



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

THIARA DO AMARAL FERREIRA

**DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
FORMADORAS DE BIOFILME**

FORTALEZA

2016

THIARA DO AMARAL FERREIRA

DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
FORMADORAS DE BIOFILME

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: Profa. Dra. Oscarina Viana de Sousa.

Co-orientadora: Profa. Msc. Rosa Helena Rebouças

FORTALEZA

2016

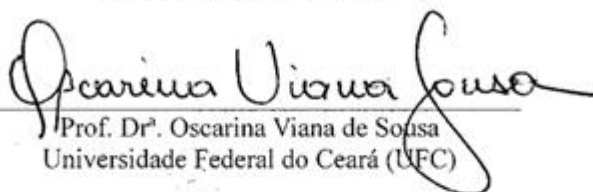
THIARA DO AMARAL FERREIRA


DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA POR CONSÓRCIOS DE BACTÉRIAS
FORMADORAS DE BIOFILME


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: 16/02/2015.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr.^a Oscarina Viana de Sousa
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Dr.^a Marina Teresa Torres Rodriguez
Universidade Federal do Ceará (UFC)


Dr.^a Karla Maria Catter
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

F444d Ferreira, Thiara do Amaral.

Degradação do herbicida atrazina por consórcios de bactérias formadoras de biofilme / Thiara do Amaral Ferreira – 2016.

64 p. : il. color., enc. ; 30 cm.

Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Instituto de Ciências do Mar, Curso Bacharelado em Ciências Ambientais, 2016.

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

Co-Orientação: Prof^a. M.^a Rosa Helena Rebouças.

1. Herbicida – Biodegradação. 2. Ecotoxicologia. I. Título.

CDD 632.954

A Deus.

A minha amada Santa Teresinha do Menino
Jesus.

Aos meus pais, Viana e Ângela por todo amor,
carinho e dedicação.

AGRADECIMENTOS

A Deus, em primeiro lugar, por me iluminar, me dar força e discernimento ao longo desse caminho.

Aos meus pais, Angela e Viana por toda dedicação ao longo desses anos. Por serem o meu sustento, minha calma, força e alento. Por acreditarem em mim e sempre torcerem por minhas conquistas. Por fazerem dos meus sonhos também o deles. O meu muito obrigada!

Ao meu irmão, Thiago no qual compartilho grandes momentos da minha vida por longos anos. Obrigada por sempre torcer por mim.

Ao Agapito Breno por toda ajuda, carinho, cuidado, compreensão e amor dedicado a mim. Obrigada por me apoiar sempre e compartilhar comigo essa conquista.

À Profª Drª. Oscarina Viana, pela orientação, por ter acreditado em mim e no meu trabalho, por todos os ensinamentos, pela convivência diária e grande amizade. Obrigada!

À Profª Drª. Regine Helena, pelos ensinamentos compartilhados diariamente, pela convivência e amizade.

À minha co-orientadora Rosa Helena, pela paciência, dedicação, apoio e amizade, sua participação foi de grande importância para o êxito desse trabalho. Meu muito obrigada!

À Cristiane Teles e Gleire Menezes pela amizade, ajuda e dedicação. Muito Obrigada!

Ao grande amigo, Rafael Santos, pela grande amizade firmada, por tamanha ajuda, conselhos, palavras de apoio e conforto. Eu agradeço muito por ter sua amizade! Obrigada por tudo.

À grande amiga Rebeca Martins, pela linda amizade, por tantos conselhos, palavras de apoio, conforto e por todos os momentos compartilhados juntas. Obrigada!

A todos que fazem parte do LAMAP: Lorrana, Adson, Jade, Daniel, Jéssica, Hemilly, Déborah, Rubson, Italo e Sylvânio que contribuíram de alguma forma com esse trabalho.

À Marina Teresa e Karla Maria por fazerem parte da banca e contribuírem para o êxito desse trabalho.

Aos meus amigos de sala por esses anos de convivência e por tantos momentos compartilhados.

À minha grande amiga, Tanara Lima, que sempre foi minha dupla em todos os trabalhos acadêmicos e meu braço direito em todos os momentos. Obrigada por todo apoio amiga!

À Eunice Menezes, secretária do curso de Ciências Ambientais por toda ajuda ao longo desses anos.

Ao Murilo, pela sua alegria diária e por todo auxílio durante esses anos de graduação.

Ao Laboratório de Avaliação de Contaminantes Orgânicos – LACOR, por fornecer o herbicida usado no presente estudo.

À minha cachorra Pandora (*in memoriam*) pela fidelidade, lealdade, amor canino e companhia por tantos anos. Muitas Saudades!

À todos que de alguma forma contribuíram direto ou indiretamente para esse trabalho.
Obrigada.

“Quando a última árvore cair,
quando o último rio tiver secado,
quando o último peixe for pescado,
vocês vão entender que dinheiro
não se come”.

(Greenpeace)

RESUMO

A agricultura é uma das principais bases da economia brasileira. Com o advento da revolução verde o processo de produção agrícola foi modificado e houve um estímulo ao uso de substâncias químicas com o intuito de controlar as pragas nas lavouras e aumentar a produtividade. Os herbicidas se destacam nessa atividade correspondem a 45% do total dos agrotóxicos comercializados usados com a finalidade de remover ervas daninhas que competem com a cultura agrícola. A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um desses herbicidas usado intensivamente em todo o mundo e seu uso indiscriminado acarreta impactos sobre as matrizes ambientais. A principal via de dissipação de atrazina no ambiente inclui a biodegradação portanto, a prospecção de microrganismos com a capacidade de biotransformar ou degradar a atrazina é uma alternativa viável para processos de mitigação ambiental. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi analisar a capacidade de degradação do herbicida atrazina por consórcios bacterianos formadores de biofilmes. Foram realizados testes fenotípicos com intuito de detectar a capacidade de formação de biofilme, teste de degradação da atrazina, teste de antagonismo, formação de consórcios bacterianos de águas salinas e doces, quantificação do biofilme e testes fitotoxicológicos com vegetal com o intuito de monitorar a degradação do herbicida através da redução de seu efeito sobre um indicador vegetal. Foi possível selecionar bactérias aptas para formação dos biofilmes, degradadoras de atrazina, que não produziram substâncias antagonicas e que unidas em consórcios bacterianos foram capazes de crescer ou tolerar o herbicida em todas as concentrações testadas. Os biofilmes foram formados em superfícies de polietileno de alta densidade (PEAD) usando bactérias isoladas de ambientes salinos (em condição de crescimento com 1% NaCl) e dulcícolas, separadamente. Os consórcios bacterianos mostraram capacidade de utilização da atrazina como fonte de carbono e nitrogênio o que os coloca como alternativa viável de biorremediação de áreas contaminadas com atrazina. O teste fitotoxicológico foi eficaz na análise da redução da toxicidade desse herbicida, pois foi possível detectar os efeitos letais e subletais sobre as sementes de pepino Aodai, entretanto, são necessários mais experimentos para validar essa técnica.

Palavras-chave: herbicidas, bioensaio, ecotoxicologia, associação de bactérias, biodegradação.

ABSTRACT

Agriculture is one of the main bases of the Brazilian economy. Since the Green Revolution advent, agricultural production process was modified and encouraged to use of chemicals in order to control pests in crops and increase productivity. Herbicides correspond to 45% of the total pesticides marketed used for the purpose to remove weeds which compete with crop. Atrazine (2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine) is a herbicide used intensively all over the world and its indiscriminate use results in impact on environmental matrices. The major route of dissipation of atrazine in the environment includes biodegradation, therefore the prospection of microorganisms with capacity to biotransform or degrade atrazine is a viable alternative for environmental mitigation processes. Thus, the aim of this study was to evaluate the degradation capacity of herbicide atrazine by bacterial biofilms forming consortia. In order to achieve this goal, it was conducted phenotypic tests for detection of biofilm formation capacity, atrazine degradation test, antagonism test, bacterial consortia formation in salt and fresh water, biofilm quantification and phytotoxicological tests in order to monitor the herbicide degradation by reducing its effect on a plant indicator. It was possible to select bacteria suitable for the formation of biofilms, atrazine-degrading, without producing antagonistic substances and united in bacterial consortia were able to grow or tolerate the herbicide at all tested concentrations. Biofilms were formed in high density polyethylene (HDPE) surfaces using bacteria from saline environments (growing condition of 1% NaCl) and freshwater separately. The bacterial consortium showed capacity to utilization atrazine as a source of carbon and nitrogen which puts them as a viable alternative to bioremediation of atrazine contaminants. The phytotoxicological test was effective in toxicity reducing of herbicide because it was possible to detect the lethal and sublethal effects on Aodai cucumber seeds, however further experiments are needed to validate this technique.

Keywords: herbicides, bioassay, ecotoxicology, bacterial association, biodegradation.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 01 | Representação do fenômeno de deriva..... | 17 |
| Figura 02 | Estrutura química da atrazina | 18 |
| Figura 03 | Processo de desenvolvimento do biofilme de uma estirpe de <i>P. aeruginosa</i> | 21 |
| Figura 04 | Modelo de distribuição das concentrações de atrazina na placa de petri com crescimento bacteriano..... | 28 |
| Figura 05 | Representação esquemática do teste de degradação de atrazina em meio líquido | 29 |
| Figura 06 | Desenho esquemático do sistema criado para os testes de indução do biofilme e degradação da atrazina..... | 30 |
| Figura 07 | Etapas da quantificação do biofilme por meio da técnica de “pour plate”... | 31 |
| Figura 08 | Resultado positivo para o teste de aderência ao vidro..... | 35 |
| Figura 09 | Resultado do teste de microplacas de poliestireno | 36 |
| Figura 10 | Resultado ao teste do Ágar Vermelho Congo | 37 |
| Figura 11 | Consórcios bacterianos | 43 |
| Figura 12 | Raízes do Pepino Aodai crescidas expostas ao consórcio bacteriano após 3 dias de cultivo a 30°C | 46 |
| Figura 13 | Raízes do Pepino Aodai crescidas expostas ao consórcio bacteriano após 6 dias de cultivo a 30°C | 47 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | | |
|------------|---|----|
| Gráfico 01 | Comportamento da bactéria <i>Pseudomonas</i> sp (04) no teste de degradação em meio líquido | 40 |
| Gráfico 02 | Comportamento da bactéria <i>Bacillus</i> sp (63) no teste de degradação em meio líquido | 41 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 01 | Gêneros bacterianos utilizados neste trabalho com suas respectivas numerações | 25 |
| Tabela 02 | Resultado dos testes fenotípicos | 34 |
| Tabela 03 | Análise do teste de antagonismo com as cepas de água e sedimento de regiões doce..... | 42 |
| Tabela 04 | Análise do teste de antagonismo com as cepas de água e sedimento de regiões salinas | 42 |
| Tabela 05 | Porcentagem de germinação das sementes | 45 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATZA - Enzima atrazina clorohidrolase
ATZB - Enzima hidroxiatrazina etilaminohidrolase
ATZC –Enzima N-isopropilamelida isopropilaminohidrolase
AVC- Ágar Vermelho Congo
BHI- *Brain Heart Infusion Ágar*
CO₂ - Dióxido de Carbono
CONAMA- Conselho Nacional do Meio Ambiente
DEA - Desetilatrazina
DIA - Desisopropilatrazina
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos
EPS – Exopolissacarídeos
IBAMA – Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LAMAP – Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado
MS – Ministério da Saúde
NaCl – Cloreto de Sódio
NH₃ - Amônia
OPAS – Organização Pan – Americana de Saúde
PEAD – Polietileno de Alta Densidade
TSA – Ágar Triptona de Soja
TSB - Caldo Triptona de Soja

LISTA DE SÍMBOLOS

% - Porcentagem

μL - Microlitro

Cm - Centímetros

G - Grama

gL^{-1} – Grama por litro

H - hora

Kg – Quilograma

L - Litro

mg/L – Miligrama/litro

mL - Mililitro

nm - Nanômetro

°C - Grau Celsius

Ppb – Parte por bilhão

Ppm – Parte por milhão

Rpm - Rotação por minuto

UFC/m^2 – Unidades Formadoras de Colônia por metro quadrado.

$\mu\text{g}/\text{L}$ -Micrograma por litro

μ - Média

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 16 |
| 2.1. Agrotóxico..... | 16 |
| 2.2. Atrazina..... | 18 |
| 2.3. Biofilme..... | 20 |
| 2.4. Biodegradação da Atrazina..... | 22 |
| 3. OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1. <i>Objetivos específicos</i> | 25 |
| 4. METODOLOGIA..... | 26 |
| 4.1. Seleção dos microrganismos..... | 26 |
| 4.2. Testes fenotípicos..... | 27 |
| 4.2.1. <i>Teste de aderência a superfície de vidro (TAV)</i> | 27 |
| 4.2.2. <i>Teste de aderência em microplaca</i> | 27 |
| 4.2.3. <i>Ágar Vermelho Congo</i> | 28 |
| 4.3. Teste de Degradação..... | 28 |
| 4.3.1. <i>Teste de degradação em ágar por meio de poços</i> | 28 |
| 4.3.2. <i>Teste de degradação da atrazina em meio líquido</i> | 29 |
| 4.4. Teste de antagonismo..... | 30 |
| 4.5. Montagem dos consórcios bacterianos..... | 30 |
| 4.6. Preparação do sistema..... | 31 |
| 4.6.1. <i>Indução do biofilme</i> | 31 |
| 4.6.2. <i>Quantificação das bactérias no biofilme</i> | 32 |
| 4.7. Teste de degradação da atrazina pelos consórcios bacterianos..... | 33 |
| 4.8. Teste fitotóxico com sementes de Pepino Aodai (<i>Cucumis sativus L.</i>)..... | 33 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 35 |
| 5.1. <i>Testes fenotípicos</i> | 35 |
| 5.1.1. <i>Teste de aderência ao Vidro (TAV)</i> | 35 |
| 5.1.2. <i>Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC)</i> | 37 |
| 5.1.3. <i>Teste de Ágar Vermelho Congo (AVC)</i> | 38 |
| 5.1.4. <i>Comparação dos métodos fenotípicos</i> | 39 |
| 5.2. Teste de degradação por meio de difusão em ágar..... | 40 |

| | |
|---|-----------|
| 5.3. Teste de degradação da atrazina em meio líquido..... | 40 |
| 5.4. Teste de antagonismo..... | 42 |
| 5.5. Consórcios Bacterianos..... | 43 |
| 5.6. Quantificação de bactérias no biofilme..... | 45 |
| 5.7. Degradação da atrazina pelos consórcios bacterianos..... | 45 |
| 5.8. Teste fitotóxico com sementes de Pepino Aodai (<i>Cucumis sativus L</i>)..... | 46 |
| 6. CONCLUSÃO..... | 50 |
| 7. REFERÊNCIAS..... | 51 |

1. INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das principais bases da economia brasileira (IBAMA, 2010). Desde a década de 1950 com o advento da “revolução verde” esse setor passou por inúmeras modificações, das quais podemos destacar os investimentos em novas tecnologias e o uso intensivo de substâncias químicas para o controle de pragas, doenças e aumento da produtividade (MOREIRA *et al.*, 2002).

Essas substâncias químicas são conhecidas como agrotóxicos, os quais são definidos como produtos que agem direta ou indiretamente em um organismo vivo, podendo matá-lo ou controlá-lo de alguma maneira. Possuem diversas classificações de acordo com a praga que controlam, as de maiores destaques são os herbicidas (JARDIM; ANDRADE, 2009).

