

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
TROPICAL

The seal of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central figure of a person with arms raised, surrounded by a laurel wreath. Above the figure are three stars. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written along the top inner edge of the circle, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written along the bottom inner edge.

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DE *Allium fistolium* L. COM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEB NA COMUNIDADE NOVA ESPERANÇA MANAUS-AM**

CAROLINA REBIÈRE

MANAUS  
2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA  
TROPICAL

CAROLINA REBIÈRE

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DE *Allium fistolium* L. COM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEB NA COMUNIDADE NOVA ESPERANÇA MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Orientador: Prof. Dr. José Odair Pereira

MANAUS 2013

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

R291b      Rebiere, Carolina  
BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DE *Allium fistollium* L. COM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEB NA COMUNIDADE NOVA ESPERANÇA MANAUS-AM / Carolina Rebiere. 2013  
96 f.: il. color; 27,94 cm.

Orientador: José Odair Pereira  
Coorientador: Ieda Hortêncio Batista  
Dissertação (Mestrado em Agronomia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Agrotóxicos. 2. Bactérias. 3. Degradação. 4. Bacillus. I. Pereira, José Odair II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

**CAROLINA REBIÈRE**

**BACTÉRIAS ISOLADAS DE SOLOS RIZOSFÉRICOS DE *Allium fistolium* L. COM HISTÓRICO DE APLICAÇÃO DO FUNGICIDA MANCOZEB NA COMUNIDADE NOVA ESPERANÇA MANAUS-AM**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia Tropical da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Agronomia Tropical, área de concentração em Produção Vegetal.

Aprovada em 28 de junho de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

Prof. Dr. José Odair Pereira, Presidente  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Pedro de Queiroz Costa Neto, Membro  
Universidade Federal do Amazonas

Prof. PhD João Lúcio de Azevedo, Membro  
Universidade de São Paulo (ESALQ/USP)

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela existência.

Aos familiares pelo apoio dado.

Ao meu orientador por ter me dado oportunidade de me aprofundar na microbiologia.

A minha co-orientadora pela paciência nas correções.

A FAPEAM pela bolsa concedida.

Aos amigos do laboratório de DNA.

Ao Mário.

As meninas da UEA.

Aos professores que me auxiliaram em minhas dúvidas.

Aos amigos da PPGATR.

Aos amigos de sempre.

A todos que de alguma forma colaboraram para que esse trabalho fosse possível.

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Jamizan e Patrick, a meu filho João  
Sol, a toda família e amigos por todo  
apoio.

## ABSTRACT

The utilization of pesticides in agriculture has been intensified, causing big impact in the soils and biota. The presence of these compounds in soils has been resulting in microorganism behavior modification, developing survival strategies to the presence of these products. The Mancozeb is a carbamate`s fungicides group that acts, inactivating the essential enzymes of fungi. The subjects of this study were: to characterize chemically and physically rhizosphere soil samples with history of repeated fungicide application; to isolate bacteria from this soil; to characterize the isolates with biochemical tests and molecular tools; to obtain the growth of the isolates in environment with the fungicide; to establish a bacterial collection with bioremediation potential. Samples of soils were collected and it was determined their chemical and physical characteristic. The bacterias were isolated using two different techniques: minimal salt broth, and Busheel Haas broth containing 3,6g/L of Mancozeb. The isolated strains were submitted to tests in minimal salt broth to evaluate the potential of degradation in environment with this fungicide. The identification was made through the phenotypic characterization, using biochemical tests to determine the gender and molecular identification using the sequencing of the region 16S, with the primers 1492R, 513F with amplification of 1000 pb. The 23 bacterial isolates were identified as 4 families, 4 genders and 11 species. The Bacillaceae family is more representative with 86,95% of the isolates. These tests provided to verify the tolerance of the bacteria that was isolated in higher concentrations of Mancozeb that are used in field to control pests. The collection of microorganisms resulting from this research may contribute for future studies involving the biodegradation of xenobiotics.

Keywords: bacterial, biodegradation, pesticides.

## RESUMO

A utilização de fungicidas na agricultura tem se intensificado, causando grande impacto nos solos e na biota em que eles se encontram. A presença desses compostos no solo vem acarretando modificações no comportamento dos microrganismos, que passaram a adquirir estratégias de sobrevivência à presença desses produtos. O Mancozeb é um fungicida do grupo dos carbamatos sendo que sua ação pelo contato, inativa as enzimas essenciais dos fungos. Os objetivos deste trabalho foram: caracterizar físico-quimicamente amostras de solo rizosférico com histórico de aplicação do Mancozeb; isolar bactérias desse solo; caracterizar os isolados com ensaios bioquímicos e ferramentas moleculares; obter o crescimento dos isolados em meio mínimo acrescido do fungicida; estabelecer uma coleção de bactérias com potencial de biorremediação. Amostras de solo foram coletadas e determinaram-se suas características físico-químicas. As bactérias foram isoladas a partir de técnicas de isolamento em dois meios de cultura diferentes: meio mínimo e meio Busheel Haas acrescidos de  $3,6\text{gL}^{-1}$  de Mancozeb. As linhagens isoladas foram submetidas a ensaios em meio mínimo para verificar o potencial de degradação dessas bactérias ao agrotóxico. Realizou-se a identificação por meio da caracterização fenotípica, utilizando-se de ensaios bioquímicos, para determinar o gênero e identificação molecular pelo emprego do sequenciamento da região 16S, com os iniciadores 1492R, 513F, os quais amplificam 1000 pares de base. Os 23 isolados de bactérias foram identificadas em quatro famílias quatro gêneros e onze espécies. A família *Bacillaceae* foi a mais representativa, com 86,95% dos isolados. Esses ensaios proporcionaram verificar a tolerância das bactérias isoladas em concentrações superiores as usadas em campo para o controle de pragas. A coleção de microrganismos decorrentes da realização dessa pesquisa poderá servir para estudos futuros envolvendo a biodegradação de xenobióticos.

**Palavras-chave:** Agrotóxicos, bactérias, degradação.



**LISTA DE FIGURAS**

Figura 01: Características do fungicida: .....	19
Figura 02: Decomposição do Mancozeb.....	20
Figura 03: Mapa de localização da área a qual foram retiradas as amostras .....	50
Figura 04: Área de cultivo de <i>Allium Fistollium</i> .....	51
Figura 05: Gram positivo, Gram negativo .....	55
Figura 06: Isolamento bacteriano em meio mínimo .....	55
Figura07: Purificação de bactérias pela técnica de esgotamento .....	55
Figura 08: Ensaio de fermentação e oxidação .....	58
Figura 09: Utilização de distintas fontes de carbono.....	59
Figura 10: Determinação da atividade enzimática da amilase . .....	59
Figura11: Hemólise bacteriana nos isolados .....	60
Figura 12: Presença de esporos, observados no microscópio de contraste de fase .....	62
Figura 13: Antibiograma realizado .....	64
Figura 14: Extração de DNA bacteriano genômico.....	69

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 01: Análise química do solo.....	51
Tabela 02: Análise física do solo.....	52
Tabela 03: Características de suas colônias, formas e ensaio Gram dos isolados bacterianos. ....	54
Tabela 04: Identificação fenotípica dos isolados.....	61
Tabela 05: Ensaio de sensibilidade antimicrobiana á antibióticos nos isolados Gram positivos. .	65
Tabela 06: Percentual de resistência dos á antibióticos dos 9 isolados. ....	66
Tabela 07: Resultados da identificação com o 16 S rRNA dos isolados de solo. ....	70
Tabela 08: Resultados da concentração inibitória mínima nos isolados bacterianos .....	77
Tabela 09: Identificação dos isolados e resultados do CIM.....	79
Tabela 10: Crescimento bacteriano em meio M9 acrescido de fungicida e glicose. ....	80

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO .....	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
3.1 Agrotóxicos.....	14
3.2 Fungicidas.....	17
3.3 Impacto dos agrotóxicos no solo- interação da microbiota com o pesticida. ....	21
3.4 Biodegradação de agrotóxicos .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Localização da área de estudo.....	27
4.2 Obtenção das amostras de solo para isolamento de microrganismos.....	33
4.3 Coleta de amostras para análise físico-química do solo .....	28
4.4 Caracterização do solo.....	28
4.5 Extração com KCl 1M de Cálcio, Magnésio e Alumínio .....	29
4.6 Cálcio e magnésio trocáveis .....	29
4.7 Alumínio trocável.....	30
4.8 Extração com solução de Mehlich1: fósforo, potássio e sódio.....	30
4.9 Potássio trocável.....	31
4.10 Sódio trocável .....	31
4.11 Fósforo remanescente .....	31
4.12 Determinação do sulfato.....	32
4.13 pH em água .....	32
4.14 pH em cloreto de potássio.....	32
4.15 Acidez potencial.....	33
4.16 Cultivo dos microrganismos em meio seletivo .....	34
4.17 Isolamentos de bactérias .....	34
4.18 Caracterização das bactérias .....	35
4.19 Caracterização fenotípica.....	35
4.20 Coloração de Gram.....	36

4.21 Utilização de Citrato.....	37
4.22 Provas fermentativas: .....	38
4.23 Hidrólise do amido .....	38
4.24 Ensaio em meio SIM .....	39
4.25 Ensaio da urease .....	40
4.26 Ensaio de catalase e oxidase .....	41
4.27 Ensaio de lactose .....	42
4.28 Ensaio de oxidação e fermentação .....	42
4.29 Hemólise bacteriana .....	43
4.30 Ensaio de Sensibilidade a Antimicrobianos .....	44
4.31 Caracterização molecular.....	44
4.31.1 Extração do DNA das bactérias .....	45
4.31.2 Reação em cadeia de polimerase PCR .....	46
4.31.3 Precipitação com Polietilenoglicol (PEG) .....	47
4.31.4 Reação de sequenciamento do gene 16S Rrna.....	47
4.31.5 Processamento e análise das sequências.....	48
4.32 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	49
4.33 Ensaio em meio mínimo.....	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	50
5.1 Área de obtenção das amostras .....	50
5.2 Características do solo.....	51
5.3 Isolamento das bactérias .....	53
5.4 Ensaio bioquímico.....	58
5.5 Ensaio de sensibilidade antimicrobiana (TSA) .....	64
5.6 Caracterização molecular.....	68
5.7 Análise das sequências .....	70
5.8 Concentração inibitória mínima (CIM) .....	76
5.9 Ensaio em meio mínimo acrescido do fungicida.....	80
6 CONCLUSÃO .....	84
7 REFERÊNCIAS.....	85

## INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos têm sido cada vez mais utilizados como a principal ferramenta de combate à pragas, insetos e plantas espontâneas nas lavouras. Para aumentar a qualidade dos produtos, diminuir as perdas de alimentos e reduzir os custos com mão de obra. O Brasil é o maior consumidor mundial deste produto, devido ao sistema de produção adotado, pela sua extensa área agrícola, e tamanho da produção correspondendo à maior área agricultável da América do Sul.

Grandes quantidades de agrotóxicos são utilizadas nas lavouras, dentre eles os fungicidas lideram o ranking de consumo. O Mancozeb é um fungicida com ação de contato, atua na inativação das enzimas essenciais para o crescimento e desenvolvimento dos fungos, largamente utilizados nos sistemas agrícolas nas culturas de arroz, café e couve.

