



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DO MAR
CURSO DE CIÊNCIAS AMBIENTAIS**

SANDRA REBECA OLIVEIRA MARTINS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS EM
ESTUÁRIO DO RIO JAGUARIBE (CEARÁ, BRASIL).**

FORTALEZA

2015

SANDRA REBECA OLIVEIRA MARTINS

**BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS EM
ESTUÁRIO DO RIO JAGUARIBE (CEARÁ, BRASIL).**

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Orientadora: Prof. Dr.^a Oscarina Viana de Sousa.

Co-orientadora: Dr.^a Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Rui Simões de Menezes

M347b Martins, Sandra Rebeca Oliveira.

Bioprospecção de bactérias degradadoras de agrotóxicos em estuário do Rio Jaguaribe (Ceará, Brasil) / Sandra Rebeca Oliveira Martins – 2015.
60 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso Bacharelado em Ciências Ambientais, 2015.

Orientação: Profª. Drª. Oscarina Viana de Sousa.

Co-Orientação: Drª. Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

1. Bactéria. 2. Agrotóxicos - Contaminação. 3. Microbiologia. I. Título.

CDD 579.3

SANDRA REBECA OLIVEIRA MARTINS

BIOPROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS EM
ESTUÁRIO DO RIO JAGUARIBE (CEARÁ, BRASIL).

Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Ambientais.

Aprovada em: 03/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr. Oscarina Viana Sousa (orientadora)

Universidade Federal do Ceará

Prof^ª Dr. Regiane Helena Silva dos Fernandes Vieira

Universidade Federal do Ceará

Prof^ª Dr. Renata Albuquerque Costa

Faculdade INTA, Brasil

A Deus.

Aos meus pais Sandra e Airton que são a minha base e o meu porto seguro.

Aos meus avós (*in memoriam*) que sempre torceram por mim e de onde estiverem, estão comemorando esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por conduzir a minha vida e me dar forças para superar as adversidades.

Aos meus pais, Sandra e Airton por toda a dedicação e amor a mim devotados. Obrigada por me ensinarem o valor da educação, por sempre acreditarem em mim e me impulsionarem a ir além. O amor e estímulo de vocês, em todos os momentos, são fundamentais. Amo vocês!

Aos meus avós, Manoel Izidório Filho e Oscarina Lima de Oliveira; Raimundo Lúcio Pereira Martins e Olindina Pereira Martins (*in memoriam*) pelo amor e cuidado que demonstravam por mim e por me servirem de exemplo.

Aos meus familiares, pela grande torcida e apoio.

Aos grandes amigos que eu tenho nessa vida, em especial à Jorgiana Silva de Assis, por acreditar em mim, me apoiar e me entender, sempre. Às amigas Lorena Colares e Talita Rocha por uma vida inteira de amizade e por estarem ao meu lado em todos os momentos. À Rayhna Rodrigues pela certeza da amizade e por me divertir todas as vezes em que estamos juntas. À Lídia Teixeira pelo afeto e cuidado constantes.

À Prof^ª. Oscarina, por aceitar ser minha orientadora e me dar à oportunidade de fazer parte do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP), por acreditar no meu trabalho e pelos ensinamentos dados em sala de aula e dentro do laboratório.

Às professoras Prof^ª. Dr^ª. Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira e Prof^ª. Dr^ª. Renata Albuquerque Costa, por aceitarem o convite e participarem da banca examinadora. Desde já, agradeço as contribuições e sugestões.

À Cristiane Teles, por ser uma mãezona e uma amiga. Por acreditar na minha capacidade, me incentivar e me dar ânimo sempre que precisei e por me ajudar em tudo. Cris, você foi indispensável na realização desse trabalho. Muito Obrigada!

À Gleire Menezes, Marina Torres, Rosa Rebouças e Rafael Rocha por me ajudarem e tantas vezes tirarem minhas dúvidas. Muito Obrigada!

A todos os meus colegas do LAMAP, pelo convívio diário e divertido. Em especial à Thiara do Amaral, Jade Abreu, Raquel Soares, Daniel Rodrigues, Jéssica Lucinda, Hemilly Praxedes, Déborah Amarante. Muito Obrigada por me ajudarem quando precisei.

Aos meus colegas de faculdade por esses anos de convivência e por tantos momentos compartilhados.

Aos professores que tive ao longo da graduação e que contribuíram para a minha formação acadêmica.

À Eunice Menezes, secretária do curso de Ciências Ambientais, que sempre se mostrou disposta a me ajudar e resolver tudo o que precisei.

Ao Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos – LACOR, por conceder os agrotóxicos usados no presente estudo.

À CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa.

Aos meus cachorros que me dão alegrias diárias, principalmente à Frida, meu grande amor canino, razão de tanto contentamento, pelo amor leal e desmedido e por ser uma das minhas melhores companhias.

A cada um que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização desse trabalho.

Muito Obrigada!!

“Eu queria aprender o idioma das árvores.
Saber as canções do vento nas folhas da tarde.
Eu queria apalpar os perfumes do sol.”
(Manoel de Barros)

RESUMO

O uso indiscriminado de agrotóxicos ocasiona prejuízos ao meio ambiente e também à saúde humana, devido à sua toxicidade. Uma alternativa para mitigar os impactos causados pelos agrotóxicos é a biodegradação dessas substâncias por bactérias. O objetivo dessa pesquisa foi selecionar bactérias potencialmente degradadoras de agrotóxicos isoladas do estuário do Rio Jaguaribe, no semiárido do Ceará. Foram realizadas três coletas em três pontos previamente estabelecidos, variando de acordo com o gradiente de salinidade (doce, salobre e salgado). Em cada ponto foram coletadas amostras de água e de sedimento. As amostras foram inoculadas em meios de cultura convencionais e meios de cultura com adição de um mix contendo os agrotóxicos: picloram, metil paration e atrazina. Essa diferenciação dos meios serviu para observar a influência da presença da substância seletiva (mix de agrotóxico) sobre a contagem total das bactérias cultiváveis. Em seguida, as estirpes foram isoladas, quantificadas, identificadas e submetidas aos testes de antibiograma e cura de plasmídeo. A contagem das bactérias variou de $18,6 \times 10^2$ a $>250 \times 10^6$ est. para as amostras de água, de 180×10^1 a $159,5 \times 10^3$ para as amostras de sedimento controle e de 145×10^1 a $>250 \times 10^6$ est. para as amostras de sedimento com agrotóxico. Dentre os isolados, as bactérias Gram-positivas (63%) se sobressaíram sobre as bactérias Gram-negativas (37%). Do total de isolados, 86% foram identificadas até o nível de gênero e 14% foram identificadas até o nível de filo. Do total de estirpes isoladas, 61% apresentaram resistência a um ou mais antibióticos e o maior perfil de resistência observado foi referente aos antimicrobianos Penicilina e Ampicilina. Das estirpes que foram submetidas ao procedimento de cura de plasmídeo, 61% apresentaram resistência potencialmente cromossômica e 19% apresentaram resistência plasmidial. Os resultados mostraram que foi possível isolar bactérias com potencial degradador e que a equivalência encontrada entre as populações de bactérias totais e degradadoras de agrotóxicos no estuário do rio Jaguaribe é um fator importante, do ponto de vista ecológico, indicando que a presença de substâncias químicas poluidoras vem exercendo uma pressão seletiva na comunidade microbiana local.

Palavras chave: comunidade bacteriana, contaminação, pesticidas, biodegradação.

ABSTRACT

The indiscriminate use of pesticides causes damage to the environment and human health as a result of its toxicity. An alternative to mitigate the impacts of pesticides is the biodegradation of these substances by bacteria. The objective of this research was to select potentially pesticide-degrading bacteria isolated from the estuary of Jaguaribe River, semiarid of Ceará state. Three collections were carried out at three points previously established according to salinity gradient (fresh, brackish and salt water). In each point were collected water and sediment samples. The bacterial strains were inoculated onto conventional culture medium and culture medium added by mix of pesticides picloran, metil parathion and atrazine. This differentiation media was used to observe the influence of the presence of selective substance (pesticide mix) on the count of total cultivable bacteria. Then, the bacteria were isolated, quantified, identified and submitted to antimicrobial susceptibility test and plasmid curing. The bacterial counts were ranged of $18,6 \times 10^2$ a $>250 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹ est. for water samples, 180×10^1 a $159,5 \times 10^3$ UFC.g⁻¹ for control sediment samples and 145×10^1 a $>250 \times 10^6$ UFC.g⁻¹ est. for sediment samples onto pesticide mix culture medium. Among the strains, 67% were Gram-positive bacteria, while 37% Gram-negative. Of the total strains, 86% were identified until genus and 14% until phylum. Furthermore, 61% of strains were resistant to one or more antibiotics and a largest profile was observed resistance to penicillin and ampicillin. Of the strain subjected to plasmid curing, 61% had potentially chromosomal resistance and 19% had plasmid-mediated resistance. The results showed that was possible to isolate potentially degrading-bacteria. Also, from an ecological point of view, the equivalence found among the total population and pesticide-degrading bacteria in the estuary of the river Jaguaribe is an important factor, indicating that the presence of polluting chemicals has exerted a selective pressure on the local microbial community.

Keyword: bacterial community, contamination, pesticides, biodegradation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Mapa de localização dos pontos de coleta das amostras de água e de sedimento, no estuário do rio Jaguaribe, de acordo com o gradiente de salinidade	24
Figura 2 – Fluxograma das diluições e processamento das amostras de água.....	26
Figura 3 – Fluxograma das diluições e processamento das amostras de sedimento	27
Figura 4 – Fluxograma da Técnica de Coloração de Gram	28
Figura 5 – Fluxograma do teste de antibiograma	31
Figura 6 – Fluxograma da técnica de cura de plasmídeo	32

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e aos principais grupos químicos a que pertencem.....	17
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Percentual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de amostras de água e sedimento ao longo do baixo Rio Jaguaribe - CE.....	36
Gráfico 2 – Percentual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas distribuído por ponto de coleta isoladas de amostras ambientais ao longo do baixo Rio Jaguaribe.....	37
Gráfico 3 - Percentual de isolados bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos por amostra e por ponto	38
Gráfico 4 – Percentual das linhagens bacterianas identificadas nas amostras de água e de sedimento.....	39
Gráfico 5 – Abundância relativa de grupos bacterianos por ponto de coleta	40
Gráfico 6 – Diversidade bacteriana de acordo com os pontos de coleta e por amostra.....	40
Gráfico 7 - Perfis relativos das bactérias frente aos antimicrobianos testados, por ponto de coleta.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL ₅₀	18
Tabela 2 –	Classificação dos Agrotóxicos quanto à sua classe, grupo químico a que pertence e toxicidade	19
Tabela 3 –	Consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011	20
Tabela 4 –	Discos antimicrobianos utilizados de acordo com os mecanismos de ação de cada grupo.....	30
Tabela 5 –	Parâmetros físico-químicos da água determinados no momento da coleta ..	33
Tabela 6 –	Contagens das populações de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) totais e potencialmente degradadoras	34
Tabela 7 –	Número e distribuição das culturas bacterianas obtidas ao longo do estuário do Rio Jaguaribe por ponto de coleta e matriz ambiental	36
Tabela 8 –	Numero de bactérias resistentes a antimicrobianos de acordo com a matriz ambiental de origem e característica da parede	43
Tabela 9 –	Caracterização da origem da resistência de acordo com o número de estirpes	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABRASCO	Associação Brasileira de Saúde Coletiva
AMP	Ampicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APA	Avaliação do Potencial de Periculosidade Ambiental
BAAR	Coloração álcool-ácido resistente
BHC	Bactérias heterotróficas cultiváveis
CLO	Cloranfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standard Institute
DSV	Departamento de Sanidade Vegetal
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Est.	Estimado
GEN	Gentamicina
GPS	Global Positioning System
GSP	Ágar Seletivo para Pseudomonas Aeromonas
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IBAMA	Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAMAP	Laboratório de Microbiologia Ambiental
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
NaCl	Cloreto de Sódio
NAL	Ácido Nalidíxico
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
PEN	Penicilina
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	<i>South</i>
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
SUT	Sulfazotrim
TCBS	Ágar Tiosulfato Citrato Bile Sacarose
TSA	Ágar Triptona Soja
VNC	Viáveis mas não cultiváveis
VP	Vermelho de Metila

VP Voges-Proskauer
W *West*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
DL ₅₀	Dose média letal
g	Gramas
Km	Quilômetro
km ²	Quilômetro quadrado
mg/kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitro
nm	Nanômetro
ppm	Parte por milhão
UFC/g	Unidades formadoras de colônia por grama
UFC/ml	Unidades formadoras de colônia por mililitro
µg	Micrograma
m	Metro
U	Unidade
µg/mL	Micrograma por mililitro
°C	Grau Celsius
L	Litro
Min	Minuto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1	Estuários	15
2.1.1	<i>Estuário do Rio Jaguaribe</i>	16
2.2	Agrotóxicos	16
2.2.1	<i>Consumo de Agrotóxicos no Brasil</i>	20
2.3	Bactérias Degradadoras	21
2.4	Biorremediação	21
3	OBJETIVOS	23
3.1	Objetivos Específicos	23
4	MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1	Local de Coleta	24
4.2	Procedimentos de Coleta	25
4.2.1	<i>Determinação dos parâmetros físico-químicos</i>	25
4.2.2	<i>Amostras de Água</i>	25
4.2.3	<i>Amostras de Sedimento</i>	25
4.3	Diluições e Processamento das Amostras	25
4.3.1	<i>Amostras de Água</i>	25
4.3.2	<i>Amostras de Sedimento</i>	27
4.4	Isolamento Bacteriano	28
4.5	Caracterização fenotípica das estirpes isoladas	28
4.5.1	<i>Análise Morfotintorial</i>	28
4.6	Identificação bioquímica das estirpes isoladas	29
4.7	Teste de antibiograma através do método de difusão em discos (Teste de Kirby – Bauer)	29
4.8	Cura de plasmídeo	32
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	Parâmetros físico-químicos da água nos pontos de coleta	33
5.2	Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis potencialmente degradadoras de agrotóxicos	34
5.3	Características tintoriais das estirpes isoladas	36

5.4	Diversidade bacteriana.....	38
5.5	Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos	41
6	CONCLUSÃO.....	46
7	REFERÊNCIAS.....	47

1 INTRODUÇÃO

Com o início da “Revolução Verde”, na década de 1950, modificações significativas foram observadas tanto no processo tradicional de produção agrícola, como nos seus impactos sobre o ambiente e sobre a saúde humana. Tecnologias mais modernas passaram a ser usadas tendo como base o uso extensivo de agentes químicos visando o controle de doenças, a proteção contra pragas e insetos e o consequente aumento da produtividade (MOREIRA *et al.*, 2002).