Os herbicidas são utilizados para remover ervas daninhas que competem com a cultura agrícola. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) eles compreendem 45% do total comercializado de agrotóxicos no Brasil. (MEIRELES, 2005). A atrazina é um herbicida bastante utilizado em todo o mundo, pertence a família das triazinas, possui ação seletiva, agindo na inibição da fotossíntese e é utilizada no controle pré e pós emergencial em uma variedade de culturas de folhas largas (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995; EPA, 2006).

Sua alta mobilidade no solo e seu elevado potencial de contaminação das águas superficiais e subterrâneas gera grande preocupação ambiental (GRAYMORE *et al.*, 2001). Com o intuito de amenizar esse impacto ambiental sobre as matrizes ambientais, a seleção de microrganismos isolados ou em associações com a capacidade de biotransformar ou degradar pesticidas é uma alternativa viável e que está sendo bastante estudada (JACQUES, 2010). No caso da atrazina, várias cepas de bactérias têm sido relatadas pela sua capacidade de degradar esse composto, podendo executar desalquilação, desaminação e decloração, mas não completa mineralização. A associação desses microrganismos em consórcios aumenta a eficiência da degradação dessa substância. (LOPEZ *et al.*, 2005; MARECICK *et al.*, 2008).

As bactérias em associação formam os biofilmes que são sistemas biológicos compostos por células agregadas, organizadas e funcionais embebidas em uma matriz extracelular composta por substâncias poliméricas (DONLAN; COSTERTON, 2002) associados a uma superfície abiótica ou biótica. (DAYEV; OTOOLE, 2000). Estes estão envolvidos em processos de tratamento de água, águas residuais, água subterrânea contaminada com produtos derivados de petróleo e no tratamento de outros contaminantes (DAYEV; OTOOLE, 2000).

No presente trabalho, bactérias pré-selecionadas quanto a capacidade de produzir biofilme, degradar a atrazina e a não produção de substâncias antagônicas foram unidas em consórcios bacterianos em um sistema contendo uma superfície de polietileno de alta densidade (PEAD) que serviu de material aderente para o biofilme. A capacidade de degradação dos consórcios foi monitorada por meio de um teste fitotoxicológico com sementes de um vegetal. Essa abordagem permitiu acompanhar o decaimento da toxicidade da substância usando um organismo indicador. A principal vantagem de empregar esse teste é seu baixo custo, sua fácil realização, as sementes são comercializadas facilmente em mercados e pode ser aplicado a diversos contaminantes ambientais (RODRIGUES *et al.*, 2013).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Agrotóxico

Segundo a legislação nacional vigente, Lei Federal 7.802 de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto 4.074 de 04/01/2002 no seu artigo 2, inciso I:

Os agrotóxicos e seus afins são definidos como produtos e componentes de processos físicos, químicos e biológicos destinados ao uso no setor de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 2002).

Quanto à finalidade a qual são destinados são classificados em inseticidas, fungicidas, herbicidas e outros grupos (OPAS/OMS, 1997). Um estudo toxicológico realizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) destacou que a classe dos herbicidas é a mais comercializada no Brasil, compreendendo 45% do total de agrotóxicos, os fungicidas 27% e os inseticidas 28% (MEIRELLES, 2005).

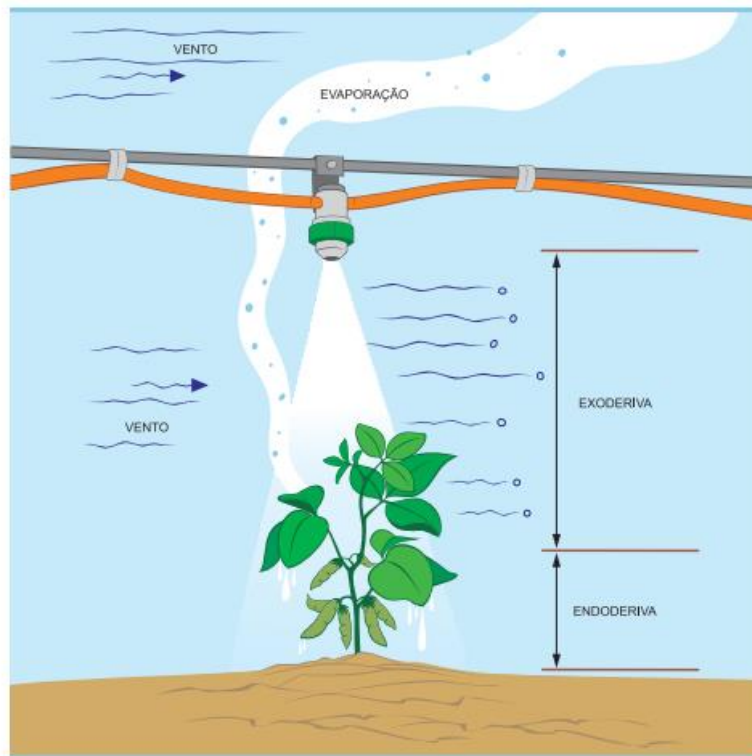
A Portaria SNVS 03/92 da Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária, do Ministério da Saúde, estabelece critérios e a classificação toxicológica dessas substâncias: Classe I- Extremamente tóxico, Classe II- Altamente tóxico, Classe III- Moderadamente tóxico e Classe IV- Pouco tóxico. O herbicida atrazina segundo a monografia autorizada da ANVISA é classificada como moderadamente tóxico (Classe III) embora possa causar diversos prejuízos ao meio ambiente, aos organismos e ao ser humano (MIGEOT *et al.*, 2013).

O processo de produção agrícola brasileiro está cada vez mais dependente de agrotóxicos, pois essa substância permite um maior índice de produtividade e um aumento de lucros (IBAMA, 2010). Em 2013 foram utilizadas 495.764,60 toneladas de agrotóxicos em 72.434,134 hectares, o que corresponde a uma comercialização de 6,8kg de agrotóxicos por hectare (IBGE/SIDRA, 2013). Dessa forma, uma série de prejuízos as matrizes ambientais, aos organismos e ao ser humano são relatados pelo uso excessivo desses pesticidas (RIBAS; MATSUMURA, 2009).

Segundo a Associação Nacional de Defesa Vegetal (ANDEF, 2004) um dos maiores problemas da aplicação de pesticidas é a deriva, que se refere ao movimento das gotículas do jato do pesticida que não atinge o alvo durante a pulverização (Figura 01). Explicam ainda que:

Esse fenômeno ocorre por meio da ação dos ventos, escoamento ou mesmo volatilização, e divide-se em endoderiva e exoderiva. A primeira é quando são utilizados grandes volumes de herbicidas e as gotas são maiores do que a superfície foliar impedindo a penetração e atingindo o solo. A exoderiva é quando as gotas são pequenas e por esse motivo são levadas pelo vento para fora do alvo (Figura 01). (ANDEF, 2004).

Figura 01 – Representação do fenômeno de deriva.



Fonte: ANDEF, 2004

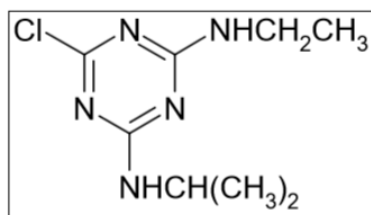
Ao atingir o solo, essas substâncias podem ser adsorvidas às partículas, ser dissolvidas pela água presente no solo, volatilizar-se, ser absorvida pelas plantas ou organismos vivos, percolar e atingir as águas subterrâneas, ser carregado pelas águas das chuvas até as águas superficiais ou sofrer degradação química ou biológica. Além disso, os pesticidas impactam diretamente a saúde humana. Uma pesquisa realizada pelo Ministério da Saúde em 2012 estimou que, no Brasil, anualmente, existam mais de 400 mil pessoas contaminadas por agrotóxicos, com cerca de 4 mil mortes por ano (HOLT, 2000; RIBAS; MATSUMURA, 2009, AUGUSTO *et al.*, 2012).

2.2. Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida pertencente à família das triazinas, cujas propriedades foram descobertas em 1952, por meio

de estudos sobre o crescimento seletivo de plantas e foi registrada pela primeira vez em 1958 (ESSER *et al.*, 1985; EPA, 2006). Sua estrutura química (Figura 02) é formada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina o que o torna recalcitrante para a degradação biológica no meio ambiente (COLLA *et al.*, 2008).

Figura 02- Estrutura química da atrazina.



Fonte: ANVISA

Seu uso é proibido nos países europeus, no entanto, ainda é um dos principais herbicidas utilizados no Brasil, EUA e Argentina, países produtores de grãos. Ele atua de forma sistêmica e seletiva no controle de ervas daninhas e age na inibição da fotossíntese. É utilizada no controle pré e pós-emergencial, no preparo de áreas para plantio e em uma variedade de culturas de folhas largas e gramíneas, tais como milho, soja, sorgo, cana de açúcar, abacaxi, pinus, seringueira, sisal e nozes de macadâmia (RODRIGUES; ALMEIDA, 1995; EPA, 2006; AGROFIT, 2015).

A atrazina é considerada como um contaminante em potencial da água por ter alta persistência no solo, em regiões tropicais e subtropicais podem permanecer por mais de 12 meses dependendo da dose aplicada, são de degradação lenta com meia vida de 13 a 260 dias dependendo das condições ambientais e do solo, solubilidade baixa para moderada, em água é de 33mg/L (25°C) e absorção moderada à matéria orgânica e argila (ARANTES; LIMA, 2006; JUNIOR, 2006).

Devido a sua alta mobilidade água-solo esse herbicida está entre os agroquímicos mais detectados nos recursos hídricos. Em águas dos Estados Unidos e Europa estava presente em concentrações variando de 2,9 a 89µg.L⁻¹. Em águas doces, as concentrações dessas substâncias pode variar de 0,2g.L⁻¹ a 1000g.L⁻¹ em corpos de água próximos a regiões de plantio. Em águas fluviais a maior concentração está relacionada ao período de aumento das chuvas, na época da primavera e verão. Nos Estados Unidos a atrazina é 20 vezes mais detectada em águas subterrâneas do que qualquer outro herbicida (GRAYMORE *et al.*, 2001; GARCIA *et al.*, 2011).

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) determina um nível aceitável de atrazina em águas para consumo humano de $3,0\mu\text{gL}^{-1}$, no Brasil, a resolução CONAMA n° 357 de 17 de Março de 2005 estabelece um valor de $2,0\mu\text{gL}^{-1}$. No Ceará, foi detectada concentrações de atrazina em águas subterrâneas variando de $0,76$ a $42,77\mu\text{gL}^{-1}$ no município de Tianguá (BARRETO; NASCIMENTO, 2004). Na região do perímetro irrigado Jaguaribe-Apodi, 39 poços de água foram monitorados e apresentaram concentrações de atrazina variando de $1,39$ a $9,95\mu\text{gL}^{-1}$. Foi detectada atrazina nos 36 poços amostrados em concentrações menores (em 19 poços) e maiores (em 17 poços) que o limite máximo permitido pela legislação (BARRETO, 2006).

A atrazina é classificada como moderadamente tóxica (Classe III), mas seus efeitos ao meio ambiente, à biota e a saúde humana é bastante discutido. A EPA (2006) sugere que a exposição a comunidades aquáticas em concentrações de 10-20ppb já traga riscos ambientais. Dessa forma, essa substância é relatada por causar mudanças comportamentais e degeneração das células de peixes prejudicando suas atividades fisiológicas, causando danos renais e até a morte desses organismos (EPA, 2006; DONG *et al.*, 2009; XING *et al.*, 2012).

Esse agroquímico também interfere no funcionamento natural do sistema endócrino das espécies animais, acarretando na feminilização dos anfíbios e podendo causar até sua morte. Um estudo realizou um bioensaio de exposição à atrazina em girinos de *Rhinella schneideri* e *Physalaemus nattereri* na qual as concentrações avaliadas de $1,5 - 25\text{mg/L}^{-1}$ permitiu detectar efeitos letais e subletais a esses organismos (IGLESIAS, 2015). Hayes *et al.* (2010), relataram que as rãs africanas *Xenopus laevis*, que geneticamente são masculinas quando expostas a 2,5ppb de atrazina ao longo do seu período larval sofreram um processo de feminilização. E após três anos do dimorfismo sexual mantiveram as mesmas características. Além disso, essa substância teve a capacidade de diminuir os níveis de testosterona, convertendo-a em estradiol e alterou a laringe desses organismos (HAYES *et al.*, 2010).

O uso desse agrotóxico é também relacionado ao aumento de doenças nos seres humanos, a EPA (2006) considera essa substância com potencial carcinogênica uma vez que se apresenta como um disruptor endócrino (GRAYMORE *et al.*, 2001; GHISELLI; JARDIM, 2007; MARECICK *et al.*, 2008). Essa substância pode interferir na diminuição da testosterona, hormônio masculino, pois é capaz de induzir a enzima aromatase convertendo a testosterona em estrógeno. Também é prejudicial para as gestantes, pois causa anomalias pré-natais, gera bebês prematuros e/ou abortos espontâneos. (HASE *et al.*, 2008; CHEVRIER *et al.*, 2011; CRAGIN *et al.*, 2011; RAJKOVIC *et al.*, 2012; MIGEOT *et al.*, 2013).

Dessa forma, o uso significativo de atrazina na agricultura tem ocasionado diversos

efeitos como citados acima, o que propicia uma busca por soluções viáveis economicamente e ambientalmente de maneira a mitigar os danos causados aos ambientes afetados por sua utilização (CAMPOS, 2009).

2.3. Biofilme

Por muito tempo a microbiologia restringiu seus estudos apenas às células planctônicas, também denominadas de células livres ou em suspensão. No entanto, Van Leeuwenhoek observou que os organismos se aderem e crescem a superfícies expostas, surgindo então, estudos que buscam compreender a associação desses microrganismos a determinadas superfícies. Com os avanços na área microbiológica tem se compreendido que a maioria das bactérias cresce nessa forma nos ambientes naturais (MARSHALL, 1992; COSTERTON *et al.*, 1995; DONLAN, 2002; LÓPEZ *et al.*, 2010).

Os biofilmes são definidos como a associação de uma única ou múltiplas espécies aderidas por uma matriz extracelular produzida pelos próprios organismos com composição variada, que pode ser formada por polissacarídeos, proteínas, ácidos nucléicos, glicoproteínas, lipídeos ou fosfoproteínas. Esses microrganismos possuem a capacidade de agregar-se a superfícies bióticas e ou abióticas. Estima-se que cerca de 99% das bactérias presentes na natureza em algum período de seu ciclo de vida apresente-se nessa forma (COSTERTON *et al.*, 1987; CAPELLETTI, 2006; TORTORA *et al.*, 2012; LENNOX, 2016).

Alguns gêneros bacterianos são citados pela sua capacidade de formar essas associações, tais como *Alcaligenis*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Staphylococcus*. Quanto aos patógenos formadores de biofilme, os mais citados são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescense*, *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa* (MATTILA SHANDHOLM; WIRTANEN, 1996; WIRTANEN, 1995; KERR; SNELLING, 2009; NORDMANN; CORNAGLIA, 2012).