A ampla utilização dessas substâncias vem aumentando a preocupação quanto às consequências dessas ao meio ambiente em que está sendo empregado, gerando pesquisas com o objetivo de estudar tanto o impacto desses agrotóxicos no solo, para determinar suas consequências sobre as populações microbianas, a capacidade que estas possuem em tolerar, resistir e degradar esses compostos em ambientes tanto aquáticos quanto terrestres.

A deterioração de certas moléculas químicas por organismos vivos é uma ferramenta tecnológica que está sendo utilizada para descontaminar ambientes com esses xenobióticos, diminuindo o impacto ambiental. Os locais onde ocorre maior prospecção desses microrganismos são águas e solos, pois esses são os maiores reservatórios de microrganismos, representam o repertório mais rico em diversidade química e molecular na natureza, constituindo a base de processos ecológicos, além de manterem relações vitais entre si e com os organismos superiores.

Dentre essas populações de microrganismos destacam-se as bactérias pela grande capacidade de adaptabilidade aos ambientes o que as torna um grande potencial para o uso em métodos de biorremediação dos solos e da água. Estes microrganismos possuem essa capacidade em decorrência dos processos de troca gênica, como mutação, combinação e transdução.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

- ✓ Isolar e identificar bactérias de solo rizosférico com potencial para biorremediação de *Allium fistollium L.* contaminados com agrotóxicos.

### **2.2 Objetivos específicos**

- ✓ Caracterizar físico-quimicamente amostras de solo rizosférico com histórico de contaminação por fungicidas na comunidade Nova Esperança em Manaus, AM;
- ✓ Isolar bactérias do solo rizosférico, em meios seletivos contendo o fungicida Mancozeb como única fonte de carbono;
- ✓ Realizar a caracterização morfológica e bioquímica das bactérias isoladas em meios seletivos;
- ✓ Identificar as bactérias isoladas utilizando técnicas moleculares;
- ✓ Estabelecer uma coleção de cultura com as bactérias isoladas, com potencial de biorremediação, identificadas e caracterizadas.

### **3.REVISÃO DE LITERATURA**

#### **3.1Agrotóxicos**

A partir da fixação do homem na terra pela prática da agricultura, iniciou-se o processo de domesticação e desenvolvimento de técnicas que levassem ao surgimento de uma produção com características desejáveis como: aumento da qualidade, tamanho, sabor, forma e quantidade de alimentos produzidos, provocando significativa perda da variabilidade genética nas espécies modificadas.

O sistema de produção que, a priori, atendia à necessidade básica das famílias, se modificou para aumentar a produção de alimentos, devido ao aumento significativo da população nas cidades, ocasionado pela crescente industrialização nos centros urbanos. Este agroecossistema que antes se compunha de vários elementos, agora se transformara num monocultivo cuja principal característica a baixa variabilidade genética, tornando-o muito vulnerável a incidência de pragas e doenças. No entanto, a transição do sistema de produção de policultivo para monocultivo ocorreu também pela influência do mercado de produtos químicos que não tinha como escoar esses produtos, haja vista que havia terminado a guerra do Vietnã na qual se utilizava intensamente o agente laranja (Dicloro-Difenil-Tricloroetano-DDT), um produto desfolhante que ajudava a visualização dos soldados nas florestas (LONDRES, 2011).

Iniciou-se então o processo chamado de revolução verde, um pacote tecnológico apoiado pela FAO (organização das Nações unidas para alimentação e agricultura) e pelo banco mundial promovendo fortemente a difusão dessa tecnologia que contempla o uso de sementes melhoradas, adubos agrícolas e agrotóxicos, além da criação do sistema de crédito rural que proporcionava

para os produtores uma série de isenções fiscais aos que aderissem ao uso dessas ferramentas tecnológicas. Desta forma intensificou-se o uso dos agrotóxicos nas lavouras (LONDRES, 2011).

O Brasil possui a maior área agricultável da América do Sul. Aliado a isso, para sustentar esta forma de produção lidera o consumo mundial de agrotóxicos, gerando uma receita de US\$ 7 bilhões e um consumo de 1 milhão de toneladas destes produtos (ANVISA, 2009). A indústria química teve uma expansão enorme no passar dos anos com o lançamento no mercado de aproximadamente 100.000 produtos químicos.

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, há cerca de 450 princípios ativos usados na produção de agrotóxicos registrados na ANVISA. Segundo Londres. (2011) alguns dos fatores que contribuíram e contribuem para isto são as diversas políticas voltadas para a seguridade deste sistema de produção. Destacam-se nestas políticas os créditos agrícolas, com obrigatoriedade da compra desses insumos, assim como o Programa Nacional de Defensivos Agrícolas, o qual proporciona financiamento para criação de empresas nacionais e instalação de empresas transnacionais de insumos agrícolas. Pode-se ainda mencionar as isenções fiscais e tributárias no comércio desses produtos as quais vigoram atualmente (Imposto sobre circulação de mercadorias e serviços- ICMS, Imposto sobre produtos industriais- IPI).

Os agrotóxicos são definidos conforme a Lei nº 7.802/89 como “os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos” (BRASIL, 1989).



Na última década o consumo dos agrotóxicos no Brasil, mais precisamente nos anos de 2001 a 2008, aumentou do faturamento de um pouco mais de 2 para 7 bilhões de dólares. E no ano de 2009, o faturamento deste setor chegou a US\$ 7,2 bilhões segundo dados do SINDAG-Sindicato Nacional da Indústria de Produtos de Defensivos Agrícolas (LONDRES, 2011).

De acordo com a ANVISA (2006), o registro de agrotóxicos no Brasil envolve diversos órgãos, sendo esses: o Ministério da Agricultura responsável pelo registro desses produtos, o Ministério do Meio Ambiente, responsável pela avaliação dos riscos e o Ministério da Saúde responsável pela avaliação dos riscos à saúde da população.

No Estado do Amazonas, apenas no mês de agosto de 2012, aprovou-se na Assembleia Legislativa (ALEAM) o projeto de Lei nº 181/2012 que trata sobre a produção, comercialização, armazenamento, utilização, transporte interno, destino final de embalagens vazias, controle, inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins. Apesar da existência da Lei Federal nº9.605/98 nenhum tipo de fiscalização ocorria no Estado, sendo sua compra e utilização realizada pelos agricultores sem o acompanhamento técnico previsto na Lei. Alguns cursos, sobre a forma adequada de utilização dos agrotóxicos, foram oferecidos pelo Instituto de Desenvolvimento Agropecuário e Florestal Sustentável do Estado do Amazonas (IDAM), todavia de forma muito incipiente.

A pluralidade de legislações culminaria no objetivo de minimizar os danos ambientais e à saúde da população se fossem cumpridas por todos: fabricantes, comerciantes, órgãos de legislação e agricultores. No entanto, na prática isto não ocorre, havendo um enorme descontrole no uso desses produtos, trazendo consequências danosas ao ambiente como a contaminação do

solo e da água; à saúde humana, intoxicações registradas pela vigilância em saúde, e resíduos de agrotóxicos nos alimentos e amplo acúmulo de resíduos com danos à vida selvagem.

Segundo a Lei nº 7.802/89, os agrotóxicos apresentam diferentes categorias, as quais são definidas a partir do poder de ação do ingrediente ativo sobre os organismos alvo: herbicidas, fungicidas, acaricidas, nematicidas entre outros (BRASIL, 1989).

### **3.2 Fungicidas**

Fungicidas podem ser definidos como compostos químicos ou biológicos, que protegem as culturas contra a ação de patógenos podendo promover a erradicação de infecções já estabelecidas. Esses produtos são constituídos de duas partes distintas: o ingrediente ativo, responsável pela ação do produto e o ingrediente inerte que serve de veículo e diluente para o princípio ativo.

O uso de fungicidas é um dos principais métodos de controle de doenças de plantas, quer pela facilidade de uso como também pelos resultados imediatos, porém seu constante uso pode promover a seleção de fungos resistentes colocando em risco a eficiência do método (STOLTE, 2006). A aplicação desses produtos para proteger sementes e plântulas de microrganismos patogênicos é uma prática comum na agricultura moderna.

O início de sua aplicação em grande escala para o controle de doenças ocorreu com a descoberta da calda bordalesa (mistura de sulfato de cobre e cal hidratada) em 1882. Por mais de 50 anos foi o mais utilizado (AZEVEDO, 2001). De acordo com a FAO os fungicidas são importantes insumos para a produção mundial de alimentos.

Esses podem ser classificados de acordo com a natureza química e modo de ação do produto. A classificação no modo de ação inclui os protetores ou de contato, erradicantes, sistêmicos, supressores, indutores de resistência, podendo assim ser dispostos como: Protetores com ação de contato e ação erradicantes, penetrantes com ação de profundidade, sistêmicos com ação sistêmica, com ação erradicante (ZAMBOLIM et al., 2002).

Os fungicidas de contato são poucos solúveis em água ou de solubilidade lenta. O conídio ou esporo do fungo para germinar necessita de água, ocorrendo a absorção desta com o ingrediente ativo que penetrará no interior das células do fungo. Portanto os fungicidas de contato atuam prevenindo a germinação e penetração dos fungos na planta hospedeira, também podendo ser denominados de protetores (ZAMBOLIM et al., 2002).

Os métodos de aplicação variam de acordo com a finalidade do tratamento, do tipo de formulação e da parte da planta a ser tratada. De maneira geral, os métodos empregados na aplicação desses produtos são: Pulverização, polvilhamento, tratamento do solo, método de dispersão, aplicação no sulco de plantio e fumigação (DUARTE, 2005).

Dentre estes o mais comum é a pulverização sendo aplicada em folhas, frutos e caules. A formulação denominada pó molhável é a mais usada neste método de aplicação. O diluente ou veículo comumente usado é a água, o método consiste na aplicação deste por via líquida, seja em suspensão, solução ou emulsão, sob a forma de gotículas, produzidas por pulverizadores. Neste processo obtém-se a melhor cobertura da superfície vegetal, e efeito residual mais prolongado devido à maior aderência e tenacidade obtida (DUARTE, 2005).

Os principais grupos químicos dos pesticidas são: os organoclorados a base de carbono com radicais de cloro, organofosforados que são compostos orgânicos derivados de ácido fosfórico, ácido tiosfosfórico e ácido ditiosfosfórico, carbamatos, derivados de ácido carbâmico, e

piretróides, compostos sintéticos que apresentam estrutura semelhante à piretrina, substância existente nas flores de *Chrysanthemum* (SAVOY, 2011).

Os ditiocarbamatos (DTC) são compostos orgânicos sulfurados derivados dos bisditiocarbâmico com estrutura química  $(C_4H_6N_2S_4Mn) \times Zn$  sendo amplamente utilizado nas lavouras de hortaliças. Pertencem ao grupo dos fungicidas, foram desenvolvidos na década de 1930 e 1940 e até os dias atuais são mundialmente empregados, possuindo ação contra aproximadamente 400 patógenos. Esse grupo é extremamente tóxico aos seres humanos, causando opressão torácica, vertigem, hipotensão grave, náuseas e vômitos entre outros (ROSA, 2009).

O fungicida/acaricida Mancozeb é encontrado pelo nome comercial de Dithane NT, Manebe e Manzebe. Sua denominação química é etileno-bis-ditiocarbamato de manganês e zinco (Figura 01). O Mancozeb foi comercializado no início dos anos 60, pela companhia Rohm & Hass e Du Pont e é definido como sendo um sal complexo de manebe (contém Mn 2+) e zinebe (contém Zn). Possui ambos os metais na sua estrutura sendo que seu espectro antifúngico e demais propriedades são muito semelhantes às do manebe, porém com zinco, o que diminui sua fitotoxicidade (ROSA, 2009). Encontrado na forma de pó molhável, sendo aplicado nas lavouras por aplicações com bombas pulverizadoras, possui intervalo de segurança de 14 dias. Sua ação nos fungos se dá pela inativação de enzimas essenciais.

