



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

**DANIEL RODRIGUES DOS SANTOS**

**BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE**  
**BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS ISOLADAS DO RIO**  
**PACOTÍ- CE**

**FORTALEZA**

**2013**

**DANIEL RODRIGUES DOS SANTOS**

**BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS ISOLADAS DO RIO  
PACOTÍ- CE**

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

Orientadora: Prof. Dr<sup>a</sup>. Oscarina Viana de Sousa.

Co- orientadora: Dr<sup>a</sup>. Fátima Cristiane Teles de Carvalho

**FORTALEZA**

**2013**

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

---

S234b Santos, Daniel Rodrigues dos.

Bioprospecção e avaliação do potencial biotecnológico de bactérias degradadoras de agrotóxicos isoladas do Rio Pacoti - CE / Daniel Rodrigues dos Santos – 2013.  
56 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso de Ciências Ambientais, Fortaleza, 2013.

Orientação: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Oscarina Viana de Sousa.

Co-Orientação: Dr<sup>ª</sup>. Fátima Cristiane Teles de Carvalho.

1. Microbiota aquática. 2. Pesticida. 3. Biodegradação. I. Título.

---

CDD 571.29177

**DANIEL RODRIGUES DOS SANTOS**

**BIOPROSPECÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE  
BACTÉRIAS DEGRADADORAS DE AGROTÓXICOS ISOLADAS DO RIO  
PACOTÍ- CE**

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

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Oscarina Viana de Sousa (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Fátima Cristiane Teles de Carvalho (Co- orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudia Miranda Martins  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dr<sup>a</sup>. Karla Maria Catter  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

Aos meus pais, Ricardo Henrique Vieira dos Santos e Maria Lucieuda Rodrigues dos Santos, que me ensinaram os valores da vida e que me amam.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, a quem atribuo tudo o que tenho e sou.

À meus amados pais, Ricardo e Lucieuda, a quem sou grato por quem sou, pelo amor e incentivo durante toda minha vida.

À toda minha Família que me apoio e incentivou durante toda minha vida.

Aos meus avós Terezinha Vieira dos Santos e Manoel Rodrigues Neto, (*in memoriam*), que são muito importantes para mim.

À minha irmã Raquel Rodrigues dos Santos, pela paciência e carinho. Obrigado.

À Shirley de Almeida Oliveira, minha namorada, pelo seu amor, dedicação, paciência, compreensão. TE AMO.

À Jade Oliveira Abreu e Raquel Soares, pela ajuda no Laboratório nos momentos de apertado. Obrigado.

À minha irmã mais velha de Laboratório Edirsana Carvalho, por me ensinar e me ajudar em muitas coisas, pela sua alegria que contagia a todos. Obrigado.

À Gleire Rodrigues, Marina Rodriguez e Giselle Cristina pelo incentivo, apoio e dedicação, e claro, pela amizade. Obrigado.

À toda equipe do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado pela colaboração na minha pesquisa.

Aos meus amigos, IRMÃOS do peito, Willame Cavalcante e Icaro Breno, pelo apoio, incentivo, ajuda, e todas as brincadeiras. Sem palavras.

À Eunice a melhor secretária de todas!

Às Prof<sup>as</sup>. Danielle Garcez, Kamila Mendonça e Sandra Santaella, pela educação, amizade, conversas e apoio. Obrigado.

À todos os amigos do Movimento de Encontro de Jovem Shalom, por tudo que aprendi e vivi com vocês. Muito Obrigado.

A toda Equipe do Laboratório de Análise de Contaminantes Orgânicos em especial Wersangela, Poliana e Aline, pela ajuda e parceria.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para a realização desta pesquisa.

### **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

À Fátima Cristiane Teles de Carvalho Co- orientadora e (mãe de Laboratório) a, a quem devo o meu aprendizado científico. Obrigado por me AJUDAR, ENSINAR tudo que sabe, incentivar apoiar e acreditar em mim. Sua amizade é muito importante.

À minha Orientadora e também minha (Avó de Laboratório), Prof<sup>a</sup> Oscarina Viana de Sousa (Osca), por acreditar em mim no início de minha vida acadêmica, por me ensinar todos os seus conhecimentos, incentivo, por investir com forças no meu aprendizado, principalmente pela amizade e carinho. Obrigado por tudo, seu neto de Laboratório.

À minha segunda orientadora Prof<sup>a</sup> Regine Helena Silva dos Fernandes Vieira, um exemplo de pessoa, muito profissional, uma pesquisadora de renome. Obrigada pela confiança amizade e incentivo e carinho.

“Citação relacionada com o tema do trabalho,  
com indicação de autoria.”



## RESUMO

O aumento da população humana está diretamente relacionada com intensificação das atividades agropécuaras. No atual modelo agroindustrial, os agrotóxicos têm um papel importante no aumento da produtividade. Contudo o uso indiscriminado destas substâncias vem gerando danos sociais, econômicos e ambientais, seu lançamento afeta os vários compartimentos ambientais (atmosfera, solo e água), depreciando a qualidade destes recursos, além de representar riscos por sua toxicidade e possibilidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar. O Rio Pacotí, um dos principais da região metropolitana de Fortaleza, é um dos destinos finais dos agroquímicos utilizados no Ceará (Atrazina, Metil- Paration, Picloran, Clorpirifós, dentre outros). O conhecimento sobre a microbiota e seu efeito sobre os agrotóxicos é um grande passo na busca por alternativas para a mitigação dos danos causados ao meio ambiente. Diante do exposto, o objetivo desse trabalho foi isolar, selecionar e caracterizar estirpes bacterianas com tolerância e/ou potencial de degradação de agrotóxicos ocorrentes no Rio Pacotí. Foram feitas três amostragens de água em três pontos ao longo do rio seguindo um gradiente de salinidade (doce (P1), salobra (P2) e salgada (P3)). As amostras passaram por uma seleção de micro- organismos sendo inoculada em meio de cultura (*Plate Count Agar*), acrescido de 50 ppm de um coquetel dos agrotóxicos supracitados. Foram feitas contagens das bactérias potencialmente degradadoras dos agrotóxicos nas amostras com isolamento de colônias, levando-se em consideração sua morfologia, tamanho e presença de pigmentos. Após o isolamento, as estirpes bacterianas foram submetidas à purificação, provas bioquímicas para posterior identificação e teste de degradabilidade dos agrotóxicos. Os testes foram feitos a partir das técnicas Concentração Inibitória Mínima (CIM) seguido da Concentração Bactericida Mínima (CBM). O P2 apresentou uma maior média de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) de bactérias por mililitro de água. A maioria (73%) dos isolados bacterianos se mostrou eficiente em utilizar os agrotóxicos como fonte de obtenção de carbono mesmo em concentrações elevadas das substâncias (100 até 200 ppm). Alguns isolados apresentaram bioluminescência quando expostos aos agrotóxicos. A salinidade foi um fator determinante na abundância de bactérias no estuário do Rio Pacotí. O agrotóxico Clorpirifós apresentou, individualmente, a maior taxa de degradabilidade por bactérias entre as substâncias testadas, enquanto o Picloran foi o mais tóxico para as bactérias.

**Palavras chave:** Microbiota aquática. Pesticida. Herbicida. Biodegradação.

## ABSTRACT

The intensification of agricultural activities, which aim at food production, is directly related to the increase in human population. In the agro-industrial model in place, pesticides play an important role in increasing productivity. However, the indiscriminate use of these substances has generated social, economical and environmental damages. The launch of pesticides affects all the environmental compartments (air, soil and water), the quality of these resources, and pose risks for their toxicity and ability to bioaccumulate in the food chain. The Pacotí River, which is the major water source for the metropolitan region of Fortaleza, is one of the final destinations of agrochemicals used in Ceará (Atrazine, Methyl- parathion, Picloran, Chlorpyrifos, and others). The knowledge of microbiota and its effect on pesticides is an important step in the search for alternatives to mitigate the damage caused to the environment. Given the reasons above, the aim of this work was to isolate, select and characterize bacterial strains with tolerance and/or potential for degradation of pesticides occurring in Pacotí River. Three water samples were collected at three different points along the river following a salinity gradient (fresh water, brackish water and salt water). The samples went through a selection of microorganisms; later being inoculated in a culture media (Plate Count Agar) that was supplemented with 50 ppm of pesticides cocktail. Potentially degrading bacteria of the pesticides in samples were counted with isolation of colonies, taking into account their morphology, size and presence of pigments. After isolation, the bacterial cultures were subjected to purification and biochemical tests for identification and testing efficiency against pesticides. The tests were made from the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) followed by Minimum Bactericidal Concentration (MBC) test. The brackish water showed higher average colony forming units (CFU) of potentially degrading bacteria per milliliter of water. The majority (73%) of the bacteria isolates proved to be efficient to use the pesticide as a source of carbon, value obtained even at high concentrations of these substances (100 to 200 ppm). Some isolates began to exhibit a characteristic bioluminescence when exposed to pesticides. Salinity was a key environmental factor in the abundance of bacteria in the estuary of the River Pacoti. Chlorpyrifos presented individually, the highest rate of bacterial degradability among the tested substances while Picloran was the most toxic to bacteria.

**Keywords:** Aquatic microbiota. Pesticide. Herbicide. Biodegradation

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Formula estrutural do DDT .....	19
Figura 2 –	Dinâmica dos agrotóxicos no ecossistema .....	23
Figura 3 –	Localização geográfica dos pontos de amostragem no Rio Pacotí, Eusébio- CE .....	28
Figura 4 –	Fluxograma de seleção de estirpes resistentes e/ ou degradadoras de agrotóxicos .....	30
Figura 5 –	Fluxograma de coloração de Gram .....	31
Figura 6 –	Resultado do teste de catalase .....	32
Figura 7 –	Teste da produção de enzima oxidase .....	33
Figura 8 –	Fluxograma do teste de oxidação/ fermentação de carboidratos (O/F) .....	34
Figura 9 –	Fluxograma da Determinação de tolerância e/ ou eficiência de degradação de agrotóxicos.....	36
Figura 10 –	Placas com crescimento bacteriano (a) em luz natural e (b) expostas a luz Ultra Violeta .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Categorias de agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida, ao grupo químico a que pertencem e seus representantes .....	21
Tabela 2 –	Classificação toxicológica dos agrotóxicos .....	22
Tabela 3 –	Características morfofintoriais e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxico isoladas de água doce do Rio Pacotí .....	41
Tabela 4 –	Características morfofintoriais e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxico isoladas de água salobra do Rio Pacotí .....	42
Tabela 5 –	Características morfofintoriais e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxico isoladas de água salgada do Rio Pacotí .....	43
Tabela 6 –	Comportamento das estirpes bacterianas isoladas ao longo de um gradiente salino no Rio Pacotí frente aos agrotóxicos .....	44

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 – Contagem de bactérias potencialmente degradadoras de agrotóxicos em amostra de água do Rio Pacotí ao longo do dia de coleta em relação a variação da maré..... 37
- Gráfico 2 – Morfologia celular e características tintoriais de culturas bacterianas tolerantes a agrotóxicos isoladas em águas do Rio Pacotí seguindo um gradiente de salinidade..... 39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
C	Carbono
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
Cl	Cloro
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DDT	1,1,1-tricloro-2,2-di (p-clorofenil) etano
DL 50	Dose Letal para 50% da população
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
GPS	<i>Global Positioning System</i>
H	Hidrogênio
H <sub>2</sub> O	Água
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MO	Matéria Orgânica
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
ONU	Organização das Nações Unidas
S	<i>South</i>
SAD 69	<i>South American Datum 1969</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UV	Ultra Violeta
VNC	Viável Mas Não Cultivável
W	<i>West</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

μL	Microlitro
%	Porcentagem
L	Litro
h	Hora
mL	Mililitro
mm	Milímetro
μg	Micrograma
Km	Quilômetros
ppm	Parte por milhão
°C	Graus Centígrados

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
2	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	18
2.1	<b>Definição</b> .....	18
2.2	<b>Histórico e Classificação</b> .....	19
2.3	<b>Agrotóxicos, Saúde e Meio Ambiente</b> .....	22
2.4	<b>Bactérias Degradadoras</b> .....	25
3	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
3.1	<b>Objetivos Específicos</b> .....	26
4	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	<b>Procedimentos de Coleta</b> .....	27
4.2	<b>Análises</b> .....	29
4.2.1	<i>Determinação dos parâmetros físico-químicos</i> .....	29
4.2.2	<i>Amostras de água</i> .....	29
4.2.2.1	<i>Processamento e diluição das amostras</i> .....	29
4.3	<b>Caracterização das estirpes potencialmente degradadoras isoladas</b> .....	30
4.3.1	<i>Morfologia das colônias</i> .....	30
4.3.2	<i>Análise morfolotintorial das células (técnica de Gram)</i> .....	30
4.4	<b>Caracterizações bioquímicas</b> .....	31
4.4.1	<i>Teste da catalase</i> .....	31
4.4.2	<i>Teste de oxidase</i> .....	32
4.4.3	<i>Teste de oxidação ou fermentação da glicose (O/F)</i> .....	33
4.5	<b>Determinação de tolerância e/ ou eficiência de degradação das bactérias frente aos agrotóxicos</b> .....	34
4.5.1	<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i> .....	34
4.5.2	<i>Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)</i> .....	35
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	37
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	47
8	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	47
9	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	48



## 1 INTRODUÇÃO.

Nos últimos anos a população humana mundial vem crescendo intensamente, criando a necessidade do aumento da produção de alimentos e intensificação das atividades agropecuárias. A utilização de produtos químicos na agricultura vem apresentando um relevante crescimento especialmente após a segunda metade do século passado até a atualidade (ASSUNÇÃO; ROHLFS, 2012).