O padrão agrícola estabelecido no período do pós-guerra teve sua base firmada na mecanização, técnicas de irrigação, cultivos potencialmente rentáveis e, principalmente, no uso de agroquímicos como agrotóxicos, fertilizantes e corretivos como meios de elevar a produtividade. Existe, portanto, uma estreita relação entre a agricultura intensiva moderna e a utilização de agrotóxicos (SPADOTTO, 2006).

A utilização desses produtos em sistemas abertos como o meio ambiente, impossibilita o efetivo controle e proteção dos compartimentos ambientais (água, solo, ar) e dos ecossistemas (ABRASCO, 2015). Os agrotóxicos podem ser persistentes, móveis e tóxicos. Tendem a acumular no solo e na biota, podendo chegar às águas superficiais através do escoamento e às águas subterrâneas por meio da lixiviação. Seu uso intensivo está associado à contaminação de alimentos, à degradação ambiental e agravos à saúde da população, tanto dos consumidores como dos trabalhadores que lidam diretamente com esses produtos (BRASIL, 2010a).

No Brasil, o agronegócio tem gerado impactos ambientais na região Nordeste, sendo a agricultura um dos principais fatores de poluição difusa de águas e solos por fertilizantes e agrotóxicos (PINHEIRO; AMARAL; CARVALHO, 2010). No último censo agropecuário realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o Ceará apareceu como o quarto estado brasileiro em número de estabelecimentos que utilizam agrotóxicos (BRASIL, 2006a).

O agronegócio da fruticultura irrigada vem se desenvolvendo no Ceará em regiões como a do Baixo Jaguaribe. Devido ao modelo químico-dependente de agrotóxicos, a cadeia produtiva do agronegócio se configura como um processo de insustentabilidade ambiental (ABRASCO, 2015). Essa situação é ainda mais crítica quando consideramos a fragilidade hídrica do nosso estado.

O Rio Jaguaribe é o maior curso d'água do estado do Ceará. Tem sua nascente na serra da Joanhina no município de Tauá e deságua no Oceano Atlântico, no município de Fortim. Sua bacia é considerada uma das mais importantes em termos socioeconômicos do Ceará (OLIVEIRA, 2012).

A conservação e o controle de ecossistemas estuarinos tem sido de grande importância, visto que, esses ambientes apresentam um quadro preocupante de contaminação dos sedimentos e das águas superficiais por substâncias químicas tóxicas (DOMINGUES, 2007).

A biodegradação de agrotóxicos por bactérias surge como uma alternativa de mitigação dos impactos causados por essas substâncias no meio ambiente (SANTOS 2013).

A biodegradação de poluentes orgânicos é um processo que, para algumas substâncias, pode demorar anos, por isso a utilização de microrganismos como alternativa que acelera esse fenômeno natural (MELO 2006).

A biorremediação é a alternativa ecologicamente mais adequada para mitigação de áreas afetadas ao possibilitar a degradação do poluente por processos naturais (BONONI *et al.*, 2008). Por consequência, levando em conta a necessidade de técnicas viáveis para mitigar as áreas contaminadas, a bioprospecção de bactérias com potencial biotecnológico tem se tornado uma etapa necessária dentro das chamadas tecnologias limpas (SILVA, 2014).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Estuários

Os estuários podem ser definidos como uma região costeira semifechada onde há mistura da água doce do rio com a água do mar, sendo ambientes que apresentam altas variações físico-químicas (SCHMIEGELOW, 2004). São importantes áreas de reprodução, alimentação e refúgio de várias espécies e configuram-se como um dos ambientes mais importantes da zona costeira (DANTAS, 2011).

Os estuários são, portanto, áreas de transição entre oceano e continente e que servem como habitat natural de diversas comunidades biológicas, além de serem fundamentais para o desenvolvimento urbano, social e econômico de cidades que o circundam. Porém, os estuários, apresentam características que são propícias à acumulação de poluentes oriundos de atividades antrópicas, tais como os agrotóxicos (DUAVÍ, 2013).

Nas últimas décadas, devido ao crescimento urbano e a intensificação de algumas atividades como a carcinicultura, houve um aumento do uso e ocupação de regiões estuarinas (COSTA, 2013), tornando esses ecossistemas em ambientes frágeis e vulneráveis devido às pressões antrópicas e causando um desequilíbrio em sua dinâmica natural (ARAÚJO; FREIRE, 2007). Represamento de rios, agropecuária e outras atividades antrópicas realizadas nas bacias de drenagem ou nas áreas adjacentes ao estuário também promovem impactos sobre esse ecossistema (TORRES, 2009).

Os estuários atuam como depósito de nutrientes, matéria orgânica particulada, sedimento e contaminantes. A introdução de xenobióticos em ambientes estuarinos, associada ao processo de sedimentação, pode acarretar em problemas aos organismos aquáticos e à saúde humana (DOMINGUES, 2007).

Ambientes naturais, comumente, apresentam comunidades microbianas diversificadas com composições e estruturas determinadas por fatores físicos, químicos e biológicos e quaisquer alterações ambientais decorrentes de atividades antrópicas causam mudanças significativas nessas comunidades microbianas (PIZA, 2004).

A microbiota de estuários, normalmente, é equilibrada com presença de bactérias que podem ser benéficas ou patogênicas oportunistas (MENEZES *et al.*, 2013).

Estudos realizados já descreveram a diversidade microbiana dos estuários e alguns demonstraram como as comunidades microbianas presentes na água doce e marinha se misturam ao longo do gradiente estuarino (CRUMP *et al.*, 2004).

2.1.1 Estuário do Rio Jaguaribe

A região estuarina do Rio Jaguaribe está localizada no litoral leste do Estado do Ceará, entre os municípios de Aracati, Fortim e Itaiçaba. Seu estuário possui 36 km de extensão, ocupando uma área de 641.216 km², sendo limitada a montante pela barragem de Itaiçaba (PAULA; MORAIS; PINHEIRO, 2006).

O Rio Jaguaribe possui 610 km de extensão (CAVALCANTE; CUNHA, 2012) e apresenta a maior bacia hidrográfica do estado do Ceará, com 75.000 km², ocupando mais da metade do estado (GODOY; LACERDA, 2011). Devido a sua extensão e por estar localizado no semiárido, foi considerado o maior rio seco do mundo (CAMPOS, 2006).

Este rio representa a maior fonte hídrica do Estado e juntamente com os rios Banabuiú e Salgado, formam as bacias do Alto, Médio e Baixo Jaguaribe (PANTALENA; MAIA, 2014).

Atividades antrópicas realizadas na região do Rio Jaguaribe, tais como: deposição de resíduos sólidos, despejos de efluentes, contaminação da fauna por escoamento superficial de áreas agrícolas vem comprometendo o valor paisagístico local e a produtividade estuarina do sistema, favorecendo assim, o desequilíbrio ambiental do ecossistema estuarino do Rio Jaguaribe (PAULA; MORAIS; PINHEIRO, 2006).

2.2 Agrotóxicos

Segundo a Lei Federal nº 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989) e o Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002 (BRASIL, 2002) que a regulamenta, os agrotóxicos são definidos como:

- a) *os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da*

flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos;

b) substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

De acordo com seus vários usos, os agrotóxicos podem receber diferentes nomenclaturas, tais como: defensivos agrícolas, praguicidas, pesticidas, remédio de planta e veneno (DUAVÍ, 2013).

Os agrotóxicos podem ser classificados quanto à sua ação e grupos químicos a que pertencem (Quadro 1), quanto ao seu potencial de periculosidade ambiental e quanto à sua toxicidade.

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS, 1997), essa classificação é importante para o diagnóstico de intoxicações e para o uso de tratamento específico.

Quadro 1 – Classificação dos agrotóxicos quanto à sua ação e aos principais grupos químicos a que pertencem.

Classificação	Ação	Grupos químicos
Inseticidas	Usados no combate de insetos, larvas e formigas	Organofosforados Carbonatos Organoclorados Piretróides
Fungicidas	Usados no combate aos fungos	Etileno-bis-ditiocarbonatos Trifenil estânico Captan Hexaclorobenzeno
Herbicidas	Usados no combate a ervas daninhas	Paragat Glifosato Pentaclorofenol Derivados do ácido fenoxiacético Dinitrofenóis

Fonte: Organização Pan-Americana de Saúde – (OPAS, 1997).

Há ainda outros grupos como: raticidas, acaricidas, molusquicidas, nematicidas e fungicidas que são usados no combate a roedores, ácaros, moluscos, nematóides, insetos e bactérias, respectivamente (OPAS, 1997).

Com relação ao potencial de periculosidade ambiental dos agrotóxicos, o Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) é o órgão responsável por realizar essa avaliação, que é conhecida como APA – Avaliação do potencial de periculosidade ambiental.

De acordo com a Portaria nº 84, de 15 de outubro de 1996 (BRASIL, 1996), os agrotóxicos são classificados quanto a sua periculosidade ambiental baseando-se em parâmetros como: bioacumulação, transporte, persistência, toxicidade a diversos organismos e potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico.

No Brasil, a classificação dos agrotóxicos segundo seu poder tóxico está a cargo do Ministério da Saúde (OPAS, 1997).

A toxicidade da maioria dos agrotóxicos é expressa em valores referentes à dose média letal (DL₅₀), por via oral, determinada em mg/kg (miligramas do produto tóxico por quilo de peso vivo) necessária para provocar a morte de 50% da população em estudo como ratos e outros animais testes (BRASIL, 2003).

De acordo com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS, 1997), é obrigatório por lei a apresentação de uma faixa colorida nos rótulos dos agrotóxicos indicando a sua classe toxicológica. A tabela 1 apresenta a classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL₅₀.

Tabela 1 – Classificação toxicológica dos agrotóxicos em função da DL₅₀.

Classe Toxicológica	Toxicidade	DL₅₀ (mg/kg)	Cor da faixa
Classe I	Extremamente tóxico	≤ 50 mg/kg	Vermelho
Classe II	Altamente tóxico	50 – 500 mg/kg	Amarelo
Classe III	Moderadamente tóxico	500 – 5.000 mg/kg	Azul
Classe IV	Pouco tóxico	> 5.000	Verde

Segundo a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN, 2000), no Brasil, os órgãos responsáveis por regular e fiscalizar a distribuição e comercialização de agrotóxicos são a Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), do Ministério da Saúde e o

Departamento de Sanidade Vegetal (DSV), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).

A tabela 2 apresenta a classificação dos agrotóxicos usados no presente estudo quanto a sua classe, grupo químico e toxicidade.

Tabela 2 – Classificação dos Agrotóxicos quanto à sua classe, grupo químico a que pertence e toxicidade.

Nome	Fórmula bruta	Classe	Grupo químico	Classificação toxicológica
Picloram	$C_6H_3Cl_3N_2O_2$	Herbicida	Ácido piridinocarboxílico	Classe I
Metil Paration	$C_8H_{10}NO_5PS$	Inseticida	Organofosforado	Classe I
Atrazina	$C_8H_{14}ClN_5$	Herbicida	Triazina	Classe III

Fonte: Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2011).

No Brasil, os herbicidas, caso do picloram e atrazina, correspondem a 45% de todo o mercado de defensivos agrícolas (BRASIL, 2012). O crescente consumo de agrotóxicos da classe dos herbicidas pode estar relacionado à expansão da fronteira agrícola e o aumento de terras com práticas de plantio direto (BRASIL, 2010b). Parte desses herbicidas apresenta atividade residual no solo.

O picloram é um herbicida ambientalmente perigoso, principalmente em locais com lençol freático superficial e em áreas que integram lavouras e pecuária (SÉRGIO *et al.*, 2009). Segundo Assis *et al.* (2010), a baixa umidade do solo pode aumentar o poder de sorção do picloram em colóides orgânicos e minerais do solo, tornando o herbicida parcialmente inativo. Por outro lado, a manutenção da umidade do solo favorece a permanência do picloram, contribuindo para a absorção do mesmo pelo sistema radicular de algumas plantas.