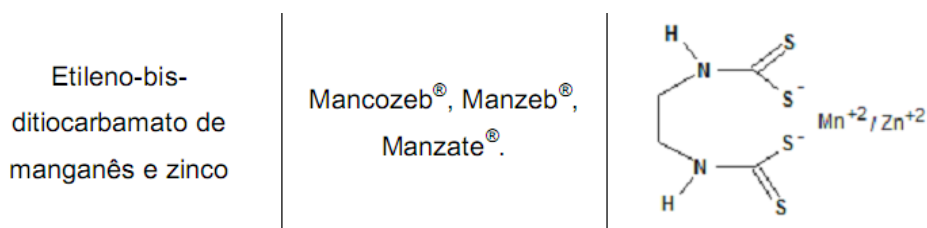


Figura 01: Características do fungicida, nome químico, nome comercial, fórmulas estruturais. Fonte: ARCANJO, 2007

Segundo a Lei nº 7.802/89 possui classificação toxicológica I - extremamente tóxico classificação do potencial de periculosidade ambiental II, produto muito perigoso ao meio ambiente, altamente tóxico para microrganismos, minhocas e organismos aquáticos.

Os metabólitos dos ditiocarbamatos são os isotiocianatos os quais podem interromper a síntese protéica e o metabolismo, agindo através da inativação dos grupos S-H em aminoácidos, enzimas e proteínas (GUVENL et al., 2003).

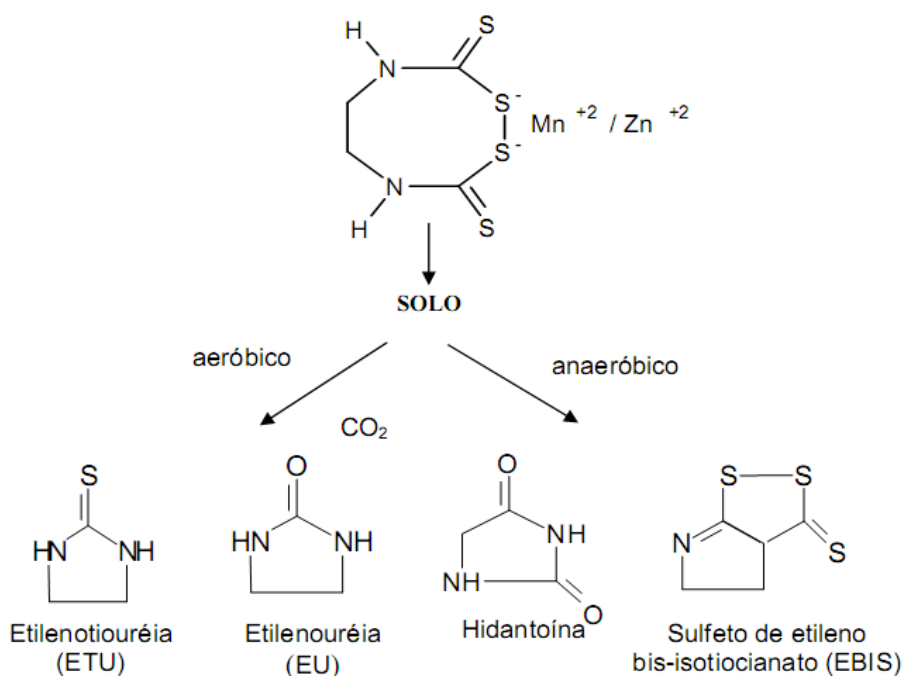


Figura 02: Decomposição do Mancozeb. Fonte: ARCANJO 2007

### **3.3 Impacto dos agrotóxicos no solo- interação da microbiota com o pesticida.**

Os solos sustentam uma enorme diversidade de organismos que interagem entre si e exercem funções fundamentais à manutenção da fertilidade e à nutrição e proteção das plantas. A esta enorme diversidade presente nos solos corresponde um complexo sistema de relações estabelecidas entre os organismos, plantas, restos de vegetais e animais que compõe a matéria orgânica do solo, contribuindo de forma determinante na dinâmica de ciclagem e disponibilização de nutrientes, agregação e estrutura do solo e proteção de plantas (CASARINO et al., 2008 ).

A microfauna do solo possui papel fundamental na ciclagem de nutrientes, através da decomposição de matéria orgânica, estabelecendo uma relação de interdependência com os restos vegetais, da mesma forma, influenciando vários níveis da cadeia trófica, estabelecendo relações com a micro, meso e macrofauna do solo. A biota do solo exerce importante papel na agregação do solo, onde microrganismos possibilitam a estabilização de agregados, pela formação de materiais húmicos degradados. Assim essa fauna também age nesta agregação pela ingestão, decomposição e excreção de materiais do solo, misturando compostos orgânicos e minerais (LOPES, 1997).

Primavesi (1980) ressaltou que o processo de decomposição da matéria orgânica é complexo, uma sequência de oxidações e reduções, que demandam várias etapas de transformação, sendo que para cada uma delas existem organismos específicos, bactérias e ou fungos, que possuem enzimas específicas para cada processo químico. No caso dos solos tropicais, a presença desta diversidade de organismos é ainda mais importante. A autora afirmou que a proliferação dos microrganismos é determinada pelo pH, temperatura, umidade, tipo da matéria orgânica e pela riqueza mineral do solo.

A junção destes fatores determina quais tipos de organismos irão se estabelecer e qual o nível de atividade que será desenvolvida. As altas temperaturas (acima de 20 °C) e umidade dos solos tropicais determinam um predomínio de bactérias no processo de decomposição e ciclagem, sendo estas extremamente ativas, não permitindo o acúmulo de húmus, que é formado basicamente pela atuação de fungos, presentes em condições de níveis mais baixos de temperatura e umidade; sendo que ambos demandam um adequado arejamento dos solos para seu bom desenvolvimento (PRIMAVESI, 1980).

A possibilidade de solos tropicais manterem uma vegetação exuberante e de grande porte está diretamente relacionada com a ação dos organismos do solo. Nos trópicos, os solos sofrem maior nível de intemperização e lixiviação, portanto, geralmente, são mais pobres mineralogicamente. Contudo o processo de desenvolvimento da vegetação está determinado pelos altos níveis de ciclagem de nutrientes, possibilitados pela ação da biota do solo (PRIMAVESI, 1980).

Como exemplo pode-se tomar os solos amazônicos, onde solos de horizonte A delgado e de origem mineralógica relativamente 'pobre', mantêm altos níveis de produção vegetal pela rápida circulação de nutrientes, possibilitada pela decomposição da matéria orgânica pelos organismos do solo, havendo pouco acúmulo de material, porém alta disponibilização de nutrientes (LOPES ASSAD, 1997).

No solo, um dos maiores prejuízos causados pela excessiva quantidade e diversidade de substâncias químicas lançadas sobre ele é a redução da biodiversidade e a supressão de microrganismos que possuem funções importantes na quebra da matéria orgânica, fixação de nutrientes e na participação da catálise do ciclo de vários nutrientes (MESQUITA, 2006).

A introdução de agrotóxicos no solo pode exercer uma pressão de seleção nos organismos, alterar a dinâmica bioquímica acarretando mudanças na função do ecossistema e na biomassa microbiana (ANDRIGHETTI, 2011).

A população microbiana pode sofrer uma drástica redução quando em contato com esses produtos. Foi observada a redução significativa de fungos, actinomicetos e bactérias através da aplicação do composto carbendazim-mancozeb nas populações alvo e não alvo. Isto ocorre até nas doses recomendadas pelo fabricante, confirmando grandes efeitos na microbiota do solo após sucessivas aplicações, além do impacto na transformação do nitrogênio, na atividade celulolítica e na atividade de pectinase por essas comunidades (FAWOLE, 2009).

Contudo, a população microbiana se restabeleceu em 21 dias, demonstrando assim a capacidade adaptativa dessas às mudanças ambientais, desenvolvendo em certas circunstâncias estratégias à sua sobrevivência. Outro resultado bastante interessante foi a não significância da elevação das doses desse composto fúngico sobre a população alvo, sendo inválido desta forma o aumento das quantidades tão praticado nas lavouras agrícolas pelos agricultores (FAWOLE, 2009).

As propriedades físico-químicas, o modo de aplicação, a frequência de uso desses produtos aliadas as características do meio ambiente, como os fatores bióticos e abióticos, podem determinar o destino desses no ambiente ao qual esta sendo empregado. Alguns processos do comportamento e interação, apesar de não seguirem um modelo, para determinados produtos são conhecidos, tais como: retenção, transformação e transporte. O considerável volume de agrotóxicos aplicados vem trazendo uma série de transtornos e modificações no ecossistema (RIBAS e MATSUMURA, 2009).



O impacto dos agrotóxicos não é sempre óbvio, porém geralmente residual. Provoca efeitos muito mais sérios do que se aparenta tais como a mudança adversa na qualidade ambiental, que pode reduzir o potencial produtivo, ao invés da aparente toxicidade (AZEVEDO et al., 1997).

Os agrotóxicos figuram atualmente como um dos principais poluidores e agentes causadores de impacto nos agroecossistemas, principalmente no solo. Eles são responsáveis pelas mais diversas interações, que muitas vezes levam à degradação dos recursos naturais fundamentais para a fertilidade do solo, alterações na sua estruturação e principalmente na supressão de determinados organismos vivos do solo que atuam diretamente na ciclagem de nutrientes. Essa alteração na diversidade de microrganismos provoca uma eliminação de espécies sensíveis e a proliferação de outras resistentes ou mais tolerantes aos agrotóxicos, em um processo conhecido como redundância. Os recordes de safra são obtidos à custa da utilização de toneladas de agrotóxicos gerando os mais diversos impactos no meio ambiente e alterando decisivamente a biota e a biodiversidade dos ecossistemas (MESQUITA, 2006).

### **3.4 Biodegradação de agrotóxicos**

Biorremediação é um processo no qual as plantas e microrganismos são utilizados para remover ou reduzir muitos compostos poluentes do ambiente. Uma das características da população microbiana é a capacidade de adaptação à presença desses compostos químicos. O sistema metabólico que se tem mostrado mais aptos para biodegradar moléculas xenobióticas recalcitrantes nesses processos é o microbiano, uma vez que os microrganismos desempenham a

tarefa de reciclar a maior parte das moléculas da biosfera, participando ativamente dos principais ciclos biogeoquímicos e representando, portanto, o suporte de manutenção da vida na Terra (GAYLARDE et al., 2005).

Essas populações adaptadas por meio de mutação, indução ou inibição seletiva de um ou mais membros da comunidade microbiana podem degradar mais rapidamente os pesticidas. Outro fator é o mecanismo de conjugação, troca de material genético que pode ocorrer entre microrganismos na natureza e constitui um fator que contribui para o potencial biodegradador de uma comunidade. Esse material pode ser trocado entre bactérias de uma mesma espécie ou mesmo entre microrganismos de espécies diferentes (GAYLARDE et al., 2005).