Os agrotóxicos são utilizados na agricultura com a finalidade fitossanitária, incremento da produção e na garantia da produção de alimentos. Segundo Stützer; Guimarães (2003) os agrotóxicos foram desenvolvidos para serem utilizados como uma ferramenta para o agricultor minimizar o prejuízo causado pela ação danosa de insetos, fungos, plantas invasoras, dentre outros agentes.

Contudo a contaminação ambiental gerada pelos agrotóxicos tem provocado cada vez mais preocupações quanto ao seu uso indiscriminado e/ ou disposição final (LUCHINI; ANDRÉA, 2000). Scorza Júnior; Névola; Ayelo, (2010) afirmaram que a qualidade dos recursos hídricos (água subterrânea e superficial) vem cada vez mais diminuindo devido aos impactos da agricultura gerando contaminação desses com resíduos de agrotóxicos.

Alguns agrotóxicos, ao atingirem o meio aquático, oferecem riscos por sua toxicidade e possibilidade de bioacumulação ao longo da cadeia alimentar (MILHOME, *et al.*, 2009). Cavalcante *et al.* (2012), apontaram os estuários dos Rios Pacoti e Jaguaribe como destino final dos agrotóxicos Picloram, Metil-Paration, Atrazina, Clorpirifós e Cipermetrina.

O Rio Pacotí é o maior dos cursos d'água a atravessar a região metropolitana de Fortaleza, percorre cerca de 150 km de sua nascente na Serra de Baturité, até desembocar no mar no município de Aquiraz (SEMACE, 2010).

Qualquer medida para diminuir os efeitos dos pesticidas nos ecossistemas, será uma solução paliativa e não definitiva para os problemas causados. Infelizmente, há sempre danos irreparáveis aos organismos e ao meio ambiente, como por exemplo, a extinção de espécies de aves e micro-organismos do mundo (PORTO *et al.*, 2010).

Para Araújo (2002) os micro-organismos têm ação fundamental sobre os agrotóxicos e constitui um processo importante, pois na maioria dos casos, contribui para a dissipação da molécula dessas substâncias no meio ambiente.

Muitos estudos sobre a degradação de agrotóxicos no solo vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas, mas ainda pouco se sabe sobre a dinâmica dessas

substâncias no ambiente aquático principalmente quanto à diversidade da microbiota potencialmente degradadora dessas substâncias. Nesse contexto vemos a importância da biodegradação dos agrotóxicos por bactérias, tentando mitigar os impactos causados por essas substâncias no meio ambiente.

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Definição**

São considerados agrotóxicos segundo a Food and Agriculture Organization (FAO), Programa da Organização das Nações Unidas (ONU) responsável pelas áreas de agricultura e alimentação, os agrotóxicos são definidos como:

Qualquer substância, ou mistura de substâncias, usadas para prevenir, destruir ou controlar qualquer praga – incluindo vetores de doenças humanas e animais, espécies indesejadas de plantas ou animais, causadoras de danos durante (ou interferindo na) a produção, processamento, estocagem, transporte ou distribuição de alimentos, produtos agrícolas, madeira e derivados, ou que – ou que deva ser administrada para o controle de insetos, aracnídeos e outras pestes que acometem os corpos de animais de criação (PERES; MOREIRA, 2003).

De acordo com a legislação brasileira, Ministério do Meio Ambiente (MMA) (1998), agrotóxicos ou pesticidas são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento dos 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 é alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (MMA, 1998).

A Lei de Agrotóxico e Afins, nº 7.802, de 11 de julho de 1989, estabelece que os agrotóxicos somente possam ser utilizados no país se forem registrados em órgão federal competente, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (MMA, 1998).

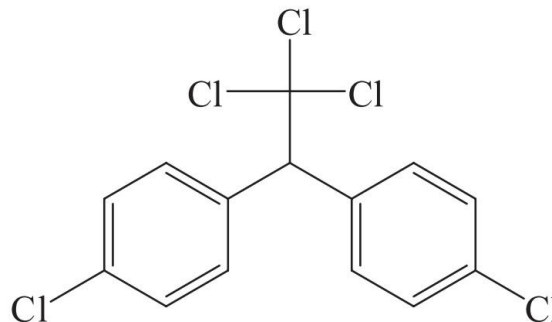
O Decreto nº 4.074, de 04 de janeiro de 2002, que regulamentou a Lei, estabelece as competências para os três órgãos envolvidos no registro de agrotóxicos: Ministério da Saúde (MS), Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e Ministério do Meio Ambiente, através do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

Renováveis (IBAMA). O MS por meio da ANVISA é o responsável, dentre outras competências, pela avaliação e classificação toxicológica de agrotóxicos, e junto com o MAPA, em respectivas áreas de competência, pelo monitoramento dos resíduos de agrotóxicos e afins em produtos de origem vegetal. A ANVISA estabelece o Limite Máximo de Resíduos (LMR) e o intervalo de segurança para o ingrediente ativo do agrotóxico para cada tipo de cultura agrícola (ANVISA, 2009).

## 2.2 Histórico e classificação

Em 1939 Paul Muller, redescobria o inseticida 1,1,1-tricloro-2,2-di (*p*-clorofenil) etano (Figura 1), conhecido como DDT, enquanto procurava um veneno de contato para traças em roupas e ácaros em tapetes (OLIVEIRA-FILHO, 2013). Esse inseticida teve uso pela primeira vez em 1943, durante a Segunda Guerra Mundial em Nápoles, na Itália, para combater piolhos que infestavam tropas norte-americanas na Europa e que transmitiam uma doença chamada tifo exantemático (BRANCO, 2013; OLIVEIRA-FILHO, 2013). Entre os anos de 1940 e 1970, o DDT foi largamente utilizado em florestas e na agricultura para controlar uma grande variedade de insetos causadores de doenças.

Figura 1- Formula estrutural do DDT



Desde então foi introduzido o emprego de novas variedades mais eficientes e cada vez mais específicas aos diferentes tipos de “alvos”, como: herbicidas, fungicidas, acaricidas, parasiticidas, inseticidas, pesticidas, visando cada vez mais o incremento da produção agrícola, embora possa também gerar alterações negativas, tais como o surgimento de novas pragas e a contaminação do ambiente. Os agrotóxicos podem receber diferentes

nomenclaturas, variando com os seus diversos usos, são eles: defensivos agrícolas, pesticidas, praguicidas, remédios de planta e até veneno.

Inseticidas, são substâncias utilizadas nas metodologias adotadas como parte do manejo sustentável e integrado para o controle de vetores em Saúde Pública (ROSE, 2001).

Herbicidas, são substâncias químicas consideradas como o principal método de controle das plantas daninhas em áreas de cultivo, seletivos e com espectro de ação sobre diferentes alvos (GIANCOTTI *et al.*, 2013).

Fungicida, são as substâncias utilizadas para o controle de doenças fúngicas em plantas, sementes e outros produtos agropecuários.

Os agrotóxicos podem pertencer a uma vasta gama de substâncias químicas além de algumas de origem biológica que podem ser classificadas de acordo com o tipo de praga que controlam, com a estrutura química das substâncias ativas e com os efeitos à saúde humana e ao meio ambiente (AGROFIT, 1998).

A tabela 1 mostra as divisões dos agrotóxicos utilizados no presente trabalho, conforme seu grupamento químico e seu “grupo alvo”.

Os organoclorados foram os primeiros utilizados desde 1939 com a redescoberta do DDT e são compostos por átomos de carbono (C), hidrogênio (H) e cloro (Cl). Segundo Oliveira-Filho (2013), possuem baixa volatilidade, estabilidade química, lipossolubilidade, baixa taxa de biotransformação e biodegradação, características como essas fazem desse grupo um excelente inseticida. Contudo também possuem uma alta persistência no ambiente, altos fatores de bioacumulação e por sua vez um alto potencial de biomagnificação em diversas cadeias alimentares.

Os piretroides foram introduzidos no mercado nos anos de 1980, é obtido a partir de flores da espécie *Chrysanthemum cinerariaefolium*; foi considerado até 2008 o inseticida mais seguro do mercado (ROMANINI; TEIXEIRA, 2008). Entretanto, Oliveira-Filho (2013), diz que são neurotóxicos, com ação sobre o sistema nervoso central e periférico, pela interação de canais de sódio em mamíferos e/ ou insetos e que uma simples dose em mamíferos produz efeitos colaterais como tremores, hiperexcitabilidade, salivação e até paralisia.

Segundo Veiga *et al.* (2006) organofosforados e carbamatos foram até o início do século XXI, os agrotóxicos mais utilizados possuem uma atividade inseticida muito eficiente, devido a sua característica de inibidor da enzima acetilcolinesterase no sistema nervoso, que tanto atua em insetos quanto em mamíferos.

De acordo com informações da literatura científica, os agrotóxicos organofosforados são derivados de gases químicos sintetizados para fins bélicos entre eles o Tabun (gás mostarda), conhecido como neurotóxicos. Possui uma baixa persistência no ambiente, baixa seletividade para organismo “alvos”, toxicidades para mamíferos, vieram para substituir os organoclorados (OLIVEIRA-FILHO, 2013).

Os carbamatos foram desenvolvidos e usados em larga escala durante quatro décadas aproximadamente e mais de cinquenta variedades eram conhecidos até o final dos anos de 1980 (WHO, 1986). Apresentam alta eficiência praguicida, principalmente, atividade inseticida, baixa ação residual e baixa toxicidade em longo prazo, com amplo espectro de uso, contudo possui uma ação anticolinesterásica como supracitado (MÍDIO; SILVA, 1995; ROSATI, 1995).

Tabela 1- Categorias de agrotóxicos quanto à natureza da praga combatida, ao grupo químico a que pertencem e seus representantes.

Classificação quanto à natureza da praga controlada	Classificação quanto ao grupo químico	Exemplos (produto/substâncias/agentes)
Inseticidas (controle de insetos)	Organoclorados	DDT*
Fungicidas (combate aos fungos)	Organofosforados	Metil-paration, Clorpirifós
Herbicidas (controle de ervas daninhas)	Ditiocarbamatos	Metiram
	Fentalamidas	Captam
	Ácido Piridinocarboxílico	Picloram
	Triazina	Atrazina

\* Proibido em vários países e no Brasil.

Fonte: adaptado de Peres; Moreira, (2003).

Segundo a ANVISA (2011), o Brasil é o maior consumidor mundial de agrotóxicos e que estudos científicos têm apontado que a utilização abusiva de agrotóxicos leva à contaminação do meio ambiente, significando que todos estão expostos aos seus riscos.

### 2.3 Agrotóxicos, saúde e meio ambiente

Os órgãos estaduais e do Distrito Federal, também devem realizar o controle e a fiscalização da comercialização e uso desses produtos na sua jurisdição cada um dentro de sua área de competência.

A avaliação dos possíveis efeitos adversos à saúde humana e ao ambiente deve ser de fundamental importância para a concessão ou não do registro. Embora os resultados positivos na produção possam ser facilmente comprovados pelo próprio usuário, os danos toxicológicos à saúde humana e ao ambiente, na maioria dos casos, não o são (PERES; MOREIRA, 2003).

Ecotoxicologia é definida por Sisinnio; Oliveira- Filho (2013), como abordagem integrativa que compreende o impacto de substâncias nos ecossistemas, onde é preciso reunir informações toxicológicas e de química ambiental.

A utilização indiscriminada dos agrotóxicos, sem as devidas precauções e cuidados, em relação à sua manipulação, estocagem e destino final, põe em risco a integridade do meio ambiente, bem como a saúde de organismo incluindo a de humanos que de alguma forma entram em contato com tais produtos contaminados.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica os agrotóxicos de acordo com os efeitos à saúde humana (Tabela 2).

Tabela 2- Classificação toxicológica dos agrotóxicos.

Classe toxicológica	Toxicidade	DL50	Faixa colorida
I	Extremamente tóxico	$\leq 5$ mg/Kg	Vermelha
II	Altamente tóxico	Entre 5 e 50 mg/Kg	Amarela
III	Medianamente tóxico	Entre 50 e 500 mg/Kg	Azul
IV	Pouco tóxico	Entre 500 e 5.000 mg/Kg	Verde
-	Muito pouco tóxico	$> 5.000$ mg/Kg	-

Fonte: adaptado de Peres; Moreira, (2003).