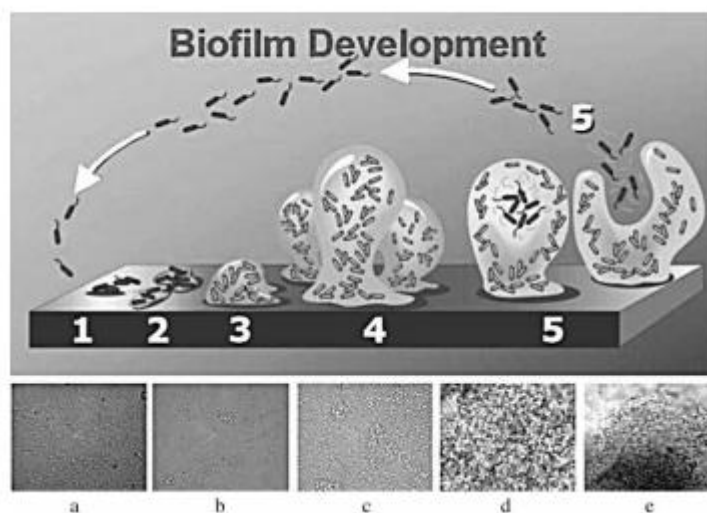
As formações desses agregados ocorrem em várias etapas, desde a adesão até a adaptação dos organismos ao meio suporte. O primeiro processo é a adesão bacteriana, onde os organismos planctônicos que estão dispersos no meio servem de colonizadores primários, aderindo-se a determinados materiais (CAPELLETTI, 2006; FLACH, 2006; TORTORA *et al.*, 2012).

As superfícies de adesão podem ser abióticas como plásticos ou bióticas como células, tecidos animais ou vegetais. A agregação ocorre devido ao movimento browniano e a força gravitacional, além da motilidade por meio de flagelos e pili. Essa fase é reversível e as forças de interação que influenciam esse processo de desagregação são as forças de atração de Van

der Walls, forças eletrostáticas e as interações hidrofóbicas (O'TOOLE *et al.*, 1998; KUMAR; ANAND 1998; DUNNE, 2002).

Logo em seguida há uma mudança da fase reversível para a fase irreversível, as células continuam a crescer e a produzir exopolissacarídeos (EPS) o que permite uma maior aderência das células planctônicas. Além dessa matriz polimérica as estruturas de adesão (adesinas), como as fimbrias permitem a fixação dessa associação ao substrato. Logo após ocorre a fase de maturação que é quando o biofilme apresenta alta densidade celular. O biofilme maduro é constituído por uma estrutura complexa e com múltiplas camadas. Em seguida, é atingida a fase de dispersão, onde as células passam a se desagregar tornando-se novamente planctônicas e podendo gerar novos biofilmes (Figura 03). (KUMAR; ANAND, 1998; DUNNE, 2002; STOODLEY *et al.*, 2002; SAUER *et al.*, 2002).

Figura 03- Processo de desenvolvimento do biofilme de uma estirpe de *P. aeruginosa* em crescimento em um substrato de vidro. 1- Adesão primária das células planctônicas. 2- Adesão irreversível e produção de EPS. 3- Aumento da densidade celular e desenvolvimento da arquitetura do biofilme. 4- Fase de maturação. 5- Fase de dispersão, as células se desprendem e formam novos biofilmes.



Fonte: Adaptado SAUER *et al.*, 2002.

Ao atingir a fase de maturação o biofilme desencadeia um sistema complexo de sinalização celular denominado de “*quorum sensing*”, que consiste em uma comunicação química entre as bactérias que permite coordenar suas atividades (CASERTA *et al.*, 2010; TORTORA *et al.*, 2012). Os biofilmes também são um lugar ideal para a troca genética, pois as células ficam próximas umas das outras, mas não imobilizadas, podendo trocar as informações genéticas (FLEMMING, 2007).

Dessa forma, a fixação das bactérias a superfícies e a formação desses associados denominados de biofilmes é de grande importância para processos médicos, industriais e ambientais. (MCCLAINE; FORD, 2002). Dentro dessa associação as bactérias possuem a capacidade de compartilhar nutrientes e obtêm proteção quanto aos fatores danosos do meio ambiente, como a dessecação, os antibióticos e o sistema imune corporal (TORTORA *et al.*, 2012).

Os biofilmes apresentam-se como benéficos quando são utilizados em processos de fermentação, como a produção de vinagre (BOLETTI, 1921; GJALTEMA, 1996; PEREIRA, 2001) e em tratamentos aeróbios e anaeróbios de efluentes domésticos e industriais, além de processos biotecnológicos de degradação de poluentes orgânicos e inorgânicos, tais como herbicidas (VIANA, 2009; HOREMANS *et al.*, 2013).

Quanto aos efeitos negativos, a adesão a superfícies está associada à deteriorização de materiais e do ambiente. Esses biofilmes indesejáveis são chamados de “*biofouling*” e afetam uma grande diversidade de sistemas. Na área clínica prejudicam os dentes, as lentes de contato, as próteses e os implantes, e a sua resistência a antimicrobianos é a principal causa das infecções. Também afetam os sistemas de distribuição de água, as construções de edifícios e monumentos e processos industriais (COSTERTON *et al.*, 1999; JASS; WALKER, 2000; PEREIRA, 2001).

2.4. Biodegradação da Atrazina

A necessidade de uma alternativa para mitigar o impacto ambiental oriundo do uso de pesticidas tem despertado o interesse científico para a biodegradação (ARAÚJO, 2002). Um dos métodos de biodegradação é o processo de biorremediação que compreende o isolamento, identificação e caracterização de microrganismos com habilidade ou atividade enzimática para metabolizar diversas substâncias tóxicas ao meio ambiente. O objetivo é explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana, tornando os contaminantes menos tóxicos ao ambiente para que possam retornar ao meio e contribuir com os ciclos biogeoquímicos (UETA *et al.*, 1999).

A biodegradação pode ser “*in situ*” ou “*ex situ*”, a primeira trata a perturbação no local, é a de menor custo e evita que o poluente se espalhe, enquanto a segunda refere-se à retirada de uma amostra de solo ou de água contaminada do local a ser tratado. Quanto aos tipos de biodegradação, destacam-se a bioestimulação e o bioaumento. O primeiro refere-se à adição de nutrientes e oxigênio de modo a permitir o aumento da atividade bacteriana auxiliando na degradação do composto e o segundo compreende a adição de microrganismos a água ou ao

solo contaminado (CHOWDHURY *et al.*, 2008).

Embora existam diversos métodos para reduzir o impacto da atrazina, o único capaz de mineralizá-la é o biológico (GHOSH; PHILIP, 2006). Dessa forma, a completa degradação de um composto até CO₂ (mineralização) é o resultado da atividade microbiana individual ou em consórcios. Esses microrganismos possuem a capacidade de metabolizar os pesticidas através de suas enzimas e transformá-las em energia e nutrientes para a sua sobrevivência (ARAÚJO, 2002). A mineralização da atrazina por um único microrganismo é menor quando comparada com consórcios empregando dois ou mais organismos, que estão sendo bastante estudadas. (RASODEVICH *et al.*, 1995; SENE *et al.*, 2010).

Muitas bactérias são relatadas pela sua capacidade de degradar isoladamente esse composto, tais como *Pseudomonas* sp. (FERNANDES, 2014), *Nocardia* sp. (GIARDINA *et al.*, 1982), *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. e *Acidovorans Delftia* (VARGHA *et al.*, 2005), *Klebsiella pneumoniae* (COOK *et al.*, 1981), *Rhodococcus* sp., *Ralstonia* sp., *Clavibacter* sp., *Agrobacterium* sp. e *Streptomyces* sp. (ATRAZINEb, 2015).

Em forma de consórcios, Smith *et al.*, (2005) examinou um complexo de oito membros e sua eficiência na degradação da atrazina. Ele utilizou as estirpes bacterianas *Agrobacterium* sp., *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanoikuyae*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp., *Flavimonas oryzihabitans* e *Variovorax paradoxus*.

Um dos gêneros mais estudados por sua eficiência na degradação da atrazina é *Pseudomonas* sp. A degradação desse herbicida por essa bactéria ocorre devido à presença de enzimas específicas Atza, Atzb e Atzc. O processo inicia por meio da dechlorinação hidrolítica, que envolve a enzima atrazina clorohidrolase (Atza), codificada pelo gene atzA, em seguida ocorre duas reações de deaminação catalisada pelas enzimas hidroxiatrazina etilaminohidrolase (AtzB) e pela N-isopropilamelida isopropilaminohidrolase (AtzC), codificadas pelos genes atzB e atzC, que convertem a atrazina em ácido cianúrico, que posteriormente é mineralizado a CO₂ e NH₃ por outras três hidrolases (MANDELBAUM *et al.*, 1995; MARTINEZ *et al.*, 2001; GODOI, 2012).

Portanto, a atrazina é um herbicida bastante utilizado nas atividades agrícolas, e se faz necessário compreender os mecanismos responsáveis por sua degradação biológica de modo a reduzir seu impacto nas matrizes ambientais (PEREIRA, 2011).

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

- Analisar a capacidade de degradação do herbicida atrazina por consórcios bacterianos formadores de biofilmes.

3.1. Objetivos Específicos:

- Testar a capacidade de agregação das cepas bacterianas selecionadas;
- Analisar a capacidade de produção de exopolissacarídeos das cepas selecionadas;
- Testar a capacidade individual das cepas para degradar a atrazina em diversas concentrações;
- Verificar a presença ou ausência de interações antagônicas entre as cepas bacterianas selecionadas;
- Induzir a formação de biofilme bacteriano em uma superfície de plástico de polietileno de alta densidade (PEAD);
- Quantificar o biofilme aderido à superfície do plástico;
- Verificar a capacidade dos consórcios bacterianos em degradar a atrazina;
- Avaliar a toxicidade da atrazina por meio de testes de toxicidade usando sementes de pepino.

4. METODOLOGIA

4.1. Seleção dos microrganismos

Os microrganismos utilizados neste trabalho pertencem à bacterioteca do Laboratório de Microbiologia Ambiental e do Pescado (LAMAP). Os isolados são oriundos de amostras de água e sedimento com agrotóxico de regiões doces e salinas dos municípios de Fortim, Itaiçaba e Jaguaruana (MARTINS, 2015).

Ao total foram utilizados 17 microrganismos da bacterioteca, sendo 16 microrganismos testados quanto a capacidade de formação de biofilme e degradação de atrazina e uma estirpe de *Pseudomonas aeruginosa*, utilizada como controle positivo em todos os testes deste trabalho.

Os 16 isolados testados pertencem aos gêneros *Pseudomonas* sp., *Tatumella* sp., *Bacillus* sp., *Clostridium* sp. e *Vibrio* sp. (Tabela 01).

Tabela 01 – Gêneros bacterianos utilizados neste trabalho com suas respectivas numerações.

| Código da Bactéria | Gênero | Característica morfotintorial | Origem ambiental |
|---------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| 01 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Bastonete curto Gram - | Água doce |
| 04 | <i>Pseudomonas</i> sp. | Bastonete curto Gram - | Água doce |
| 14 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água doce + agrotóxico) |
| 16 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Água salina |
| 56 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água doce + agrotóxico) |
| 58 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água doce + agrotóxico) |
| 63 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Água salina |
| 64 | <i>Clostridium</i> sp. | Bastonete Gram + | Água salina |
| 72 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água salina + agrotóxico) |
| 73 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água salina + agrotóxico) |
| 74 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água salina + agrotóxico) |
| 91 | <i>Tatumella</i> sp. | Bastonete Gram - | Água doce |
| 92 | <i>Tatumella</i> sp. | Bastonete Gram - | Água doce |
| 95 | <i>Tatumella</i> sp. | Bastonete Gram - | Água doce |
| 124 | <i>Vibrio</i> sp. | Bastonete Gram - | Água salina |
| 131 | <i>Bacillus</i> sp. | Bastonete Gram + esporogênico | Sedimento (água salina + agrotóxico) |
| Padrão | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bastonete curto Gram - | Galeria fluvial |

Fonte: Próprio Autor

A fim de verificar a pureza dos isolados bacterianos, as culturas foram submetidas a técnica de coloração de Gram (SOARES, 1987).

4.2. Testes fenotípicos

A capacidade de formação de biofilme das cepas testadas foi avaliada fenotipicamente por meio de três testes: teste de aderência ao vidro, teste de aderência à microplaca e teste do ágar vermelho congo.

4.2.1 Testes de aderência a superfície do vidro (TAV)

O protocolo descrito foi adaptado de Christensen *et al.* (1985). As estirpes bacterianas foram inoculadas em TSA a 35°C por 24h.

Após incubação, os inóculos foram transferidos para tubos de ensaio contendo 3mL de Caldo Triptona de Soja (TSB) e levados à estufa bacteriológica onde permaneceram por 35°C durante 48h. Após o período de crescimento bacteriano, os caldos foram descartados e o interior dos tubos foi lavado com água destilada por três vezes. Em seguida, os tubos foram colocados para secar na posição invertida com a boca para baixo a temperatura ambiente.

Posteriormente, em cada tubo, foi adicionado 1mL de metanol por 15 minutos sendo removido com água destilada. Após a secagem, adicionou-se a solução de Cristal Violeta 1% por 5 minutos. A solução foi removida, os tubos foram lavados com água destilada para retirar o excesso de corante e invertidos para secagem.

O teste foi realizado em triplicata e foi considerado como positivo quando ocorreu a formação de um biofilme na parede dos tubos evidenciados pelo corante. Foi utilizada a estirpe de *Pseudomonas aeruginosa* como controle positivo. A capacidade das cepas aderirem foi classificada em:

- 1- **Fraca ou ausente** – nenhum tubo apresentou formação de biofilme;
- 2- **Moderada** – um ou dois tubos apresentaram formação de biofilme;
- 3- **Alta** – três tubos apresentaram formação de biofilme.

4.2.2. Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC)

O teste de aderência em microplacas de poliestireno com cristal violeta foi realizado de acordo com a descrição de Christensen *et al.* (1985), com adaptações.

A partir do crescimento das cepas em TSA, foram inoculados tubos contendo 3mL de TSB que foram incubados em estufa bacteriológica por 35°C durante 48h. Em seguida, 200µL de células em suspensão foram inoculadas em triplicata em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços em fundo “u” e incubou-se por 35°C por 48h sem agitação. Retirou-se o inóculo e os poços foram lavados três vezes com 200µL de água destilada e secos em estufa a 60°C por 1h.

Logo após, os poços foram corados com uma solução de cristal violeta 1% por 1 minuto. Procedeu-se lavagens sucessivas dos poços com água destilada e em seguida as placas foram colocadas para secar em temperatura ambiente. Após a secagem das placas foi realizada uma análise visual dos poços para verificar a presença ou ausência de uma coloração roxa. Foram consideradas positivas para a capacidade de formação de biofilme as estirpes que propiciaram aderência evidenciada pela coloração nas placas e os resultados foram classificados em:

- 1- **Fraca ou ausente** – nenhum poço apresentou formação de biofilme;
- 2- **Moderada** – um ou dois poços apresentaram formação de biofilme;
- 3- **Alta** – três poços apresentaram formação de biofilme.

Foi utilizada a estirpe de *P. aeruginosa* como controle positivo.

4.2.3. Ágar Vermelho Congo (AVC)

Utilizou-se a metodologia descrita por Freeman *et al.* (1989) com adaptações. Para a preparação do meio Ágar Vermelho Congo (AVC), utilizou-se 0,8g de corante vermelho congo para 1L de *Brain Heart Infusion Agar* (Ágar BHI) sem adição de sacarose.

As cepas bacterianas foram repicadas para o TSA e incubadas a 35°C por 24h. A partir do crescimento em TSA, as placas de AVC foram inoculadas e incubadas a 35°C por 24h, seguidas por incubação a temperatura ambiente por 48h. A análise do teste levou em consideração a variação de cores do preto ao vermelho (MOREIRA, 2011).

Foi utilizada a estirpe de *P. aeruginosa* como controle positivo.