Os microrganismos exibem duas estratégias ecológicas para metabolismo de pesticidas: o cometaolismo, o processo no qual o microrganismo enquanto se desenvolve tem a capacidade de transformar outro composto sem derivar um benefício direto deste metabolismo; o microrganismo pode transformar o pesticida, sem retirar energia para o seu desenvolvimento. E a mineralização, no qual o substrato absorvido é degradado até carbono, água e sais inorgânicos (MELO, 2006).

O isolamento de microrganismos degradadores de defensivos agrícolas é importante para determinar o mecanismo do processo de biodegradação microbiana e da evolução dos genes e enzimas envolvidos neste, assim como para utilizar os microrganismos para destoxificação e descontaminação de ambientes terrestres e aquáticos. É importante também caracterizar os produtos da hidrólise destes compostos, pois esses podem ser mais tóxicos que a molécula inicial (CHICA-CARDONA, 2011).

Alguns microrganismos já são conhecidos pela sua capacidade de degradar pesticidas como a *Chelatobacter heintzii* que degrada a atrazina (ROUSSEAU et al., 2003). Melo (2006)

observou que os solos de rizosfera contaminados com Diuron apresentaram uma evolução de CO<sub>2</sub> três vezes maior comparado com solos da mesma área sem vegetação, indicando possível degradação desse composto pela *Acinetobacter baumannii* presente na rizosfera.

O fungicida clorotalonil, de amplo espectro, sofre degradação microbiológica, mas pode ser persistente devido à adsorção e dessorção pelos colóides do solo. Bactérias degradadoras foram isoladas e caracterizadas mostrando que os compostos orgânicos foram degradados acima de 80%. O grupo de bactérias que se destacou foi actinomicetos identificados como: *Arthrobacter nicotinovorans*, *A. globiformis*, *A. ilicis* e *A. ureafaciens* (FAY et al., 2004).

Góes (2009) isolou e caracterizou por meio da identificação por análise do 16S rRNA *Staphylococcus* sp., *Pandoreae* sp., *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus* sp. em solos com histórico de aplicação de acefato, composto pertencente ao grupo dos organofosforados. *Rhodococcus* sp. apresentou melhor desempenho com degradação de 99,24%, quando o acefato foi avaliado combinado com outras fontes de carbono e nitrogênio o resultado da degradação para essa espécie foi de 19%. *Staphylococcus* sp., *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pandoreae* sp., não mantiveram o crescimento quando a única fonte de carbono foi o acefato.

Estas linhagens apresentaram crescimento em acefato como fonte de nitrogênio e enxofre, porém nas análises de cromatografia gasosa e espectrometria de massa demonstraram que não houve degradação nestas condições.

Estudos com este mesmo grupo químico, no entanto, com o inseticida Diazinon mostraram isolamento de *Pseudomonas* sp. e *S. marcenses*, apresentando uma taxa de degradação de 87 e 83% aos 42 dias, para *S. liquefaciens* essa taxa foi menor, com degradação de 74%. O melhor resultado foi apresentado para o consórcio das três espécies com percentual de degradação superior a 90% (CYCON et al., 2009).

Nas últimas décadas, têm sido desenvolvidas inúmeras técnicas de classificação e identificação de microrganismos, mais precisamente a partir da década de 80 tornando-as cada vez mais rotineiras na análise de diversidade genética dos isolados de solos. E esses métodos obtiveram um grande impulso com o desenvolvimento da reação em cadeia de polimerase (PCR) descrita por Saiki et al. (1985). Esta técnica permite amplificar pequenos e específicos segmentos do genoma, permitindo a obtenção *in vitro* de várias cópias de determinada região do DNA. Todas as técnicas de classificação se baseiam, direta ou indiretamente, na informação genética contida na célula, independentemente do componente celular em análise. No caso do seqüenciamento com o gene 16S rRNA utiliza-se da comparação entre zonas conservativas deste gene.

#### **4. MATERIAL E MÉTODOS**

##### **4.1 Localização da área de estudo**

A coleta das amostras de solo foi realizada na Comunidade Nova Esperança, Ramal Nova Esperança, Bairro Jorge Teixeira, zona Leste do município de Manaus-AM. Esta região é composta de 98 produtores familiares, os quais utilizam sistemas convencionais de produção, em 415 casas de vegetação, tendo como principal fungicida utilizado o Dithane NT\*. A Área total existente é de 49, 375 hectares, e a área cultivada é de 33,186, com produção anual de 498.936 toneladas de hortaliças. As principais plantas cultivadas na área são: cebolinha (*Allium fistollium* L.), coentro (*Coriandrum sativum* L.), alface (*Lactuca sativa* L.) e couve (*Brassica oleraceae* L.) os quais irão abastecer os mercados e feiras de Manaus (OLIVEIRA FILHO et al., 2009). A

coleta das amostras se deu nas seguintes coordenadas geográficas: amostra um, Latitude  $3^{\circ}0'56,87''$ ; Longitude  $59^{\circ}55'15,18''$ ; amostra dois Lat.  $3^{\circ}0'56,97''$ ; Long.  $59^{\circ}55'13,24''$ ; amostra três: Lat.  $3^{\circ}0'57,43''$ ; Long.  $59^{\circ}55'14,41''$ ; amostra quatro Lat.  $3^{\circ}0'57,82''$ ; Long.  $59^{\circ}55'13,22''$ ; amostra cinco Lat.  $3^{\circ}0'57,90''$ ; Long.  $59^{\circ}55'15,18''$ .

#### **4.2 Coleta de amostras para análise físico-química do solo**

Para as análises de solo foram coletadas cinco subamostras de forma aleatória nas profundidades de 0-10 cm e 10-20 cm. Essas foram homogeneizadas constituindo 2 (duas) amostras compostas. Após a coleta as amostras de solo foram secas em local ventilado e peneiradas em peneira de dois milímetros, e encaminhadas ao Laboratório de Solos da Universidade Federal do Amazonas. Consideraram-se as características do solo para a análise físico-química a fim de identificar: a umidade, a textura, os macro e micronutrientes.

#### **4.3 Caracterização do solo**

Foram realizadas as análises de extração de cálcio, magnésio, alumínio trocável, enxofre, boro, fósforo e fósforo remanescente, potássio, pH em água, e pH cloreto de potássio (KCl), acidez potencial e granulometria, de acordo com o manual de análises químicas de Solos, plantas e fertilizantes (SILVA, 2009). Todas as etapas foram realizadas no Laboratório de Solos da Universidade Federal do Amazonas.

#### 4.4 Extração com KCl 1 M de cálcio, magnésio e alumínio

Realizou-se a extração a partir de 10 cm<sup>3</sup> de Terra Fina Seca ao Ar (TFSA) em frascos Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 100 ml de solução de KCl 1M, agitou-se a solução por cinco minutos em agitador horizontal circular. Deixou-se então a amostra decantando por uma noite.

O cálcio e magnésio foram extraídos por KCl 1M em conjunto com o Alumínio trocável, titulando-se, numa fração do extrato, o alumínio com o hidróxido de sódio (NaOH), na presença de azul de bromotimol como indicador. Em outra fração do extrato, foram titulados o cálcio e o magnésio por complexometria com EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), usando como indicador o negro de eriocromo T. Numa terceira alíquota, foi feita a determinação de cálcio por complexometria com EDTA e ácido calcon carbônico como indicador (SILVA, 2009).

#### 4.5 Cálcio e magnésio trocáveis

Para determinar o teor de magnésio utilizou-se o método complexométrico com emprego de EDTA.

Pipetou-se 25 mL do extrato para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 4 mL do coquetel de cianeto de potássio, trietanolamina e solução tampão, adicionou-se 30 mg de ácido ascórbico e três gotas do indicador negro de eriocromo T. A titulação foi feita com sal dissódico de EDTA a 0.0125 M. A viragem se deu do róseo para o azul puro.

O teor de cálcio e magnésio existente na amostra foi dada pela igualdade  $\text{cmol de Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} / \text{dm}^3 \text{ de TFSA} = \text{mL de EDTA } 0,0125 \text{ M}^{-1} \text{ gastos na titulação}$  (SILVA, 2009).

#### **4.6 Alumínio trocável**

Para determinar o alumínio trocável utilizou-se o método volumétrico por titulação com hidróxido de sódio, após a extração do alumínio do solo por Cloreto de potássio 1 mol/ L.

Pipetou-se 25 mL do extrato para um frasco Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se três gotas do indicador azul de brometimol 1 g L<sup>-1</sup>. A titulação ocorreu em solução de hidróxido de sódio 0,025 M<sup>-1</sup>. A viragem ocorreu do amarelo para o verde. O teor de alumínio existente na amostra foi dado pela igualdade cmol de Al<sup>3+</sup>/dm<sup>3</sup> de TFSA = mL de NaOH 0,025 M<sup>-1</sup> gastos na titulação (SILVA 2009).

#### **4.7 Extração com solução de Mehlich1: fósforo, potássio e sódio**

A solução extratora de Mehlich 1, também chamada de solução duplo ácido ou de Carolina do Norte, é constituída por um mistura de HCl 0,05 M mais ácido sulfídrico 0,0125 M. O emprego desta solução baseia-se na solubilização desses elementos pelo efeito de pH, entre 2 e 3, sendo a função do cloreto o de restringir o processo de readsorção dos fosfatos recém extraídos (SILVA, 2009).

Colocou-se 10 cm<sup>3</sup> de TFSA em frasco Erlenmeyer de 125 mL, adicionou-se 100 mL de solução extratora duplo ácido (HCl 0,05M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,0125M<sup>-1</sup>), agitou-se por cinco minutos em agitador horizontal circular, deixando decantar por uma noite.

#### **4.8 Potássio trocável**

Método direto pelo fotômetro de chama Micronal B 462. Utilizou-se uma alíquota de 20 mL filtrada em papel filtro próprio para potássio. Levou-se o extrato ao fotômetro de chama para efetuar a leitura (SILVA, 2009).

#### **4.9 Sódio trocável**

Método direto pelo fotômetro de chama Micronal B 660 a um comprimento de onda de 660 nm. Utilizou-se uma alíquota de 20 mL filtrada em papel filtro próprio para potássio. Levou-se o extrato ao fotômetro de chama para efetuar a leitura (SILVA, 2009).

#### **4.10 Fósforo remanescente**

O fósforo remanescente permite caracterizar os solos em relação ao fator capacidade e estimar sua capacidade máxima de adsorção de fósforo.

Colocou-se 2,5 cm<sup>3</sup> de TFSA em frasco Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 25 mL da solução de cloreto de cálcio 0,01 M contendo 60 mg/L de fósforo, efetuou-se agitação por cinco minutos e repouso por 16 horas. Tomou-se uma alíquota de 0,5 mL de cada amostra e 0,5 mL da solução de CaCl<sub>2</sub> 0,01 mol/L, misturou-se 9,0 mL do reagente de trabalho. Após 30 minutos realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 725 nm (SILVA, 2009).



#### **4.11 Determinação do sulfato**

O método baseia-se em marcha analítica proposta por Vitti (1989), ou seja, a extração do sulfato por íons de fosfato (500 mg de P/L) dissolvidos em ácido acético 2 M e posterior quantificação do enxofre disponível pela medição, espectrofotômetro da turbidez formada pela precipitação de sulfato pelo cloreto de bário.

Em frasco Erlenmeyer de 125 mL adicionou-se 10 cm<sup>3</sup> de solo e 25 mL de ácido acético 2 M, agitou-se por 30 minutos, adicionou-se 500 mg de cloreto de bário e 1 mL de solução de cloreto de hidrogênio a 6 M. Realizou-se a leitura no espectrofotômetro no comprimento de onda de 420 nm.