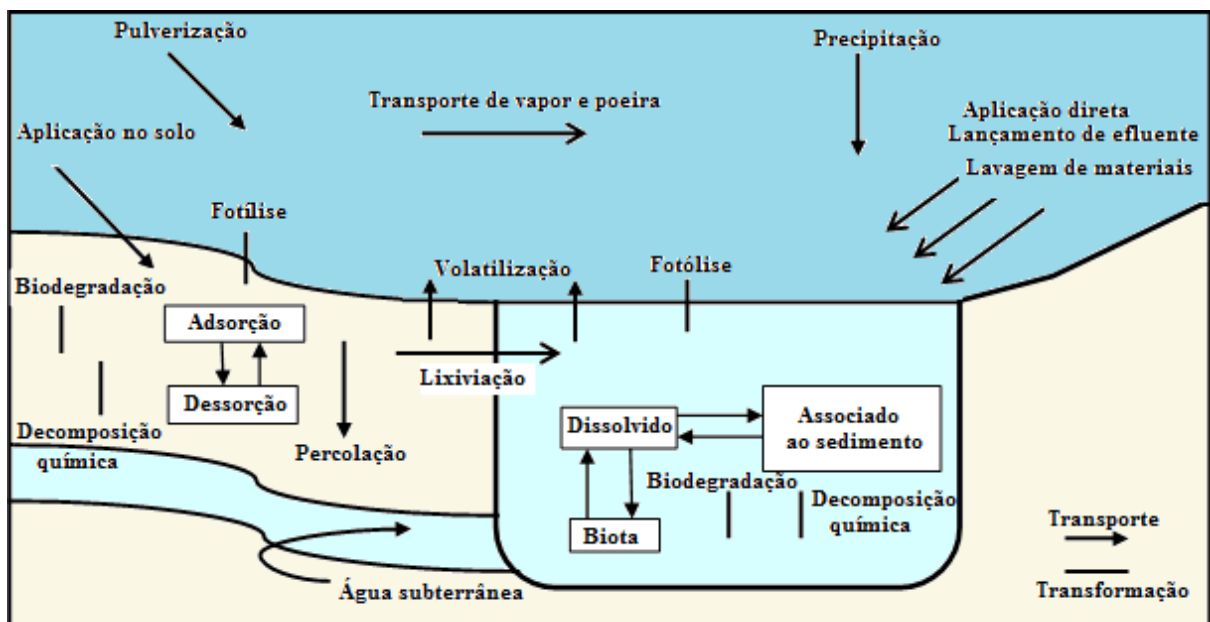
Ao entrarem em contato com o meio ambiente, os agrotóxicos estão sujeitos aos processos físico-químicos, que são reguladores do destino dos agrotóxicos. Podem ser:

retenção, lixiviação, escoamento superficial, volatilização, absorção pelas plantas, fotodegradação, decomposição química e microbiológica (BAILEY; WHITE, 1979).

Segundo Olaniran; Igbinsosa (2011), na natureza, os agrotóxicos interagem com o ambiente através de uma série de processos como a retenção, capacidade do ambiente “reter” a molécula de pesticida impedindo-a de se mover no solo, ou de se volatilizar; a biodisponibilidade e bioacumulação de contaminantes que tem função complexa nos diversos compartimentos do ecossistema tanto aquático quanto terrestre; a lixiviação, movimentação do pesticida ao longo do perfil do solo, em direção ao lençol freático ou superfície em declive do solo alcançando os corpos de água próximos; absorção, quando a molécula de pesticida penetra nas partículas de solo ou mesmo em um organismo vivo.

Os agrotóxicos podem ser metabolizados por micro-organismos ou permanecer intacto no citoplasma, bioacumulando ou bioconcentrando. O processo de bioacumulação é a capacidade que os pesticidas têm de se depositarem no organismo e sofrerem amplificação biológica ou biomagnificação com a possibilidade de alcançar os elos superiores da cadeia alimentar (OLANIRAN; IGBINOSA, 2011). A Figura 2 mostra algumas possíveis interações dos agrotóxicos na natureza.

Figura 2- Dinâmica dos agrotóxicos no ecossistema.



Fonte: adaptado de Dores; Lamônica-Freire, (1999).

Biodegradação é a transformação de compostos orgânicos pela atividade metabólica dos organismos, especialmente micro-organismos e se dá através do aproveitamento dos

contaminantes pelos micro-organismos como fonte de carbono que os permitem produzir novas células e, também, suprir-se de elétrons que possibilitem a obtenção de energia (PEDROTI, 2007).

Segundo Musumeci (1992) o termo biodegradação é utilizado para descrever os tipos de transformação de um composto através de organismos, seja ela parcial (formando produtos menos tóxicos que os de origem) ou completa (mineralizando até a formação de CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O e outros).

Segundo Araújo (2002) a biodegradação de um agrotóxico por um micro-organismo pode estar ligada a relações com outro organismo (consórcio) resultando na mineralização do mesmo.

Segundo Anderson; Domsch (1993) no processo de biodegradação de agrotóxicos, os micro-organismos dependem e/ ou são influenciados por fatores ambientais como temperatura, pH, umidade, vento, intensidade luminosa, matéria orgânica disponível, etc.

Várias pesquisas já foram feitas sobre o processo de degradação de substâncias agrotóxicas em solos, mas ainda existem poucas informações sobre esses processos dentro do sistema aquático, um dos principais receptores devido à lixiviação dos solos agrícolas (CAI *et al.*, 2011; REIS *et al.*, 2008; AMATO; LADD, 1998, ANDERSON; DOMSCH, 1993; HOLT; MAYER, 1998). Nas regiões semiáridas, onde a água é um recurso pouco abundante essa introdução de substâncias tóxicas para a biota é intensificada.

Nesse cenário, a contaminação ambiental bem como os danos à saúde das populações do semiárido são testemunhos de todo o processo histórico de insustentabilidade do desenvolvimento rural brasileiro.

Biorremediação é a transformação ou destruição de contaminantes orgânicos por decomposição, pela ação de micro-organismos, como: as bactérias, os fungos e protozoários. Estes micro-organismos transformam poluentes tóxicos, para obtenção de energia (alimento), em substâncias como dióxido de carbono, água, sais minerais e gases (CETESB, 2007).

A capacidade de acumulação de alguns agrotóxicos no ambiente é um problema ambiental e de saúde pública, por isso pesquisas vêm sendo realizadas visando estabelecer o comportamento ambiental dessas substâncias e desenvolver tecnologias que possam reduzir a presença desses compostos. A biorremediação é uma tecnologia limpa, viável e eficiente que utiliza micro-organismos vivos e/ou seus produtos a fim de degradar ou imobilizar poluentes minimizando seu impacto sobre o ambiente.



## **2.4 Bactérias degradadoras**

As bactérias possuem algumas características que propiciam sua adaptação a várias condições ambientais, como seu crescimento rápido, versatilidade metabólica, plasticidade genética e rápida adaptação a variações do meio (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010). Martins (2004) afirmou que para sua sobrevivência e crescimento, as bactérias necessitam basicamente de energia, carbono e nutrientes (N, P, S, K, Ca, Mg, etc.).

Segundo Spessoto (2004), várias espécies têm sido descritas como hábeis em degradar as mais diversas formas moleculares de agrotóxicos no ambiente, através de reações de caráter oxidativo, redutor, ou ainda hidrolítico. Em ambientes naturais, a maior parte da matéria orgânica é mineralizada aerobicamente, mas este processo pode ocorrer também na ausência de oxigênio (SMITH, 1990; HOPPER, 1991).

O primeiro passo da degradação microbiana consiste em obter melhor contato da superfície celular com a substância a ser degradada, em seguida acontece o transporte das moléculas através da membrana celular (TONINI; REZENDE; GRATIVOL, 2010).

### **3 OBJETIVOS**

O isolamento, seleção e caracterização de estirpes bacterianas com tolerância e/ou potencial de degradação de agrotóxicos.

#### **3.1 Objetivos Específicos**

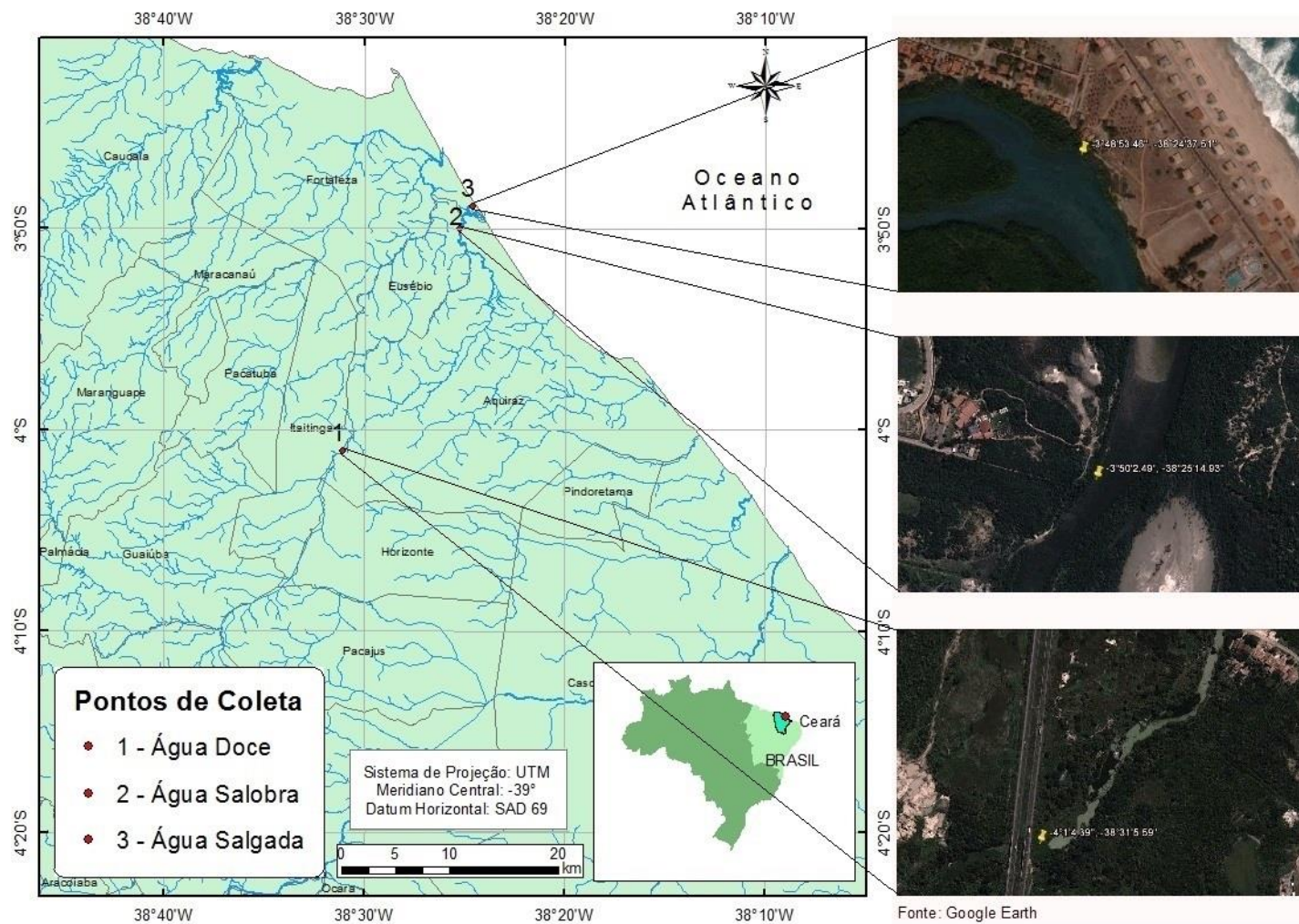
1. Pesquisar a presença de bactérias com potencial de degradação de substâncias agrotóxicas na microbiota das águas do Rio Pacotí;
2. Isolar e caracterizar, através de provas bioquímicas as estirpes degradadoras;
3. Determinar o perfil fenotípico de capacidade de degradação de agrotóxicos;
4. Avaliar a eficiência de degradação dos isolados bacterianos individualmente e em consórcio.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Procedimentos de coleta

Foram feitas três coletas, em horários diferentes, em três pontos previamente selecionado ao longo do Rio Pacotí (município de Eusébio, Ceará), seguindo um gradiente crescente de salinidade (Figura 3). Os locais de coleta foram georreferenciados com o uso de equipamento de geolocalização (GPS) Garmin III Plus. Os pontos de coleta no rio estão localizados nas coordenadas geométricas South American 69 (SAD 69) 4°01'04.39'' S; 38°31'05.59'' W (P1), 03°50'02.49'' S; 38°25'14.93'' W (P2) e 03°48'53.46'' S; 38°24'37.51'' W. Foi realizada uma campanha no mês de novembro de 2011, onde as três coletas foram realizadas em horários diferentes (T1, T2 e T3) ao longo do Rio Pacotí, onde foram marcados os pontos (P1= água doce; P2= água salobra e P3= água salgada), em cada amostragem foi recolhido 1 L de água em cada ponto.