4.3. Teste de degradação

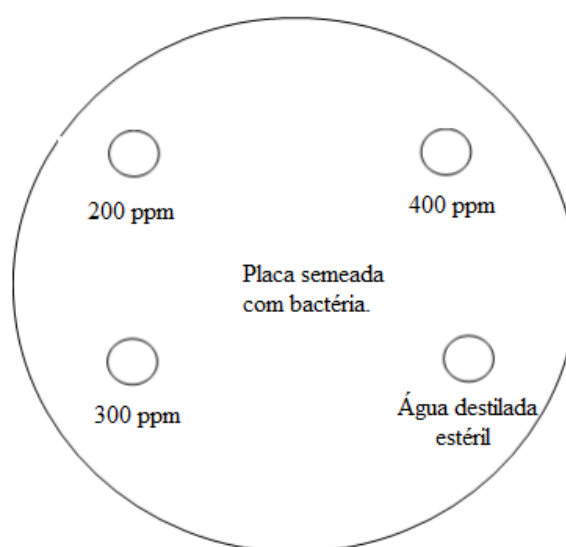
4.3.1. Teste de difusão em ágar por meio de poços

Esse teste foi adaptado para agrotóxicos por meio da metodologia utilizada para antibióticos pelo *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI, 2010). As estirpes foram repicadas para um ágar TSA e incubadas a 35°C por 24h. A partir do crescimento de 24h em TSA, foram transferidos inóculos para tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% e 1% de NaCl até obter uma concentração de células semelhante à Escala de McFarland 0,5. Em seguida, com o auxílio de um *swab* estéril foram inoculadas placas contendo Ágar Peptona para a formação de um crescimento em forma de tapete.

As placas foram deixadas em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente

três minutos. Em seguida, foram feitos quatro poços com aproximadamente 6mm de diâmetro. Cada poço foi devidamente identificado e adicionado de 50µL de atrazina nas concentrações de 200ppm, 300ppm e 400ppm (Figura 04). Como controle negativo foi utilizado água destilada estéril. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa bacteriológica a 35°C por 24h e 48h. Todo o procedimento foi realizado em duplicata. O resultado positivo no teste foi a ausência de halos, indicativo de que a bactéria não sofre influência da atrazina.

Figura 04- Modelo de distribuição das concentrações de atrazina na placa de petri com crescimento bacteriano.



Fonte: Próprio Autor

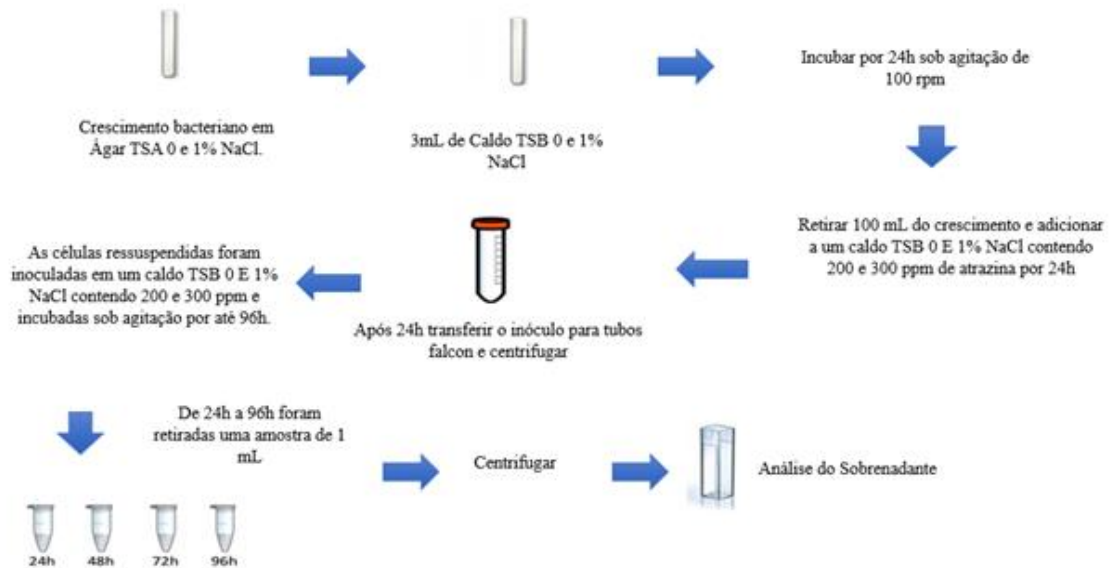
4.3.2. Teste de degradação da Atrazina em meio líquido

A partir de um crescimento em TSA, as cepas foram inoculadas em 3mL de caldo TSB e incubadas a 35°C por 24h sob agitação a 100rpm. Em seguida, 100µL do inóculo foi adicionado a tubos de ensaio contendo 10mL de caldo TSB 0% e 1% NaCl contendo 200 ppm e 300 ppm de atrazina, em duplicata e incubados a 35°C por 24h sob agitação.

Após o período de incubação as amostras foram transferidas para tubos tipo Falcon e centrifugadas a 9000rpm a 4°C por 15 minutos e o sobrenadante desprezado. As células ressuspensas foram adicionadas a um tubo de ensaio contendo 10mL de caldo TSB 0% e 1% NaCl contendo atrazina nas concentrações de 200ppm e 300ppm, em duplicata, e incubados sob agitação. Após o período de incubação de 24h a 96h foi retirada uma amostra de 1mL, centrifugada e o sobrenadante analisado no espectrofotômetro com absorvância de 625nm, os valores foram anotados e comparados posteriormente (Figura 05) (Adaptado de

FERNANDES, 2014).

Figura 05 - Representação esquemática do teste de degradação de atrazina em meio líquido.



Fonte: Próprio Autor

4.4. Teste de Antagonismo

A partir do crescimento de 24h em TSA, foram transferidos inóculos para tubos de ensaio contendo solução salina 0,85% e 1% de NaCl até obter uma concentração celular semelhante à Escala de McFarland 0,5. Em seguida com auxílio de um *swab* estéril, o inóculo foi semeado em placas contendo TSA a 35°C por 24h. Após incubação foram retirados blocos de ágar de aproximadamente 6mm, os quais foram transferidos invertidos em uma nova placa contendo TSA semeada com a cepa a ser testada e dispostos equidistantes um do outro. As placas foram incubadas a 35°C e foi verificada a formação de halos com 24h e 48h. A presença de halos ao redor dos blocos de ágar representam ocorrência de antagonismo (Adaptado de SILVA *et al.*, 2013).

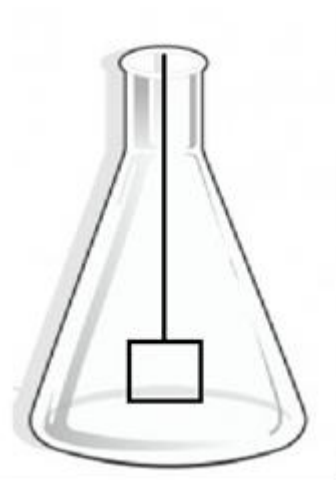
4.5. Montagem dos consórcios bacterianos.

Foram formados dois consórcios bacterianos de acordo com sua necessidade de íons de sódio (sem adição de NaCl e com adição de 1% de NaCl). As cepas selecionadas foram as que apresentaram melhores resultados positivos nos testes de degradação da atrazina, formação de biofilme e negativos no teste de antagonismo.

4.6. Preparação do sistema

Para o teste de indução do biofilme e de degradação do herbicida atrazina foi criado um sistema composto por um erlenmeyer de 250mL, contendo em seu interior um recorte de garrafa plástica de polietileno de alta densidade (PEAD) com dimensões de 2x2 cm preso a um fio de nylon de 0,25mm (Figura 06).

Figura 06 – Desenho esquemático do sistema criado para os testes de indução do biofilme e degradação da atrazina.



Fonte: Próprio Autor

4.6.1. Indução do biofilme.

Para a indução do biofilme foram utilizadas cepas pré-selecionadas como citado anteriormente (item 4.5). Essas cepas foram crescidas em TSA por 24h. A partir desse crescimento, foram transferidos os inóculos para tubos de ensaio contendo solução salina (0,85% ou 1% de NaCl) até obter uma concentração celular semelhante à Escala de McFarland 0,5. A partir dessa diluição as bactérias foram inoculadas no sistema para formação do biofilme contendo caldo TSB.

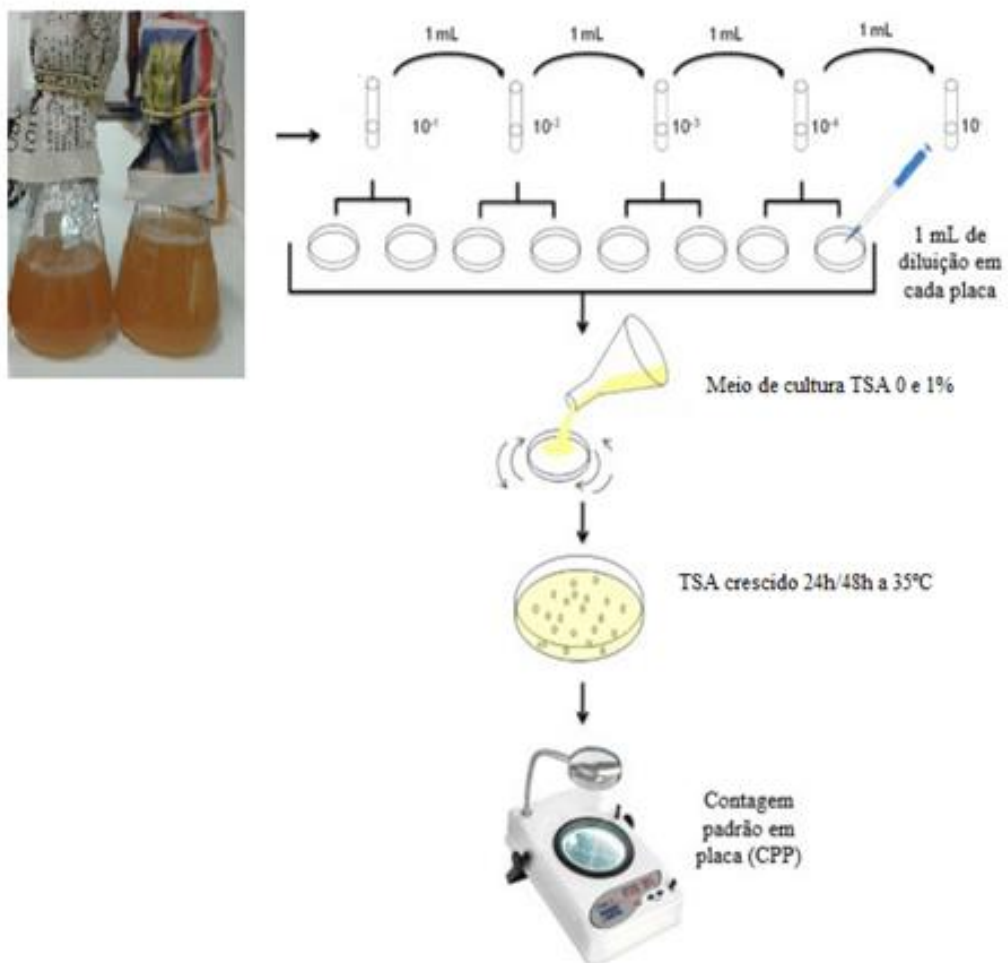
O teste foi realizado em duplicada, sendo no total quatro sistemas: dois contendo caldo TSB + 100ppm de atrazina (S1) e TSB + 1% NaCl + 100ppm de atrazina (S2) e dois apenas com o caldo TSB (S3) e TSB + 1% NaCl sem adição de atrazina (S4). O controle positivo consistiu dos sistemas apenas com os inóculos bacterianos (TSB e TSB 1%). No controle negativo foi usado apenas os meios de cultura esterilizados. Todos os sistemas ficaram na estufa bacteriológica a 35°C por 5 dias.

4.6.2. Quantificação das bactérias no Biofilme

A quantificação do biofilme foi realizada por meio do método de contagem padrão em placa por UFC/cm² pela técnica de *pour plate*. Foi usado o sistema de controle positivo. Após os cinco dias de incubação o suporte para crescimento do biofilme foi retirado e um *swab* estéril foi esfregado. Em seguida, o *swab* foi colocado em salina e agitado, configurando a diluição 10⁻¹. Logo após, foi retirado 1mL da salina ajustada e transferida para uma nova salina, configurando a diluição 10⁻². Esse processo foi repetido até a diluição 10⁻⁵.

Posteriormente, foi retirado 1mL de cada diluição e colocado em placas de petri esterilizadas e cobertas com meio TSA, fundido, de acordo com a técnica de *pour plate*. Após solidificadas as placas foram incubadas invertidas a 35°C por até 48h (Figura 07) (SOARES *et al.*, 1997).

Figura 07- Etapas da quantificação do biofilme por meio da técnica “*pour plate*”



4.7. Teste de degradação da atrazina pelos consórcios bacterianos.

Após os cinco dias de incubação, foi retirado o recorte da garrafa plástica de polietileno de alta densidade (PEAD), que serviu de suporte para a formação do biofilme. O recorte com o biofilme aderido foi transferido para um novo sistema (item 4.6) contendo apenas o herbicida atrazina em uma concentração de 500ppm. O sistema foi levado à estufa bacteriológica a 35°C por 6 dias.

4.8. Teste fitotóxico com sementes de Pepino Aodai (*Cucumis sativus L.*)

O teste de toxicidade foi realizado de forma simultânea a degradação da atrazina pelos consórcios bacterianos. O sistema para degradação da atrazina ficou incubado a 35°C por 6 dias. O teste toxicológico foi realizado no 3º e 6º dia de incubação com cultivo das sementes de pepino totalizando 5 dias para cada amostra a 30°C. O método utilizado foi baseado no bioensaio da proliferação da raiz de um vegetal descrito por Dutka (1989).

Para cada consórcio bacteriano foram utilizadas seis placas de petri contendo as sementes de pepino Aodai, em duplicata. Uma folha de papel de filtro foi colocada no fundo de cada placa de petri, sendo as sementes distribuídas em cinco fileiras com quatro sementes, totalizando vinte sementes em cada placa de petri. A partir de cada consórcio bacteriano foram realizadas diluições nas concentrações 1:1, contendo 10 mL da amostra contendo 500ppm de atrazina + inóculo bacteriano e 10mL de água destilada estéril. Na diluição 1:5 foram utilizados 4 mL da amostra contendo 500ppm de atrazina + inóculo bacteriano e 16mL de água destilada estéril.

De cada diluição foram retirados 3mL e adicionados as placas de petri contendo as sementes de pepino até que todas as sementes ficassem úmidas. Esse procedimento foi realizado em duplicata para cada consórcio bacteriano.

Foram utilizados dois controles, um negativo, com água destilada estéril e outro positivo, com solução salina NaCl na concentração de 0,5%.

Em seguida, anotou-se o número de sementes que germinaram e o comprimento da raiz em mm desde o ponto de intersecção do hipocótilo à raiz principal. A toxicidade foi avaliada pela medição dos efeitos letais (número de sementes germinadas) e subletais (inibição da proliferação da raiz) segundo Poi de Neiff e Ramos (2001). A quantidade de sementes germinadas foi quantificada e caracterizada como:

Não tóxica: quando 90% ou mais das sementes germinaram em relação ao controle negativo

Tóxica: quando houve uma germinação entre 75-90%;

Muito tóxica: quando os valores foram menores que 75% de germinação quando comparados ao controle negativo.