Do total da produção mundial de herbicidas, 30% correspondem ao grupo da triazina, sendo a atrazina o herbicida mais utilizado (RODRIGUES; ALMEIDA 2005; LEBARON; MCFARLAND; BURNSIDE, 2008). A atrazina é um contaminante comumente encontrado em águas subterrâneas e superficiais, é conhecida também por ser um disruptor endócrino causador de disfunções reprodutivas em anfíbios, peixes, répteis e mamíferos. Um exemplo dos diversos problemas reprodutivos causados pela atrazina é a “feminização” das gônadas masculinas de vários animais após exposição ao herbicida (TYRONE *et al.*, 2011).

De acordo com dados do IBAMA, em 2009, a atrazina esteve entre os dez ingredientes ativos mais comercializados no Brasil, ocupando o sétimo lugar no ranking (BRASIL, 2010b).

O metil paration é um organofosforado comumente utilizado na agricultura e aquicultura devido a sua elevada ação inseticida (MONTEIRO, 2006). Na aquicultura, os orgafosforados são usados com o intuito de controlar insetos predadores de peixes (MATAQUEIRO, 2002).

2.2.1 Consumo de agrotóxicos no Brasil

Segundo dados da ANVISA (BRASIL, 2012), desde 2008 o Brasil ocupa o lugar de maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Nos últimos dez anos, o mercado brasileiro de agrotóxico cresceu 190%, enquanto que o mercado mundial cresceu 93%. Esse mercado movimentou cerca de 936 mil toneladas desses produtos, na última safra (segundo semestre de 2010 e primeiro semestre de 2011). A tabela 3 apresenta o crescimento do consumo de agrotóxicos pela agricultura brasileira segundo dados da Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO, 2015).

Tabela 3 – Consumo de agrotóxicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011.

Ano	2002	2003	2004	2005	2006
Agrotóxicos (milhões de L)	599,5	643,5	693,0	706,2	687,5
Ano	2007	2008	2009	2010	2011
Agrotóxicos (milhões de L)	686,4	673,9	725,0	827,8	852,8

Fontes: SINDAG (2009, 2011), ANDA (2011), BRASIL (1998-2011).

De acordo com a Associação Brasileira de Saúde Coletiva, (ABRASCO, 2015), esse crescimento foi proporcional ao aumento das monoculturas que são cada vez mais dependentes de insumos químicos.

No Brasil, há uma concentração de mercado de agrotóxicos para determinadas categorias de produtos. Por exemplo, os herbicidas representam 45% do total de agrotóxicos comercializados, os fungicidas 14% do mercado nacional, os inseticidas 12% e as demais categorias de agrotóxicos correspondem a 29% (BRASIL, 2012).

2.3 Bactérias degradadoras

Bactérias degradadoras são microrganismos de grande interesse para a indústria e na aplicação e recuperação de ambientes contaminados. Estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de conhecer melhor a ecologia e dinâmica de comunidades bacterianas degradadoras de poluentes (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2011).

Os microrganismos degradadores proporcionam a mineralização e o total desaparecimento do poluente, não deixa resíduo e possibilita a rotação de culturas em uma mesma área. A aplicação desses microrganismos no solo pode reduzir a vida útil do poluente. A atrazina, por exemplo, tem sua vida útil reduzida devido à ação degradadora de microrganismos. Para os fungicidas, pode haver degradação de até 60% do produto absorvido no solo (MELO, 2006).

A degradação microbiana é uma importante rota de remoção de poluentes químicos no meio ambiente. Porém, a biodegradação de agrotóxicos é comumente complexa e envolve uma série de reações bioquímicas (KASEMODEL, 2012). Fatores ambientais de natureza física, química e biológica podem interferir na capacidade de degradação de um sistema bacteriano (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Há uma crescente necessidade por pesquisas que visem o conhecimento do maior número de espécies degradadoras, bem como suas características metabólicas e respectivas funções para a biodegradação de poluentes e a consequente descontaminação de ambientes contaminados por estes compostos (WETLER-TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2011).

2.4 Biorremediação

A biorremediação consiste em uma técnica que utiliza o metabolismo de microrganismo para redução a níveis aceitáveis ou eliminação de poluentes presentes no meio ambiente (COLLA *et al.* 2008).

O processo biológico de biorremediação tem sido recomendado como uma alternativa viável para o tratamento de ambientes contaminados com compostos recalcitrantes e funciona como uma alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz no tratamento desses ambientes (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

O sucesso da técnica de biorremediação requer microrganismos eficientes que consigam degradar o poluente a um nível mínimo. Para os pesticidas, uma taxa adequada de

biodegradação é necessária para atingir o nível aceitável do pesticida ou seus metabólicos no local contaminado em um curto período de tempo (SINGH, 2008).

3 OBJETIVOS

Selecionar bactérias aptas à degradação de agrotóxicos isoladas do estuário de um rio no semiárido cearense e avaliar a eficiência de degradação utilizando um bioindicador bacteriano.

3.1 Objetivos específicos

- 1.** Pesquisar a presença de bactérias com potencial de degradação de substâncias agrotóxicas na microbiota das águas e do sedimento do estuário do Rio Jaguaribe;
- 2.** Isolar e identificar, através de provas bioquímicas, as estirpes degradadoras;
- 3.** Determinar o perfil fenotípico de resistência a antibióticos entre os isolados bacterianos através de teste de antibiograma;
- 4.** Estabelecer a potencial origem genética dos perfis de resistência;
- 5.** Avaliar possíveis correlações entre os perfis de degradação e a resistência a antimicrobianos.

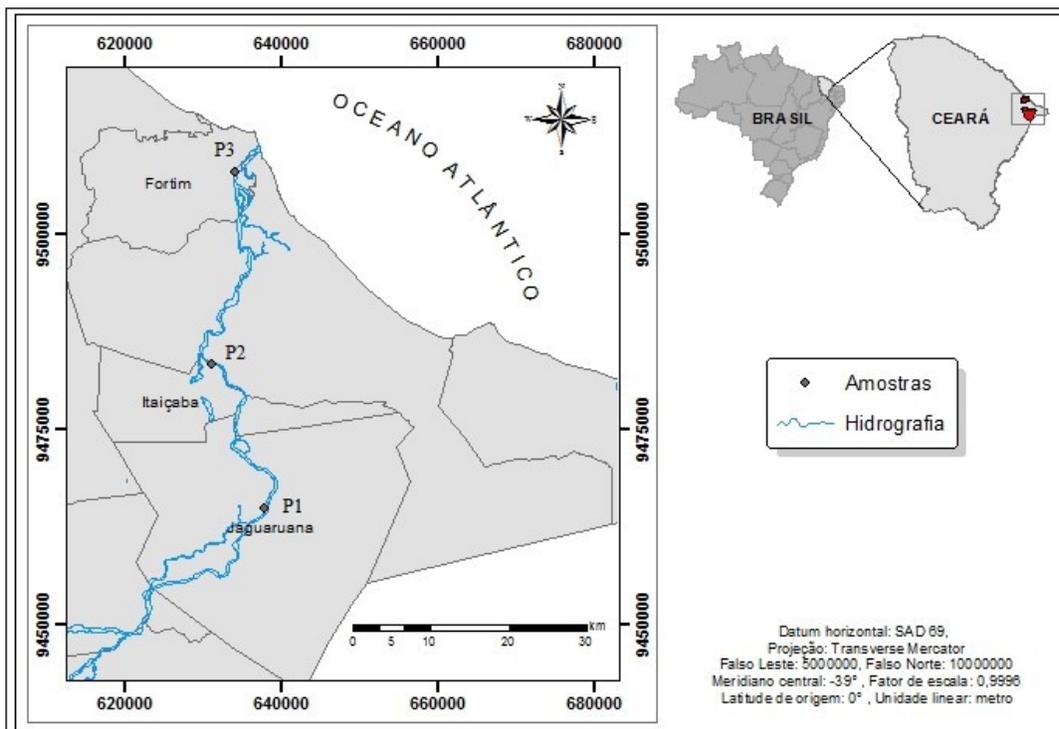
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Local de Coleta

Foram realizadas três coletas, entre outubro de 2013 e outubro de 2014, em três diferentes pontos previamente estabelecidos no estuário do Rio Jaguaribe, localizado no semiárido cearense. Os pontos seguiram um gradiente de salinidade da água ao longo do rio, sendo o Ponto 1 (P1) água doce; Ponto 2 (P2) água salobra e; Ponto 3 (P3) água salgada situados nas cidades de Jaguaruana, Itaiçaba e Fortim, respectivamente (Figura 1). Em cada ponto foram coletadas amostras de água e de sedimento.

As coordenadas associadas a cada um dos pontos de coleta foram obtidas com o uso de equipamento de geolocalização (GPS) Garmin Colorado 400d e são elas: (P1): 04° 50' 23.2" S; 037° 45' 29.2" W; (P2): 04° 40' 14.9" S; 037° 49' 09.0" W; (P3): 04° 27' 00.3" S; 037° 47' 34.8" W

Figura 1 - Mapa de localização dos pontos de coleta das amostras de água e de sedimento, no estuário do rio Jaguaribe, de acordo com o gradiente de salinidade.



Fonte: o autor.

4.2 Procedimentos de Coleta

4.2.1 Determinação dos Parâmetros físico-químicos

No momento da coleta, com a ajuda de um termômetro (INCOTERM), foi medida a temperatura da água. Em laboratório, foram medidos a salinidade, usando um refratômetro da marca ATAGO S/MILL e o pH (potencial hidrogeniônico) utilizando-se um potenciômetro da marca MARCONI – PA 200P.

4.2.2 Amostras de Água

Foi coletado 1L de água em garrafas de vidro âmbar previamente esterilizadas. O volume de água coletado foi filtrado em um chumaço de gaze estéril de 1 m de comprimento e embebido em caldo mineral contendo um mix com os seguintes agrotóxicos: Picloram, Metil-Paration e Atrazina correspondendo a uma etapa de seleção prévia. As amostras foram acondicionadas em caixa isotérmica e transportadas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) no LABOMAR/UFC.

4.2.3 Amostras de Sedimento

As amostras de sedimento foram coletadas com ajuda de um coletor de sedimento, armazenadas em sacos plásticos estéreis, acondicionadas em caixa isotérmica e transportadas até o Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP) no LABOMAR/UFC.

4.3 Diluições e Processamento das Amostras

4.3.1 Amostras de Água

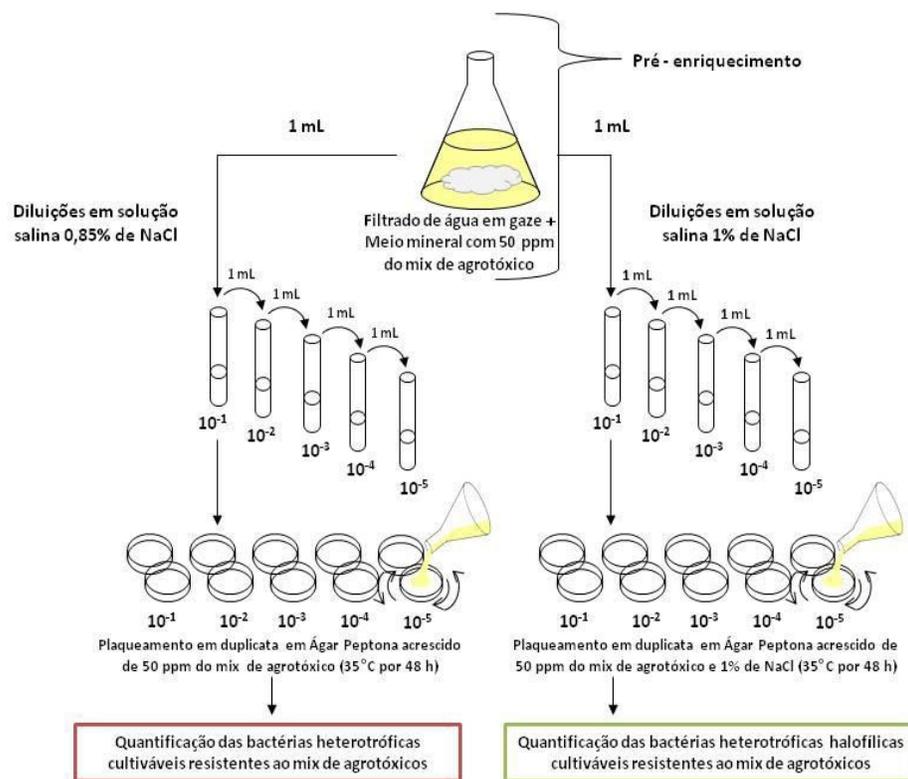
A partir do caldo de seleção prévia, foi diluído 1 mL da amostra em 9 mL de solução salina (proporção de 1:9) com concentração de NaCl ajustada de acordo com o grau de salinidade de cada ponto, ou seja, solução salina 0,85% para água doce (P1) e solução salina 1% para águas salobra e salgada (P2 e P3). Esta correspondeu à diluição 10^{-1} e a partir dela foram feitas diluições decimais até a diluição 10^{-5} . Vale ressaltar que, o ajuste de NaCl de

acordo com o grau de salinidade de cada ponto foi feito em todos os meios de cultura utilizados no presente estudo.

A quantificação das populações de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) potencialmente degradadoras de agrotóxico foi feita a partir de plaqueamento em Ágar Peptona acrescido de 50 ppm do mix de agrotóxicos. Foi usada a técnica de *Pour Plate*. O procedimento foi realizado em duplicata e as placas foram incubadas em estufa a 35°C por 48h (DOWNES; ITO, 2001).