Figura 3- Localização geográfica dos pontos de amostragem no Rio Pacotí, Eusébio- CE.



Fonte: Imagens de satélite fornecida pelo o *software Google Earth 7*.

## 4.2 Análises

### 4.2.1 Determinação dos parâmetros físico-químicos

No momento da coleta foi medida a salinidade com o uso de um refratômetro da marca ATAGO S/MILL.

### 4.2.2 Amostras de água

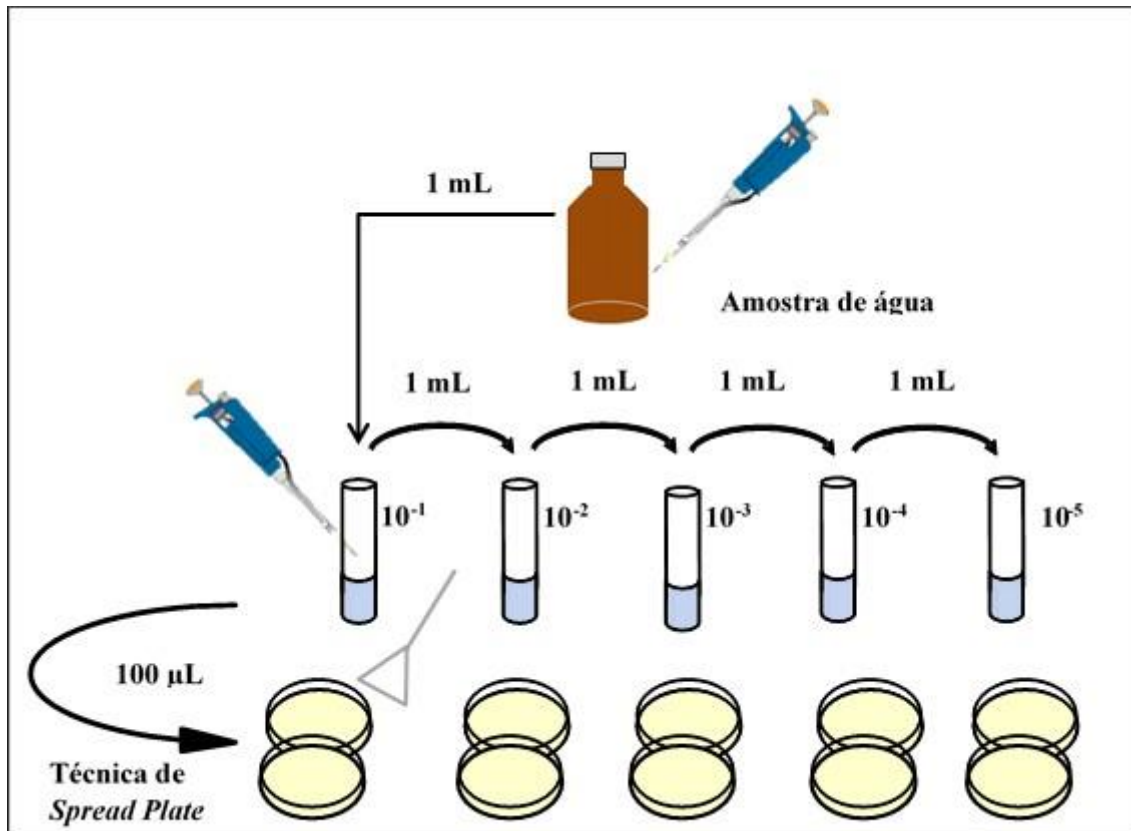
Para quantificação de bactérias heterotróficas foi coletado 1 L de água em garrafas âmbar esterilizadas e acondicionadas em caixa de material isotérmico contendo cubos de gelo e enviadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado.

#### 4.2.2.1 Processamento e diluição das amostras

As amostras de água foram diluídas na proporção de 1:9 (volume de amostra/diluyente) que correspondeu à diluição  $10^{-1}$ . A partir desta foram feitas diluições seriadas até  $10^{-5}$ . Foi usado diluyente com concentração de cloreto de sódio diferenciada de acordo com a salinidade original da amostra, sendo: solução salina 0,85% de NaCl para P1, e solução salina 1% de NaCl para P2 e P3.

A quantificação da população microbiana heterotrófica cultivável resistente e/ou degradadora de agrotóxicos, foi realizada pela técnica de *Spread Plate* a partir do plaqueamento em meio Plate Count Agar (PCA) acrescido de 50 ppm de uma mistura de agrotóxicos, contendo Atrazina, Metil-Paration, Picloran e Clorpirifós (URURAHY, 1998). Para tanto foi inoculada uma alíquota de 100  $\mu$ L das diluições em cada placa e espalhado sobre o ágar com auxílio de uma alça de Drigalski. Esse procedimento foi feito em duplicata e as placas incubadas por 48 horas a 30 °C. Foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias e os resultados expressos por mililitro de amostra (UFC/mL) (Figura 4).

Figura 4- Fluxograma de seleção de estirpes resistentes e/ ou degradadoras de agrotóxicos.



### 4.3 Caracterização das estirpes potencialmente degradadoras isoladas

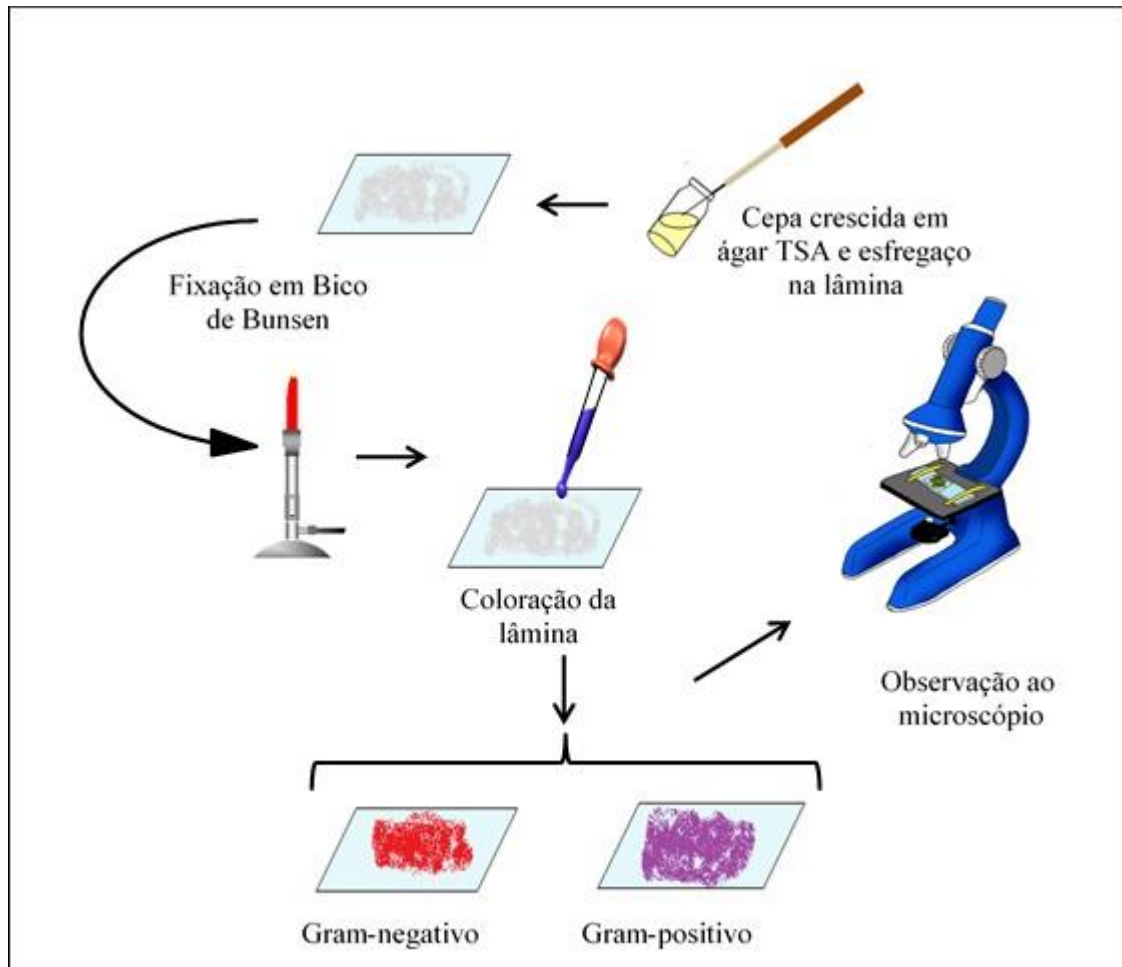
#### 4.3.1 Morfologia das colônias

As colônias crescidas sobre o meio Agar PCA com agrotóxico foram analisadas quando a morfologia, tamanho e presença de pigmentos para seleção e isolamento. Depois de etapas de purificação, as culturas bacterianas foram submetidas a testes para identificação prévia e testes de eficiência de degradação.

#### 4.3.2 Análise morfotintorial das células (técnica de Gram)

Para verificar as características das paredes celulares dos isolados bacterianos foi empregada a técnica da coloração de Gram, que segundo Levy (2004) é utilizada para classificar bactérias com base no tamanho, morfologia celular e comportamento diante dos corantes (Figura 5).

Figura 5- Fluxograma de coloração de Gram.



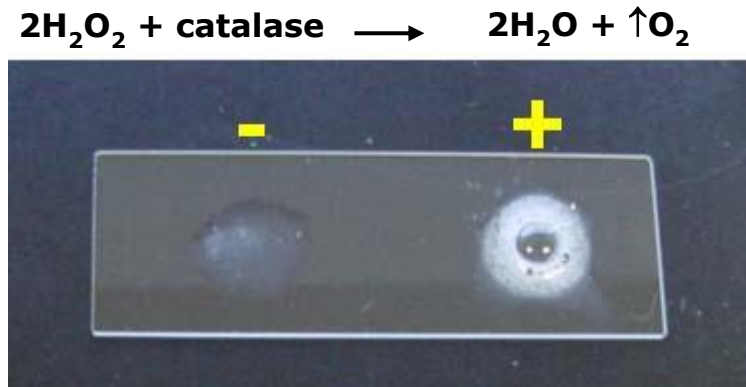
#### 4.4 Caracterizações bioquímicas

##### 4.4.1. Teste da catalase

Este teste é utilizado para detectar organismo que produzem catalase, uma vez que algumas bactérias produzem peróxido de hidrogênio durante a respiração aeróbica (PEREIRA, 2006).

O teste foi feito expondo uma pequena quantidade da cultura bacteriana com 24h de crescimento ao peróxido de hidrogênio a 3%. A enzima catalase promove a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, logo o aparecimento de bolha indica a positividade do teste (Figura 6).

Figura 6- Resultado do teste de catalase.



Fonte: [http://iws2.collin.edu/dcain/CCCCD%20Micro/catalase\\_test.htm](http://iws2.collin.edu/dcain/CCCCD%20Micro/catalase_test.htm)

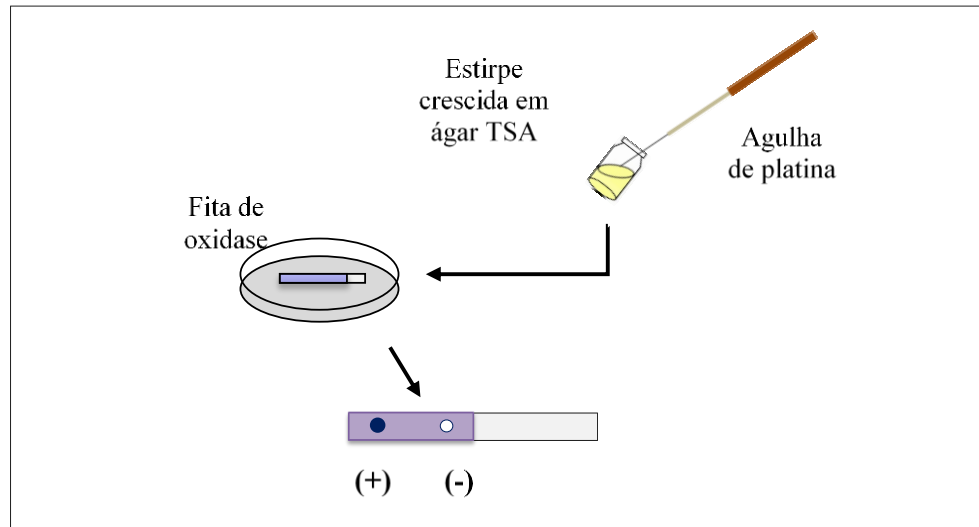
#### 4.4.2 Teste de oxidase

O teste de oxidase é baseado na produção da enzima oxidase pela bactéria e ajuda a distinguir não fermentadores (oxidase positiva) de enterobactérias, útil na caracterização de bactérias Gram- negativas (oxidase negativa) (ANVISA, 2010).