#### **4.12 pH em água**

Medição eletroquímica da concentração efetiva de íons H<sup>+</sup> na solução do solo, por meio de eletrodo combinado, imerso em suspensão solo/água na proporção de 1:2,5. Colocou-se 10 cm<sup>3</sup> de TFSA em Becker identificados de 100 mL, adicionou-se 25 mL de água destilada, agitou-se com bastão por 30 segundos e repouso por uma hora. Posteriormente foi realizada a leitura.

#### **4.13 pH em cloreto de potássio**

Colocou-se 10 cm<sup>3</sup> de TFSA em Becker numerado de 50 mL, adicionou-se 25 mL de cloreto de potássio a 1 M, agitou-se com bastão por 30 segundos e repouso por uma hora. Posteriormente realizou-se a leitura.

#### **4.14 Acidez potencial**

Extração da acidez potencial do solo com solução de acetato de cálcio e titulação alcalimétrica do extrato. A extração de  $H^+ + Al^{3+}$  pelo acetato de cálcio é baseada na propriedade tampão do sal, decorrente da presença de ânions acetatos, com pH ajustado a 7.0.

Colocou-se 5 cm<sup>3</sup> de TFSA em frasco Erlenmeyer de 125 mL adicionou-se 75 mL de acetato de cálcio a 0,5 M pH 7.1-7.2. Decantou-se durante uma noite. Pipetou-se 25 mL do extrato em um frasco Erlenmeyer de 125 mL. A titulação ocorreu com a solução de hidróxido de sódio 0,025 M, usando três gotas de fenolftaleína a 10 g L<sup>-1</sup> como indicador. Mudança de incolor para rósea persistente.

#### **4.15 Obtenção das amostras de solo para isolamento de microrganismos**

As amostras foram coletadas no período da manhã da região rizosférica da cultura de cebolinha. Coletou-se 5 (cinco) subamostras, as quais foram homogeneizadas para formar uma amostra composta. Essa foi acondicionada em saco plástico estéril devidamente identificado e armazenado a - 4 °C no Laboratório de Genética da Faculdade de Ciências Agrárias no Campus da Universidade Federal do Amazonas.

#### 4.16 Cultivo dos microrganismos em meio seletivo

As bactérias foram isoladas em meios seletivos contendo agrotóxicos como única fonte de carbono. O fungicida utilizado foi o Mancozeb de nome comercial Dithane\* NT, sua dose recomendada para controle como fungicida nas lavouras é de 2 a 3 Kg por ha<sup>-1</sup>.

Desta forma foi pesado 200 g de solo rizosférico mantidos em incubadoras de 5,0 L com 3 L do meio Bushell Hass BH: MgSO<sub>4</sub> .7H<sub>2</sub>O, (0, 20 g); K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>( 1,0 g); NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> (1,0 g); FeCl<sub>3</sub> . 6 H<sub>2</sub>O (0,05 g); CaCl<sub>2</sub> (0,02g) e o meio de cultivo quimiostático (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,75 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1,0 g; MgCl<sub>2</sub>. 6H<sub>2</sub>O, 0,2 g; NaCl, 0,1g; FeCl<sub>3</sub> . 6 H<sub>2</sub>O, 0,02 g; CaCl<sub>2</sub>, 0,01g; H<sub>2</sub>O destilada 999 mL mais 1 mL de elementos traços: H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub>, 1,5.10<sup>-4</sup> %; MnSO<sub>4</sub>, 8,0.10<sup>-5</sup> %; ZnSO<sub>4</sub> .7 H<sub>2</sub>O, 6,0.10<sup>-5</sup> %; CuSO<sub>4</sub>.5 H<sub>2</sub>O, 2,5. 10<sup>-6</sup> %; CaSO<sub>4</sub> . 7H<sub>2</sub>O, 1,0.10<sup>-7</sup>), tendo como única fonte de carbono o Dithane\* NT a 3,6 g L<sup>-1</sup>.

A incubação ocorreu a 28 °C por sete dias. Após esse período 100 mL do meio fermentado foi retirado e inoculado novamente em 3 L do mesmo meio acima citado e incubado por mais sete dias nas mesmas condições de cultivo. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, quando então se procedeu à diluição em série (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> ) do meio de cultivo da última fermentação e semeadura em placas de Petri em meio BH e quimiostático (PROCÓPIO, 2007).

#### 4.17 Isolamentos de bactérias

Para obtenção das culturas isoladas repicou-se todas as colônias de microrganismos que se desenvolveram nas placas e purificou-se pela técnica de esgotamento por estrias. Após terem

sido purificadas as mesmas foram devidamente identificadas e armazenadas em triplicata em microtubos de 1 mL (310 µL da cultura crescida em Meio Luria-Bertani – LB- (Tryptona – 1 g Extrato de Levedura - 0,5 g , NaCl – 1 g), e 690 µL de glicerol 50% , autoclavados, e guardados a -80 °C .

#### **4.18 Caracterização das bactérias**

A identificação das bactérias isoladas foram realizadas em duas etapas, uma fenotípica, onde as bactérias foram submetidas a 16 ensaios bioquímicos e outra molecular no qual utilizou-se parte do gene 16S rRNA.

#### **4.19 Caracterização fenotípica**

A identificação fenotípica bacteriana baseia-se em uma série de ensaios bioquímicos os quais verificam as reações metabólicas dos microrganismos, características morfológicas das colônias (BANDO, 2008). A identificação fenotípica foi baseada no Manual de Bergey`s de Sistemática Bacteriológica (VOS et al., 2009) e Manual de Microbiologia Clínica para Controle de Infecções de Serviços de Saúde, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Realizou-se 16 ensaios, descritos abaixo:

O método de coloração de Gram, verificação de enzimas de oxidase, catalase, ensaios de oxidação e fermentação, motilidade, produção de H<sub>2</sub>S, utilização de uréia e citrato e provas fermentativas, com glicose, inositol, sorbitol arabinose, ensaio de fermentação de lactose, hemólise e verificação de enzimas de  $\alpha$ ,  $\beta$  amilase e triptofanase. Em todos os ensaios os

materiais, como placas de Petri, tubos, e os meios utilizados foram devidamente autoclavados a 121 °C por 20 minutos, esses foram realizados em duplicata, e incubados a temperatura de 30 °C, a leitura dos ensaios foi realizada em 18-24 horas após incubação.

#### **4.20 Coloração de Gram**

A técnica da coloração de Gram separa as bactérias em dois grandes grupos, Gram positivas e negativas de acordo com a composição de sua parede celular, tendo a Gram positiva uma parede celular com menos lipídeos facilitando a fixação do corante cristal violeta. A parede celular das Gram negativas possui grande quantidade de lipídeos que aumenta a permeabilidade aos solventes orgânicos permitindo a descoloração (ALTERTHUM, 2008).

Para o ensaio de coloração de Gram foi feito um pré-inóculo em placas, que posteriormente foram colocadas em lâminas de vidro com o auxílio de alça bacteriológica em uma gota de 10 mL de água deionizada. Para fixar o material na lâmina passou-se a mesma sobre a chama do bico de bunsen. Após, cobriu-se o material com a solução violeta genciana por um minuto, esta foi lavada em seguida com água corrente, cobriu-se o material com lugol por um minuto, lavou com álcool-acetona, solução descorante por 15 segundos, lavou com água corrente e finalmente cobriu-se com solução de fucsina por um minuto. As lâminas foram deixadas em temperatura ambiente na posição vertical para secar e posteriormente serem visualizadas no microscópio óptico no aumento de 100 vezes (MARTINEZ et al., 2008).

#### 4.21 Utilização de citrato

Permite diferenciar microrganismos de acordo com sua capacidade para usar o citrato como única fonte de carbono. Na ausência de glicose ou lactose fermentáveis, alguns microrganismos são capazes de usar o citrato como única fonte de carbono para produzir energia. Esta capacidade depende da presença de citrato permease que facilita o transporte do citrato para a célula. Uma vez dentro da célula o citrato é degradado pela enzima citrase, produzindo ácido oxalacético e acetato. Estes produtos são depois convertidos enzimaticamente em ácido pirúvico e  $\text{CO}_2$ .

O meio de Simmons contém citrato de sódio como única fonte de carbono,  $\text{NH}_4^+$  como fonte de nitrogênio e o indicador de pH, azul de bromotimol. Esta prova é feita em tubos em rampa, uma vez que o  $\text{O}_2$  é necessário para a utilização do citrato. Quando o microrganismo remove o citrato do meio e o oxida, ocorre liberação de  $\text{CO}_2$ . Durante esta reação o meio torna-se alcalino, pois o  $\text{CO}_2$  gerado combina-se com sódio (fornecido pelo citrato de sódio) e água para formar carbonato de sódio, que é um produto alcalino. A presença de carbonato de sódio faz aumentar o pH e virar o indicador de pH do meio de verde para azul forte (FRANZOLIN, 2008).

Foi preparado o pré inóculo em tubos contendo 5 mL de meio LB, colocou-os em agitação a 180 rpm, a 30 °C. Após 18 horas esse inóculo foi colocado com um auxílio de uma alça de platina em tubos contendo 3mL de meio Simmons os quais foram colocados em incubadora a temperatura acima citada na posição de rampa. As leituras ocorreram 24 horas após a incubação, as culturas positivas para citrato foram identificadas pela presença de crescimento bacteriano, na superfície da rampa, acompanhado de coloração azul no meio de cultura. Nas

culturas citrato negativa a cor do meio manteve-se verde e não apresentaram crescimento no meio de cultura.

#### **4.22 Provas fermentativas**

Foram realizados os ensaios com fonte de inositol, sorbitol, arabinose a 5% no meio vermelho de fenol. . Neste ensaio verificou-se a produção de gás e fermentação dos carboidratos, através do processo metabólico oxidação redução que ocorre em condições anaeróbicas. Na fermentação desses açúcares ocorre a formação de ácidos orgânicos que fazem o pH do meio diminuir. Essa acidificação do meio modifica sua coloração.

Este ensaio iniciou-se com o preparo de um pré-inóculo, crescidos em 24 horas os quais foram colocados com auxílio de uma alça de platina em tubos contendo 3 mL de meio vermelho de fenol. A leitura para verificação da fermentação dos açúcares foi observada pela mudança de cor do meio de vermelho para amarelo. Para verificar a produção de gases utilizaram-se tubos de Dühran invertidos. A produção de bolhas no interior desses tubos evidenciou a presença de gases.

#### **4.23 Hidrólise do amido**

As moléculas de amido são constituídas por amilose e amilopectina que são rapidamente hidrolisadas por algumas bactérias, a partir da, originando dextrinas, glicose e maltose. Estes ensaios foram realizados com a inoculação de culturas frescas pelo auxílio de uma alça bacteriológica em placas de Petri, contendo o meio comercial batata dextrose agar (BDA) fabricante Himedia acrescido de 1% de amido.

Para leitura desta prova utilizou-se a solução de iodo para indicar a presença de amido. Quando o iodo entra em contato com o amido forma um complexo azul acastanhado. O amido hidrolisado não produz alteração de cor forma-se um halo (zona clara) após adição de iodo caso haja produção de  $\alpha$ -amilase pela bactéria. Se não ocorrer a formação do halo, o amido não foi hidrolisado.

#### **4.24 Ensaio em meio SIM**

Neste ensaio verificaram-se três características importantes das bactérias, a presença da enzima triptofanase, motilidade e produção de ácido sulfídrico ( $H_2S$ ). Para a inoculação da bactéria no meio comercial SIM fabricante Himedia, utilizou-se uma agulha bacteriológica.