As contagens foram feitas usando contador de colônias da marca Phoenix, e os resultados expressos em Unidades Formadoras de Colônias por mililitro da amostra (UFC/mL).

Figura 2 - Fluxograma das diluições e processamento das amostras de água.



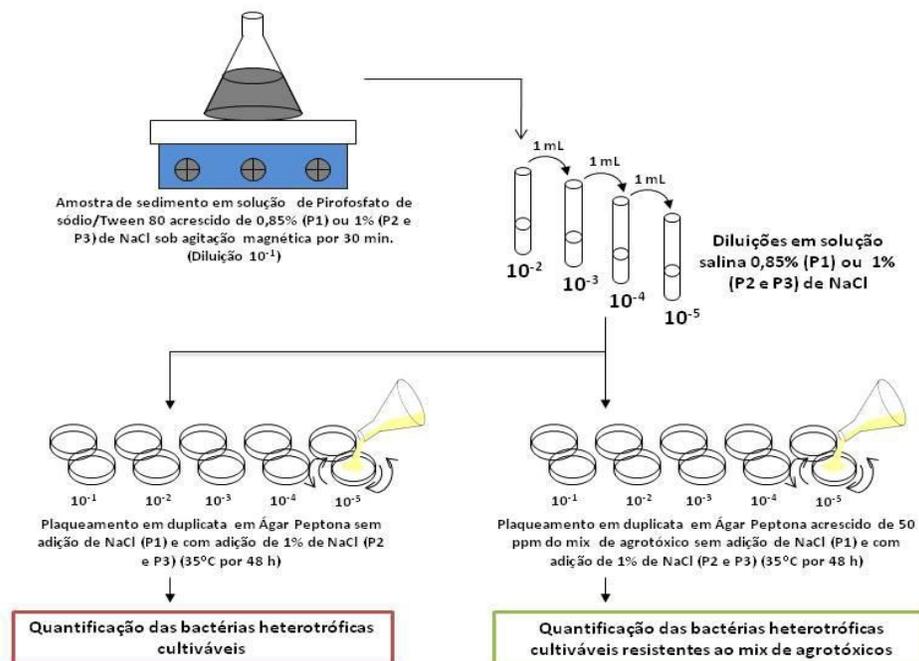
Fonte: Arquivo pessoal.

4.3.2 Amostras de Sedimento

Foram pesados 10 g das amostras de sedimento e diluídas em 90 ml de solução salina, com concentração de NaCl também ajustada de acordo com o grau de salinidade de cada ponto e contendo 1 g de Pirofosfato de Sódio e 0,1% de Tween 80. Esta solução foi mantida sob agitação magnética por 30 min e correspondeu à diluição 10^{-1} . A partir dela foram feitas diluições decimais até 10^{-5} . Em seguida, foi feito plaqueamento em Ágar Peptona acrescido de 50 ppm do mix de agrotóxico e em Ágar Peptona normal. Essa diferenciação dos meios serviu para observar a influência da presença da substância seletiva (mix de agrotóxicos) sobre a contagem total das bactérias cultiváveis. A Contagem Padrão em Placas foi feita usando a técnica de *Pour Plate* (DOWNES; ITO, 2001).

O procedimento foi realizado em duplicata e as placas incubadas em estufa a 35°C por 48 h. Após a contagem, os resultados foram expressos em UFC/g de sedimento.

Figura 3 - Fluxograma das diluições e processamento das amostras de sedimento.



Fonte: Arquivo pessoal.

4.4. Isolamento bacteriano

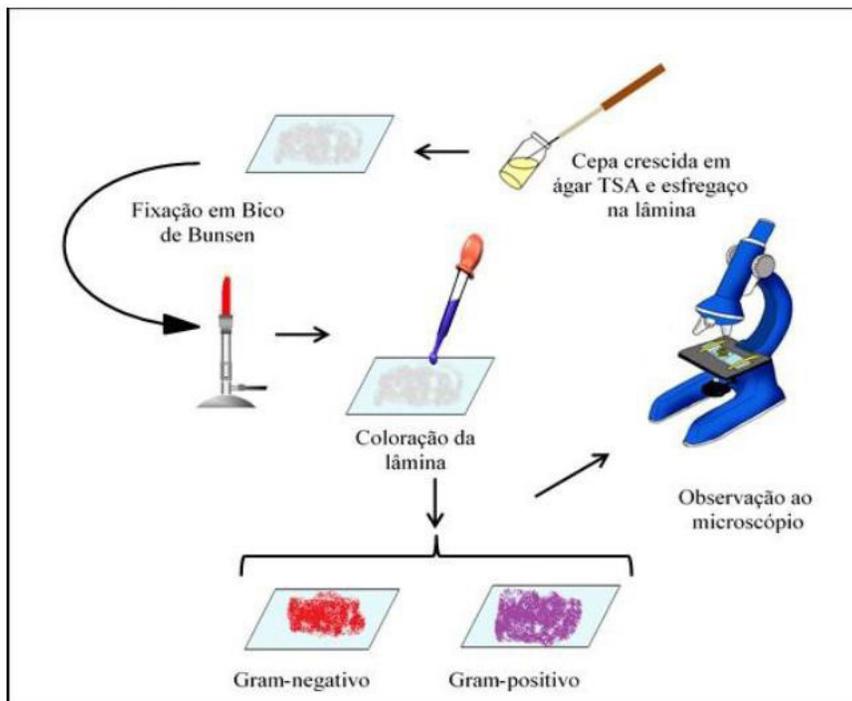
As colônias crescidas nos meios de cultura utilizados foram analisadas quanto a sua morfologia, tamanho e coloração e isoladas em Ágar Triptona Soja (TSA), com crescimento em estufa a 35°C por 24 h.

4.5. Caracterização fenotípica das estirpes isoladas

4.5.1 Análise Morfológica

Para a caracterização morfológica das estirpes isoladas, foi semeado material em Ágar Triptona Soja (TSA) e após o período de incubação de 24 h, em estufa a 35°C, foi aplicada a técnica de coloração de Gram, um método importante de classificação das bactérias, dividindo-as em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005) (Figura 4).

Figura 4 - Fluxograma da Técnica de Coloração de Gram.



Fonte: SANTOS (2013).

A caracterização das culturas foi utilizada para selecionar as chaves de identificação a serem seguidas.

4.6. Identificação bioquímica das estirpes isoladas

Para a identificação das estirpes isoladas, foram realizadas algumas provas bioquímicas tais como: oxidase, catalase, fermentação da glicose, fermentação do manitol, caldo ureia, citrato, bile esculina, motilidade, produção de indol e sulfeto de hidrogênio (H₂S), descarboxilase da lisina, teste do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP), susceptibilidade ao vibriostático O/129 (10 µg e 150 µg), coloração álcool-ácido resistente (BAAR), crescimento em meios como Ágar MacConkey, GSP e TCBS. As provas foram propostas pelo manual de Bergey's (STALEY *et al.*, 2005), KONEMAN *et al.* (2006) e Módulo 6 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2013).

4.7 Teste de antibiograma através do método de difusão em discos (Teste de Kirby – Bauer)

As estirpes identificadas foram divididas em Gram-positivas e Gram-negativas e testadas frente a seis antimicrobianos pertencentes a três grupos de diferentes mecanismos de ação, sendo eles: Grupo I: Inibidores da síntese de parede celular (Penicilina 10 U e Ampicilina 10 µg); Grupo II: Inibidores da síntese de proteína (Cloranfenicol 30 µg e Gentamicina 10 µg) e Grupo III: Inibidores da síntese de ácidos nucleicos (Sulfazotrim 25 µg e Ácido Nalidíxico 30 µg) (Tabela 4). Os discos de antimicrobianos utilizados são da marca BD BBL e o teste de antibiograma seguiu as orientações estabelecidas pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010).

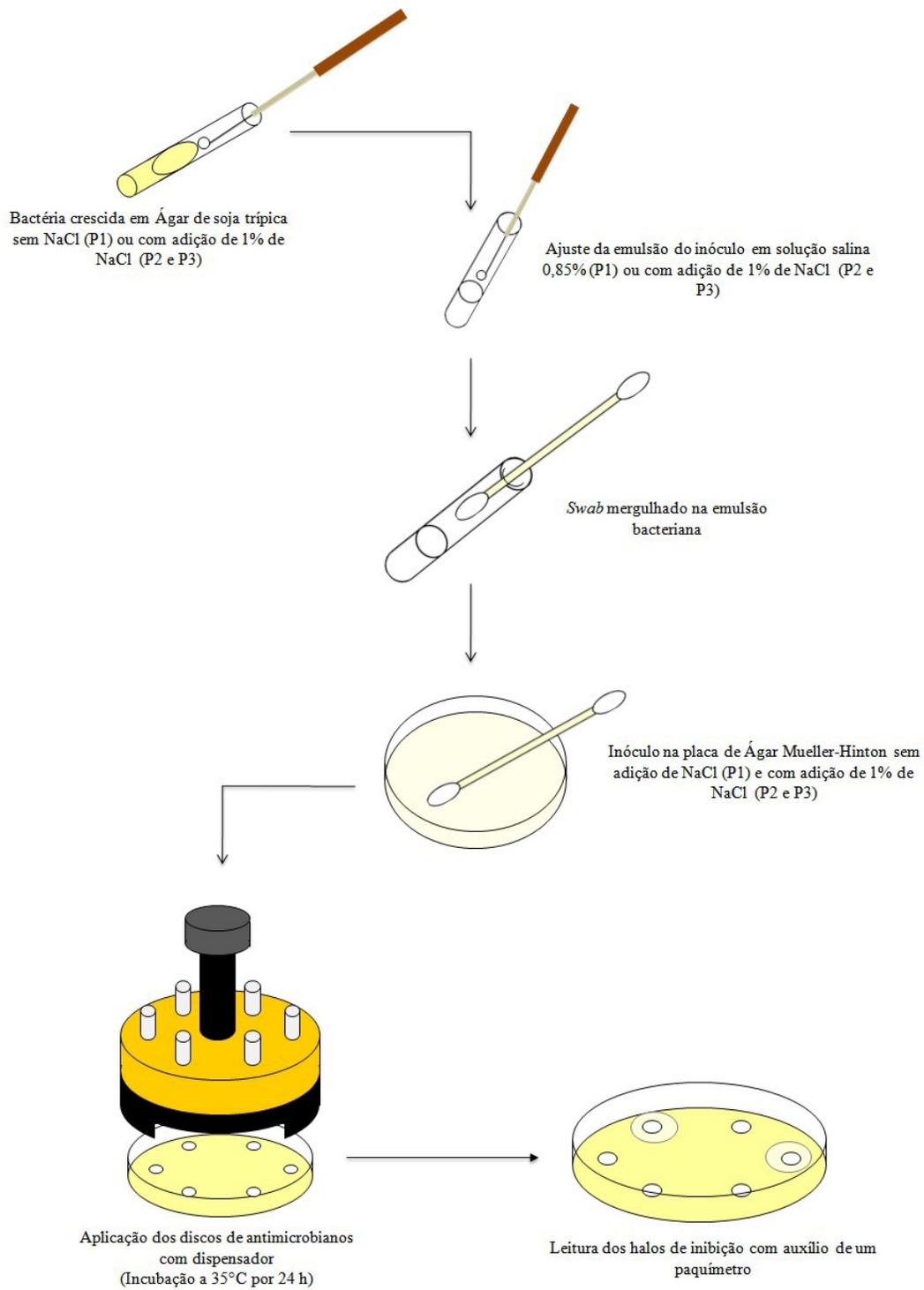
Tabela 4 - Discos antimicrobianos utilizados de acordo com os mecanismos de ação de cada grupo.

Mecanismos de ação	Antimicrobianos	Sigla	Concentração dos discos
Grupo I – Inibidores da síntese de parede celular	Penicilina	PEN	10 U
	Ampicilina	AMP	10 µg
Grupo II- Inibidores da síntese de proteínas	Cloranfenicol	CLO	30 µg
	Gentamicina	GEN	10 µg
Grupo III- Inibidores da síntese de ácidos nucleicos	Sulfazotrim	SUT	25 µg
	Ácido Nalidíxico	NAL	30 µg

A partir das culturas crescidas em TSA e TSA 1%, a 35°C por 24 h, foi inoculado parte do material em solução salina 0,85% e solução salina 1% de NaCl até conseguir uma turbidez equivalente à turbidez padrão 0,5 da escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). A absorbância foi aferida em um espectrofotômetro (Micronal B542) com comprimento de onda de 625 nm.

Em seguida, com o auxílio de um *swab* de algodão estéril, as culturas foram inoculadas em placas de Petri contendo Ágar Muller-Hinton e Muller-Hinton 1%. Os discos de antimicrobianos foram aplicados no meio com a ajuda de um dispensador de discos da marca Becton Dickinson. As placas foram invertidas e incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Após o período de incubação, foi medido o diâmetro dos halos através de um paquímetro digital (Digit). De acordo com o resultado da medição dos halos, as estirpes foram classificadas em resistentes (R), Intermediárias (I) e Sensíveis (S), segundo as recomendações do Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2010).

Figura 5 - Fluxograma do teste de antibiograma.

