; Chang S.C. Characterization of phenol and TCEdegradation by the rhizobium *Ralstonia taiwanensis*. *Research in Microbiology*. 155: 672-680, 2004.

CHENG, H.H. Pesticides in the soil environment: process, impacts and modeling. Madison: Soil Science Society of America, p. 1-5, 1990.

CHRISTOFFOLET, P. J.; OVEREJO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2. ed., Campinas: Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas, 2004.

COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; DE LIMA M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciênc. Agrotec. Lavras*, V.32, n 3, p. 809-813, 2008.

CYCÓN, M., SEGET-PIOTROWSKA, Z. Changes in bacterial diversity and community structure following pesticides addition to soil estimated by cultivation technique. *Ecotoxicology*. v.18, p. 632-42, 2009.

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, dez. 2006.

DE SOUZA, M.L., SADOWSKY, M.J., E WACKETT, L.P. 1996. Atrazine Chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp.strain ADP: Gene Sequence, Enzyme Purification, and Protein Characterization. *Journal of Bacteriology* v.178, p.:4894-4900,1996.

DE SOUZA, MERVYN L.; WACKETT, LAWRENCE P.; SADOWSKY, MICHAEL J. The *atzABC* genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and environmental microbiology*, v. 64, n. 6, p. 2323-2326, 1998.

DONNELLY, P.; ENTRY, J. A.; CRAWFORD, D. L. Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2642-2647, 1993.

DÖRFLER, U.; FEICHT, E.A. & SCHEUNERT, I. S-Triazine residues in groundwater. *Chemosphere*, 35:99-106, 1997.

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

EISEN, J. A. E HANAWALT, P. C. A phylogenomic study of DNA repair genes, proteins, and process. *Mutat Res.* 435: 171-213. 1999.

ESPOSITO, E.; MOODY, J ; CANHOS, V ; CERNIGLIA, C . Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cyclothyrium* sp.. *Chemosphere*, v. 57, p. 943-952, 2004.

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

FARNSWORTH, N. Testando plantas para novos remédios. In *Biodiversidade*. Editado e org. por E. O.Wilson. Editora Nova Fronteira, p. 107. 1977.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* v.39, p.783-791, 1985.

FERREIRA, J. V. R. Bioprospecção e identificação de micro-organismos com potencial biotecnológico para biorremediação na interface solo-planta-micro-organismos. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação Tecnologia em Biotecnologia) — Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012.

FERNANDES, T. F. A. Caracterização fenotípica e molecular de linhagens de *Pseudomonas* spp. Envolvidas na biodegradação da atrazina. Dissertação (Biociências); Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. São Paulo, 2014.

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

GARCÍA, M. T. et al. *Halomonas organivorans* sp. nov., a moderate halophile able to degrade aromatic compounds. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 54, n. 5, p. 1723-1728, 2004.

GUIMARÃES, L.T; TURETTA, A.P.D.; COUTINHO, H.L.C. Uma proposta para avaliar a sustentabilidade da expansão do cultivo da cana-de-açúcar no Estado de Mato Grosso do Sul. *Sociedade & Natureza*. v. 22 (2), p.313-327, 2010.

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

HICKEY W. J., FUSTER D. J., and LAMAR R. T. Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. *Soil Biology and Biochemistry* 26, 1655-1671, 1994.

HUANG, H. L.; ZHANG, S. Z.; WU, N. Y.; LUO, L.; CHRISTIE, P. Influence of *Glomus etunicatum/Zea mays mycorrhiza* on atrazine degradation, soil phosphatase and dehydrogenase activities, and soil microbial community structure. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 41, p. 726-734, 2009.

HUNTER, W. J., SHANER, D. L. Biological Remediation of Groundwater Containing Both Nitrate and Atrazine. *Current Microbiology*, v. 60, n. 01, p. 42 – 46, 2010.

IWASAKI, R., TAKAGI, K., YOSHIOKA, Y., FUJI, K., KOJIMA, Y., HARADA, N. Isolamento e caracterização de uma nova beta-Proteobacterium e detecção de genes que codifica simazina-degradantes s-triazina enzimas que degradam. *Pest Manag. Sci.* , 63 , 261-268. 2007.

JABLONOWSKI, N.D.; KÖPPCHEN, S.; HOFMANN, D.; SCHÄFFER, A.; BURAUDEL, P. Persistence of <sup>14</sup>C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. *Environmental Pollution, Massachusetts*, v.157p.2126-2131, 2009.