##### **4.24.1 Prova do indol**

O triptofano é um aminoácido essencial que pode sofrer oxidação pelas atividades enzimáticas de algumas bactérias. A conversão do triptofano em produtos metabólicos é mediada pela produção da enzima triptofanase que oxida o triptofano até indol.

Após o crescimento bacteriano se verifica a presença de indol adicionando-se o reagente de Kovac's (amarelo) ao longo das paredes do tubo, de modo que não se misture com o meio de cultura. Este reagente reage com o indol produzindo um composto rosado (FRANZOLIN, 2008).



#### **4.24.2 Motilidade**

Por ser um meio semi sólido e as bactérias serem inoculadas na parte central deste, quando as mesmas são móveis se movimentam no meio tornando-o turvo, quando são imóveis seu crescimento fica restrito ao ponto onde foram inoculadas (FRANZOLIN, 2008).

#### **4.24.3 Produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S)**

Este ensaio determina a produção de ácido sulfídrico H<sub>2</sub>S, observada a partir da ação enzimática em aminoácidos sulfurados e tiosulfato de sódio, a qual produz uma coloração negra na linha onde ocorreu a inoculação da bactéria, sendo a prova positiva. Caso a linha fique inalterada a prova é negativa (FRANZOLIN, 2008).

#### **4.25 Ensaio da urease**

O objetivo deste ensaio foi determinar a capacidade do microrganismo em quebrar a uréia que é uma diamina do ácido carbônico em duas moléculas de amônia por meio da enzima urease. A urease é uma enzima hidrolítica que ataca a ligação entre o nitrogênio e o carbono em compostos como a uréia, formando o produto final alcalino, carbonato de amônia, além de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) e água H<sub>2</sub>O. Esta enzima é considerada constitutiva, pois é sintetizada pela bactéria na presença ou ausência da uréia (FRANZOLIN, 2008).

O preparo do meio ágar uréia Christensen ocorreu em tubos com quantidade de 3 mL acrescidos de 40% de uréia filtrado em filtros de membrana 0,45 µm, esses tubos foram

colocados inclinados para que formassem uma rampa, um ângulo de aproximadamente 45°. Foram inoculadas as colônias frescas de bactérias no meio. A leitura deste ensaio se deu pela mudança de coloração do meio, quando positivo ele modifica de amarelo para rosa.

#### **4.26 Ensaio de catalase e oxidase**

Este ensaio determina a capacidade dos microrganismos de produzir a enzima catalase para degradar o peróxido de hidrogênio. Através da visualização da formação de bolhas de gás (oxigênio livre) quando ocorre a adição de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Para realização deste ensaio com o auxílio de um bastão de vidro foram coletadas as colônias frescas e friccionadas sobre um papel filtro e sobre as colônias adicionou-se uma gota de peróxido de hidrogênio, o ensaio é positivo, caso não ocorra à formação dessas bolhas, o ensaio é negativo (FRANZOLIN, 2008).

Este ensaio permite distinguir grupos de microrganismos tendo como base a atividade da enzima citocromo oxidase, a partir da verificação das hemoproteínas que possuem ferro e se encontram na última molécula da ligação da cadeia respiratória aeróbia, esses elétrons são transferidos do hidrogênio ao oxigênio com a formação de água (FRANZOLIN, 2008).

Para este procedimento realizou-se um esfregaço das colônias frescas, com o auxílio de um bastão de vidro, sobre elas adicionou-se uma gota do reagente de Kovacs. A leitura do ensaio foi feita pela verificação da coloração rosa indicando ensaio positivo.

#### **4.27 Ensaio de lactose**

O meio MacConckey é seletivo e diferencial para bactérias fermentadoras e não fermentadoras. O cristal violeta inibe o crescimento de microrganismos Gram positivos especialmente enterococos e estafilococos. A concentração de sais de bile é relativamente baixa em comparação com outros meios, por isso não é tão seletivo para Gram negativos, contém vermelho neutro que cora bactérias fermentadoras de lactose, bactérias não fermentadoras não são coradas, suas colônias crescem e ficam transparentes ou incolores no meio (FLOURNOY, et l., 1990). As células frescas e purificadas foram inoculadas com auxílio de uma alça bacteriológica nas placas de Petri, com o meio comercial MacConckey preparado conforme indicação do fabricante (Himedia).

#### **4.28 Ensaio de oxidação e fermentação**

O açúcar é o substrato mais comumente utilizado no metabolismo fermentativo. Essa molécula sofre uma degradação parcial a moléculas orgânicas menores fornecendo energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina) para a célula. Durante o processo, a glicose é inicialmente degradada a piruvato na glicólise e este por sua vez é metabolizado a vários compostos de acordo com o tipo de fermentação e da espécie. As bactérias podem realizar tanto fermentação como respiração anaeróbica (TORTORA et al., 2000).

Para realizar este ensaio colônias frescas purificadas foram inoculadas com o auxílio de uma agulha bacteriológica no meio OF, distribuídos em tubos acrescidos de glicose a 20%, filtrada em filtros milipore 0,45 µm. Este ensaio foi feito em duplicata, pois as reações de

oxidação e fermentação são verificadas separadamente, visto que nos tubos de fermentação adicionou-se óleo mineral sobre a superfície do meio. A leitura do ensaio ocorreu pela mudança da coloração, quando os mesmos permanecerem verdes não houve utilização do carboidrato, reação de oxidação negativa, caso o meio tenha mudado para a coloração amarela, o ensaio é positivo. (FRANZOLIN, 2008).

#### **4.29 Hemólise bacteriana**

Vários patógenos sintetizam proteínas que atuam na membrana citoplasmática das células animais provocando lise celular, conseqüentemente a morte celular. É fácil detectar a ação destas toxinas, hemolisinas, com glóbulos vermelhos (eritrócitos e hemácias), esta verificação de hemólise pode ser observada através do inóculo bacteriano em placa de ágar sangue. Durante o crescimento das colônias certas quantidades de hemolisina são produzidas a partir da lise dos eritrócitos próximos, originando assim uma zona clara (halo) típica de hemólise, de acordo com o tipo de halo formado é possível distinguir os diferentes tipos de hemólises: alfa hemólise ( $\alpha$ )-halo de hemólise parcial, observa-se a coloração esverdeada ao redor das colônias em decorrência da perda massiva de potássio por parte dos eritrócitos do ágar sangue, beta hemólise ( $\beta$ )-halo de hemólise completo, observa-se a zona transparente formada ao redor das colônias. Bactérias não hemolíticas são denominadas gama hemolíticas ( $\delta$ ) (MADIGAN et al., 2004).

A atividade hemolítica foi verificada através da reação bacteriana após inoculação de colônias frescas no meio ágar sangue de carneiro desfibrinado a 7% (pronto para uso). A leitura da reação foi realizada por meio da observação dos halos formados ao redor das colônias bacterianas.

#### **4.30 Ensaio de Sensibilidade a Antimicrobianos (ESA)**

Para realizar o procedimento do ensaio de sensibilidade a antimicrobianos utilizou-se o Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a antimicrobianos (ANVISA/OPAS/SVS, 2006; NCCLS, 2003). Neste ensaio utilizaram-se unidades de multidiscos com os seguintes antimicrobianos: gentamicina 10 µg, oxacilina 1 µg, penicilina 10 µg, tetraciclina 30 µg, sulfatozimidazolidinona 25 µg, vancomicina 30 µg, clindamicina 2 µg, ciprofloxacina 5 µg, ceftiofona 30 µg, cloranfenicol 10 µg, eritromicina 15 µg, rifampicina 30 µg. Preparou-se o pré-inóculo numa concentração de 0,5 da escala de MC Farland, o swab foi embebido nesta solução, o mesmo foi comprimido contra as paredes do tubo para tirar o excesso e posteriormente semeou-se na superfície de uma placa de ágar Luria Bertani (LB). Após 15 minutos, com o auxílio de uma pinça flambada colocou-se as unidades de multidiscos sobre a superfície do meio inoculado. Após 18-24 horas a incubação em estufa a 30 °C, analisou-se o padrão de crescimento com o auxílio de uma régua foi medido o diâmetro de cada halo inibitório e o resultado pesquisado em tabelas apropriadas segundo a espécie bacteriana em análise.

#### **4.31 Caracterização molecular**

As colônias de bactérias isoladas em meios seletivos contendo Mancozeb foram identificadas por métodos moleculares, utilizando-se o sequenciamento do gene 16S rRNA, gene de uma região conservada em bactérias.

#### 4.31.1 Extração do DNA das bactérias

A extração do DNA se deu pelo método do fenol/clorofórmio (SAMBROOK e RUSSEL, 2001) com as seguintes modificações descritas.

Este procedimento iniciou-se pela preparação do inóculo no qual foram colocadas as células para crescerem em 5 mL de caldo LB, 180rpm , por 18 horas. Essas células foram coletadas por meio de centrifugação a 12000 g por dois minutos , e ressuspenso o sedimento em 1 mL de tampão TEN (NaCl 100 mM, Tris-HCl,50 mM, EDTA 50 mM, pH 8,0). Centrifugou-se a 12000 g por dois minutos, descartou-se o sobrenadante.

Para a etapa de rompimento da membrana celular (lise celular) ressuspenso o sedimento em 300 µ L de TEN, adicionou-se 30 µL de lisozima (20 mg/mL) e incubou por 40 minutos em temperatura ambiente, adicionou-se 50 µL de Triton X-100 10% e 30 µ L de NaCl 3 M, seguido da incubação a 60 °C por cinco minutos. Resfriou-se a solução a temperatura ambiente. Adicionou-se 1 µL de RNase A (10 mg/mL) e incubou por 15 minutos a 37 °C. Adicionou-se 0,1 V de SDS 10%, homogeneizou bem. Adicionou-se 3 µL de Proteinase K (10 mg/mL) e incubou por 30 minutos a 37 °C.

Para o processo de lavagem do DNA Adicionou-se 1 V de FENOL, agitou-se manualmente por cinco minutos, centrifugou-se a 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação formou-se duas fases, recuperou-se a fase superior, a fase aquosa. Adicionou-se 1V clorofane, Centrifugou-se 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente, e recuperou-se a fase aquosa, adicionou-se 1 V de clorofórmio, centrifugou-se 12.000 g por 10 minutos a temperatura ambiente.

Em seguida recuperou-se a fase aquosa final, para precipitar o DNA adicionou-se 0,1 V de NaCl 3 M vagarosamente 2,5 V de etanol 100% a -20 °C. Centrifugou-se a 12.000 g por 30 minutos. Descartou o sobrenadante.

Com o emprego do etanol lavou-se e ressuspendeu-se o sedimento, após centrifugou-se a 12.000 g por cinco minutos e desprezou o sobrenadante. O DNA extraído foi colocado no fluxo laminar para secar. Após ser seco foi dissolvido em 200 - 500 µL de tampão TE.

A quantificação do DNA foi realizada utilizando o aparelho Nano Drop. Foram selecionadas para a etapa seguinte amostras com concentração superior a 30 ng/µL.