Os efeitos subletais foram medidos e avaliados por meio da porcentagem de inibição da alongação da raiz (IE), mediante a fórmula:

$$PI = \left(\frac{\mu \text{ amostra} - \mu \text{ controle (-)}}{\mu \text{ amostra}} \right) \times 100$$

PI= negativa. Estimula o crescimento

PI= positiva. Tóxico

PI= 0. Não tóxica

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Testes fenotípicos

Depois de analisada a pureza dos isolados, eles foram submetidos a testes de caracterização fenotípica de forma a selecionar candidatos viáveis para compor consórcios bacterianos a serem utilizados na degradação da atrazina. Na tabela 02 estão apresentados os resultados dos testes fenotípicos realizados.

Tabela 02 – Resultados dos testes fenotípicos.

| Testes fenotípicos | | | |
|--------------------|-----------|-----|----------------|
| Bactéria | Aderência | | Vermelho congo |
| | TAV | TMC | |
| 01 | - | +++ | - |
| 04 | +++ | +++ | - |
| 14 | - | ++ | + |
| 16 | ++ | ++ | + |
| 56 | - | - | + |
| 58 | - | ++ | - |
| 63 | ++ | ++ | + |
| 64 | +++ | ++ | + |
| 72 | - | ++ | - |
| 73 | ++ | ++ | - |
| 74 | - | - | + |
| 91 | - | - | - |
| 92 | ++ | ++ | - |
| 95 | +++ | ++ | - |
| 124 | ++ | +++ | + |
| 131 | - | ++ | + |
| Padrão | +++ | +++ | + |

- Fraca; + Positivo; ++ Moderada; +++ Alta; TAV Teste de Aderência ao Vidro; TCM Teste de Aderência em Microplacas de Poliestireno.

5.1.1. Teste de Aderência ao Vidro (TAV)

O resultado do teste compreende a observação visual das células aderidas ao tubo de ensaio, evidenciado pela coloração roxa (Figura 08), proveniente do corante cristal violeta que possui a capacidade de ligar-se as moléculas carregadas negativamente e a matriz polissacarídea (CHRISTENSEN *et al.*, 1982; PEETERS *et al.*, 2008; ABDALLAH *et al.*, 2009).

Figura 08 – Resultado positivo para o teste de aderência ao vidro, à direita resultado do teste para a espécie *Pseudomonas aeruginosa*.



Fonte: Próprio Autor

Entre as cepas testadas, 50% (oito isolados), apresentaram resultados positivos para o teste TAV. Analisando quanto à origem das cepas, três isolados (04, 92, 95) oriundos de pontos do rio com água doce foram positivos para este teste. Entre os isolados de água e sedimento das regiões salinas, cinco delas (16, 63, 64, 73, 124) apresentaram capacidade de aderência ao vidro.

As cepas foram classificadas quanto a sua capacidade de formação de biofilme em três níveis de intensidade: I- fraca, II- moderada, III- alta. Dois (2) isolados com origem de pontos com baixa salinidade, *Pseudomonas* sp., e *Tatumella* sp., identificados como isolados 04 e 95, respectivamente, apresentaram positividade para aderência ao vidro com alta intensidade. Uma outra bactéria também do gênero *Tatumella* sp. (92), apresentou uma atividade moderada, com dois dos três tubos positivos.

O gênero *Pseudomonas* sp. é bastante relatado por sua habilidade de formar biofilmes, tanto em culturas puras como em associações, isso está relacionado a capacidade que essa espécie tem de produzir uma grande quantidade de exopolissacarídeos. Por exemplo, a espécie de *P. aeruginosa* é relatada pela produção de alginato, uma matriz hidrofóbica, que auxilia na adesão desse organismo e consequentemente na formação do biofilme (LINCOPAN; TRABULSI, 2008; IRIE *et al.*, 2010).

Dos cinco isolados salinos, destaca-se por apresentar atividade alta para a formação de biofilme apenas o gênero *Clostridium* sp., com numeração 64. Os demais apresentam atividade moderada e pertencem aos gêneros *Bacillus* sp. (3) e *Vibrio* sp. (1), com numerações 16, 63, 73 e 124, respectivamente. Em estudo com a espécie de *Clostridium difficile* ficou caracterizado que a formação de biofilme *in vitro* é um processo multifatorial com papel

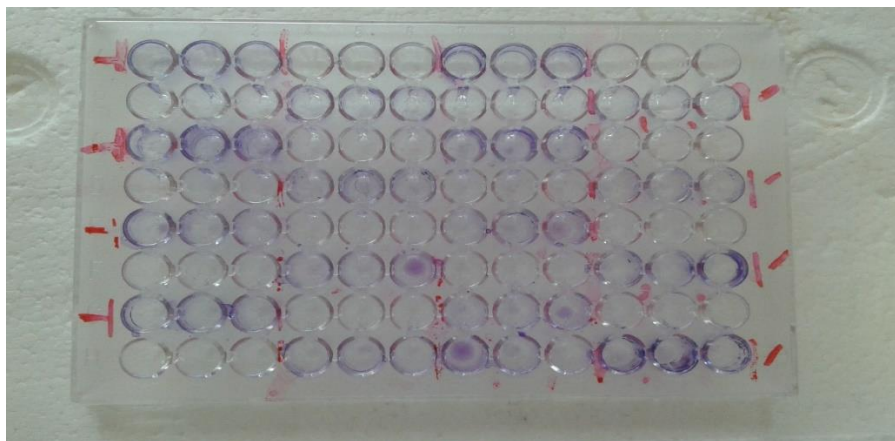
importante para proteínas relacionadas a diferentes aspectos da fisiologia da bactéria (PANTALEON *et al.*, 2015).

A capacidade dos organismos aderirem também depende fortemente da natureza da superfície. Dessa forma, as superfícies hidrofóbicas, tais como plásticos são mais propícias à adesão bacteriana do que as hidrofílicas, tais como vidro ou metais (RODRIGUES, 2009). No entanto, um trabalho realizado com *Staphylococcus aureus* apresentou formação de biofilme maior em vidro do que em aço inoxidável (MARQUES *et al.*, 2007).

5.1.2. Teste de aderência em microplacas de poliestireno (TMC)

A análise da produção de biofilme pelo teste de aderência em microplacas apresentou resultado positivo em 13 (81,25%) das 16 cepas analisadas. Foi considerado como positivo a presença de uma coloração roxa em cada poço. (Figura 09).

Figura 09 - Resultado do teste de microplacas de poliestireno.



Fonte: Próprio Autor

Seis (06) microrganismos com origem em regiões doces, *Pseudomonas* sp. (01 e 04), *Tatumella* sp. (92 e 95) e *Bacillus* sp. (14 e 58) apresentaram teste positivo para aderência em microplaca de poliestireno

Com relação aos isolados oriundos de matriz salgada, 05 bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* sp. (16, 63, 72, 73 e 131), um *Clostridium* sp. (64) e um *Vibrio* sp. (124) apresentaram positividade para o teste TMC.

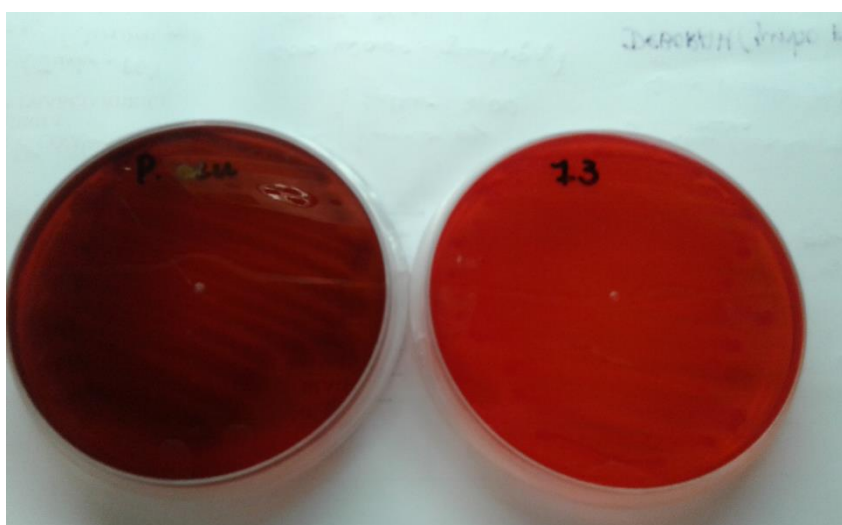
Um trabalho realizado com *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* relata que essas espécies apresentam forte capacidade de aderência ao poliestireno, sendo a *Pseudomonas aeruginosa* a mais eficiente (BERGAMI, 2015).

Freitas *et al.* (2010) realizaram esse mesmo teste com *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, no entanto, a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou uma menor habilidade de formação de biofilme do que *Staphylococcus aureus*. O autor atribuiu esse resultado a composição da matriz dessa bactéria que é bastante hidratada, além da sua característica hidrofóbica que confere uma menor adesão a superfícies hidrofílicas, como o poliestireno.

5.1.3. Teste de Ágar Vermelho Congo (AVC)

Segundo Arciola *et al.* (2002), o corante vermelho congo evidencia a produção de exopolissacarídeos (EPS), as cepas capazes de produzir essa matriz apresentam coloração preta ao teste, as que não possuem essa capacidade apresentam coloração vermelha (Figura 10).

Figura 10 – Resultado do teste do Ágar Vermelho Congo. À esquerda, resultado positivo para a espécie de *Pseudomonas aeruginosa* utilizada como controle. À direita, resultado negativo para o gênero *Bacillus* sp.



Fonte: Próprio Autor

Os exopolissacarídeos são uma matriz hidratada na qual as camadas de células ficam embebidas. A principal função dessa matriz é permitir a adesão das células bacterianas a superfícies sólidas ou a outras células dando origem aos biofilmes (CHRISTENSEN, 1989). São responsáveis por promover a proteção dos organismos, confere resistência aos estresses múltiplos, como a falta de água e nutrientes, a presença de substâncias biocidas, a agentes antimicrobianos e as condições ambientais (CAIXETA, 2008).

Dos 16 isolados, oito (08) apresentaram-se positivos para o teste, compreendendo uma

porcentagem de 50%. Os dois isolados de água e sedimento com agrotóxico de regiões doces (14, 56) pertencem ao gênero *Bacillus* sp. Os seis isolados que foram positivos das águas e sedimentos com agrotóxico de regiões salinas, quatro pertencem ao gênero *Bacillus* sp. (16, 63, 74, 131), 1 *Clostridium* sp. (64) e 1 *Vibrio* sp. (124). A estirpe *Pseudomonas aeruginosa* foi utilizada como controle positivo nesse teste.

O gênero *Bacillus* sp. representou 75% de positividade ao teste do AVC, totalizando seis organismos. Essa bactéria compreende diversos habitats e é conhecida pela sua capacidade de produzir enzimas capazes de degradar diversos substratos orgânicos (FRANCO; LANDGRAF, 2002) e hidrocarbonetos de petróleo (CRAPEZ *et al.*, 2002).

O gênero *Bacillus* sp são capazes de produzir um material polimérico chamado de cápsula. A maioria das cápsulas é formada por exopolissacarídeos. A espécie de *Bacillus anthracis* produz uma cápsula polipeptídica. A principal função dessa cápsula é a proteção da bactéria contra as condições adversas do ambiente como a dessecação, além de facilitar a aderência e interferir na fagocitose (QUINN *et al.*, 2007). Além disso, esse gênero bacteriano produz esporos que são hidrófobos conferindo a essa bactéria a capacidade de aderência a diversos materiais (GOMES, 2013).

5.1.4. Comparação dos métodos fenotípicos

Através da comparação dos métodos fenotípicos para a detecção de bactérias capazes de formar biofilmes podemos destacar que os gêneros *Bacillus* sp. (16 e 63), *Clostridium* sp. (64), *Vibrio* sp. (124) foram positivos aos três testes. Apenas a *Tatumella* (91) apresentou resposta negativa a todos os testes.

Os gêneros *Tatumella* sp. (92 e 95) e *Bacillus* sp. (73) foram positivos ao teste de aderência ao vidro e microplaca de poliestireno. Os gêneros *Bacillus* sp. (14 e 131) foram positivos ao teste do AVC e ao teste de microplaca.

Essas divergências podem estar relacionadas às diversas condições de crescimento e mecanismos de aderência de cada espécie bacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2006). As bactérias Gram-negativas são descritas por apresentar uma vantagem competitiva no processo de adesão inicial, colonização da superfície e formação de biofilme devido a suas estruturas peculiares, tais como os *pilis* e flagelos (BOARI *et al.*, 2009; DONLAN, 2011). Porém, algumas espécies Gram-positivas também são relatadas pela sua capacidade de formação de biofilme, tais como *Staphylococcus aureus* (BOARI *et al.*, 2009) e *Bacillus cereus* (ROSSI, 2008).

Outro fator a ser considerado é a hidrofobicidade das superfícies. Superfícies hidrofílicas desfavorecem o processo de adesão microbiana, um estudo realizado com 21 isolados confirmaram que as bactérias *P. aeruginosa* e *Staphylococcus sciuri* tiveram um maior crescimento em superfícies hidrofóbicas do que em superfícies hidrofílicas. (TEIXEIRA *et al.*, 2005). O que explica um maior número de adesão bacteriana no teste de microplaca de poliestireno do que no teste de aderência ao vidro.

5.2. Teste de degradação por meio de difusão em ágar

Os resultados obtidos pelo método de difusão em ágar por poços demonstraram que nenhuma das 16 bactérias testadas teve seu crescimento inibido pelas concentrações de 200ppm, 300ppm e 400ppm de atrazina.

Não há estudos que evidenciam o uso dessa metodologia para agroquímicos, no entanto, há uma ampla literatura da aplicação desse método em testes antimicrobianos e extratos vegetais. Segundo Alves *et al.* (2008) esse método apresenta resultados mais satisfatórios que a técnica de discos, pois há um maior contato da cepa bacteriana com a substância a ser testada.

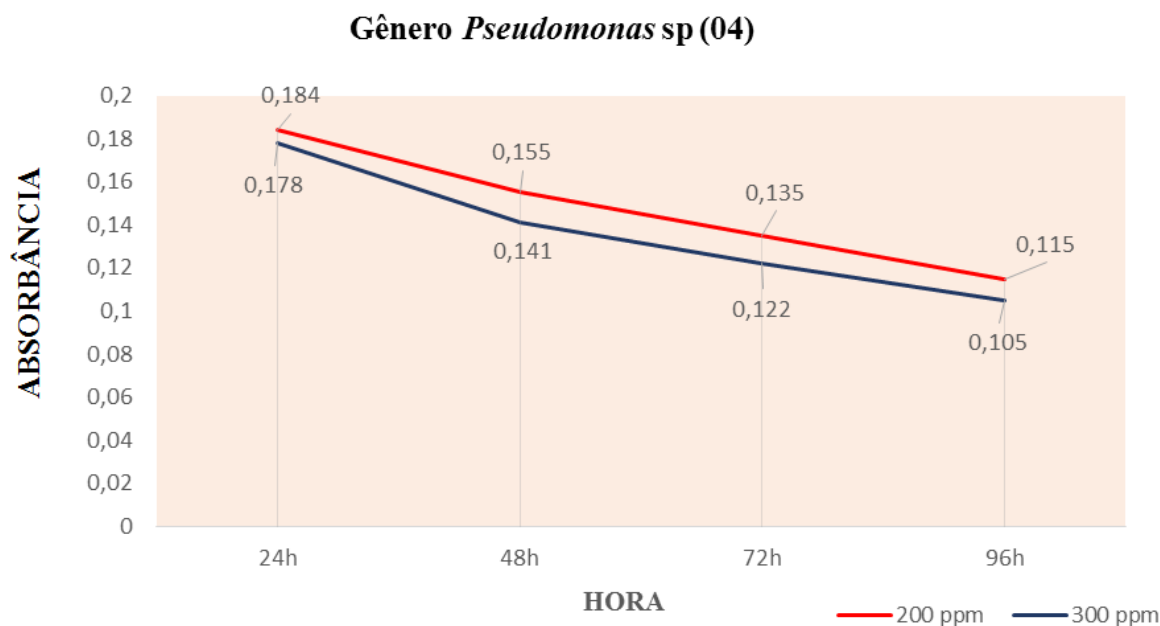
A ausência de halos de inibição pode ser atribuída à habilidade dos microrganismos testados de agir diretamente sobre esse herbicida por meio da produção de enzimas e metabólitos capazes de degradá-la, além da possível utilização desta substância como fonte de alimento ou em seus processos metabólicos. Dessa forma, esses organismos apresentam-se de grande relevância para os processos de biorremediação de ambientes contaminados com esse herbicida (POLONIO *et al.*, 2014).