JACQUES, R.J.S. Anthracene biodegradation by *Pseudomonas* sp isolated from a petro-chemical sludge landfarming. *International Biodeterioration and Biodegradation*. v. 56, n. 3, p. 150-156, 2005b.

JACQUES, R.J.S. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. *Bioremediation Journal*. v. 11, n. 1, p.1-11, 2007.

KARIGAR, C. et al. Phenol degradation by immobilized cells of *Arthrobacter citreus*. *Biodegradation*, v. 17, n. 1, p. 47-55, 2006.

KHAN, S. U.; In *Fundamental Science in the Soil. Environment. Ed.*, Cap 2, p9. 1980.

KIM, D. et al. Molecular cloning and functional characterization of the genes encoding benzoate and p-hydroxybenzoate degradation by the halophilic *Chromohalobacter* sp. strain HS-2. *FEMS microbiology letters*, v. 280, n. 2, p. 235-241, 2008.

KIMURA, M. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* v.16, p. 111-120, 1980.

KUMAR S., TAMURA K., AND NEI, M. MEGA 3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*. v.5, p.150-163, 2004.

LUO, S; ZHANG, J.; ZHOU, N. Molecular cloning and biochemical characterization of protocatechuate 3, 4-dioxygenase in *Burkholderia* sp. NCIMB 10467. *Microbiology*, v. 35, n. 5, p. 712-719, 2008.

LÓPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; JUAREZ, B.; MARTÍNEZ-TOLEDO, M.V.; e GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. "A identificação de bactérias isoladas de um lago, oligotróficas". *Ecotoxicology*,, 14, pp. 299-312. 2005.

- MANDELBAUM, R.T., DEBORAH, A.L., WACKETT. P., L. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. v.61, n.4, p.1451-1457, 1995.
- MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: MELO, I. S. et al. Biodegradação. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 1-28, 2001.
- MOREIRA, M. Identificação de consorcio bacteriano com potencial para biorremediação de arsênio e sulfeto. Dissertação (Engenharia Ambiental); Universidade Federal de Ouro Preto- Minas Gerais, 2013.
- MUTNURI, S. et al. Degradation of anthracene and pyrene supplied by microcrystals and non-aqueous-phase liquids. *Applied Microbiology and Biotechnology*. v. 67, n. 4, p. 569-576, 2005.
- PHILLIPS, A., JANIES, D. E WHEELER, W. Multiple sequence alignment in phylogenetic analysis. *Mol. Phylogenet. Evol* 16, 317-330. 2000.
- PULLEMAN, M., CREAMER, R., HAMER, U., HELDER, J., PELOSI, C., PERES, G., RUTGERS, M., Soil biodiversity, biological indicators and soil ecosystem services-an overview of European approaches. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 4:529-538. 2012.
- QUEIROZ, B. P. V. de; MONTEIRO, R. T. R. Degradação de <sup>14</sup>C-Atrazina em solo sob condições semicontroladas. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 35, n. 04, p. 849-856, 2000.
- RALEBITSO, T. K.; SENIOR, K.; VANVERSEVELD, H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation*, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 11-19, jan. 2002.
- RADEHAUS, P.M; SCHMIDT, S.K. Characterization of a novel *Pseudomonas* sp. that mineralizes high concentrations of pentachlorofenol. *Applied and Environmental Microbiology*, v.58, p.2879–2885, 1992.
- REID, WALTER V. Prospección de la biodiversidade. Instituto Nacional de Biodiversidade, San José, Costa Rica. Editado pelo World Resources Institute. 1993.