#### **4.31.2 Reação em cadeia da polimerase PCR**

A amplificação do gene 16S rRNA foi realizada por meio da reação em cadeia de polimerase- PCR com oligonucleotídeos iniciadores: 530 F (5`-TGA CTG ACT GAG TGC CAG CMG CCG CGG-3`) e 1492R (5`TGA CTG ACT GAG AGC TCT ACC TTG TTA ACM CGM CTT 3`) que amplificam 1000 pares de bases. A amplificação consistiu de um volume final de 25 µL (MgCl<sub>2</sub> 50 mM, DNTPs 2,5 mM, 5 pmol/µL de cada iniciador, 1,25 U/µL de Platinum Taq DNA polimerase Hight Fidelity, tampão 10X, DNA bacteriano a uma concentração de 30 -100 ng, completou-se com água Meli-Q) (BORNEMAN e TRIPPLETT, 1997). Foi utilizado como controle o DNA bacteriano da *Escherichia coli* ATCC 25922.

O ciclo de amplificação consistiu no perfil térmico que se iniciou com a desnaturação inicial à 95 °C por dois minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação de fitas-molde a 95 °C por 40 segundos, o pareamento dos iniciadores se deu a 60 °C por 40 segundos e a extensão a 72 °C por um minuto, o aparelho utilizado neste procedimento dói um termociclador Biocycle.

O material foi analisado por eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE (Tampão de Tris HCl, EDTA e ácido bórico), utilizando para visualização o brometo de etídio (10 mg/mL). Os resultados obtidos foram visualizados em trans-iluminador em luz ultravioleta e fotografados em seguida para serem analisados.

#### **4.31.3 Precipitação com Polietilenoglicol (PEG)**

A precipitação com polietileno tem como objetivo purificar o DNA amplificado eliminando os resíduos gerados após as reações de PCR. Transferiu-se para as placas de PCR 30 µl de produto da PCR. Foi adicionado o mesmo volume de PEG e incubou-se por 37 °C por 15 minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos, em temperatura ambiente. Após inverteu-se a placa para descartar o sobrenadante, secando-a com papel toalha. Centrifugou-se novamente a 100 rpm por um minuto, adicionou 125 µL de EtOH 80% gelado, para lavar o pellet, centrifugou-se a 1450 rpm por dois minutos, a placa foi invertida e centrifugada a 100 rpm por um minuto. Ao final da precipitação a placa foi incubada a 37 °C por 15 minutos, as amostras foram ressuspensas em 20 µl de água Melli Q. O produto foi quantificado em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) e visualizadas em trans-iluminador com luz ultravioleta e fotografados.

#### **4.31.4 Reação de sequenciamento do gene 16S rRNA**

A reação de sequenciamento foi processada utilizando-se 2 µL de DNA, purificado (50 ng), em seguida preparou-se o mix da reação: 0,3 µL de ABI Big Dye do kit de reação Big Dye



Terminator Cycle Sequencing Applied Biosystems, 2  $\mu\text{L}$  do primer 530F e 1492R concentração de 5 pmol/ $\mu\text{L}$ ; 2  $\mu\text{L}$  de tampão 5X e completou-se com água Melli-Q para um volume final de 10  $\mu\text{L}$ . O perfil térmico consistiu de 25 ciclos, como segue: desnaturação de fitas-molde a 96 °C por 10 segundos, anelamento a 50 °C, com extensão a 60 °C por um minuto e 20 segundos.

Após a reação, as amostras foram precipitadas para o sequenciamento, conforme o protocolo de etanol-EDTA adicionou-se sobre 10  $\mu\text{L}$  de produto da reação de sequenciamento, 30  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto (100%) e 2,5  $\mu\text{L}$  EDTA 125 mM. O material foi homogeneizado em vórtex e incubado em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas durante 25 minutos em 2500 rpm, a 4 °C. As placas foram invertidas para retirada do etanol, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de etanol 70%, seguido de agitação em vórtex por alguns segundos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 1450 rpm, a 4 °C. As placas foram invertidas e centrifugou-se a 100 rpm por alguns segundos, inverteu-se a placa e, secou-a sob papel absorvente. Em seguida as amostras foram secas no fluxo laminar por 15 minutos, até todo etanol ser evaporado, sendo ressuspensas em 10  $\mu\text{L}$  de formamida, agitadas em vórtex, após o DNA foi desnaturado em termociclador a 95 °C durante um minuto. Por fim as amostras foram submetidas à eletroforese capilar em seqüenciador (ABI 3130–Applied biosystems DNA sequence).

#### **4.31.5 Processamento e análise das seqüências**

As seqüências obtidas foram processadas para remoção dos iniciadores contaminantes e de nucleotídeos de baixa qualidade utilizando-se o programa “Phred”. Cada seqüência foi comparada com seqüências depositadas no “Genbank” utilizando-se o programa de busca

avançada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) do “National Center of Biotechnology Information” (NCBI) (SCHAFFER et al., 2001), utilizando-se os parâmetros “nucleotide blast”, “others database set” e “highly similar sequences”.

#### **4.32 Concentração inibitória mínima (CIM)**

Os métodos de diluição em caldo são igualmente aceitáveis para medir quantitativamente a atividade *in vitro* de um agente antimicrobiano contra um determinado isolado bacteriano.

Para realizar o ensaio, os inóculos foram preparados em caldo até a turbidez de uma solução padrão de MC Farland de 0,5 ( $2 \times 10^8$  UFC/mL) e transferidos a tubos de ensaio de 10 mL no volume de 1 mL nas concentrações de 0,00011mgL<sup>-1</sup> a 62,5 mgL<sup>-1</sup>. Utilizou-se como controle a *Chromobacterium violaceum* CVMO3 (VALLE, 2006). A leitura da mínima concentração inibitória foi realizada após 18 horas, ao ser determinada realizou-se o plaqueamento, no mesmo meio, para verificar a ação bacteriostática do fungicida Mancozeb. A CIM, entretanto, não representa um valor absoluto. A “verdadeira” CIM está num ponto entre a menor concentração do ensaio que inibe o crescimento do organismo (ou seja, a leitura da CIM) e a próxima menor concentração do ensaio (NCCLS, 2003).

#### **4.33 Ensaio em meio mínimo**

Os ensaios para verificar a degradabilidade do fungicida pelas bactérias iniciaram-se pelo preparo do pré-inóculo, colocando-se as bactérias para crescer em caldo LB por 12 horas, utilizando-se a escala MC Farland para verificar o crescimento celular, o meio foi centrifugado para que não fosse acrescido no ensaio nenhuma outra fonte de carbono além do fungicida. Em

seguida as culturas foram colocadas em tubos de 15 mL, adicionados 5 mL de meio mínimo M9 ( $6 \text{ g L}^{-1} \text{ Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $3 \text{ g L}^{-1} \text{ KH}_2\text{PO}_4$ ,  $0,5 \text{ g NaCl}$ ,  $1 \text{ M MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $1 \text{ M CaCl}_2$ ) acrescidos de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  de Mancozeb, na temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  na rotação de 180. A degradação foi testada pelo método visual de turvação do meio de cultura no período de 12 em 12 horas durante duas semanas. Foram realizados ensaios em consórcio colocando-se todos os inóculos em um tubo nas mesmas condições descritas acima, para os dois ensaios utilizou-se como controle o meio LB acrescido do fungicida em mesma concentração.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Área de obtenção das amostras

As amostras da rizosfera foram obtidas conforme metodologia descrita no item 4.2 e coletadas na área identificada nas figuras 3 e 4, no período da manhã, no dia 23 de novembro de 2011.

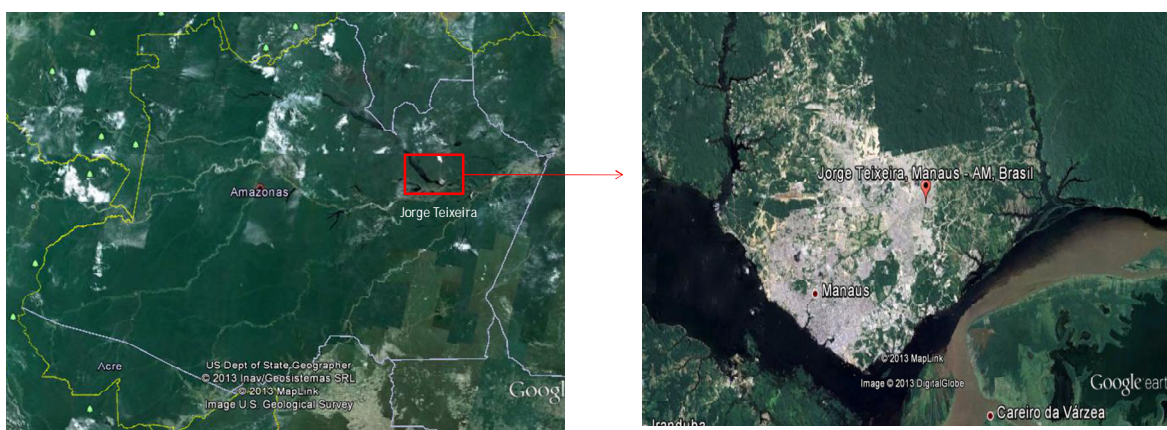


Figura 03: Mapa de localização da área a qual foram retiradas as amostras. Fonte: Google Earth, janeiro 2013.



Figura 04: Área de cultivo de *Allium Fistollium* Comunidade Nova Esperança – Município de Manaus-AM. Foto: Carolina Rebière 2012.

## 5.2 Características do solo

As análises químicas e físicas de solo são realizadas pra determinar a quantidade de certos elementos químicos no solo assim como a sua classificação textural, geralmente com o objetivo de observar se esses elementos estão em níveis apropriados para o desenvolvimento das plantas. No entanto as análises foram realizadas para se verificar em quais condições de solo, as bactérias se encontravam quando foram isoladas.

Tabela 01: Análise química do solo

Profund.	pH	P	K	B	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Ca	Mg	Al	H + Al	SB	(T)
cm		mg dm <sup>-3</sup>				cmol dm <sup>-3</sup>					
0-10 cm	7.49	824.72	14	0,373	0.158	2.60	0.25	0	4.53	2,89	7,42
10-20 cm	7.60	745.55	25	0,494	0.210	2.55	0.60	0	0.0825	3,21	3,3

A análise foi interpretada segundo Ribeiro (1999). De acordo com a classificação química o pH em água, relação 1:2,5 TFSA foi classificado como de alcalinidade fraca, apresentando valores na faixa de 7.49 e 7.60. Segundo a classificação agrônômica quando o pH se encontra superior a 7,0 (>7.0), é muito alto. O nível do Cálcio é classificado como bom (2,60, 2,55), o magnésio baixo(0-10cm), médio(10-20cm), o alumínio muito baixo, a acidez potencial (0-10) baixo, (10-20) muito baixo, soma de bases SB médio, capacidade de troca catiônica pH 7 médio(0-10cm), baixo(10-20cm).

Tabela 02: Análise física do solo.

Profund.	Areia	Silte	Argila	Classe textural	(t)	V	m	M.O	P-rem
cm	dag kg <sup>-1</sup>				cmol	dm <sup>-3</sup>	%	dag kg <sup>-1</sup>	mg L <sup>-1</sup>
0-10 cm	92,24	7,33	0,43	Areia	2,886	38,915	0	0.550	54,28
10-20 cm	93,55	5,95	0,5	Areia	3,214	97,497	0	1.10	54,36

A análise física do solo foi realizada para identificar a classe textural do solo a partir da observação dos percentuais de silte, argila e areia. A matéria orgânica na profundidade de 0-10cm foi determinada como muito baixo (0,550dagKg<sup>-1</sup>), na profundidade 10-20cm foi determinada como baixo . A saturação por bases na profundidade de 0-10cm foi baixo, na profundidade de 10-20cm, muito bom.