5.3. Teste de degradação de Atrazina em meio líquido

O teste de degradação da atrazina em meio líquido teve como objetivo avaliar a capacidade de degradação dos microrganismos em cultura pura, para posteriormente avaliar sua contribuição em consórcios.

As bactérias foram submetidas às concentrações de 200ppm e 300ppm de atrazina até 96h e em seguida foi analisada a 625nm de absorbância. Destacou-se o comportamento do gênero *Pseudomonas* sp. (04) e *Bacillus* sp. (63). O gênero *Pseudomonas* sp. (04) apresentou um declínio de 24 a 96h com uma redução na concentração bacteriana. (Gráfico 01).

Gráfico 01– Comportamento da bactéria *Pseudomonas* sp (04) no teste de degradação em meio líquido.

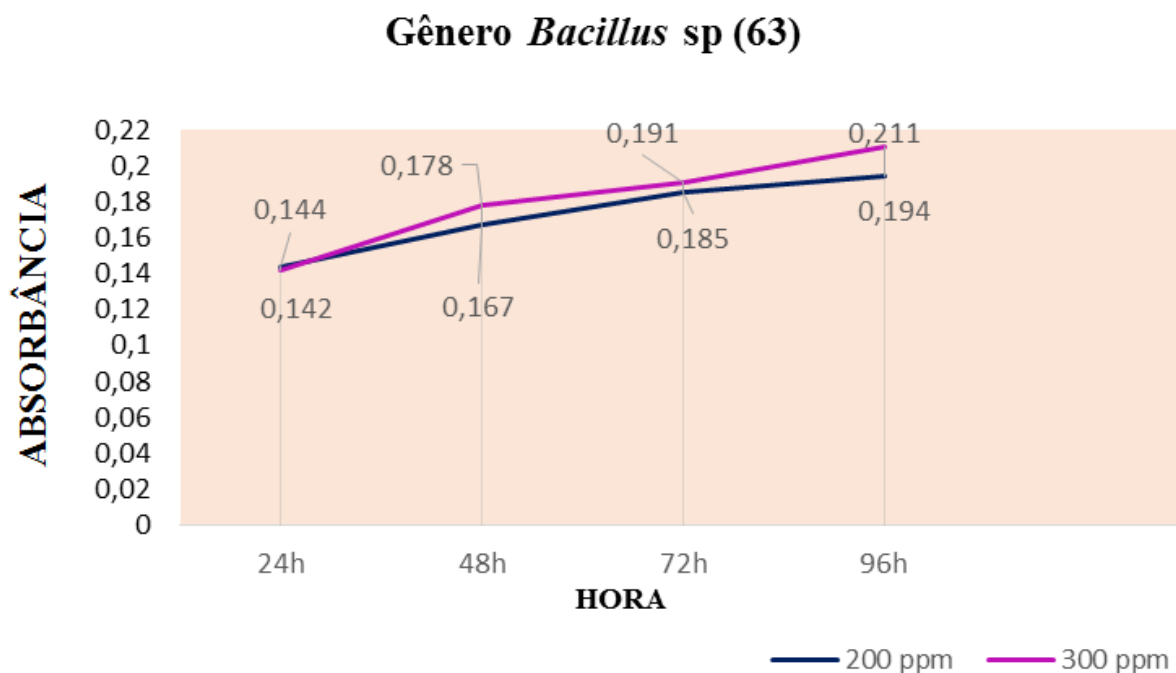


Quanto ao gênero *Pseudomonas* sp. (04) seu declínio pode estar relacionado ao processo de aclimação dos microrganismos que acelerou o processo degradativo dessa substância reduzindo a quantidade desse substrato no meio, o que tornou um fator limitante para o crescimento dos organismos. O crescimento bacteriano pode ser limitado pelo consumo de um nutriente do meio de cultura ou um produto de excreção dos organismos (MADIGAN *et al.*, 2010).

Em um estudo usando concentração de 33ppm de atrazina em meio líquido foi obtido a mineralização desse herbicida por ação da *Pseudomonas* sp. ADP em 72h. (FERNANDES, 2014). Enquanto Silva *et al.* (2004) obtiveram uma rápida degradação da atrazina após 28 dias, que correspondeu ao período de aclimação dos microrganismos.

Quando o teste foi feito usando isolado de *Bacillus* sp. (63) foi verificado um crescimento contínuo na população bacteriana ao longo das 96h testadas (Gráfico 02).

Gráfico 02– Comportamento da bactéria *Bacillus* sp. (63) no teste de degradação em meio líquido.



O aumento no crescimento bacteriano durante o período de 24h ao longo das 96h para o gênero *Bacillus* sp. (63) pode estar relacionada à capacidade desses microrganismos utilizarem a atrazina como fonte de nitrogênio em seu metabolismo. Sene *et al.* (2010) relataram a capacidade do gênero *Bacillus* sp. em degradar a atrazina utilizando-a como única fonte de nitrogênio. No entanto, um estudo realizado com o herbicida 2,4D foi observado que inicialmente houve um crescimento dos microrganismos com a presença desse herbicida, mas à medida que as concentrações foram aumentando houve um decréscimo na atividade microbiana (PRADO; AIROLDI, 2001).

5.4. Teste de antagonismo

O teste de antagonismo foi um pré-requisito para a formação dos consórcios bacterianos. Apenas os melhores microrganismos formadores de biofilme e degradadores de atrazina foram testados quanto a sua capacidade de produzir substâncias antagônicas.

Para o consórcio sem adição de sal foram selecionadas as bactérias *Pseudomonas* sp. (04), *Tatumella* sp. (92 e 95) (Tabela 03).

Tabela 03 – Resultado da análise do teste de antagonismo com as cepas de água e sedimento de regiões doces.

| Bactéria | 04 | 92 | 95 |
|----------|----|----|----|
| 04 | | X | |
| 92 | | | |
| 95 | | X | X |

X - Apresentou halo de inibição.

Das três bactérias testadas no consórcio sem adição de sal apenas os gêneros *Pseudomonas* sp. (04) e *Tatumella* sp. (95) não apresentaram atividade antagônica.

Para o consórcio com adição de 1% de NaCl foram utilizadas as bactérias *Bacillus* sp. (16, 63 e 73), *Clostridium* sp. (64) e *Vibrio* sp. (124) (Tabela 04).

Tabela 04 – Resultado da análise do teste de antagonismo com as cepas de água e sedimento de regiões salinas.

| Bactéria | 16 | 63 | 64 | 73 | 124 |
|----------|----|----|----|----|-----|
| 16 | | | X | | X |
| 63 | X | | X | | |
| 64 | | X | | | X |
| 73 | | | X | | |
| 124 | | | | | |

X- Apresentou halo de inibição.

No consórcio contendo 1% de NaCl três bactérias não apresentaram atividade antagônica, *Bacillus* sp. (63 e 73) e *Vibrio* sp. (124).

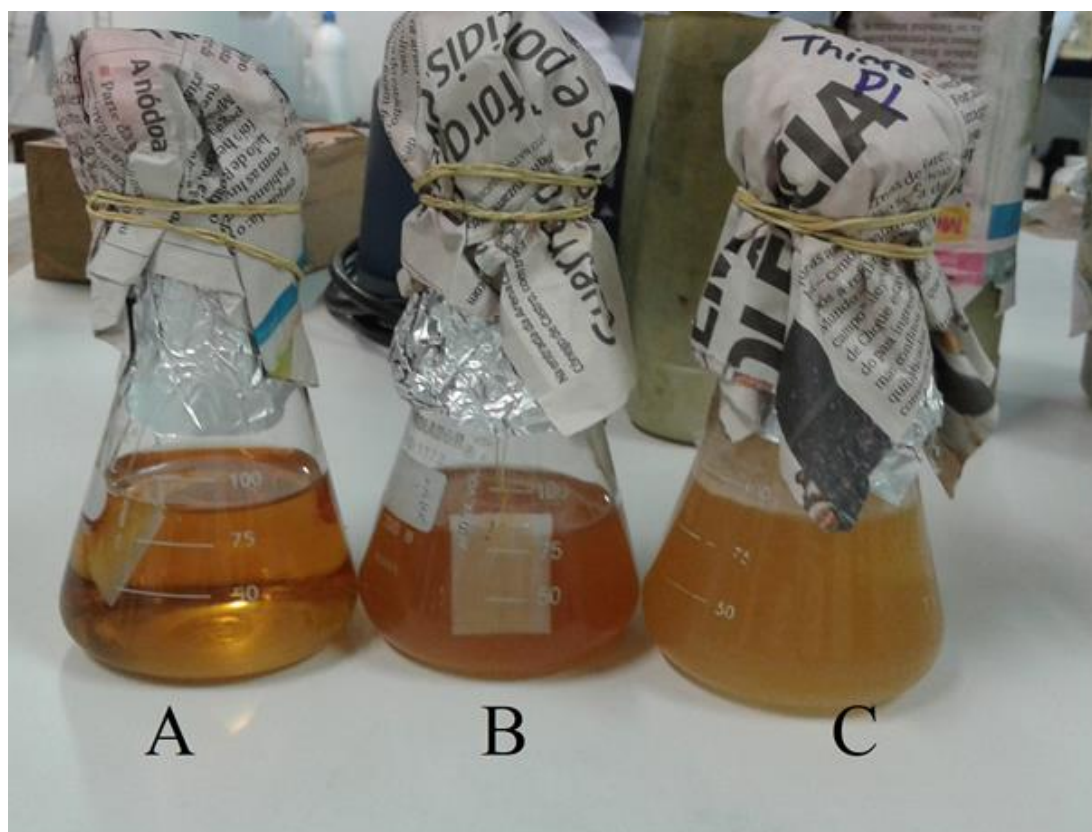
Quando há uma contaminação ambiental as bactérias são capazes de adaptar-se rapidamente, multiplicando-se e procurando meios de superar os seus concorrentes. Dessa forma, produzem substâncias sinérgicas ou antagônicas. (ROMANÍ *et al.*, 2006; GERTLER *et al.*, 2010), potencializando a degradação dos compostos (ALVAREZ, 2007). Logo, esse teste é de grande importância para a formação dos consórcios bacterianos, pois a ausência da produção de substâncias antagônicas é fundamental para o crescimento e atuação simultânea dos microrganismos.

5.5. Consórcios Bacterianos

Foram criados quatro consórcios bacterianos, dois sem adição de NaCl e outros dois com adição de 1% de NaCl. Os consórcios sem adição de NaCl foram formados por duas cepas, compreendendo os gêneros *Pseudomonas* sp. (04) e *Tatumella* sp. (95) e os consórcios com adição de 1% de NaCl foram formados por duas cepas de *Bacillus* sp. (63 e 73) e um *Vibrio* sp. (124).

Ao longo dos cinco dias de incubação a 35°C houve um aumento da biomassa bacteriana em todos os consórcios testados. No entanto, visualmente podemos detectar que houve um maior crescimento nos sistemas que continham 100ppm de atrazina (Figura 11).

Figura 11- Consórcios Bacterianos. **A)** Controle sem inóculo e sem adição de 100ppm de atrazina. **B)** Caldo TSB 1% sem adição de atrazina **C)** Caldo TSB 1% com adição de 100ppm de atrazina.



Fonte: Próprio Autor

O aumento da biomassa bacteriana nos consórcios contendo 100ppm de atrazina pode ser explicado pela presença desse herbicida como contaminante nos compartimentos ambientais, tais como solo, águas superficiais e subterrâneas (VRYZAS *et al.*, 2009). A exposição desses microrganismos a atrazina repetidamente durante um longo período pode acelerar o processo de biodegradação, pois estes estão adaptados a esse estresse ambiental. Essa pressão seletiva pode gerar o surgimento de populações microbianas resistentes ou degradantes de atrazina (ZABLOTOWICZ; REDY, 2007).

A capacidade dos organismos utilizarem a atrazina como fonte de carbono e nitrogênio para a manutenção ou crescimento de sua população é uma vantagem competitiva, pois lhe confere a habilidade de sobreviver em ambientes com altas concentrações dessa substância

(STRUTHERS *et al.*, 1998).

Santos (2013) isolou bactérias no Rio Pacoti com a capacidade de se manter viáveis e cultiváveis em concentrações de 100ppm e 200ppm de atrazina. Em outro estudo, a degradação desse herbicida por microrganismos em culturas mistas teve um melhor resultado com adição de uma fonte externa de carbono e nitrogênio (GHOSH; PHILIP, 2006).

5.6. Quantificação de bactérias no biofilme

A determinação do número de microrganismos presentes no material aderente evidencia se houve a formação do biofilme ou apenas a adesão bacteriana (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Dessa forma, apenas a diluição 10^{-5} pode ser contada, todas as outras diluições apresentaram um número maior que 250 UFC/cm².

O consórcio formado por bactérias sem adição de NaCl variou de $2,0 \times 10^7$ a $2,3 \times 10^7$ UFC/cm², enquanto o consórcio formado pelas bactérias com adição de 1% de NaCl variou de $3,5 \times 10^7$ a $3,9 \times 10^7$ UFC/cm². Para considerar um biofilme é necessário um número mínimo de 10^7 UFC/cm², enquanto outro autor considera um número de células aderidas de 10^3 UFC/cm² (WIRTANEN *et al.*, 1996; ANDRADE *et al.*, 1998).

5.7. Degradação da atrazina pelos consórcios bacterianos.

A biodegradação de moléculas complexas, como herbicidas, pode ter uma maior eficiência por meio de consórcios ou culturas mistas com dois ou mais organismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias partes do composto (ALEXANDER, 1999; SMITH *et al.*, 2005).

Os consórcios bacterianos (0% e 1% de NaCl) expostos a 500ppm de atrazina foram monitorados ao longo de 6 dias a 35°C. Ao longo desse período observou-se uma forte turvação dos meios de cultura nos consórcios, representando um indício de crescimento microbiano e a competição desses organismos por nutriente, no caso o herbicida, conseqüentemente reduzindo a concentração do agrotóxico.

No entanto, o sucesso da biodegradação depende da microbiota presente, da disponibilidade do contaminante em servir como fonte de nitrogênio e carbono e as condições ambientais que devem ser adequadas para o crescimento e atividade microbiana (HUNTER; SHANER, 2010; MENEGHETTI, 2007). Dessa forma, os microrganismos possuem enzimas específicas capazes de lhe conferir a habilidade de utilizar esse herbicida como fonte de carbono e nitrogênio e conseqüentemente mineralizar o anel triazínico (ABDELHAFID *et al.*,

2000).