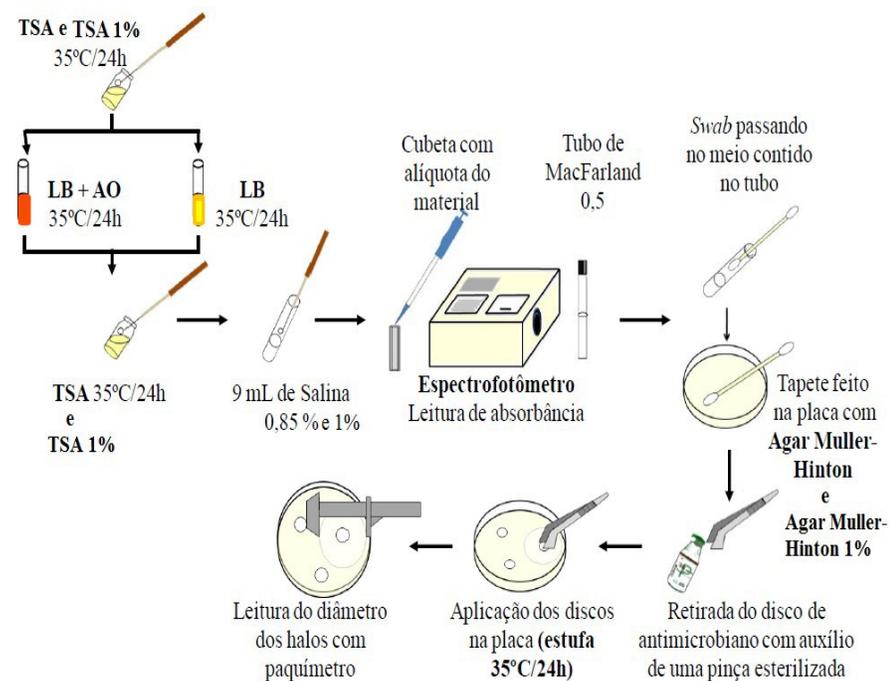


Fonte: Arquivo pessoal.

4.8 Cura de plasmídio

As estirpes que apresentaram resistência aos antimicrobianos testados e aquelas caracterizadas como intermediárias foram submetidas à técnica de cura de plasmídio a fim de determinar a origem da resistência, se plasmidial ou potencialmente cromossômica (MOLINA-AJA *et al.*, 2002). Utilizou-se caldo LB (Luria-Bertani - Difco) acrescido de 50µg/mL do agente curagênico *acridine orange* (SIGMA- A 6014). As estirpes crescidas nesse meio no período de 24 h a 35°C foram inoculadas em TSA e TSA 1%, novamente incubadas a 35°C por 24 h. Após esse período, as estirpes foram novamente submetidas ao procedimento de antibiograma descrito no item 4.7 frente aos antimicrobianos aos quais se mostraram resistentes (Figura 6).

Figura 6: Fluxograma da técnica de cura de plasmídio.



Fonte: CARVALHO (2012).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Parâmetros físico-químicos da água nos pontos de coleta

Os resultados dos parâmetros físico-químicos da água durante as coletas estão presentes na tabela 5. A temperatura variou de 28,5°C no P1 a 31°C no P2; a pouca variação nas temperaturas da água pode ser atribuída a uma característica típica do estado do Ceará que, devido a sua proximidade à linha do Equador, apresenta temperaturas médias com pequena amplitude de variação, principalmente na faixa litorânea (BRASIL, 2006b).

O pH foi alcalino em todos os pontos e variou de 7,12 a 8,14, sendo o menor valor referente ao P1 e o maior valor referente ao P2. Segundo Martins; Paula Filho; Rocha (2007), valores alcalinos de pH são comumente apresentados nas águas estuarinas da costa nordeste brasileira.

Os maiores valores de salinidade foram verificados no P3; o que é esperado, já que tal ponto refere-se à foz do rio e tem influência direta das águas oceânicas.

Tabela 5- Parâmetros físico-químicos da água determinados no momento da coleta.

Coletas	Parâmetros			
	físico-químicos	P1	P2	P3
1º coleta	Temperatura	30°C	30°C	29°C
	Salinidade	0 ppm	0 ppm	40 ppm
	pH	7,44	8,14	7,52
2º coleta	Temperatura	Sem	30°C	29°C
	Salinidade	amostra	0 ppm	40 ppm
	pH	**	7,85	7,42
3º coleta	Temperatura	28,5°C	31°C	29°C
	Salinidade	0 ppm	7 ppm	41 ppm
	pH	7,12	7,70	7,46

**nesse ponto, o rio estava seco, portanto, não houve coleta de água.

5.2 Quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis potencialmente degradadoras de agrotóxicos

A tabela 6 apresenta a quantificação das bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) totais e potencialmente degradadoras de agrotóxicos. Considerando as amostras do sedimento I, o P1 foi o que apresentou o maior índice de quantificação bacteriana, variando de 75×10^3 a $159,5 \times 10^3$ UFC/g.

Tabela 6 - Contagens das populações de bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) totais e potencialmente degradadoras.

Bactérias heterotróficas cultiváveis (BHC) totais e degradadoras UFC por ml ou g				
Coletas	Amostras	P1	P2	P3
1º Coleta	Água	$49,5 \times 10^3$	$96,5 \times 10^2$	$18,6 \times 10^2$
	Sedimento I	75×10^3	$34,5 \times 10^3$	$50,5 \times 10^3$
	Sedimento II	34×10^3	$26,5 \times 10^3$	23×10^3
2º Coleta	Água	**	65×10^6	$>250 \times 10^6$ est.
	Sedimento I	$159,5 \times 10^3$	81×10^3	134×10^3
	Sedimento II	$117,5 \times 10^3$	150×10^3	$>250 \times 10^6$ est.
3º Coleta	Água	100×10^3	$86,5 \times 10^1$	$45,5 \times 10^1$
	Sedimento I	97×10^3	180×10^1	132×10^2
	Sedimento II	188×10^2	145×10^1	$76,5 \times 10^2$

Sedimento I = controle - sem adição do mix de agrotóxicos

Sedimento II - com adição de 50 ppm do mix de agrotóxicos

est.= valor estimado

**nesse ponto, o rio estava seco, portanto, não houve coleta de água

Nas amostras de água, o número de bactérias se manteve equilibrado em relação aos pontos, com exceção da segunda coleta, nos pontos P2 e P3, onde a contagem bacteriana alcançou a ordem de 10^6 por mililitro da amostra.

O baixo volume das águas do rio pode ter sido um fator otimizador dessa concentração de bactérias, uma vez que o corpo d'água receptor tem sua capacidade de diluição reduzida. Segundo Santos (2013), em estudo semelhante realizado no estuário do rio Pacoti, o ponto referente à água salobra (P2) foi o que apresentou maior contagem das bactérias potencialmente degradadoras de agrotóxicos devido ao alto teor de matéria orgânica

presente no estuário. O teor de matéria orgânica também é um importante fator no processo de transporte e destino de agrotóxicos presentes em sedimentos de ambientes aquáticos (HUNG *et al.*, 2007).

Com relação às amostras do sedimento II, a maior densidade bacteriana, $>250 \times 10^6$ est. UFC/g, foi encontrada no P3. Nesse caso, a salinidade não foi fator limitante para o crescimento bacteriano.

Comparativamente, foi observada pouca variação entre as contagens bacterianas nas amostras de sedimento com pressão seletiva diferenciada sobre a população.

Estudos relatam que microrganismos presentes no solo são capazes de degradar alguns pesticidas usando essas substâncias como fonte de carbono e fósforo (TAHERY *et al.*, 2010).

Essa equivalência entre as populações bacterianas totais e degradadoras de agrotóxicos pode ser um indicativo de que a microbiota desse ambiente foi selecionada pela presença de agrotóxicos. Essas substâncias têm dinâmicas particulares nas diferentes matrizes ambientais. No sedimento, os compostos químicos passam por processos que favorecem a sua dispersão ou acúmulo, quando inseridos em ambientes fluviais (WINCK *et al.*, 2014). Características do sedimento, tais como temperatura, pH e teor de matéria orgânica também influenciam na interação deste com as partículas de pesticidas (DELLAMATRICE; MONTEIRO, 2014). Devido ao seu poder de acumular poluentes, o sedimento exerce papel importante para a caracterização de poluição de rios (POSSAVATZ *et al.*, 2014).

Raj e Ravichandran (2010), em estudo com bactérias heterotróficas degradadoras de pesticidas, em amostras de sedimento de um rio na Índia, observaram uma alta incidência de populações bacterianas capazes de degradar o Metil-Paration. A quantificação das bactérias degradadoras ficou entre 50 a 90×10^3 UFC/g. Não foi observada diferença significativa entre as contagens de bactérias degradadoras e bactérias cultiváveis totais.

No total, foram isoladas 130 (100%) estirpes bacterianas. Dessas, 24 (18,46%) foram consideradas como “viáveis, mas não cultiváveis” (VNC). Segundo Fernandes (2013), as VNCs são bactérias que não apresentam capacidade de crescer em meios de cultura convencionais, muito embora, metabolicamente elas permaneçam ativas.

A distribuição das bactérias que permaneceram viáveis e cultiváveis, de acordo com os pontos e por matriz ambiental, está descrita na tabela 7.

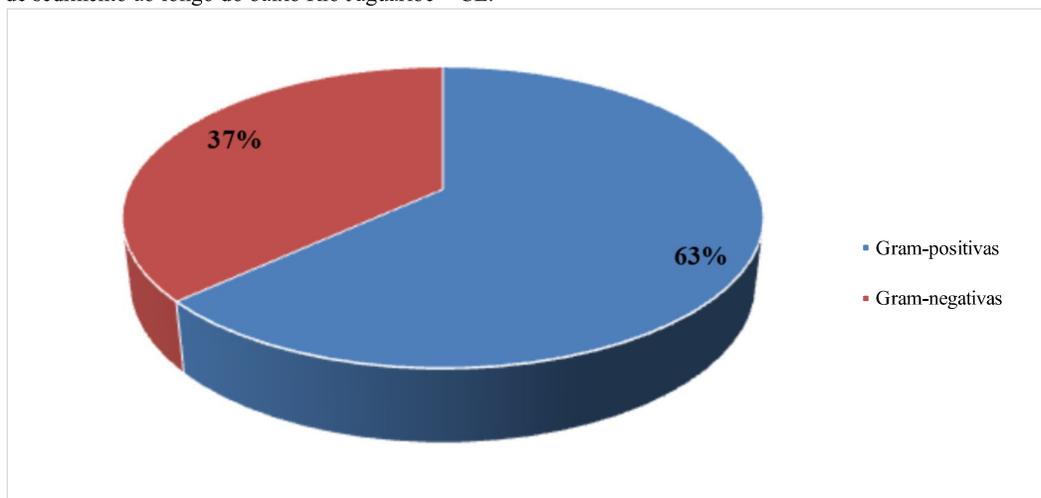
Tabela 7– Número e distribuição das culturas bacterianas obtidas ao longo do estuário do Rio Jaguaribe por ponto de coleta e matriz ambiental.

Pontos de coleta	Matriz ambiental	
	Água	Sedimento
P1	8	22
P2	13	28
P3	9	26
Total	30	76

5.3 Características tintoriais das estirpes isoladas

Do total de estirpes isoladas (100%), 63% apresentaram-se como Gram-positivas enquanto que 37% apresentaram-se como Gram-negativas (Gráfico 1).

Gráfico 1 - Percentual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de amostras de água e de sedimento ao longo do baixo Rio Jaguaribe – CE.



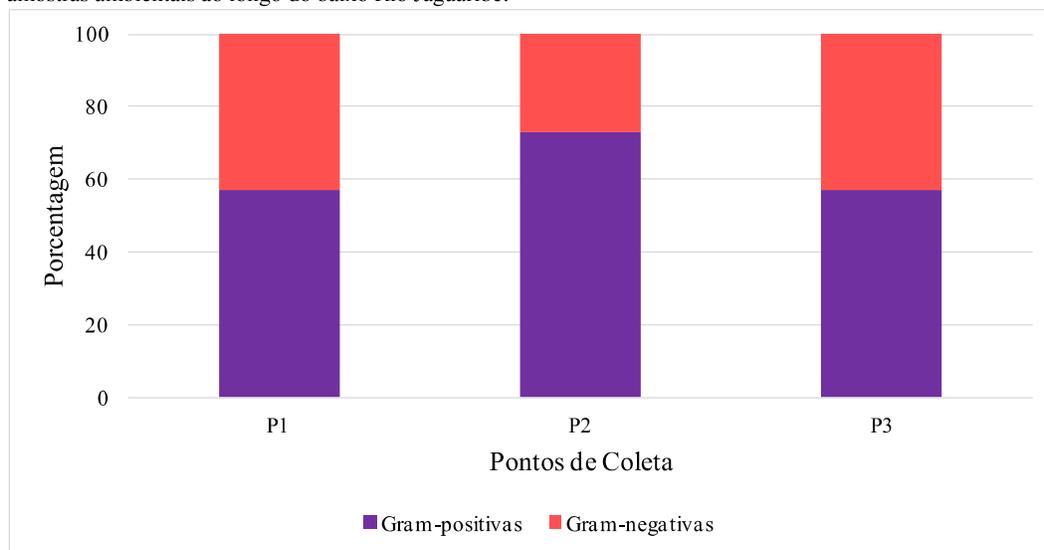
Stabili e Cavallo (2004), em estudo realizado em águas costeiras da Itália, encontraram uma predominância de bactérias Gram-negativas em comparação com as bactérias Gram-positivas. Porém, os mesmos autores (STABILI; CAVALLO, 2011), em outra pesquisa afirmaram que em ambientes costeiros tropicais é comum haver abundância de bactérias Gram-positivas.