Para realização do teste foi acrescentada uma pequena quantidade de cultura com auxílio de uma agulha de platina sobre uma fita comercial (LABOCLIN LB) contendo o reagente N, N, N, N-tetrametil- p- fenileno diamina mono- hidrócloridrato. Observou-se durante 1 minuto e a mudança de coloração para azul indicou a positividade do teste (Figura 7).



Figura 7- Teste da produção de enzima oxidase.

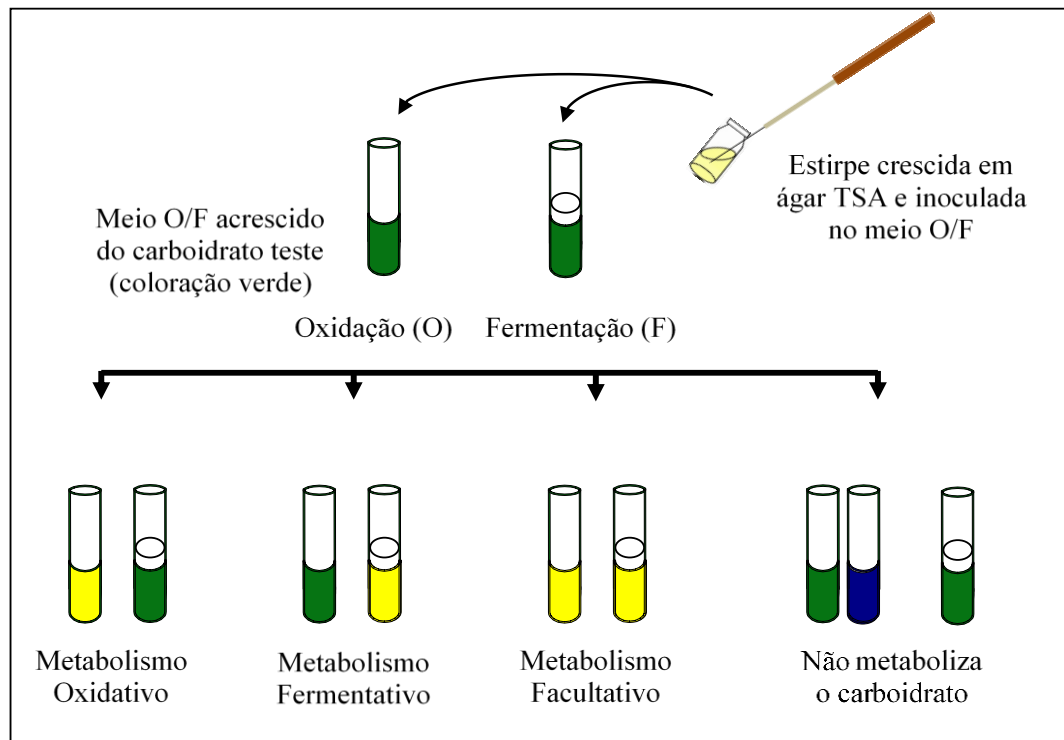


#### 4.4.3 Teste de oxidação ou fermentação da glicose (O/F)

Para realização do teste, dois tubos contendo glicose foram inoculados e um dos tubos foi selado com óleo mineral (vaselina líquida), criando assim um ambiente anaeróbico, uma vez que o óleo mineral retarda a difusão do oxigênio dentro do meio. Os dois tubos foram incubados a 35 °C por aproximadamente 48 horas, para posterior análise de mudança de cor (PEREIRA, 2006).

Uma não alteração da cor inicial ou cor azulada indicou a não capacidade de o micro-organismo consumir a glicose. Mudança para cor amarelada indicaram capacidade de fermentar ou oxidar a glicose (Figura 8).

Figura 8- Fluxograma do teste de oxidação/ fermentação de carboidratos (O/F).



#### 4.5 Determinação de tolerância e/ ou eficiência de degradação das bactérias frente aos agrotóxicos

##### 4.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As estirpes bacterianas foram submetidas ao teste de eficiência através da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foi utilizada a técnica de Diluição em Caldo (Macro diluição), utilizando caldo *Bushell Haas* sem adição de cloreto de sódio (NaCl) para P1; acrescido de 0,85% de NaCl para P2 e acrescido de 1% para P3 de acordo com as recomendações do CLSI (2010). O inóculo padrão foi obtido a partir da suspensão de colônias em tubos contendo solução salina 0,85% NaCl para amostras de P1 e 1% de NaCl para amostras dos pontos P2 e P3 até obter turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland. Para obter a concentração final de bactérias do teste, que deve ser aproximadamente  $5 \times 10^8$  UFC/ mL, o inóculo foi diluído na proporção de 1:9, o que corresponde a uma concentração bacteriana da ordem de  $10^7$  UFC/ mL (CLSI, 2010). Uma

alíquota de 100 µL do inóculo foi acrescentada a tubos contendo diferentes soluções de Caldo *Bushnell Haas* acrescido de agrotóxico em concentrações de 50 a 200 ppm. Como controle para o teste, foram utilizados tubos contendo Caldo *Bushnell Haas*, inoculados mas sem adição de agrotóxicos. Os tubos inoculados foram incubados em estufa *Shaker* a 35°C entre 16-20h.

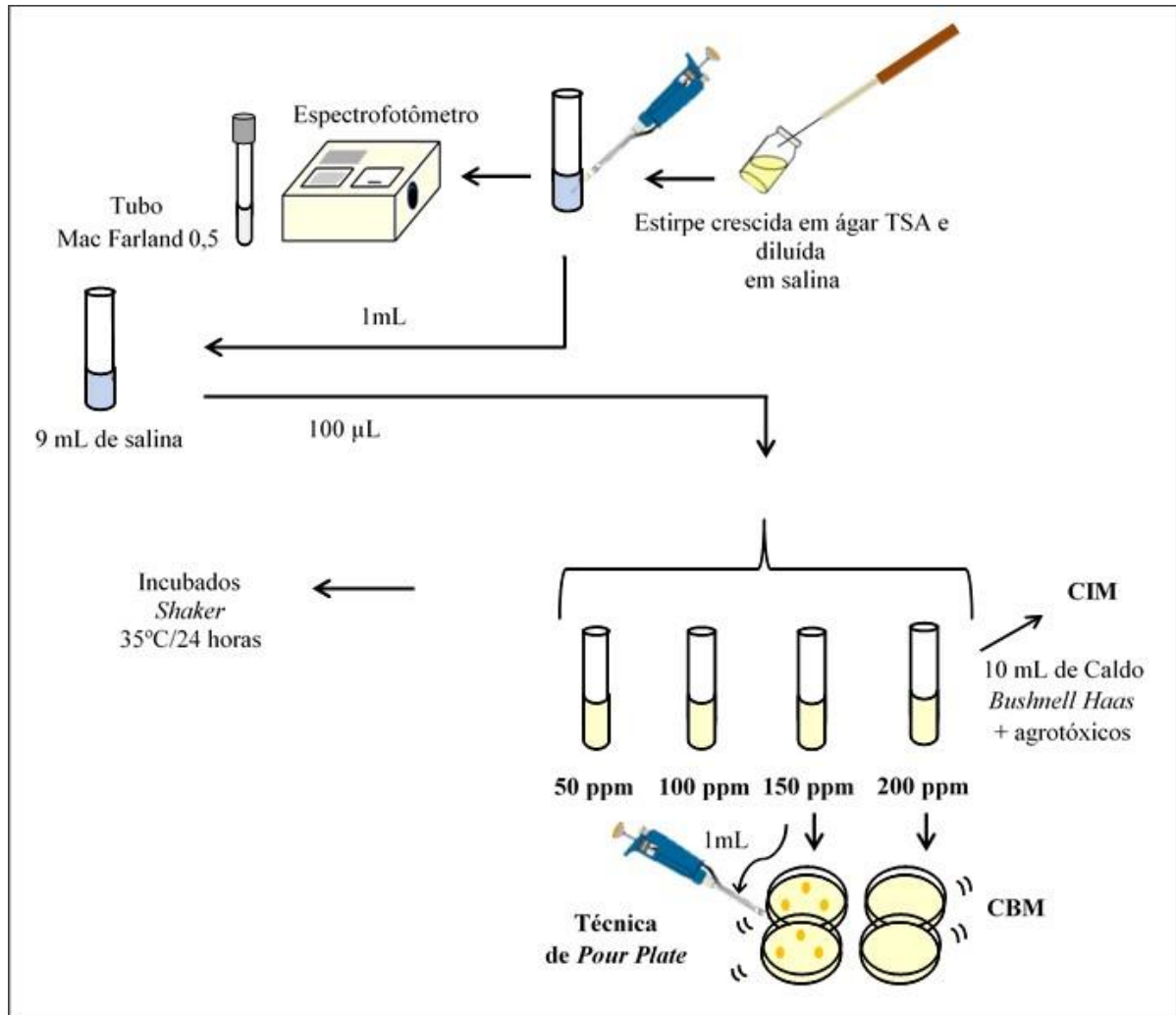
Após o período de incubação, o resultado era indicado pela alteração na turbidez do meio verificada no espectrofotômetro.

A partir dos tubos com concentrações de 150 e 200 ppm de agrotóxicos foram retiradas alíquotas de 1mL, colocadas em placas de Petri e os inóculos cobertos com 15 mL de Agar Peptona fundido (45 °C). Esse procedimento foi feito em duplicata e as placas incubadas por 48 horas a 30 °C. A CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo no tubo detectado a olho nu (CLSI, 2010) (Figura 9).

#### **4.5.2. Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)**

Dos frascos com maior concentração de agrotóxicos (150 e 200 ppm) foram retiradas alíquotas de 1 mL e inoculadas em placas, cobertas com Agar peptona fundido (técnica de *pour plate*). Depois do meio solidificado, as placas inoculadas foram incubadas por 48 horas a 30°C. Depois desse período, foi verificado o crescimento ou não de colônias no meio de cultura para determinação do CBM.

Figura 9- Fluxograma da Determinação de tolerância e/ ou eficiência de degradação de agrotóxicos.

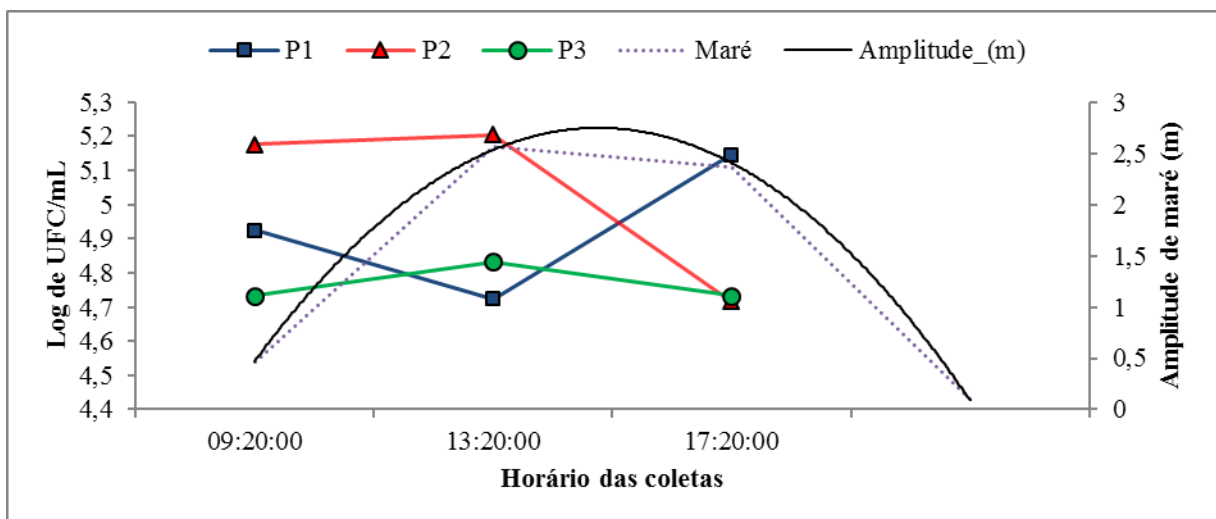


## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O valores médios da salinidade nas amostras foram: < 0,1% em P1, 1,9% em P2 e 4,0% em P3. Segundo Silveira *et al.* (2011), a salinidade é o principal parâmetro abiótico em ambientes aquáticos, que determina composição e abundância da população microbiana heterotrófica. Evans *et al.* (2011), determinaram que a salinidade e as diferentes formas de nitrogênio em águas oceânicas, como os principais parâmetros ambientais moduladores da comunidade microbiana, são responsáveis por 72% das variações da estrutura populacional.

No Gráfico 1 é apresentado o comportamento das contagens de bactérias potencialmente degradadoras de agrotóxicos, relativo aos pontos de amostragem no Rio Pacotí em relação a amplitude de marés registradas. Quantitativamente as populações bacterianas variaram de  $53 \times 10^3$  a  $53 \times 10^4$  UFC/ mL nas amostras de água doce (P1),  $51 \times 10^3$  a  $16 \times 10^4$  UFC/ mL para água salobra (P2) e  $54 \times 10^3$  a  $68 \times 10^4$  UFC/ mL para a água salgada (P3).