- ROUSSEAU, S. HARTMANN; SOULAS, A. G. Isolamento e caracterização de bactérias Gram positivas e Gram negativas capazes de degradar a atrazina obtidas de diferentes tipos de solos franceses. *Microbiologia*, v.36, p.211-222. 2001.
- SAITOU, N., NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* v.4, p.406-425, 1987.
- SANTOS, L. A. Uso de ferramentas de bioinformática para estudos de epidemiologia molecular, filogeografia e filodinâmica viral. Dissertação (Pós- Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) Salvador, BA – FIOCRUZ, 139p. 2010.
- SANTOS, C. G. G; MUNIZ, M. J. S; BARBOSA, J. G; SOUZA, A. J; SILVA, J. A. T; BADJI, C. A; SOBRAL, J. K. Influência do pesticida orthene sobre o crescimento de bactérias diazotróficas do gênero *Burkholderia*. Xiii jornada de ensino, pesquisa e extensão (jepex, ufrpe), Recife, 2013.
- SEMPLE, K.; FERMOR, T. The bioremediation of xenobiotic contamination by composts and associated microflora. In: International congress on the science and cultivation of edible fungi, 14., 1995, Oxford: Oxford University Press, p. 917-924, 1995.
- SILVA, C. M. M. S. O fenômeno da biodegradação acelerada de pesticidas. In: MELO, I. S. et al. Biodegradação. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 15- 28, 2001.
- SILVEIRA, A.P.D, FREITAS,S.S Microbiota do Solo e Qualidade Ambiental. Instituto Agrônomo Campinas, São Paulo, 2007.
- SOUZA, M.L., SEFFERNICK, J., MARTINEZ, B., SADOWSKY M.J., WACKETT, L.P. 1998. The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved.. *J Bacteriol.* v. 180(7), p.1951-4, 1998.
- SOUZA, BRUNO SANTOS. Avaliação do Processo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV como Pós-Tratamento e Remoção da Atrazina de um Efluente Secundário de ETE para Fins de Reuso. Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ ProGrama de Engenharia Química, 2011.
- STEFFEN, G.P.K., STEFFEN, N. B., ANTONIOLLI, Z.I. Contaminação do Solo e da Água pelo Uso de Agrotóxico. *Tecno-lógica*, 15: 15-21. 2011.

SEFFERNICK, J. L. ALEEM, A. OSBORNE, J. P. JOHNSON, G. SADOWSKY, M. J. WACKETT, L. P. Hydroxyatrazine *N*-Ethylaminohydrolase (AtzB): an Amidohydrolase Superfamily Enzyme Catalyzing Deamination and Dechlorination. *Journal of bacteriology*. Vol. 189 N° 19. 2007.

SUMARES, J. A. P. Influência da temperatura sobre fisiologia e crescimento de *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. Dissertação (Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas) Araraquara, SP – UNESP, 92p. 2012.

SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: EBING, W. ed *Terrestrial Behaviour of Pesticides*. Springer verlag, p.25-75, 1992.

STRUTHERS, J.K.; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T.B.. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology* v.64, p. 3368–3375, 1998.

THAKUR I.S.; Venna P.; Upadhayaya K. Molecular cloning and characterization of pentachlorophenol-degrading monooxygenase genes of *Pseudomonas* sp. from the chemostat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290: 770-74, 2002.

THOMPSON J.D., HIGGINS D.J., GIBSON T.J. CLUSTAL W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* v.22, p.4673–4680, 1994.

TOPP, E., MULBRY, W.M.; ZHU, H.; NOUR, S.M.; CUPPELS, D. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*. v.66, p.3134–3141, 2000.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. *Microbiologia*. 8.ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 894p. 2005.

TYLER, HEATHER L. et al. 2013. Determining potential for microbial atrazine degradation in agricultural drainage ditches. *Journal of environmental quality*, v. 42, n. 3, p. 828-834, 2013.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: micro-organismos degradadores do herbicida atrazina. *Biotecnologia*, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

UETA, J;N.L; SHUHAMA, I,K; CERDEIRA, A.L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: micro-organismos degradadores de atrazina provenientes de solos da Região do Aquífero Guarani. *Revista Plantio Direto*, 1 fev. 2001.

USEPA (Agência de proteção ambiental dos Estados Unidos. Sobre Agrotóxicos. Pesticidas Home. 2009. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticidas/about/index.htm>> Acesso em: 19 de novembro de 2014.

VIDALI, M. Bioremediation. *Pure Applied Chemistry*, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VINUESA, P., SILVA, C., WERNER, D. e MARTINEZ-ROMERO, E. Population genetics and phylogenetic inference in bacterial molecular systematics: the roles of migration and recombination in *Bradyrhizobium* species cohesion and delineation. *Mol Phylogenet Evol.* 34: 29-54. 2005.

WETLER-TONINI, R. M. C.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Biodegradação Bacteriana de Petróleo e seus Derivados *Rev. Virtual Quim.*, v. 3 (2), p.78-87, 2011.

YANG, C. LI, Y. ZHANG, K. WANG, X. MA, C. TANG, H. XU, P. Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. *Springer Science+Business Media B.V.* 2009.

YANG, Z.; NIELSEN, R. Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages. *Mol. Biol. Evol.*, v.19, p.908-917, 2002.

YANZE-KONTCHOU, C. AND GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a Pseudomonas strain. *Applied and Environmental Microbiology*. v.60, p. 4297–4302, 1994.

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