Essas bactérias são consideradas mais tolerantes ao estresse, possivelmente, devido à espessura da parede celular e a habilidade para formar endósporos que são estruturas

altamente resistentes, inclusive a substâncias químicas tóxicas (STAINER *et al.*, 1977; WIDENFALK, 2005). Possivelmente, a exposição a uma concentração elevada de agrotóxicos como estratégia de seleção das bactérias nas amostras ambientais, tenha favorecido a proliferação de bactérias Gram-positivas.

Individualmente, o P2 foi o ponto onde se verificou a maior concentração de bactérias Gram-positivas (73%) e a menor concentração de bactérias Gram-negativas (27%), enquanto que os pontos P1 e P3 apresentaram o mesmo número de isolados com características de bactérias Gram-positivas (57%) e Gram-negativas (43%) (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Percentual de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas distribuído por ponto de coleta isoladas de amostras ambientais ao longo do baixo Rio Jaguaribe.



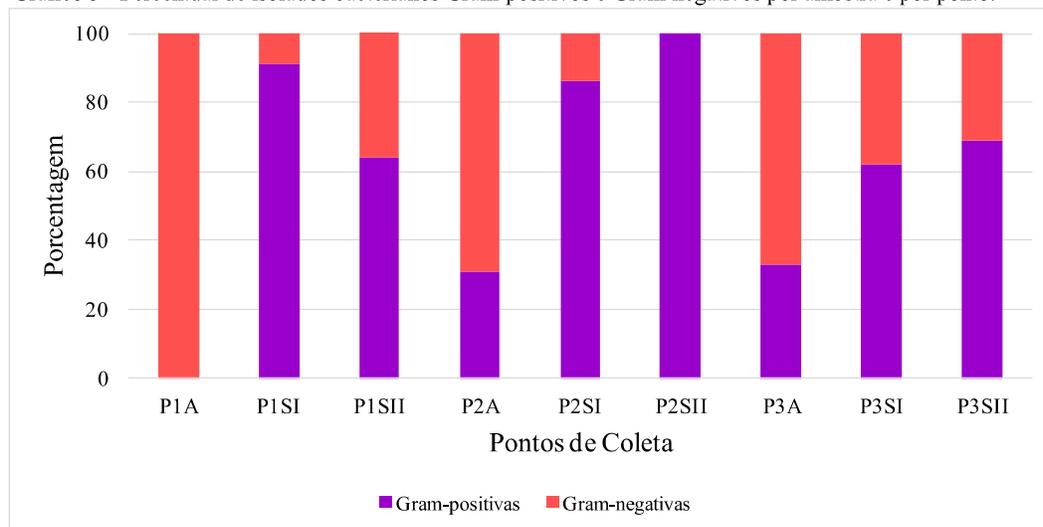
Considerando as amostras de água, o P1 apresentou em sua totalidade bactérias Gram-negativas e o P3 o maior número de bactérias Gram-positivas (33%) (Gráfico 3).

Para as amostras do sedimento I, o P1 foi o que apresentou a maior concentração de bactérias Gram-positivas (91%) e a menor concentração de bactérias Gram-negativas (9%). O oposto aconteceu no P3 para a amostra do sedimento I que apresentou a menor concentração de bactérias Gram-positivas (62%) e a maior concentração de bactérias Gram-negativas (38%), contrariando Bouvier e Giorgio (2002) que afirmaram que a salinidade pode ser um fator inibidor do crescimento de bactérias Gram-negativas, como as da classe β -proteobactérias.

Com relação às amostras do sedimento II, o P2 apresentou 100% de bactérias Gram-positivas enquanto que o maior número de bactérias Gram-negativas foi encontrado no P1 (36,4%).

Outros autores já explicaram essa dominância de bactérias com características Gram-positivas à interação desses microrganismos com o sedimento em ambientes aquáticos (WIDENFALK, 2005; NARANCIC *et al.*, 2012).

Gráfico 3 - Percentual de isolados bacterianos Gram-positivos e Gram-negativos por amostra e por ponto.



A – Água; SI – Sedimento sem o mix de agrotóxico (controle); SII – Sedimento com o mix de agrotóxico

Ainda de acordo com Bouvier e Giorgio (2002), os estuários são ambientes ideais para observar a composição bacteriana devido a grande variedade de gradientes ambientais que há nesses locais.

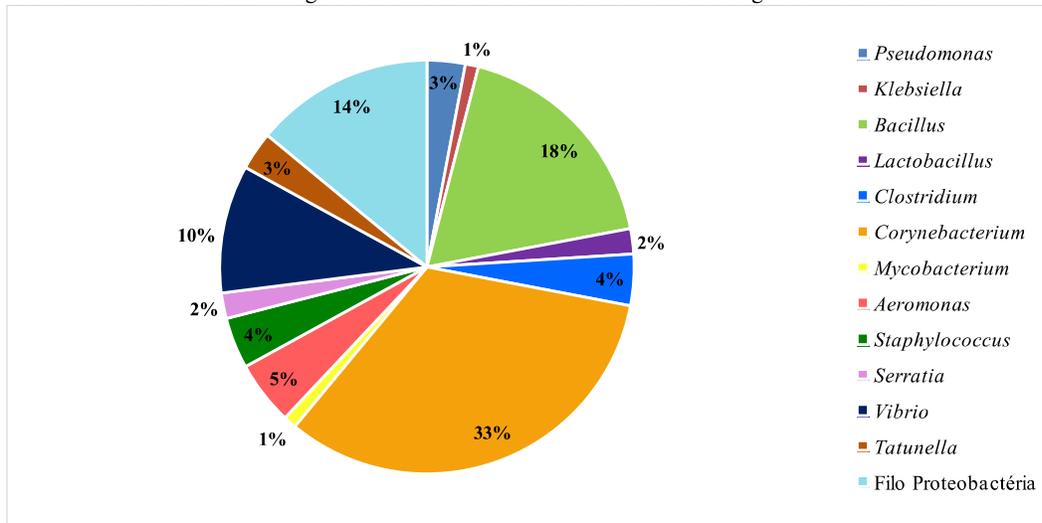
5.4 Diversidade bacteriana

Do total de estirpes isoladas, 86% foram identificadas até o nível de gênero e 14% foram identificadas até o nível de filo.

Dentre as estirpes isoladas, foram identificados doze gêneros: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Tatunella* e *Vibrio*; e um único filo: Proteobacteria.

O gráfico 4 apresenta o percentual das linhagens bacterianas identificadas. Os gêneros com maior predominância foram *Corynebacterium*, com 33%, seguido pelo gênero *Bacillus*, com 18%. Esse resultado contraria Stabili e Cavallo (2011) que observaram maior predominância de *Bacillus* entre as bactérias isoladas de águas costeiras da Itália. Os gêneros menos frequentes entre os isolados foram *Klebsiella* e *Mycobacterium* com 1%, cada.

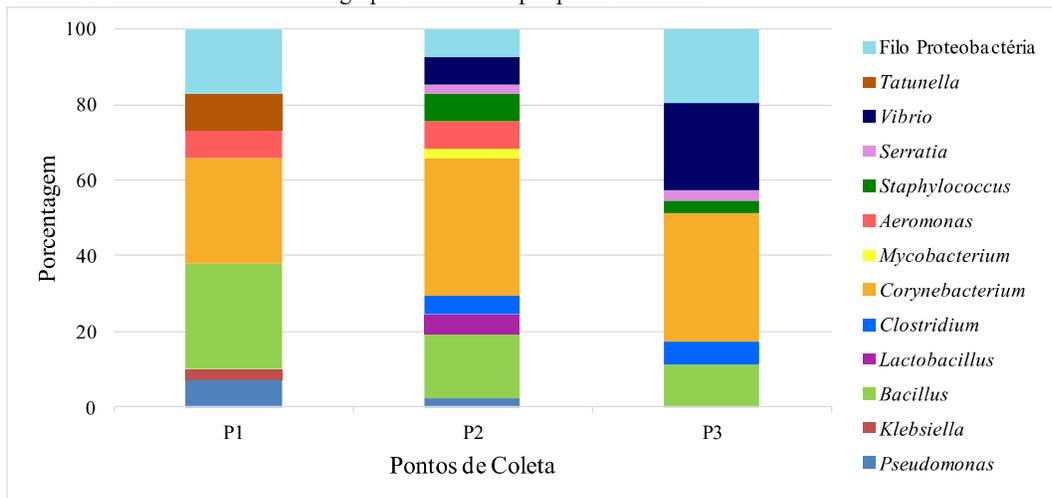
Gráfico 4 - Percentual das linhagens bacterianas identificadas nas amostras de água e de sedimento.



A maior diversidade bacteriana foi observada no P2, composto por dez gêneros diferentes e um filo. Enquanto que o P1 e o P3 apresentaram a mesma diversidade: seis gêneros e um filo (Gráfico 5).

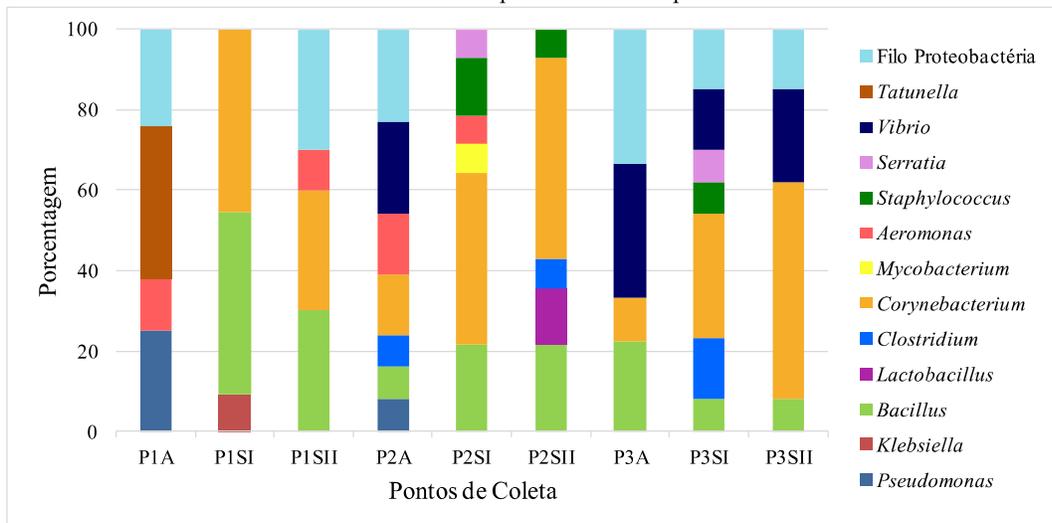
O gênero *Corynebacterium* foi o mais encontrado nos três pontos. Em um estudo anterior no mesmo estuário, Peixoto (2012) relatou esse gênero como o segundo mais frequente, tendo encontrado um maior número de isolados pertencentes ao gênero *Bacillus*.

Gráfico 5 - Abundância relativa de grupos bacterianos por ponto de coleta.



Comparativamente, as amostras de água apresentaram menor diversidade da biota bacteriana do que o sedimento, com exceção do ponto P2, que apresentou maior diversidade com predominância do Filo Proteobactéria e do gênero *Vibrio*, com 23%, cada (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Diversidade bacteriana de acordo com os pontos de coleta e por amostra.



A – Água; SI – Sedimento sem o mix de agrotóxico (controle); SII – Sedimento com o mix de agrotóxico

Entre as amostras de sedimento, o P1 apresentou a menor diversidade para sedimento I, coincidindo com a baixa diversidade bacteriana entre os isolados da água no

mesmo ponto. Apenas três gêneros foram isolados e identificados: *Klebsiella* (10%), *Bacillus* (45%) e *Corynebacterium* (45%) que não coincidiram com os isolados da água. A similaridade entre as comunidades bacterianas pôde ser observada nos outros pontos onde os componentes bacterianos do sedimento também foram encontrados na água em diferentes percentuais.

A maior diversidade para as amostras do sedimento I pôde ser observada no P3 com predominância do gênero *Corynebacterium* (31%).

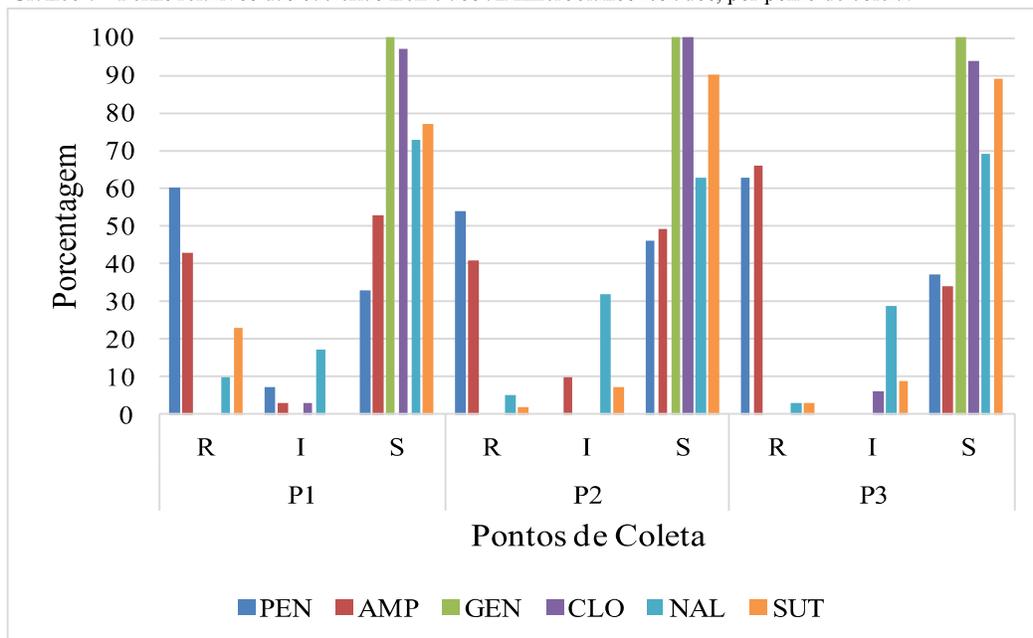
De acordo com alguns autores, o sedimento pode ser considerado um reino especial nos ambientes aquáticos. A riqueza de biomas e táxon dos microrganismos no sedimento é muito maior que aquela nos corpos de água correspondentes. Sedimentos recebem deposição de microrganismos e matéria orgânica das camadas mais superficiais da água e fornecem uma matriz complexa de nutrientes e uma superfície sólida que favorecem a multiplicação microbiana (WANG *et al.*, 2012; ZINGER *et al.*, 2011).