Gráfico 1- Contagem de bactérias potencialmente degradadoras de agrotóxicos em amostra de água do Rio Pacotí ao longo do dia de coleta em relação a variação da maré.



Foi verificada uma maior contagem bacteriana em P2, o que pode ter acontecido devido à alta concentração de matéria orgânica nos estuário. Pode se observar a partir das contagens que a variação de maré teve influência nas contagens bacterianas uma vez que P1 passou a ter uma maior densidade de bactérias na terceira coleta do que as demais que se mostraram superior nas duas primeiras coletas. Segundo Tremblay *et al.* (2005), mudanças

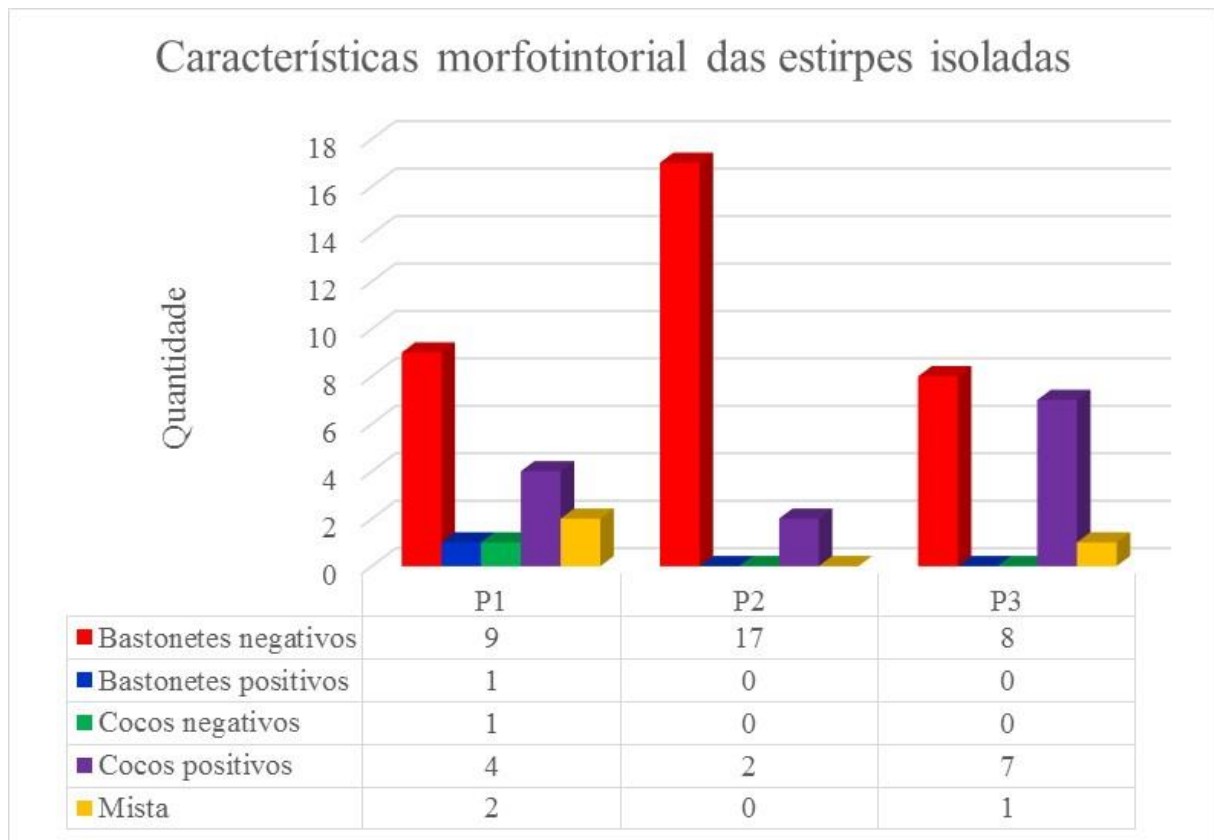
das condições entre ambientes fluviais e oceânicas, zonas estuarinas, como: temperatura, concentração da matéria orgânica (MO) dissolvida e especialmente pH e salinidade, podem afetar a dinâmica dos agrotóxicos, o que torna a variação desses fatores determinante no processo de adsorção nos ambientes aquáticos.

Oliveira (2012) ressalta que a quantidade MO encontrada nos sedimentos é um dos fatores importantes na adsorção de agrotóxicos. Os sedimentos estuarinos possuem características físicas únicas (textura e tamanho do grão) como também diferentes concentrações e composição de MO, responsáveis pela retenção desses contaminantes no assoalho estuarino (ALVES, 2005). Logo, onde existe uma maior concentração de agrotóxico, maior é a probabilidade de pressão seletiva sobre a população de bactérias.

Bouvier; Giorgio (2002) ressaltaram que os estuários são ambientes ideais para examinar a sucessão de composição bacterianas por causa das intensas variações ambientais que normalmente existem lá. Esses autores sugerem ainda, em seu estudo, que a salinidade pode ser um fator limitante para o desenvolvimento de  $\beta$ -proteobactérias (Gram-negativa), além de alterar a quantidade e diversidade da microbiota do ambiente aquático. Na presente pesquisa é possível verificar uma menor variação nas contagens bacterianas nas amostras de água salgada ao longo do tempo, bem como um aumento na quantidade de bactérias Gram-positivas. A tabela 4 mostra as características morfotintoriais dos isolados.

Foram isoladas 60 (sessenta) estirpes bacterianas, sendo 20 de cada amostra (água doce, água salobra e água salgada). O gráfico 2 mostra a morfologia celular dos isolados bacterianos e suas características tintoriais verificadas considerando seu ponto de origem.

Gráfico 2 – Morfologia celular e características tintoriais de culturas bacterianas tolerantes a agrotóxicos isoladas em águas do Rio Pacotí seguindo um gradiente de salinidade.



Entre as 60 (100%) estirpes bacterianas heterotróficas, oito (13,3%) dos isolados foram consideradas como “viáveis mas não cultiváveis” (VNC). Essas estirpes tiveram como característica um crescimento primário, sobre a superfície do meio seletivo, mas a não culturabilidade após isolamento. Pavlov *et al.* (2004) afirmaram ser comum colônias bacterianas VNC entre as populações de bactérias heterotróficas cultiváveis.

Há décadas a comunidade científica tem o conhecimento de que algumas bactérias metabolicamente ativas, não são capazes de crescer em meios de cultura. Bactérias submetidas a estresse ambiental (escassez de nutrientes, variações de pH, salinidade e temperatura) poderiam entrar em um estado chamado de VNC (THOMPSON; LIDA; SWINGS, 2004).

Bactérias VNC juntamente com as cultiváveis, são participantes nas atividades de biomineralização de substâncias orgânicas e biotransformação de minerais, principalmente em manguezais, ecossistemas marinhos altamente produtivos (GONZALEZ-ACOST *et al.*, 2006).

Conforme Lebaron (1989), a abundância bacteriana, obtida pelo método de cultivo *in vitro*, apenas deve servir de base para o estudo quantitativo do comportamento bacteriano, uma vez que dificilmente a contagem irá refletir a totalidade da comunidade bacteriana de um dado local.

Rheinheimer (1997) mostrou que a composição das comunidades de bactérias cultiváveis é fortemente correlacionada com as mudanças de salinidade em vários estuários.

Crump *et al.* (1999) sugerem que as bactérias de vida livre podem não se desenvolver em uma comunidade estuarina devido a um curto tempo de residência da água.

Os estudos cinéticos revelaram diversas interações entre sorção e degradação (GEVAO; SEMPLE; JONES, 2000.; GUO *et al.*, 2000). É comumente aceito que produtos químicos adsorvidos são menos acessíveis para os micro-organismos e que conseqüentemente limita a sua degradação, bem como o seu transporte (SELIM; MA.; ZHU, 1999; KOSKINEN; COX; YEN, 2001).

Considerando as vias metabólicas para utilização de glicose, a maioria dos isolados apresentou um caráter oxidativo da glicose com 51,9 % dos isolados seguido dos anaeróbios facultativos com 30,7%.

Singh *et al.*, (2004) isolaram seis estirpes de solo na Austrália com capacidade de degradar Clorpirifós e todos os isolados foram móveis, Gram negativos, catalase e oxidase positivos.

A maioria das estirpes isoladas apresentaram características de oxidase negativa (75 %) e catalase positiva (55,7%), nas tabelas 3, 4 e 5 é possível verificar as características morfológicas e bioquímicas individuais de cada isolado bacteriano.



Tabela 3 - Características morfológicas e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxicos isoladas de água doce do Rio Pacotí (P1).

Amostra	Cepa	Características morfológicas		Características Bioquímicas			
		Gram	Morfologia	Oxidase	Catalase	O	F
Água doce	1	Negativo	Bastonetes	-	-	+	-
	2	Negativo	Bastonetes	-	-	+	+
	3	Positivo	Mista	-	+	+	-
	4	Negativo	Bastonetes	-	-	+	-
	5	Negativo	Bastonetes	+	-	-	+
	6	Positivo	Cocos	-	+	-	+
	7	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	8	Negativo	Bastonetes	+	-	+	-
	9	Negativo	Bastonetes	+	-	-	-
	10	Positivo	Cocos	+	+	+	-
	11	Mista	Mista	-	+	+	+
	12	Negativo	Bastonetes	+	-	+	-
	13	Positivo	Cocos	-	+	+	-
	14	Positivo	Bastonetes	-	-	+	-
	15	Positivo	Cocos	-	+	+	-
	16	Negativo	Cocos	-	+	+	+
	17	Negativo	Bastonetes	-	+	+	+

Verificamos entre os isolados de P1 uma maior densidade populacional de bactérias bastonetes Gram- negativas onde entre estas quatro (4) estirpes apresentaram características de oxidase negativa e catalase positiva e característica de oxidação da glicose (teste O/F). Pode-se verificar duas (2) culturas mistas. Segundo Pino e Peñuela, (2011) em sua pesquisa testando a capacidade degradadora de um consórcio microbiano em um meio de cultura acrescido de pesticidas verificaram a degradação total (100%) dessas substâncias mostrando a eficiência degradadora das culturas mistas.

Tabela 4 - Características morfológicas e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxicos isoladas de água salobra do Rio Pacotí (P2).

Amostra	Cepa	Características morfológicas		Características Bioquímicas			
		Gram	Morfologia	Oxidase	Catalase	O	F
Água salobra	18	Negativo	Bastonetes	-	-	+	-
	19	Negativo	Bastonetes	-	-	-	+
	20	Negativo	Bastonetes	-	+	-	-
	21	Negativo	Bastonetes	-	-	+	+
	22	Negativo	Bastonetes	+	+	-	+
	23	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	24	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	25	Negativo	Bastonetes	-	+	+	+
	26	Negativo	Bastonetes	-	-	-	-
	27	Negativo	Bastonetes	-	-	+	-
	28	Negativo	Bastonetes	-	-	+	-
	29	Negativo	Bastonetes	-	+	+	+
	30	Positivo	Cocos	-	+	+	+
	31	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	32	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	33	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
34	Negativo	Bastonetes	+	+	+	+	
35	Positivo	Cocos	-	+	+	-	
36	Positivo	Bastonetes	-	-	+	-	

Verificamos entre os isolados de P2 uma maior densidade populacional de bactérias Gram- negativas, onde cinco (5) destas estirpes apresentaram características de oxidase negativa e catalase positiva e capacidade de oxidação da glicose. Esses resultados são similares aos encontrados entre os isolados bacterianos de P1. As bactérias com característica de parede Gram negativa foram dominantes. Apenas duas (2) estirpes Gram positivas foram isoladas e nenhuma cultura caracterizada mista.

Tabela 5 - Características morfofintoriais e bioquímicas das estirpes potencialmente degradadoras de agrotóxicos isoladas de água salgada do Rio Pacotí (P3).

Amostra	Cepa	Características morfofintoriais		Características Bioquímicas			
		Gram	Morfologia	Oxidase	Catalase	O	F
Água salgada	37	Negativo	Mista	-	+	-	-
	38	Positivo	Cocos	-	+	+	+
	39	Negativo	Bastonetes	-	+	+	+
	40	Negativo	Bastonetes	-	+	+	+
	41	Negativo	Bastonetes	-	+	+	-
	42	Negativo	Bastonetes	+	-	-	+
	43	Negativo	Bastonetes	+	+	+	+
	44	Positivo	Cocos	-	-	-	+
	45	Positivo	Cocos	-	+	+	-
	46	Negativo	Bastonetes	-	-	-	+
	47	Negativo	Bastonetes	+	-	-	+
	48	Positivo	Cocos	-	-	+	-
	49	Positivo	Cocos	+	-	+	-
	50	Positivo	Cocos	-	-	+	-
	51	Negativo	Bastonetes	+	+	+	-
52	Positivo	Cocos	+	-	+	-	

Entre os isolados do ponto com maior influência do mar (P3) a maioria apresentou característica de Gram negativos, entretanto comparativamente aos outros pontos analisados, houve uma maior presença de bactérias cocos Gram-positivos. Generalizando os padrões bioquímicos, houve uma maior presença de organismos oxidase negativos e com capacidade de oxidação da glicose.