Um consórcio formado por *Klebsiella* sp. e *Comamonas* sp. isoladas de uma fábrica de pesticida na China mostrou grande eficiência na mineralização da atrazina (83,3% de 5 gL⁻¹) após 24h de degradação. Utilizaram esse herbicida como única fonte de carbono e nitrogênio, e não sofreram nenhuma interferência com adição de uma fonte externa (YANG *et al.*, 2010). Smith *et al.* (2005) utilizaram um consórcio com oito microrganismos que foram capazes de degradar 33mgL⁻¹ de atrazina em quatro dias.

Portanto, foi possível observar que os consórcios bacterianos crescem na presença do herbicida atrazina, o que os tornam uma alternativa viável e eficiente em processos de biorremediação.

5.8. Teste fitotóxico com sementes de pepino Aodai (*Cucumis sativus* L.).

Os consórcios bacterianos foram analisados quanto ao efeito letal (número de sementes germinadas) e subletal (inibição da prolongação da raiz do vegetal) durante cinco dias.

Na primeira análise, foi considerada como efeito letal sobre as sementes, a inibição da germinação. O consórcio com bactérias de região salina com acréscimo de atrazina, a amostra pura e a diluição 10⁻¹ e o consórcio com bactérias de regiões doces com acréscimo de atrazina apresentaram apenas a amostra pura como tóxica (Tabela 05).

Tabela 05 – Porcentagem de germinação das sementes de Pepino Aodai (*Cucumis sativus* L.).

| Sistemas | 3º dia | | | 6º dia | | |
|----------|--------|------------------|------------------|--------|------------------|------------------|
| | Pura | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | Pura | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² |
| S1 | 85% | 92,5% | 100% | 87,5% | 92,5% | 92,5% |
| S2 | 87,5% | 87,5% | 100% | 85 % | 87,5% | 95% |
| S3 | 92,5% | 95% | 95% | 92,5% | 95% | 95% |
| S4 | 92,5% | 92,5% | 92,5% | 92,5% | 95% | 95% |

S1: Bactérias dulcícolas + 500ppm de atrazina; S2: Bactérias 1% NaCl + 500ppm de atrazina; S3: Bactérias dulcícolas sem adição de atrazina; S4: Bactérias 1% NaCl sem adição de atrazina.

No 6º dia de cultivo do consórcio bacteriano, as mesmas amostras se mantiveram tóxicas. A redução da porcentagem de sementes germinadas quanto submetidas a estresse hídrico pode estar relacionada com a redução de suas atividades enzimáticas (LABOURIAU, 1983). O consórcio bacteriano salino apresentou uma maior toxicidade, isso pode ser

relacionado com a presença dos íons de sal que dificulta a absorção de água necessária para que a germinação seja possível (MACHADO *et al.*, 2006). Cook *et al.* (2002), também realizaram testes com sementes em solo contaminado com derivados de petróleo e não obtiveram alteração na germinação das sementes. Outro fator que pode estar relacionado é a capacidade das bactérias desse consórcio de mineralizar a atrazina. Pode ter ocorrido que esses microrganismos associados não foram capazes de mineralizar totalmente o pesticida, transformando em outras substâncias também tóxicas e que inibiram o crescimento do vegetal. A biodegradação incompleta da atrazina pode gerar a desetilatrizona (DEA) e a desisopropilatrizona pelo processo de dealquinação microbiológica que são considerados tão tóxicos quanto a atrazina (WIKELMANN; KLAINE, 1991; LOSS; NIESSNER, 1999). A solubilidade desses metabólitos em água é maior do que a do herbicida atrazina causando um maior impacto nos compartimentos ambientais (SCRIBNER *et al.*, 2000).

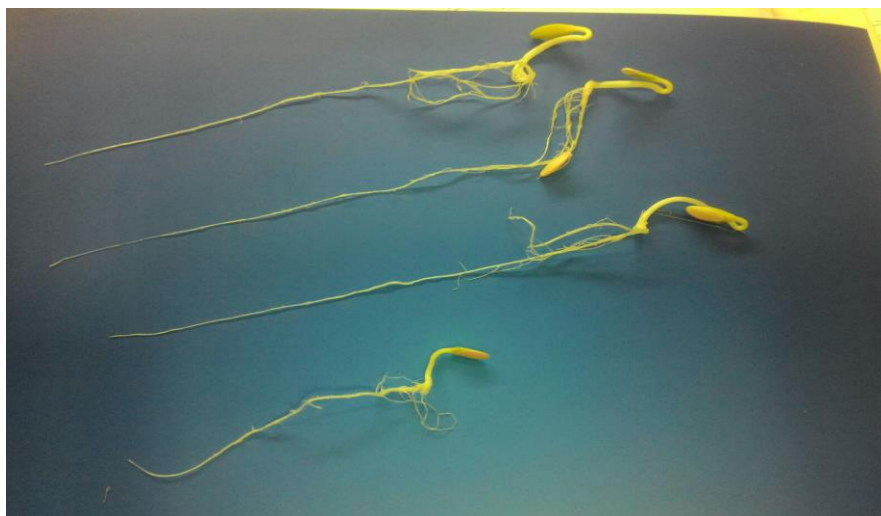
Quanto ao efeito subletal todas as amostras apresentaram IP negativo durante os seis dias de cultivo do consórcio. As sementes não sofreram nenhuma inibição no desenvolvimento de sua raiz mesmo com a presença do herbicida apresentando crescimento maior do que no controle. No teste de toxicidade realizado no 3^a dia de cultivo do consórcio bacteriano, as raízes apresentaram anormalidades como uma grande quantidade de pelos, muitas raízes secundárias, além de pequenos diâmetros. No teste de toxicidade realizado no 6^o dia de cultivo do consórcio, obtiveram-se raízes maiores e sem anormalidades, o que evidencia que houve uma redução da concentração do agrotóxico na amostra (Figuras 12 e 13).

Figura 12 – Raízes do Pepino Aodai crescidas expostas ao consórcio bacteriano após 3 dias de cultivo a 30°C.



Fonte: Próprio Autor

Figura 13 – Raízes do Pepino Aodai crescidas expostas ao consórcio bacteriano após 6 dias de cultivo a 30°C



Fonte: Próprio Autor

A utilização indiscriminada de herbicidas sintéticos tem provocado o desenvolvimento de plantas resistentes a estes, o que conduz a uma demanda de novas substâncias químicas cujos mecanismos e ações sejam diferentes dos empregados (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Rebessi *et al.* (2011) observaram que na presença do herbicida glifosato as raízes cresciam menor do que o controle. Segundo Castillo (2004) a presença de alguns micronutrientes como Cu, Zn em baixas concentrações em amostras ambientais pode estimular o crescimento do vegetal. Na aplicação desse teste de fitotoxicidade com amostras ambientais em conjunto com outros organismos tem sido detectado a estimulação do crescimento radicular. Dessa forma, foi possível detectar que a associação das bactérias com a atrazina conseguiu degradar total ou parcialmente o herbicida fornecendo nutrientes para o crescimento do vegetal.

6. CONCLUSÃO

Foi possível selecionar bactérias aptas a formação de biofilme, degradação da atrazina e que não produziram substâncias antagônicas e que unidas em consórcios foram capazes de crescer ou tolerar o herbicida em todas as concentrações testadas.

Os consórcios bacterianos mostraram capacidade de utilização da atrazina como fonte de carbono e nitrogênio o que os coloca como uma alternativa viável de biorremediação de contaminantes como atrazina. .

O teste fitotóxico foi eficiente para analisar os níveis de toxicidade do herbicida, no entanto, mais estudos devem ser feitos.

Não foi possível estabelecer a eficiência da degradação da atrazina (parcial ou completa) pelos consórcios bacterianos. Entretanto, o teste ecotoxicológico foi um bom indicador da redução do efeito tóxico da substância sobre esses vegetais. No entanto, mais estudos são necessários para a validação dessa técnica.

REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, F.B *et al.* Adherence assays and slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. **Brazilian Journal Microbiol.** v. 40, n. 2, p.394-398, 2009.
- ABDELHAFID, R *et al.* Dependence of atrazine degradation on C and N availability in adapted and non-adapted soils. **Soil Biology and Biochemistry.** v. 32, p. 389-401, 2000.
- AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários, 2015. Disponível em: http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons Acessado em: 22 de novembro de 2015.
- ALEXANDER, M. Biodegradation and Bioremediation. 2ª ed. San Diego: **U.S.A. Academic Press.** 302 p, 1999
- ALVAREZ, V. M. **Bioprospeção da população bacteriana halotolerante e biodegradadora de óleo presente em solo impactado na região de Panelas, SE.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.96f, 2007.
- ALVES, E.G *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova,** Franca, v.31, p.1224-1229, 2008.
- ANDEF - Associação Nacional de Defesa Vegetal. **Manual de tecnologia de aplicação de produtos fitossanitários.** Campinas: Linea Creativa, 50p, 2004.
- ANDRADE, N. J. *et al.* Bacteriocidal activity of sanitizers against *Enterococcus faecium* attached to stainless steel as determined by plate count and impedance methods. **Journal of Food Protection,** v.61, n.7, p.833-838, 1998.
- ARANTES, S.A.; LIMA, J.S. Sorção da atrazina em solos representativos da sub-bacia do rio das mortes. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente.** Curitiba, v. 16, 2006.
- ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosado em dois tipos de solos.** 2002. 164f. Dissertação Mestrado em Agronomia – Escola Superior de Agricultura de Luiz de

Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

ARCIOLA, C.R. *et al.* Detection of slime production by means of an optimised Congo red agar plate test based on a colourimetric scale in *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates genotyped for ica locus. **Biomaterials**, v. 23, p.4233–4239, 2002.

ATRAZINEb Pathway Map. Disponível em: http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_map.html. Acesso: 12 de dezembro de 2015.

AUGUSTO, L.G. S. *et al.* **Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. Parte 2 - Agrotóxicos, Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.** Rio de Janeiro, ABRASCO, 2012.

BARRETO, F.M.S. **Contaminação da água subterrânea por pesticidas e nitrato no Município de Tianguá, Ceará**, 2006. 183f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, 2006.

BARRETO, F.M.S; NASCIMENTO, R.F. **Caracterização preliminar da carga de agrotóxico presente na água subterrânea em Tianguá-Ceará (Brasil).** XIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas, São Paulo, 2004.

BERGAMI, S.R. *et al.* **Capacidade de Formação de biofilme por diferentes bactérias patogênicas.** VIII Mostra Nacional de Iniciação Científica e Tecnologia Interdisciplinar, 2015.

BOARI, C.A. *et al.* Formação de biofilme em aço inoxidável por *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus* usando leite e diferentes condições de cultivo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v.29 p.886-895, 2009.

BOLETTI, F. T. *Manufacture of vinegar. Microbiology; a textbook on microorganisms general and applied.* **C. E. Marshall.** London, Churchill p. 636-648, 1921.

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

CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas**

espécies de Pseudomonas em superfície de aço inoxidável. 2008, 75p. Dissertação Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

CAMPOS, M. M.C. **Estudo da remoção e toxicidade dos pesticidas atrazina e oxifluorfen pela cianobactéria *Microcystis novacekii* em condições de cultivo.** 93f. Dissertação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte, 2009.

CAPELLETTI, R. V. **Avaliação da atividade de biocidas em biofilmes formados a partir de fluido de corte utilizado na usinagem de metais.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

CARDOSO, M. J. *et al.* Avaliação preliminar de cultivares de milho para produção de espiga verde em sistema agrícola familiar. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 35, n. 2, p. 406-409, 2004.

CASERTA, R.. *et al.* Expression of *Xylella fastidiosa* Fimbrial and Afimbrial Proteins during Biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 13, p. 4250-4259, 2010.

CASTILLO, J. *et al.* Biosensors for life quality – Design, development and applications. **Sensors and Actuators B: Chemical**. v. 102, n. 2, p. 179 - 184, 2004.

CHEVRIER, C. *et al.* Urinary biomarkers of prenatal atrazine exposure and adverse birth outcomes in the PELAGIE Birth Cohort. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 7, p. 1034- 1041, 2011.

CHOWDHURY, A. *et al.* Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 114-127, 2008

CHRISTENSEN, B.E. The role of extracellular polysaccharides in biofilms. **Journal of Biotechnology**., v. 10, p. 181-202, 1989.

CHRISTENSEN, G.D. *et al.* Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 22, p.996–1006, 1985.

CHRISTENSEN, G.D. *et al.* Adherence of smile-producing strains of *Staphylococcus epidermidis* to smooth surface. **Infection and Immunity**. v. 37 p. 318-326, 1982.

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. v.29, n.3, p.149, 2010

COLLA, L.M. *et al.* Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n.3, p.809-813, 2008.

CONAMA - Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Alterado pela Resolução CONAMA 397/2008. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/conama>. Acessado em: 04 de novembro 2015.

COOK A.M. *et al.* Determination of seventeen s-triazine herbicides and derivatives by high pressure liquid chromatographes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** v. 29, p.1135-1143, 1981.

COOK, S.V *et al.* Leachability and toxicity of hydrocarbons, metais and salt contamination from flare pit soil. **Water Air Soil Poll.**v.113, n.4, p.297-314, 2002.

COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science** 284:1318-1322, 1999.

COSTERTON, J.W. *et al.* Microbial Biofilms. **Annual Review of Microbiology** v. 49 p.711-745, 1995.

COSTERTON, J.W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu. Rev. Microbiol.** 41:435-464, 1987.

CRAGIN, L. A. *et al.* Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water. **Environmental Research**, v. 111, n. 08, p. 1293-1301, 2011.

CRAPEZ, M.C. *et al.* Tratamento para derrames de petróleo: biorremediação. **Ciência Hoje**, v.30, n.179 p.33-37, 2002.

DAVEY, M.E.; OTOOLE, G.A. **Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics.**

Microbiology and Molecular Biology Reviews, v.64: p.847–867, 2000.

DONLAN RM. Biofilm Formation: A Clinically Relevant Microbiological Process. **Clinical Infectious Diseases**. v.33 p.1387-1392, 2011.

DONLAN, R.M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases Journal** v. 8, p. 881–890, 2002.

DONLAN, R.M.; COSTERTON, J.W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15: p.167-193, 2002.

DUNNE, J.R, W.M. Bacterial adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? **Clinical Microbial and Infection**, v.15, p. 155-166, 2002.

DONG, X. *et al.* Effects of atrazine on cytochrome P450 enzymes of zebrafish (*Danio rerio*). **Chemosphere**, v. 77, n. 03, p. 404-412, 2009.

DUTKA, B.J. Methods for Microbiological and Toxicological Analysis of Waters Wastewaters and Sediments. **Rivers Research Branch**. NWRII CCIW, Burlington, Ont. 1989.

EPA. **Finalization of Atrazine IRED, and Completion of Tolerance Reassessment and Reregistration Eligibility Process**, 2006.

ESSER, H.O. *et al.* In Herbicides: Chemistry, degradation and mode of action, P. C. **Kearney and D. D. Kaufman eds.**, New York, v 1, Cap 2, p129, 1985

FERNANDES, A.F.T. **Caracterização fenotípica e molecular de linhagens da *Pseudomonas* spp envolvidas na biodegradação da atrazina**, 2014. Dissertação de Mestrado em Biociências, 67f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP, 2014.