5.5 Suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos

Ainda se tenta estabelecer uma relação entre a exposição da microbiota a agrotóxicos e seu efeito sobre a resistência a antimicrobianos. Um estudo publicado pela Sociedade Americana de Microbiologia (KURENBACH *et al.*, 2015) correlacionou o uso de agrotóxicos com a seleção de bactérias resistentes a antibióticos.

Os percentuais de suscetibilidade das estirpes isoladas frente aos antimicrobianos testados e referente aos pontos de coleta estão representados no gráfico 7. Do total de estirpes isoladas, 61% apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos. O crescimento de isolados bacterianos em presença de antibióticos prova a existência de populações de bactérias naturalmente resistentes ou que sofreram algum tipo de pressão de seleção causada pela aplicação de antibióticos (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2008).

Gráfico 7 - Perfis relativos das bactérias frente aos antimicrobianos testados, por ponto de coleta.



R- Resistente; I - Intermediário; S - Sensível

O maior perfil de resistência observado foi referente aos antimicrobianos pertencentes ao Grupo 1: Penicilina e Ampicilina, seguido do Sulfazotrim e Ácido Nalidíxico, pertencentes ao Grupo 3. No P3 observou-se o maior percentual de resistência a PEN e AMP com 63% e 66%, seguido do P1 com 60% (PEN) e 43% (AMP) e do P2 com 54% (PEN) e 41% (AMP). A maior resistência ao SUT e NAL foi observado no P1, com 23% e 10%, respectivamente.

Menezes (2011), ao analisar a suscetibilidade de BHC do gênero *Vibrio*, isolados de amostras de água e de sedimento de ambientes estuarinos, observou também uma maior resistência a PEN seguido da AMP, sendo o estuário do Rio Jaguaribe um dos que apresentou maior número de estirpes resistentes a esses dois antimicrobianos.

Estudos realizados em estuário de alguns rios no Ceará, apresentaram que 100% das estirpes ambientais isoladas se mostraram sensíveis aos antimicrobianos SUT e NAL, discordando do resultado apresentado nesta pesquisa (VIEIRA *et al.*, 2008; REBOUÇAS *et al.*, 2011).

Com relação ao perfil de resistência intermediária, o NAL foi o antimicrobiano que apresentou a maior porcentagem nos três pontos. A resistência intermediária em

populações bacterianas pode representar uma diminuição da eficácia do antimicrobiano sobre a microbiota alvo (PEIXOTO, 2012).

Os antimicrobianos pertencentes ao Grupo 2, que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de proteínas, Gentamicina e Cloranfenicol foram os que apresentaram maior eficácia contra os isolados. A GEN apresentou 100% de eficácia contra todas as estirpes nos três pontos e o CLO apresentou 100% no P2, seguido do P1 (97%) e do P3 (94%). Resultado semelhante foi encontrado por Rocha (2011), ao observar que todas as estirpes do gênero *Vibrio* isoladas do estuário do Rio Acaraú, também no Ceará, foram sensíveis a GEN.

A tabela 8 apresenta o número de estirpes, entre os isolados, que apresentaram resistência, considerando as diferentes matrizes: água e sedimento e as características de parede dos isolados.

Tabela 8 – Número de bactérias resistentes a antimicrobianos de acordo com a matriz ambiental de origem e característica da parede.

	Água		Sedimento		Total por ponto
	G +	G -	G +	G -	
P1	0	6	8	4	18
P2	3	8	10	2	23
P3	1	6	10	7	24
Total	4	20	28	13	65

As amostras de sedimento apresentaram maior número de bactérias resistentes, sendo sua maioria bactérias Gram-positivas. A resistência entre bactérias Gram-positivas é motivo de preocupação entre pesquisadores, microbiologistas e clínicos pois essas bactérias acabam por dificultar o tratamento de infecções (TAVARES, 2000).

De acordo com Schlusener e Bester (2006), os antimicrobianos não são totalmente absorvidos por humanos e animais, sendo excretados após aplicação e despejados de maneira inadequada no ambiente, através de lançamentos de efluentes ou excretas, podendo contaminar o solo e águas superficiais.

A ocorrência de resíduos dessas substâncias no ambiente acaba favorecendo a resistência de microrganismos a agentes antibióticos. Com relação aos pesticidas, os antibióticos apresentam maior valor de solubilidade em água, menor potencial de bioacumulação e maior mobilidade no solo (REGINATO; LEAL, 2010).

Vale ressaltar que o uso de antibióticos em atividades como aquicultura e no trato de criações animais intensivas, representa a principal via de entrada dos antibióticos no meio ambiente. Existe também a possibilidade desses fármacos atingirem o ambiente através da disposição final de medicamentos não usados ou fora de validade (BOXALL *et al.*, 2003). Uma vez no ambiente, os resíduos de antibióticos podem ser acumulados no solo, sofrer lixiviação ou ser carregados via escoamento superficial para os corpos hídricos (DÍAZ-CRUZ; DE ALDA; BARCELÓ, 2003). Esses fatores citados podem então justificar a presença das bactérias resistentes observadas nos três pontos de coleta.

Das estirpes classificadas como intermediárias ou resistentes e que foram submetidas ao procedimento de cura de plasmídeo, 61% apresentaram resistência potencialmente cromossômica, 19 % apresentaram resistência plasmidial e 20% apresentaram resistência potencialmente cromossômica e plasmidial frente aos antimicrobianos aos quais foram submetidas.

Na tabela 9 estão dispostos os resultados do procedimento de cura de plasmídeo de acordo com o número de estirpes e os antimicrobianos testados.

Tabela 9 - Caracterização da origem da resistência de acordo com o número de estirpes.

Antimicrobianos	Símbolo	Nº de estirpes	Caracterização da Resistência	
			Cromossômica	Plasmidial
Penicilina	PEN	61	53	8
Ampicilina	AMP	56	47	9
Cloranfenicol	CLO	3	0	3
Ácido Nalidíxico	NAL	31	16	15
Sulfazotrim	SUT	13	5	8

Do total de estirpes que apresentaram resistência potencialmente cromossômica após a cura de plasmídeo, o maior percentual observado foi referente a PEN, com 44%, seguido por AMP (39%), NAL (13%) e SUT (4%).

A resistência cromossômica pode ser descrita como uma característica natural, fenotípica do microrganismo, transmitida verticalmente à prole, ou seja, faz parte da herança genética do microrganismo. Um fator determinante para a ocorrência de resistência

cromossômica é a presença ou ausência do alvo para ação da droga (DEL FIOLE; MATTOS-FILHO; GROppo, 2000).

Com relação à resistência plasmidial, o maior percentual observado foi referente ao NAL (35%). Na resistência plasmidial, elementos genéticos de resistência podem ser facilmente transmitidos por microrganismos para outros da mesma espécie ou de espécies diferentes. Estirpes com essa característica podem representar um problema de saúde pública (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005).

No caso das quinolonas (Ácido Nalidíxico) e Sulfazotrim, é importante chamar a atenção que a emergência dessa resistência aos antimicrobianos vem sendo relatada desde 1998. A maioria dos genes que codificam plasmídios mediadores de resistência está presente no ambiente aquático o que sugere que os eventos genéticos que levam a mobilização dos genes de resistência são favorecidos nesse ambiente (POIREL; CATTOIR; NORDMANN, 2012).

Vale ressaltar que, os antibióticos não são agentes mutagênicos, portanto, não causam mutações e nem o aparecimento de novas características nas bactérias, eles apenas exercem uma pressão seletiva nos microrganismos, causando a morte de estirpes sensíveis enquanto que as resistentes sobrevivem (DEL FIOLE; MATTOS-FILHO; GROppo, 2000).

6 CONCLUSÃO

Foi possível isolar bactérias com potencial degradador.

A equivalência entre as populações de bactérias totais e degradadoras de agrotóxicos no estuário do rio Jaguaribe é um fator importante do ponto de vista ecológico, indicando que a presença de substâncias químicas poluidoras vem exercendo uma pressão seletiva na comunidade microbiana local.

A predominância de isolamentos de bactérias Gram-positivas tanto em amostras de água quanto em amostras de sedimento também é um indicativo da exposição desse ambiente a fatores seletivos.

Com relação à degradação do mix de agrotóxico, foram isoladas 130 estirpes bacterianas. As linhagens foram identificadas como pertencentes a doze gêneros diferentes: *Aeromonas*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Tatunella* e *Vibrio*; e um único filo: Proteobacteria.

Um alto índice de resistência a antimicrobianos foi encontrado indicando a pressão seletiva exercida devido à presença dessas substâncias no ambiente. Foi determinada que a resistência de 19% dos isolados é plasmidial, o que favorece a transferência desses genes de resistência entre estirpes bacterianas tanto de mesma espécie como de espécies distintas.

Trabalhos posteriores podem ser realizados para avaliar o potencial de biorremediação dos isolados encontrados neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ABRASCO - Associação Brasileira de Saúde Coletiva. **Dossiê ABRASCO: um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Carneiro, Fernando Ferreira (Org.) .Rio de Janeiro / São Paulo. Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio. Expressão Popular, 2015.
- ANDA – Associação Nacional para Difusão de Adubos. Estatísticas, 2011.
- ARAÚJO, M. V.; FREIRE, G. S. S. Utilização de SIG nos estudos ambientais do estuário do Rio Acaraú/Ceará. **Revista Geonomos**, v. 15, n. 2, 2007.
- ASSIS, R. L. de *et al* . Fitorremediação de solo contaminado com o herbicida picloram por plantas de *Panicum maximum* em função do teor de água. **Eng. Agríc.**, Jaboticabal, v. 30, n. 5, p. 845-853, 2010.
- BONONI, V.L.R. *et al*. **Microbiologia Ambiental**, Eds.: Melo, I.S.; Azevedo, J.L. 2ª ed. Embrapa. Jaguariúna, 2008.
- BOUVIER, T. C.; DEL GIORGIO, P. A. Compositional changes in free-living bacterial communities along a salinity gradient in two temperate estuaries. **Limnol. Oceanogr.**, Baltimore, v. 47, n. 2, p. 453-470, 2002.
- BOXALL, A. B. A. *et al*. veterinary medicines causing environmental risks? **Environ. Sci. Technol.**, v.37, p.286A- 294A, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA -. **Detecção e identificação de bactérias de importância médica**. Módulo 6. ANVISA: Brasília. 2013. 150 p.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Universidade Federal do Paraná (UFPR). **Seminário Mercado de Agrotóxico e Regulação**, 2012. Brasília.
- BRASIL. Decreto n.4.074, de 4 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei n. 7,802/89 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, **Diário Oficial da União**, 8 jan. 2002.
- BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **Sistema de Produção**, 9 ISSN 1678-8796 Versão eletrônica Jan/2003.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Agricultura Familiar** Censo agropec., Rio de Janeiro, p.1-267, 2006a.
- BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. **Indicadores de Desenvolvimento Sustentável**. Estudos e Pesquisas. Informações Geográficas. N.7. 2010a.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/ Sistema IBGE de Recuperação Automática – IBGE/SIDRA. **Brasil, série histórica de área plantada; série histórica de produção agrícola; safras 1998 a 2011.**

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. **Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental.** Brasília: Ibama, 2010b.

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA. **Portaria Normativa n. 84, de 15 de outubro de 1996.** Brasília, 1996.

BRASIL. Lei n.7.802 de 11 de julho de 1989 (lei federal dos agrotóxicos). Brasília, *Diário Oficial da União*, 12, jul. 1989.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente - MMA. **Erosão e Progradação do Litoral Brasileiro** – Capítulo: Ceará. Brasília, 2006b.

CAMPOS, N.B. A Gestão das Águas e o Desenvolvimento do Estado do Ceará: uma perspectiva histórica. **T & Camaz.**, v.9, p.25-31, 2006.

CARVALHO, F. C. T. **Salmonella spp. e Escherichia coli em ambientes de cultivo de camarão (Litopenaeus vannamei) no Estado do Ceará**, 2012. 82f. Tese (Doutorado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

CAVALCANTE, A. A.; CUNHA, S. B. Morfodinâmica fluvial em áreas semiáridas: discutindo o vale do Rio Jaguaribe-Ce-Brasil. **RBG**, v.13, n.1, p.39-49, 2012.