Rousseaux *et al.*, (2001) apontaram que bactérias Gram-positivas não são capazes de mineralizar o anel aromático da atrazina, sugerindo que em solos aptos a degradação de agrotóxicos, a mineralização deste composto pode ser feita por um consórcio de bactérias. Em sua pesquisa bactérias Gram-positivas são capazes de degradar parcialmente a atrazina lentamente até ácido cianúrico.

Jiang *et al.*, (2007) constataram que a presença de glicose no meio de cultura como fonte primária de energia otimizou a multiplicação bacteriana influenciando na taxa de degradação dos pesticidas. Karpouzas *et al.*, (2005) afirmaram também que a capacidade de degradar agrotóxicos apresentada por isolados bacterianos de solo foi positivamente influenciada pela presença de glicose em culturas líquidas.

Segundo Pino; Peñuela (2011) em estirpes isoladas do solo com a capacidade de degradar 72% para Metil-paration e 39% Clorpirifós quando incubados em mistura (Metil-Paration + Clorpirifós), com fornecimento de glicose como fonte de carbono extra no meio de cultura, a eficiência da degradação dos pesticidas alcançou 100%. Segundo os autores, no ambiente do solo, a taxa de degradação desses pesticidas foi aumentada através da adição de nutrientes reduzindo a concentração destes e a toxicidade no ambiente. Esses mesmos autores ressaltaram que este efeito é devido a um maior número de organismos que precisa de mais energia a partir de fontes diferentes para tolerar mais facilmente a acumulação de compostos tóxicos. Isto é porque na degradação de compostos tóxicos existem grupos de microorganismos envolvidos que são responsáveis por co-metabolizar esses compostos, um processo que pode não ocorrer de forma eficiente se estiver usando uma única espécie microbiana.

Quando foi testada a eficiência de utilização dos agrotóxicos como única fonte de carbono, as estirpes bacterianas se mostraram capazes de se manter viáveis e cultiváveis até concentrações de 200 ppm, tanto frente as substâncias individualmente como em mistura dos quatro agroquímicos testados. A Tabela 6 mostra os resultados do CIM e CBM de todas as estirpes isoladas da água do Rio Pacotí.

Tabela 6 – Comportamento das estirpes bacterianas isoladas ao longo de um gradiente salino no Rio Pacotí frente aos agrotóxicos.

Concentração (ppm)	Estirpes tolerantes aos agrotóxicos (%)									
	Míx		Atrazina		M-paration		Picloran		Clorpirifós	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
≤ 100	28,8	9,6	17,4	0,0	19,2	13,5	38,5	23,1	5,8	0,0
150	13,5	17,4	25,0	5,7	21,1	1,9	25,0	19,2	9,6	0,0
200	57,7	73,0	55,8	92,3	57,7	84,6	36,5	57,7	84,6	100,0
>200	0,0	0,0	1,8	1,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Anjum; Grohmann; Malik (2011) isolaram estirpes bacterianas que toleram até concentrações de até 3200 µg/mL destes pesticidas (Indane, Endosulfan, Monocrotophos, Clorpirifos, Folpet e Captan), exceto folpet que foi tolerado até 1600 µg/mL. Ferrer; Gonzalez-Lopez.; Ramos-Cormenzana, (1986) testaram concentrações de 100, 200, 300, 400

e 500 µg/mL de 2,3,6 - TBA (ácido 2,3,6 - triclorobenzóico) causando percentuais de inibição de 28,0, 47,8, 54,5, 61,2 e 95,6 % das populações bacterianas.

Shafiani; Malik (2003) encontraram entre isolados de solo irrigado, *Pseudomonas* e *Rhizobium* que toleraram concentrações de até 1600 µg/mL de Carbofuran, 800 µg/mL de Endosulfan e 1600 µg/mL de Malathion e *Azotobacter* toleraram concentrações até 1600 µg/mL de todos os três pesticidas.

Ajaz *et al.* (2005) relataram que, sob condições de elevada concentração de Clorpirifós, o tempo de geração dos isolados tolerantes aumentou, em comparação com um tempo de geração menor em meio controle. Bhagobaty; Malik (2008) testaram o crescimento de quatro bactérias isoladas, identificadas como *Pseudomonas* spp., em meio contendo Clorpirifós em concentrações que variaram de 25 a 200 µg/mL e constataram a redução na velocidade de crescimento das bactérias com o aumento da concentração de Clorpirifós.

Neste trabalho, como podemos ver na Tabela 6, os isolados toleraram uma concentração variando de 100 até 200 ppm dos agrotóxicos, verificando também que o Picloran foi o que apresentou uma maior toxicidade para as bactérias testadas, bem como o Clorpirifós foi o que apresentou a maior taxa de utilização pelas bactérias com 100% dos isolados tolerando até 200 ppm de concentração.

Foi verificado que na presença dos agrotóxicos, alguns isolados passaram a apresentar uma característica de bioluminescência o que pode ser indicativo de um processo regulado pelo mecanismo de *quorum sensing* (estresse ambiental ao qual foram submetidas) tendo como indutores as moléculas de agrotóxico (Figura 10).

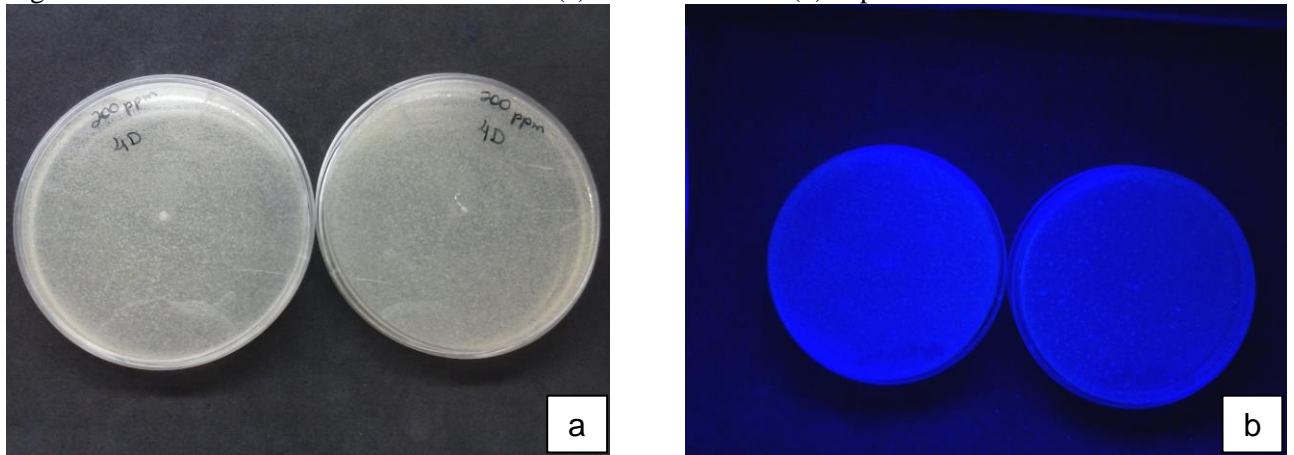
Hastings; Greenberg (1999) definem o *quorum sensing* (ou auto-indução) como uma importante aquisição evolutiva, que permite uma economia de energia uma vez que assegura que a bactéria luminescente não sintetize seus produtos até que se tenha uma concentração de células microbianas suficientes para que a luminescência seja visível.

Robinson *et al.*, (2011) relataram que a bioluminescência fornece um sistema *Bioreporter* ideal que produz uma reação física, em vez de química, evitando assim a acumulação de compostos que podem levar à toxicidade ou à instabilidade, como foi demonstrado, com a expressão da proteína fluorescente verde, em *Escherichia coli* (SIEGELE; HU, 1997).

Contudo, a produção e emissão de luminescência é energeticamente dispendiosa, por isso a importância da percepção da concentração de auto-indutores e da densidade bacteriana presente no meio, para garantir que a emissão da luminescência resultará em algum impacto significativo no meio (NUNES- HALLDORSON; DURAN, 2003).

A reação química envolvida na bioluminescência deve ser suficientemente energética para levar uma molécula a um estado excitado que resultará na liberação um fóton visível à medida que retorna ao seu estado normal (SHIMOMURA, 2006).

Figura 10- Placas com crescimento bacteriano (a) em luz natural e (b) expostas a luz Ultra Violeta.



Foi observado que os agrotóxicos M-paration e Atrazina (concentrações de 150 e 200 ppm) foram aqueles com maior efeito sobre a expressão do caráter luminescente entre as estirpes testadas. Esse fenótipo foi verificado entre as estirpes isoladas de todas as amostras de água, com maior frequência entre os isolados bacterianos da amostra de água salobra (P2). Testes adicionais serão realizados para o entendimento desse mecanismo para seu potencial uso como um bioindicador da presença de agrotóxicos em amostras ambientais.

## 6 CONCLUSÃO

- A salinidade foi um fator ambiental determinante na abundância de bactérias degradadoras de agrotóxicos no ambiente do estuário do Rio Pacotí.
- O agrotóxico Clorpirifós foi, individualmente, a substância testada com maior taxa de degradabilidade por bactérias, enquanto o Picloran foi o mais tóxico para os isolados com apenas 57,7% do total tolerando a concentração de 200 ppm de concentração.
- Entre a população de bactérias cultiváveis tolerantes/resistentes aos agrotóxicos, a maior frequência de isolamento foi de estirpes com características individuais de Gram-negativas, oxidadoras de glicose, oxidase negativa e catalase positiva.
- A expressão de luminescência por bactérias expostas aos agrotóxicos M-paration e Atrazina é um fato relevante na prospecção de bioindicadores da presença de agrotóxicos no ambiente por isso existe a necessidade de mais estudos para o entendimento desse mecanismo.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ambientes estuarinos são muito dinâmicos, bem como, muitos são os fatores que influenciaram em suas características, como variações de maré e correntes, clima e atividades antrópicas existentes em sua proximidade, sendo as comunidades bacterianas um reflexo das condições desse local. Estudos pontuais se fazem necessários ao entendimento de sua distribuição e identificação. Um maior espaço de tempo e um maior número de coletas poderiam ampliar os conhecimentos a respeito das comunidades bacterianas potencialmente degradadoras de agrotóxicos presentes em corpos e cursos d'águas.

## 8 REFERÊNCIAS

AGROFIT (Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários). Brasília: Secretaria de Defesa Agropecuária/Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1988.

AJAZ, M. *et al.* Chlorpyrifos resistant bacteria from Pakistani soils: isolation, identification, resistance profile and growth kinetics. **Pak. J. Bot.**, Karachi, v. 37, n. 2, p. 381, 2005.

ALVES, F. A. O. V. **Pesquisa de Agrotóxicos Organoclorados em Sedimentos e Rizos - sedimentos do Estuário do Rio Douro**. 2005.102 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Ciências, Universidade do Porto, 2005.

AMATO, M.; LADD, J. N. Assay for microbial biomass based on ninhydrin-reactive nitrogen in extracts of fumigated soils. **Soil Biol. Biochem.**, Elmsford, v. 20, n. 1, p. 107-114, 1998.

ANDERSON, J. P.; DOMSCH, K. H. The metabolic quotient for CO<sub>2</sub> (qCO<sub>2</sub>) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. **Soil Biol. Biochem.**, Elmsford, v. 25, n. 3, p. 393-395, 1993.

ANJUM, R.; GROHMANN, E.; MALIK, A. Molecular characterization of conjugative plasmids in pesticide tolerant and multi-resistant bacterial isolates from contaminated alluvial soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 84, n. 1, p. 175-181, 2011.

ANVISA. Módulo 5: Tecnologia em Serviços de Saúde: descrição dos meios de cultura empregados nos exames microbiológicos. *In*: **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde**. Disponível em <<http://portal.ANVISA.gov.br/wps/portal/ANVISA/home>> Acesso em: 18 de nov. 2013.

ANVISA. Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA). **Nota Técnica para divulgação dos resultados do PARA de 2008**. Gerência Geral de Toxicologia, 2009.



ANVISA. Trilhas do Campo: Livro e Vídeo Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/home>>. Acesso em: 16 de nov. 2013

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, Extração e Análise do Glifosfato em Dois Tipos de Solo**. 2002. 83f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura, Universidade de São Paulo, 2002.

ASSUNÇÃO, L. P. G.; ROHLFS, D. B. Biorremediação em Áreas Contaminadas. *In: 7ª Mostra de Produção Científica da Pós- Graduação Latu Sensu da PUC Goiá*, Goiânia, 2012. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/7mostra/Artigos1c.html>>. Acesso em: 13 de nov. 2013.

BAILEY, G. W.; WHITE, J. L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. *In: Single Pesticide Volume: The Triazine Herbicides*. Springer New York. 1970. 29-92p.