FLACH, J. **Formação de Biofilmes em Diferentes Materiais Utilizados na Indústria de Processos de Leite**, 2006, 115f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

FLEMMING, H.C. *et al*, The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. **Journal of Bacteriology**. v. 189 (22) p. 7945-7, 2007.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Editora

Atheneu. p. 41-45, 50-57, 2002

FREEMAN, D.J. *et al.* New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Pathol**, v. 42 p. 872-874, 1989.

FREITAS, V.R. *et al.* Formação in vitro de biofilme por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* na superfície de canetas odontológicas de alta rotação. **Revista de Odontologia da UNESP**, Araraquara, v.39 n.4, p.193-200, 2010.

GARCÍA, M. Á.; SANTAUFEMIA, M.; MELGAR, M. J. Triazine residues in raw milk and infant formulas from spanish northwest, by a diphasic dialysis extraction. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 03-04, p. 503-510, 2011.

GERTLER, C. *et al.* Mesocosm study of the changes in marine flagellate and ciliate communities in a crude oil bioremediation trial. **Microbial Ecology**. v. 60, p.180 – 191, 2010.

GHISELLI, G.; JARDIM, W.F. Interferentes endócrinos no ambiente. **Química Nova**, v. 30, p. 695-706, 2007.

GHOSH, P.; PHILIP, L. Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its removal by biological processes: an overview. **Global NEST Journal, Greece**, v.8, n.2, p.159-178, 2006.

GIARDINA, M.C *et al.* Atrazine metabolismo by *Nocardia*: Elucidation of initial pathway and synthesis of potencial metabolites. **Agricultural and Biological. Chemistry**. v.46 p.1439-1445, 1982.

GJALTEMA, A. **Biofilme Development: Growth versus Detachment**, 1996. 166f. (Dissertação de Doutorado). Delft: Technische Universiteit Delft. Netherlands,. 1996.

GODOI, I. **Impacto da Presença de Atrazina na comunidade bacteriana do solo**. Dissertação de Mestrado em Engenharia Agrícola. Universidade Estadual do Oeste do Pará. 44f, 2012.

GOMES, M.J.P. **Tópicos em Bacteriologia Veterinária – Gênero *Bacillus* spp.** Faculdade Veterinária, FAVET. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, 2013.

GRAYMORE, M. *et al.* Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment**

International, v.26, n.7-8, p.483-495, 2001.

HASE, Y *et al.* Atrazine binds to F1F0-ATP synthase and inhibits mitochondrial function in sperm. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 366, n. 01, p. 66-72, 2008.

HAYES, T.B. *et al.* Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male African clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of The USA** ,2010

HOLT, M. S. Sources of chemical contaminants and routes into the freshwater environment. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. S21-S27, 2000.

HOREMANS B *et al.* Carbon source utilization profiles suggest additional metabolic interactions in a synergistic linuron degrading bacterial consortium. **FEMS Microbiology Ecology** v.84 p.24–34, 2013.

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

IBAMA- **Produtos Agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental**, 2010.

IBGE/SIDRA. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística/ Sistema IBGE de Recuperação Automática – **Histórico de área plantada; histórico de produção agrícola da safra de 2013**.

IGLESIAS, J. M.P Biomarcadores de exposição e efeito para avaliação dos efeitos da atrazina a distintos níveis em girinos de anuros neotropicais, 2015. 73f. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, 2015.

IRIE, Y. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix polysaccharide Psl is regulated transcriptionally by RpoS and post-transcriptionally by RsmA. **Molecular microbiology**, 2010.

JARDIM, I.C.S.F; ANDRADE, J.A. Resíduos de agrotóxicos em alimentos: uma preocupação ambiental global – um enfoque às maçãs. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 996-1012, 2009.

JACQUES, R.J.S.; SILVA, K.J. da; BENTO, F.M.; CAMARGO, F.A.O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, v.40, n.2, p.280-287, 2010.

JASS, J.;J. T. WALKER. **Biofilms and biofouling**. Industrial biofouling - detection, prevention and control, 2000

JUNIOR, R.P.S. **Pesticidas, Agricultura e Recursos Hídricos. Circular técnico da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA**, 2006.

KERR, K. G.; SNELLING, A. M. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p. 338-344, 2009.

KUMAR, C.G; ANAND, S.K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int. J. Food. Microbiology**, v. 42, p-9-27,1998.

LABOURIAU, L.G; VALADARES, M.E.B. **On the germination of seeds *Calotropis procera* (Ait.) Ait.f.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro. v.48, n.2, p.263-284, 1983.

LAVORENTI, A. **Comportamento dos herbicidas no meio ambiente. in: Centro nacional de pesquisa de monitoramento e avaliação de impacto ambiental.** Anais do Workshop sobre Degradação. Jaguariúna, SP: Embrapa-CNPMA. v. 1. p. 81-115,1996.

LENNOX, J.E *et al.* **Biofilms: Online Manual.** Disponível em: <http://www.personal.psu.edu/faculty/fj/e/jel5/biofilms/>, Acessado em: 05 de janeiro de 2016

LINCOPAN, N. TRABULSI, L.R. ***Pseudomonas aeruginosa***. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo, Atheneu, p. 369-381, 2008.

LÓPEZ D, KOLTER R. Functional microdomains in bacterial membranes. **Genes & Development** v. 24, p.1893–1902, 2010.

LOSS, R ; NIESSER, R. Analysis of atrazine, terbutylazine and their N-dealkylated choro and hydroxy metabolites by solid-phase, extraction and gas chromatography-mass spectrometry and capillary electrophoresis-ultraviolet detection. **J. Chromatogr A835** p.217-222, 1999.

MACHADO *et al.* Deficiência hídrica induzida por diferentes agentes osmóticos na

germinação e vigor de sementes de feijão. **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n.1, p.142-148, 2006.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Capítulo 27- Controle do Crescimento Microbiano**. Microbiologia de Brock . 12ª Ed. Editora: Artmed. 2010.

MANDELBAUM, R.T *et al.* Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied Environmental Microbiology**., 61, 1451 – 1457, 1995.

MARECICK, R. *et al.* Atrazine degradation by aerobic microorganisms isolated from the rhizosphere of sweet flag (*Acorus calamus* L.). **Biodegradation**, Poznan, v.19, p.293-301, 2008.

MARIANO, A. P *et al.* Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária Ambiental**. vol.12, n.3, pp. 296-304, 2007.

MARQUES, S.C *et al.* Formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* na superfície de aço inoxidável e vidro e sua resistência a alguns sanificantes químicos. **Brazilian Journal Microbiology**. vol.38, n.3, pp. 538-543, 2007.

MARSHALL K.C. Biofilms: verview of bacterial adhesion, activity and controla surfaces. **American Society of Microbiology**. v. 58 p. 202-207. 1992.

MARTINEZ, B *et al.* Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. **Journal of Bacteriology**., 183, 5684-5697, 2001.

MARTINS, S. R. **Bioprospecção de bactérias degradadoras de agrotóxicos em estuário do Rio Jaguaribe (Ceará, Brasil)**, 2015. Monografia apresentada ao Curso de Ciências Ambientais. 60f. Universidade Federal do Ceará, 2015.

MATILA SANDHOLM, T ; WIRTANEN, G. Biofilm formaion in he industry, a review, **Food Ver**. Vol 8, p 573-603,1992.

MCCLAIN J.W, FORD R.M.. Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 78 p.179 –189 , 2002.

MEIRELLES, L.C. **A gerência geral de toxicologia da ANVISA**, 2005. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/da9ec400474586948fc7df3fbc4c6735/4.pdf?MOD=AJPERES> Acessado em: 18 de novembro de 2015.

MENEGHETTI, L.R.R. **Biorremediação na descontaminação de um solo residual de basalto contaminado com óleo diesel e biodiesel**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia. Departamento de Engenharia Civil. Universidade de Passo Fundo. 112 p, 2007.

MIGEOT, V. *et al.* Drinking-water exposure to a mixture of nitrate and low-dose atrazine metabolites and small-for-gestational age (SGA) babies: a historic cohort study. **Environmental Research** v. 122, p. 58–64, 2013

MOREIRA, C.A. **Atividade in vitro de agentes antimicrobianos contra biofilmes de *Staphylococcus spp* de ootite canina**. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica, 2011. 101f. Universidade Federal do Ceará, 2011.

MOREIRA, J.C *et al.* Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos sobre a saúde humana em uma comunidade agrícola de Nova Friburgo, RJ. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.7, n.2, p.299-311, 2002.

NORDMANN. P ; CORNAGLIA.G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action. **Clinical Microbiology and Infection**. Vol. 18, p. 411–412, 2012

O'TOOLE, G. A *et al.* Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development Kolter. **Molecular Microbiology**, v. 30, p 295-304, 1998.

OLIVEIRA,M *et al.* Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. **Veterinary Microbiology**. v.118 p.133-140, 2006.

OLIVEIRA, M. *et al.* Disinfectant action of *Cymbopogon sp* essential oils in diferente phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**.

V.21. p.549-553, 2010.

OLIVEIRA, M. F *et al.* **Capítulo 11- Comportamento de herbicidas no ambiente.** Biologia e manejo de plantas daninhas. Curitiba: Omnipax,, p.263-304, 2011.

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

PANTALEON, V. *et al.* **The Clostridium difficile Protease Cwp84 Modulates both Biofilm Formation and Cell-Surface Properties.** PLoS ONE 10(4): e0124971. doi:10.1371/journal.pone.0124971, 2015.

PEETERS, E *et al.* Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 72, p. 157-165, 2008.

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

PEREIRA, **Degradação da atrazina pelo processo UV/H₂O₂ e ozônio, identificação dos intermediários e avaliação da atividade estrogênica.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 168f, 2011.

PEREIRA,M.O. **Comparação da eficácia de dois biocidas (carbamato e glutaraldeído) em sistemas de biofilme.** 2001. 221f. Tese (Doutorado em Engenharia Química e Biológica) – Departamento de Engenharia Biológica, Universidade do Minho, Braga, 2001

POI DE NEIFF A, RAMOS A. **Utilización de bioensayos para el estudio ecotoxicológico de los ríos Salado y Negro (Chaco, Argentina)**, 2001

POLONIO *et al.* Biorremediation potential of microorganisms: Survey of industrial and municipal treatable waste in Maringá-PR, BBR - **Biochemistry and biotechnology reports.** v.3, n.2, p.31-45, 2014

PRADO, A.G.S.; AIROLDI, C. Toxic effect caused on microflora of soil by pesticide picloram application. **Journal of Environmental Monitoring** v.3, p.394-397, 2001.

QUINN, P.J *et al.* **Capítulo 15 – Gênero *Bacillus***. Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas. Editora Artmed, 2007.

RADOSEVICH M *et al.* Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. **Applied and Environmental Microbiology** v. 61, p. 297-302, 1995

RAJKOVIC, V *et al.* Atrazine-induced degranulation thyroid mast cells in peripubertal and adult rats. **Central European Journal of Biology**, v.7 p.25-32, 2012

REBESSI, A. C *et al.* Estudo da Toxicidade Crônica do herbicida glifosato em sementes de milho, de quiabo e rúcula. **Engenharia Ambiental**, Espírito Santo do Pinhal, v. 8, n. 2, p. 03-16, 2011.

RIBAS, P. P. MATSUMURA, A. T. S. A química dos agrotóxicos: impactos sobre a saúde e meio ambiente. **Revista Liberato**, Novo Hamburgo, v. 10, n. 14, p. 149-158, 2009.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas**, 4.ed. Londrina, Instituto Agrônômico do Paraná, 675p, 1995

RODRIGUES, L. C *et al.* Fitotoxicidade citogenotoxicidade de água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 17, p. 1099-1108, 2013.

RODRIGUES, L.B. **Avaliação da Formação de Biofilmes e das condições higiênicas sanitárias em superfícies de contato com alimentos em sala de cortes de matadouro de aves**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Veterinária), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 116f. 2009.

ROMANÍ, A. M *et al.* Interactions of bacteria and fungi on decomposing litter: differential extracellular enzyme activities. **Ecology**, v. 87, No. 10, p. 2559 – 2569, 2006.

ROSSI, A.C. **Estudo de biofilmes e células planctônicas de *Bacillus cereus* frente a um sanificante à base de composto quaternário de amônio utilizado na indústria de laticínios**. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Escola Superior de Agricultura Luiz, 69f, 2008.

SANCHES, S. M *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. Pesticidas: **Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53-58, 2003

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 de Ciências Ambientais, Universidade Federal do Ceará, 2013.

SAUER K *et al.* Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. **Journal of Bacteriology** 184:1140–54, 2002.

SCRIBNER, E.A *et al.* Changes in herbicide concentrations in Midwestern streams in relation to changes in use, 1989–1998. **Science Total Environment** 248: 255–263, 2000.

SENE, L *et al.* New aspects on Atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 02, p. 487 – 496, 2010.

SILVA, E *et al.* Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environ. Sci. Technol.** V.38 p.632-637, 2004.

SILVA, M.G.C *et al.* **Composição de consórcios microbianos para aplicação em processos de biorremediação**. I CONICBIO / II CONABIO / VI SIMCBIO. Universidade Católica de Pernambuco, Recife – PE, 2013.

SMITH, D *et al.* Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology.**, 53, 265 – 273, 2005

SOARES, J.B et al. Unidade I – Coloração de Gram. **Microbiologia Básica**. Edições UFC, 175f. 1987

SOARES, J.B et al. Unidade VIII– Determinação quantitativa do crescimento microbiano. **Microbiologia Básica**. Edições UFC, 175f. 1987

STOODLEY, P *et al.* Biofilms as complex differentiated communities. **Annual Review of Microbiology** v.56. p. 187-209, 2002.

STRUTHERS, J. K *et al.* Biodegradation of atrazine by Agrobacterium radiobacter J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental**

Microbiology v.64, p. 3368-3375,1998

TEIXEIRA, P *et al.* Physicochemical surface characterization of a bacteria population isolated from a milking machine. **Food Microbiology**, v. 22, p.247–251, 2005.

TOPP, E *et al.* Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology** v. 66, 2773–2782, 2000.

TORTORA, G. J *et al.* **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artemed, 2012.

UETA *et al.* Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**. Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999

VARGHA, M *et al.* Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. **Water Research** v. 39, 1560 – 1568, 2005

VIANA, M. G. **Avaliação de produtos naturais sobre biofilmes formados em sistema dinâmico**. 2009, 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Petróleo) - Centro de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

VRYZAS, Z *et al.* Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. **Water Research**, , v. 43, 1-10, 2009

WINKELMANN, D.A; KLAINÉ, S.J. Degradation and bound residue formation of atrazine in a Western Tennessee soil. **Environ Toxicol. Chem** v.10 p. 335-345, 1991.

WIRTANEN, G *et al.* Microbial evaluation of the biotransfer potencial from surfaces with *Bacillus* biofilms after rinsing and cleaning procedures in closed food-processing systems. **Journal of Food Protection**, v.59, n.7, p.727-733, 1996.

WIRTANEN, G. Biofilm formation and is eliminaion from food processing equipment. **Espoo; VTT Publications**, 1995

XING, H *et al.* Histopathological changes and antioxidant response in brain and kidney of common carp exposed to atrazine and chlorpyrifos. **Chemosphere**, v. 88, n. 4, p. 377-383, 2012.

YANG, L *et al.* Atrazine affects kidney and adrenal hormones (AHs) related genes expressions

of rare minnow (*Gobio cyprisrarus*). **Aquatic Toxicology** 97, 204–211, 2010.

ZABLOTOWICZ, R. M.; REDDY, K. N. Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. **Crop Protection**. v. 26, n. 3, p. 370-376, 2007.