CLSI/NCCLS - **Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: nineteenth informational supplement.** 19th ed. M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2010. v.29, n.3, p.149.

COLLA, L.M. *et al.* 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.

COSTA, C. G. F. Estudo da ecologia da paisagem no estuário do Rio Jaguaribe no litoral do Ceará (Brasil) numa perspectiva geoambiental. **RBGA**, v. 7, n. 2, p. 24-32, 2013. Costeiros, ISSN 1678-1953; 53.

CRUMP, B. C *et al.* Microbial Biogeography along an Estuarine Salinity Gradient: Combined Influences of Bacterial Growth and Residence Time. **Appl Environ Microbiol** v.70, n 3, p. 1494-1505, 2004.

DANTAS, A. R. M. R. L. **Influência da intensidade do fluxo de água na estrutura de assembléias bentônicas em um estuário tropical.** Universidade Federal da Bahia - UFBA Instituto de Biologia - IBIO Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Biomonitoramento. Salvador, 2011.

DEL FIOLE, F. S.; MATTOS-FILHO, T. R.; GROppo, F. C. Resistência bacteriana. **Rev. Bras. Med.**, v.57, n.10, p.1129-1140, 2000.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Rev. Bras. Eng. Agríc. Ambient.**, v.18, n.12, p.1296-1301, 2014.

DÍAZ-CRUZ, M. S.; DE ALDA, M. J. L. & BARCELÓ, D. Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. **Trac-Trends Anal. Chem.**, 22:p.340-351, 2003.

DOMINGUES, M. R. **Investigação sobre a diversidade microbiana e a filogenia de arqueias e bactérias em consórcios anaeróbios metanogênicos, originados de sedimentos estuarinos enriquecidos com clorofenóis**, 2007. Tese (Doutorado) Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Hidráulica e Saneamento – Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2007.

DOWNES, M. P., ITO, K. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4th ed, vol. I. American Public Health Association, Washington.2001.

DUAVÍ, W. C. **Impacto do uso de domissanitários no combate a pragas urbanas: um estudo de caso em manguezais da região metropolitana de Fortaleza/CE**. 2013,45f. Monografia apresentada ao Curso de graduação em Oceanografia do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

FERNANDES, E. R. **Development of a phage-based biosensor to detect *Salmonella* in food stuff**. 2013. Tese de doutoramento Programa Doutoral em Engenharia Química e Biológica. Universidade do Minho. 2013.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação: Aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Cienc. Desenvolv.**, n. 34, p.36-43, 2005.

GODOY, M. D. P.; LACERDA, L. D. **Mudanças na sedimentação no estuário do rio Jaguaribe (CE) devido a mudanças nos usos do solo**. 2011. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) - Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

HUNG, C.C. *et al.* Relationships between pesticides and organic carbon fractions in sediments of the Danshui River estuary and adjacent coastal areas of Taiwan. **Environ. Pollut.**, v. 148, p. 546-554, 2007.

KASEMODEL, M. C. **Seleção de bactérias para biodegradação dos pesticidas organoclorados DDD, PCP e dieldrin**. 2012, 129f. Dissertação de Mestrado do Instituto de Química de São Carlos. São Paulo, 2012.

KONEMAN, E. *et al.* **Color Atlas and textbook of Diagnostic Microbiology**. 6th. ed. Washington: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 1535p.

KURENBACH, B. *et al.* Sublethal Exposure to Commercial Formulations of the Herbicides Dicamba, 2,4 Dichlorophenoxyacetic Acid, and Glyphosate Cause Changes in

Antibiotic Susceptibility in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **mBIO.**, v.6, n. 2, p.9-15. 2015.

LEBARON, H; MCFARLAND, J; BURNSIDE, O., **The Triazine Herbicides: 50 Years Revolutionizing Agriculture**, 1st ed. Elsevier BV: San Diego, 2008. 584p.

MARTINS, R. V.; PAULA FILHO, F. J.; ROCHA, C. A. S. Geoquímica de fósforo como indicadora da qualidade ambiental e dos processos estuarinos do rio jaguaribe - costa nordeste oriental brasileira. **Quím. Nova**, v.30, n. 5, 2007.

MATAQUEIRO, M. I. **Toxicidade aguda e subaguda do inseticida methyl parathion no pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)**. 2002. 41f. Dissertação de Mestrado em Aquicultura Universidade Estadual Paulista em Jaboticabal. 2002.

MELO, I. S. **Bactérias aceleram processo de biodegradação de agrotóxicos agrícolas**. EMBRAPA, 2006.

MENEZES, F. G. R *et al.* Estudo de *Vibrio* spp. potencialmente patogênicos isolados de áreas de cultivo de camarões marinhos. **Anais do 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Natal –RN, 2013.**

MENEZES, F. G. R. **Caracterização fenotípica e genotípica de bactérias do gênero *Vibrio* isoladas em alguns estuários do Estado do Ceará**, 2011. 93 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Pesca) – Departamento de Engenharia de Pesca, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MOLINA-AJA, A. *et al.* Plasmid profiling and antibiotic resistance of *Vibrio* strains isolated from cultured penaeid shrimp. **FEMS Microbiol. Lett.**, Malden, v. 213, n. 1, p. 7-12, 2002.

MONTEIRO, D. A. **Efeitos do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 BR®) sobre biomarcadores d estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869) e o papel da suplementação de selênio na dieta**. São Carlos: UFSCar, 2006, 163p.

MOREIRA, J.C.; JACOB, S.C.; PERES, F.; LIMA, J.S. *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciênc. Saúde Colet.**, v.7,n.2, p.299-311, 2002.

NARANCIC, T. *et al.* Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. **J Hazard Mater.**, v.15; p.243-251, 2012.

OLIVEIRA, A.H. B. **Avaliação Ambiental e Forma de Transporte de Agrotóxicos Organoclorados no Rio Jaguaribe-Ce**. 2012.102f. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federa do Ceará, Fortaleza. 2012.

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde. **Manual de vigilância da saúde de populações expostas a agrotóxicos**. Brasília: Secretaria de Vigilância Sanitária, Ministério da Saúde; 1997.

PANTALENA, A. F.; MAIA, L. P. Marcas da ação antrópica na história ambiental do Rio Jaguaribe, Ceará, Brasil. **RGCI.**, v. 14, n. 3, p. 459-470, 2014.

PAULA, D. P.; MORAIS, J. O.; PINHEIRO, L. S. Análise geo-ambiental do estuário do rio Jaguaribe-CE: tensores naturais e antrópicos. **Anais do 6º Simpósio Nacional de Geomorfologia**, p. 1-11, 2006.

PEIXOTO, J. R. O. **Diversidade e padrões de susceptibilidade a antimicrobianos em bactérias isoladas de ostras (*crassostrea rhizophorae*) e do ambiente aquático**, 2012. 161 f. Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2012.

PINHEIRO, J. C. V.; AMARAL, C. R.; CARVALHO, R. M. Análise da viabilidade sócio-ambiental da fruticultura irrigada no baixo Jaguaribe, Ceará. **RGSA**, v.4, n.1, p. 3-17.2010.

PIZA, F. F. **Ecologia molecular microbiana associada a sedimentos do estuário de Santos - São Vicente (SP, Brasil)**, 2004. 89f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. 2004.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance; interactions between human, animal, and environmental ecologies. **Front Microbiol.**, v.3, n. 24. p.1-7, 2012.

POSSAVATZ, J. *et al.* Resíduos de pesticidas em sedimento de fundo de rio na Bacia Hidrográfica do Rio Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Rev. Ambient. Água – An Interdisciplinary Journal of Applied Science**, v.9, n.1, p. 83- 95, 2014.

RAJ, A. M.; RAVICHANDRAN, K. Study of soil microflora indicating pesticide contamination of Cauvery River belt in India. **Indian J.Sci.Technol.**, v.3,n. 1, 2010.

REBOUÇAS, R. H. *et al.* Antimicrobial resistance profile of *Vibrio* species isolated from marine shrimp farming environments (*Litopenaeus vannamei*) at Ceará, Brazil **Environmental Research**, v 111, p. 21-24, 2011.

REGINATO, J.B.; LEAL, R. M. P. Comportamento e impacto ambiental de antibióticos usados na produção animal brasileira. **Rev. Bras. Ci. Solo.**, v.34, p. 601–616, 2010.

ROCHA, R. S. **Perfil de Suscetibilidade Antimicrobiana e Preliminar de virulência entre cepas de *Vibrio* spp. isoladas da água e sedimento do estuário do Rio Acaraú, Ceará, Brasil**, 2011. 86f. Mestrado em Engenharia de Pesca da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza. 2011.

RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F.S.; **Guia de Herbicidas**, 5ª ed. Grafmark: Londrina, 2005. 591p.

SANTOS, D. R. **Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de agrotóxicos isoladas do rio Pacotí- Ce**, 2013. 57f. Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2013.

SCHLUSENER, M. P.; BESTER, K. Persistence of antibiotics such as macrolides, tiamulin and salinomycin in soil. **Environ. Pollut.**, Oxford, v.143, n.3, p.565-571, 2006.

SCHMIEGELOW, J. M. M. **O Planeta Azul – Uma Introdução às Ciências Marinhas**. Rio de Janeiro: Editora Interciência, 2004. 202p.

SÉRGIO, O. P. *et al.* **Fitorremediação de solos com resíduos de herbicidas**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros 32p. Aracaju, 2009. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros, ISSN 1678-1953:53.

SILVA, F. S. F. **Prospecção de cepas bacterianas produtoras de biossurfactantes na região do porto do mucuripe, Fortaleza-Ceará**, 2014.62 f. Monografia apresentada ao Curso de graduação em Ciências Ambientais do Instituto de Ciências do Mar (LABOMAR) da Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2014.

SINDAG – Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Workshop Mercado Brasileiro de Fitossanitários: Avaliação da exportação de misturadores, abastecedores e aplicadores de agrotóxicos. **Anais**. Brasília, 2009.

SINDAG – Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas. Dados de Produção e consumo de agrotóxicos, 2011.

SINGH, D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. **Indian J. Microbiol.**,v.48, n.1, p.35-40, 2008.

SOARES JÚNIOR, F. L. *et al.* Avaliação da resistência a antibióticos de bactérias isoladas da água de viveiros de camarão. **Anais do 2º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica**. Instituto de Tecnologia de Alimento, Campinas- São Paulo.2008.

SPADOTTO, C.A. Abordagem Interdisciplinar na avaliação ambiental de agrotóxicos. **Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar**, São Manuel, p.1- 9. 2006.

STABILI, L.; CAVALLO, R. A. Biodiversity of culturable heterotrophic bacterial in the Southern Adriatic sea Italian coastal waters. **Sci Mar.**, Barcelona, v. 68, suppl. 1, p. 31-41, 2004.

STABILI, L.; CAVALLO, R. A. Microbial pollution indicators and culturable heterotrophic bacteria in a Mediterranean area (Southern Adriatic Sea Italian coasts). **J Sea Res.**, Amsterdam, v. 65, p. 461-469,2011.

STAINER, R. Y.; ADELBERG, E. A. AND INGRAHAM, J. L. **General Microbiology. the Macmillan Press LTD**. London, Uk. 1977p.

STALEY, J. T. *et al.* **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria**. 2th ed. New York: Springer, 2005. v. 2, part B, 1388p.

SUCEN. Superintendência de Controle de Endemias. Segurança em controle químico de vetores, 2000.

TAHERY, *et al.* Isolation and Identification of Diazinon Degrading Bacteria from Fresh Water: a Case Study on the Sediments of Lake Parishan in Iran. **World J. Fish & Marine Sci.**, v.2, n.3, p.240-245, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TORRES, R. F. **Disponibilidade dos metais cobre e chumbo em um canal de maré receptor de efluentes de carcinicultura.** 2009. 134f. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Marinhas Tropicais do Instituto de Ciências do Mar – LABOMAR. Fortaleza- Ceará. 2009.

TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 8. ed. Artmed, 2005.

TRABULSI, L. R. ; ALTERTHUM, F. **Microbiologia.** 4ed – Revisada e Atualizada. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 718 p.

TYRONE, B. *et al.* Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes. **J Steroid Biochem Mol Bio.** v.127,p. 64-73, 2011.

VIEIRA, R. H. S. F. *et al.* Contaminação fecal da ostra *Crassostrea rhizophorae* e da água de cultivo do estuário do Rio Pacoti (Eusébio, Estado do Ceará): Isolamento e identificação de *Escherichia coli* e sua susceptibilidade a diferentes antimicrobianos. **Braz. J. vet. Res. anim. Sci.** v. 45, n. 3, p. 180-189, 2008. São Paulo, 2008.

WANG, Y. *et al.* Comparison of the Levels of Bacterial Diversity in Freshwater, Intertidal Wetland, and Marine Sediments by Using Millions of Illumina Tags. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78,n.23, p. 8264–8271, 2012.

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

WIDENFALK, A. **Interactions between pesticides and microorganisms in freshwater sediments – Toxic effects and implications for bioavailability.**2005.38f Doctoral dissertation. Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, Uppsala, 2005.

WINCK, *et al.* Avaliação de Elementos Potencialmente Tóxicos nos Sedimentos do rio Gravataí (RS) nos anos de 2000 e 2013. **Rev. Iniciaç. Cient. ULBRA.**Canoas, n.12; p.27-37, 2014.

ZINGER, L *et al.* Global Patterns of Bacterial Beta-Diversity in Seafloor and Seawater Ecosystems., **PLoS ONE** v..6, n.9, 2011.