BHAGOBATY, R. K.; MALIK, A. Utilization of chlorpyrifos as a sole source of carbon by bacteria isolated from wastewater irrigated agricultural soils in an industrial ares of western Uttar Pradesh, India. **Res.J.Microbiol.**, Paris, v.3, n.5,p. 293-307, 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.

BRANCO, S. M. **Natureza e Agroquímicos**. 2. ed. São Paulo: Moderna, 2013.

BRASIL (1998). Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Legislação Federal de agrotóxicos e afins. Ministério da Agricultura e do Abastecimento, Brasília, p. 7-13.

CÁCERES, T. *et al.* Toxicity of chlorpyrifos and TCP alone and in combination to *Daphnia carinata*: The influence of microbial degradation in natural water. **Water res.**, New York, v. 41, n. 19, p. 4497-4503, 2007.

CAI, T., CHEN, L., XU, J., SHU, C. Degradation of Bromoxynil Octanoate by Strain *Acinetobacter* sp. XB2 Isolated from Contaminated Soil. **Curr Microbiol.**, New York, v. 63, p.218–225, 2011.

CAVALCANTE, R. M.; LIMA, D. M.; FERNANDES G. M.; DUAVÍ, W. C. Relation Factor: A new strategy for quality control in the determination of pesticides in environmental aqueous matrices. **Talanta**, London, v.94, p.212-218, 2012.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. (2007). Disponível em <[http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas\\_contaminadas/Capitulo\\_X.pdf](http://www.cetesb.sp.gov.br/Solo/areas_contaminadas/Capitulo_X.pdf)>. Acesso em 26 de dez. 2013.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. **Methods for Broth Dilution Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals**. Guideline. M49-A, v.26, n.24, 2010. 50p.

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.

CRUMP, B. C.; ARMBRUST, E. V.; BAROSS, J. A. Phylogenetic analysis of particle-attached and free-living bacterial communities in the Columbia River, its estuary, and the adjacent coastal ocean. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 65, n. 7, p. 3192-3204, 1999.

DORES, E. F. G.C; LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticida: Vias de Contaminação e Dinâmica dos Pesticidas no Ambiente Aquático. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 9, p.1-18, 1999.

EVANS, C. *et al.* Potential climate change impacts on microbial distribution and carbon cycling in the Australian Southern Ocean. **Deep-Sea Res. Part 2, Top. Stud. Oceanogr.**, Oxford, v. 58, n. 21-22, p. 2150-2161, 2011.

FAO (Food and Agriculture Organization). Agricultural database, 2003. Disponível em: <<http://www.fao.org>>. Acesso em 26 de dez. 2013.

FERRER, M. R.; GONZALEZ-LOPEZ, J.; RAMOS-CORMENZANA, Effect of some herbicides on the biological activity of *Azotobacter vinelandii*. **Soil biol. biochem.**, Elmsford, v. 18, n. 2, p. 237-238, 1986.

GEVAO, B.; SEMPLE, K. T.; JONES, K. C. Bound pesticide residues in soils: a review. **Environ. Pollut.**, Barking, v. 108, n. 1, p. 3-14, 2000.

GIANCOTTI, P. R. F. *et al.* Efficacy of herbicides in controlled conditions for controlling sugarcane grass weeds under water restriction. **Rev. Bras. Herbic.**, Brasília, v.11, n.3, p.269-275, 2013.

GONZALEZ-ACOSTA, B. *et al.* Seasonal seawater temperature as the major determinant for populations of culturable bacteria in the sediments of an intact mangrove in an arid region. **FEMS Microbiol Ecol.**, Malden, v. 55. n. 2, p. 311-321, 2006.

GUO, L. *et al.* Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors. **J. Contam. Hydrol**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 45-62, 2000.

HASTINGS, J. W.; GREENBERG, E. P. Quorum sensing: the explanation of a curious phenomenon reveals a common characteristic of bacteria. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 181, n. 9, p. 2667-2668, 1999.

HOLT, J. A.; MAYER, R. J. Changes in microbial and protease activities of soil associated with long-term sugarcane monoculture. **Biol. Fert. Soils**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 127- 131, 1998.

HOPPER, D.J. Aspects of the Degradation of Aromatics by Microorganisms. *In*: BETTS, Walter Bernard *et al.* **Biodegradation: natural and synthetic materials**. Springer-Verlag London Ltd., 1991.238p.

JIANG, J. *et al.* Simultaneous biodegradation of methyl parathion and carbofuran by a genetically engineered microorganism constructed by mini-Tn5 transposon. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 18, n. 4, p. 403-412, 2007.

KARPOUZAS, D. G. *et al.* Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. **FEMS Microbiol Ecol**, Malden v. 53, n. 3, p. 369-378, 2005.

KOSKINEN, W. C.; COX, L.; YEN, P. Changes in sorption/bioavailability of imidacloprid metabolites in soil with incubation time. **Biol. Fert. Soils.**, Berlin, v. 33, n. 6, p. 546-550, 2001.

LEBARON. Philippe. Repartition et Dynamique de Differentes Populations Bacteriennes Autochtones et Allochtones Dans les Eaux de L'etang de Thau. 1989. 254f. Tese (Doutorado em Physiologie et biologie des organismes et des populations) - l'Université des Sciences et Techniques du Languedoc, 1989.

LEVY, C. E. Procedimentos laboratoriais: da requisição do exame à análise microbiológica. *In: Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde.* Editora Agencia de Vigilância Sanitária (ANVISA), módulo 3, 2004. 45p.

LUCHINI, L.C.; ANDRÉA, M. M. Comportamento ambiental de agrotóxicos. **Hortic. Bras.**, Brasília, v.18, p.33-35, 2000.

MARTINS, B. A. D.. **Avaliação da cinética de biodegradação do etanol em concentrações mínimas necessárias dos nutrientes nitrogênio e fósforo.** 2004. 96f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Departamento de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2004.

MIDIO, A. F.; SILVA, E. S. **Inseticidas-Acaricidas– Organofosforados e Carbamatos.** São Paulo: Roca Biomedicina, 1995. 94p.

MILHOME, M. A. L. *et.al.* Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Eng. Sanit. Ambient.**, Rio de Janeiro, v.14, n.3, p. 363-372, 2009.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Informativo MMA, 2000**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/ascom/imprensa/marco2000/informma15.html>>. Acesso em 25 de nov. 2013.

MUSUMECI, M. R. Comportamento de herbicidas no solo: Influência da matéria orgânica. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. (Ed.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência Solo, 1992. 356p.

NUNES-HALLDORSON, V. S.; DURAN, N. L. Bioluminescent bacteria: lux genes as environmental biosensors. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo, v. 34, n. 2, p. 91-96, 2003.

OLANIRAN, A.; IGBINOSA, E. Chlorophenols and other related derivatives of environmental concern: properties, distribution and microbial degradation processes. **Chemosphere**, Oxford, v.83, p. 1297-1306, 2011.

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, 2012.

OLIVEIRA-FILHO, E. C. Agrotóxicos. In: SISINNO, C. L. S. & OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. 216p.

PAVLOV, D. *et al.* Potentially pathogenic features of heterotrophic plate count bacteria isolated from treated and untreated drinking water. **Int. J. Food Microbiol.**, Amsterdam, v. 92, n. 3, p. 275-87, 2004.

PEDROTI, G. I. **Ensaio de biodegradabilidade aeróbia de hidrocarbonetos derivados do petróleo em solos**. 2007.120f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Centro Tecnológico, Departamento de Hidráulica e Saneamento, Universidade Federal do Espírito Santo, 2007.

PEREIRA, A. F. Testes Bioquímicos para Identificação de Bactérias. In: VERMELHO, A. B.; PEREIRA, A. F.; COELHO, R. R. R.; SOUTO-PADRON, T. **Práticas de Microbiologia**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 151- 195. , 2006.

PERES, F; MOREIRA, J. C. **É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.384p.

PINO, N.; PEÑUELA, G. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. **Int. Biodeterior. Biodegrad.**, Barking, v. 65, n. 6, p. 827-831, 2011.

PORTO, A. L. M. *et al.* Biodegradation of Pesticides. In: **Pesticides in the Modern World–Pesticides Use and Management**. 2010. 522p.

REIS, M. R. *et al.* Microbial Activity in Soil Cultivated with Sugarcaneafter Herbicide Application. **Planta Daninha**, Rio de Janeiro, v. 26, n. 2, p. 323-331, 2008.

RHEINHEIMER, G. The influence of natural salinity gradients on bacteria communities of flowing waters. **Limnologica**, Berlin, v. 27, n. 1, p. 29-36, 1997.

ROBINSON, G. M. *et al.* Application of bacterial bioluminescence to assess the efficacy of fast-acting biocides. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Bethesda, v. 55, n. 11, p. 5214-5219, 2011.

ROMANINI, C. A.; TEIXEIRA, A. B. Atendimento emergencial de intoxicação por piretróide Em cão na clínica veterinária da fai. **Omnia Saúde**, Adamantina, v.5, n.2, p.15-23, 2008.

ROSATI, F. Sperm-egg interactions during fertilization in invertebrates. **Ital. J. Zool.**, Modena, v. 62, n. 4, p. 323-334, 1995.

ROSE, Robert I. Pesticides and public health: integrated methods of mosquito management. **Emerg. Infect. Dis.**, Atlanta, v. 7, n. 1, p. 17, 2001.

ROUSSEAU, S; HARTMANN, A; SOULAS, G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. **FEMS Microbiol Ecol.**, Amsterdam, v. 36, n. 2-3, p. 211-222, 2001.

SCORZA JUNIOR, R. P.; NÉVOLA, F. A.; AYELO, V. S. Avaliação da contaminação hídrica por agrotóxico. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento**. Dourados: EMBRAPA Agropecuária Oeste, 2010. 33p.

SELIM, H. M.; MA, L.; ZHU, H. Predicting Solute Transport in Soils Second-Order Two Site Models. **J/ Soil Sci. Soc. Am.**, Madison, v. 63, n. 4, p. 768-777, 1999.

SEMACE. **Área de Proteção Ambiental do Rio Pacoti**. Disponível em <[www.semace.ce.gov.br](http://www.semace.ce.gov.br)>. Acesso em: 16 de nov. 2013.

SHAFIANI, S.; MALIK, A. Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater-irrigated soil. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, Oxford, v. 19, n. 9, p. 897-901, 2003.

SHIMOMURA, O. **Bioluminescence: chemical principles and methods**. World Scientific Publishing Company, 2012.496p.

SIEGELE, D. A.; HU, J. C. Gene expression from plasmids containing the araBAD promoter at subsaturating inducer concentrations represents mixed populations. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Allahabad, v. 94, n. 15, p. 8168-8172, 1997.

SILVEIRA, C. B. *et al.* Influence of salinity on bacterioplankton communities from the Brazilian rain forest to the coastal Atlantic Ocean. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17789, 2011.

SINGH, B. K. *et al.* Biodegradation of chlorpyrifos by Enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. 70, n. 8, p. 4855-4863, 2004.

SISINNO, C. L. S. ; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Fundamentod da Toxicologia Ambiental. *In*: SISINNO, C. L. S. ; OLIVEIRA-FILHO, E. C. **Princípios de Toxicologia Ambiental**. Rio de Janeiro: Interciência, 2013. p. 17- 26.

SMITH, Mark R. The biodegradation of aromatic hydrocarbons by bacteria. *In*: **Physiology of Biodegradative Microorganisms**. Springer Netherlands. 1991. 220p.

SPESSOTO, A. M. Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil. *In*: Silva, C. M. M. S.; Fay, E. F. **Impacto ambiental Impacto ambiental do fungicida Metalaxil**. Jaguariúna, SP: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa Meio Ambiente, 2006. p. 62- 78.

STÜTZER, G.; GUIMARÃES, G. Aspectos toxicológicos e ambientais relacionados com o uso de produtos fitossanitários. *In*: ZAMBOLIM, L. **O que os engenheiros agrônomos devem saber para orientar o uso de produtos fitossanitários**. Viçosa: UFV, 2003. 376p.

THOMPSON, F. L.; LIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of Vibrios. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, Washington, v. 68, n. 3, p. 403-431, 2004.

TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: Revisão. **Oecol. Aust.**, Rio de Janeiro, v. 14(4), p. 1025-1035, 2010.

TREMBLAY, L. *et al.* Effects of temperature, salinity, and dissolved humic substances on the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons to estuarine particles. **Mar.Chem.**, Amsterdam, v. 96, n. 1-2, p. 21–34, 2005.



URURAHY, A. F. P. Biodegradação de resíduo oleoso proveniente de refinaria de petróleo. 1998. 344 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1998.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIAS, M. V. C. Análise da contaminação dos sistemas hídricos por agrotóxicos numa pequena comunidade rural do Sudeste do Brasil. **Cad. Saúde Pública.**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 11, p. 2391–2399, 2006.

WORLD HEALTH ORGANISATION. **Office of Occupational Health Operational guide for the WHO neurobehavioural core test battery** WHO, Geneva, 1986.