A capacidade de troca catiônica efetiva foi determinada ambas como média, o nível de fósforo remanescente foi muito bom (54,28 mgL<sup>-1</sup>, 54,36mgL<sup>-1</sup>) nas profundidades de 0-10cm e 10-20cm respectivamente. De acordo com os dados observados na tabela acima o solo foi

caracterizado com classe textural areia por possuir composição acima de  $90 \text{ dagkg}^{-1}$  (92.24, 93.55) de areia, seguido de silte (7.33, 5.95) e argila (0.43, 0.50).

Os solos arenosos são caracterizados por possuir baixa fertilidade, contudo por se tratar de uma área cultivada, os agricultores realizam adubação constantemente, por isso os níveis de nutrientes encontrados neste solo foram classificados algumas vezes em médio (soma de bases), bom (cálcio) e muito bom (fósforo remanescente).

### **5.3 Isolamento das bactérias**

Obteve-se o total de 64 isolados, 46 do meio Busshel Hass e 18 do meio quimiostático. Após uma série de repiques alguns isolados não se mantiveram ativos, isto ocorre, pois sua sobrevivência decai em torno de 1-10 semanas (DUVEILLER et al., 1997). Considerando a viabilidade das colônias, foram selecionados 23 isolados (Tabela 03) e entre esses 11 isolados para os ensaios bioquímicos os quais apresentaram maior tolerância ao fungicida, conforme resultado apresentado adiante no ensaio de concentração inibitória mínima.

Tabela 03: Características de suas colônias, formas e ensaio Gram dos isolados bacterianos.

<b>Isolados</b>	<b>Aspecto das colônias</b>	<b>Forma</b>	<b>Gram</b>
1	Branças, seco rugoso	Bastões	+
3	Branças, seco rugoso	Bastões	+
4	Branças, seco rugoso	Bastões	+
7	Branças, seco rugoso	Bastões	+
12	Branças, seco rugoso	Bastões	+
14	Branças, seco rugoso	Bastões	+
16	Branças, seco rugoso	Bastões	+
17	Branças, seco rugoso	Bastões	+
18	Branças, seco rugoso	Bastões	+
19	Branças, seco rugoso	Bastões	+
20	Branças, seco rugoso	Bastões	+
22	Amarelas claras, úmidas	Cocos	-
27	Branças, seco rugoso	Bastões	+
39	Branças, seco rugoso	Bastões	+
42	Branças, seco rugoso	Bastões	+
44	Amarelas claras, úmidas	Cocos	-
49	Branças, seco rugoso	Bastões	+
56	Branças, seco rugoso	Bastões	+
57	Amarelas claras, úmidas	Cocos	+
58	Branças, seco rugoso	Bastões	+
60	Branças, seco rugoso	Bastões	+
63	Branças, seco rugoso	Bastões	+
64	Branças, seco rugoso	Bastões	+

Dez isolados apresentaram forma de bastão, com exceção do isolado 44 apresentou forma de cocos e apresentaram coloração Gram positiva, (Figura 05-a). Apenas os isolados 22 e 44 apresentaram coloração Gram negativo (Figura 05-b).

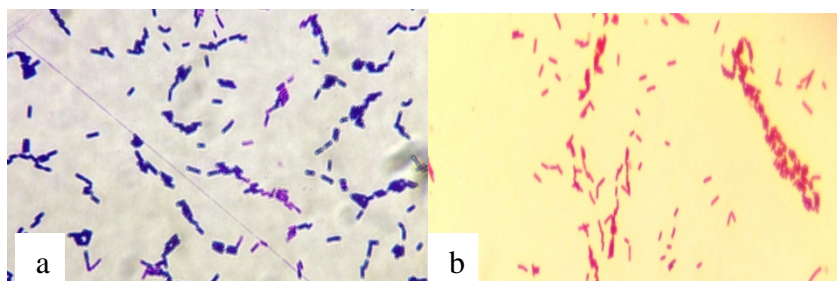


Figura 05: Gram positivo isolado 14 (a), Gram negativo isolado 22 (b). Foto: Carolina Rebière 2013.

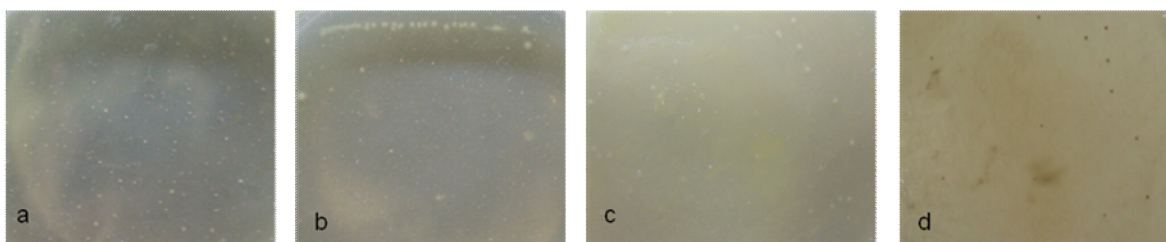


Figura 06: Isolamento bacteriano em meio mínimo (a,b), meio Luria Bertani (c,d) acrescido de  $200\mu\text{g mL}^{-1}$ . Foto: Carolina Rebière 2011.

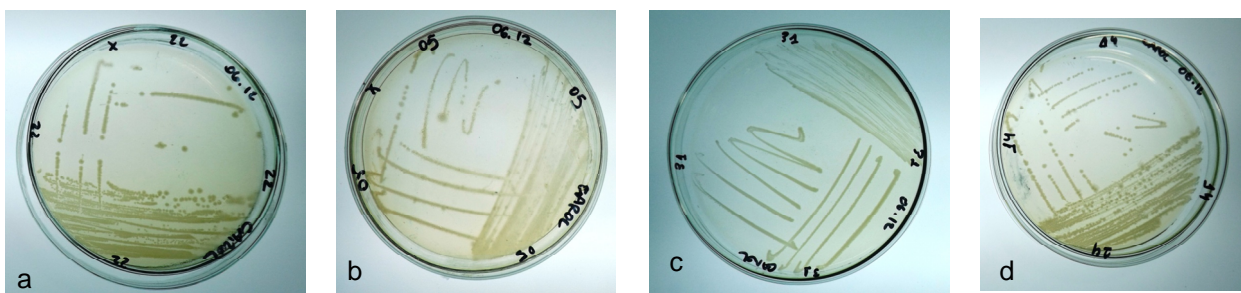


Figura07: Purificação de bactérias pela técnica de esgotamento no isolado 22 (a), isolado 04 (b), isolado 16 (c), isolado 14 (d). Foto: Carolina Rebière 2011.



A abundância de grupos de microrganismos de solo pode estar diretamente relacionada ao estado nutricional deste (SMIT et al., 2009). Esses autores realizaram estudos em solos com plantação de trigo, antes e após a adição de nutrientes. Foi observado que solos com alta concentração de nutrientes disponíveis selecionaram o filo Proteobacteria, bactérias com altas taxas de crescimento. Em baixa concentração de nutrientes ou com alto teor de substratos recalcitrantes, o filo favorecido foi o de bactérias com menor capacidade de crescimento, mas com maior capacidade para competir por substratos, como Acidobacteria.

Marschener et al (2003) observaram que as comunidades microbianas dos solos são diretamente afetadas pelo acréscimo de nutrientes, orgânicos ou não. Na presença de material vegetal facilmente degradável, ocorre favorecimento de microrganismos com alta taxa de crescimento, adaptados a ambientes com maior disponibilidade de nutrientes

Além da adaptação dos microrganismos á disponibilidade de nutrientes, encontra-se na literatura diversos relatos de bactérias isoladas de solos contaminados com diferentes tipos de xenobióticos utilizados na agricultura. Mandal et al. (2013) isolaram diferentes espécies de *Bacillus* identificados como: *Bacillus sp*, *B. mycoides*, *B. funiculus*, *B. marisflavi*, *B. weihenstephanensis*, de solos contaminados com o finopril em campos de produção de cana de açúcar. Este inseticida é utilizado no controle de vários insetos e pragas, e apresenta alta resistência no solo. Experimentos de biodegradação foram conduzidos no laboratório, no qual se analisou a dissipação do inseticida e seus metabólitos formados.

Scopel (2011) isolou do solo cepas com resistência ao glifosato. Este herbicida é intensamente utilizando no controle de plantas espontâneas, em diversas culturas. Bactérias foram isoladas de solos cultivados com macieira e crescidas em meios adicionados de  $300\mu\text{gmL}^{-1}$ , e foram identificadas como *Pseudomonos sp*, *P.aeruginosa*, *Serratia sp*, e *Arthobacter sp*. A

capacidade de degradar essa substância foi avaliada em 32 dias atingindo um percentual de 99,8% de degradação.

Sarkar et al. (2010) isolaram da rizosfera de plantio de chá (*Camellia sinensis* L.), linhagens de *Pseudomonas putida* as quais toleraram altas concentrações do acaricida propargite, ( $10\text{mgL}^{-1}$ ). Contudo a degradação se mostrou bastante superior quando o meio mineral utilizado no crescimento das linhagens foi acrescido de glicose. A degradação então atingiu 79,3% em 24 horas, para 32% em meio mineral sem glicose no mesmo período.

Singh et al. (2012) avaliaram a partir de solos contaminados com malation, o percentual de degradação por *Brevibacillus sp* e *Bacillus cereus*. Ambos os gêneros apresentaram altos percentuais de degradação, 72,20% e 87,40% respectivamente, no período de sete dias. Esses mesmos gêneros foram isolado por Yang et al. (2007) na redução e transformação de parathion e metil parathion. Do mesmo modo Batisson et al. (2009) isolaram *Bacillus sp* e *Arthobacter sp* capazes de degradar o mesotrione, um herbicida amplamente utilizado nas lavouras de milho.

Inúmeras são as espécies isoladas de solos com histórico de aplicação de herbicidas, fungicidas e ou inseticidas. Esses microrganismos têm apresentado grande potencial de biorremediação para cada produto. Em decorrência desses estudos diversos metabolitos têm sido produzidos, vários genes e proteínas envolvidos estão sendo conhecidos, aprofundando cada vez mais o conhecimento sobre a degradação e como essa atividade pode ser utilizada amenizando o impacto dos agrotóxicos sobre os solos e conseqüentemente sobre a saúde humana e dos animais.

## 5.4 Ensaio bioquímicos

Os ensaios bioquímicos são amplamente utilizados para verificação de enzimas estruturais, pesquisas de produtos metabólicos, catabólicos e na constatação da sensibilidade dos microrganismos em diferentes compostos. Como por exemplo, a habilidade de um microrganismo para fermentar um carboidrato específico, quando adicionado ao meio mínimo, podendo auxiliar na diferenciação dos gêneros e espécies.

Os resultados dos 16 ensaios bioquímicos em 11 isolados que obtiveram maior resistência ao Mancozebe, se encontram discriminados na tabela 05.

Os isolados 27 e 39 apresentaram oxidase negativa. Os demais apresentaram resultado positivo. Para o ensaio de catalase, todos os isolados foram positivos. No ensaio para verificar fermentação e oxidação os isolados 1, 4 e 44 foram oxidantes, os demais fermentadores (Figura 08-a). Todos são móveis, todos foram negativos para o ensaio de produção de ácido sulfídrico e indol. No ensaio de presença da enzima uréase os isolados 4, 16 e 27 foram negativos os demais foram positivos (Figura 08-b).

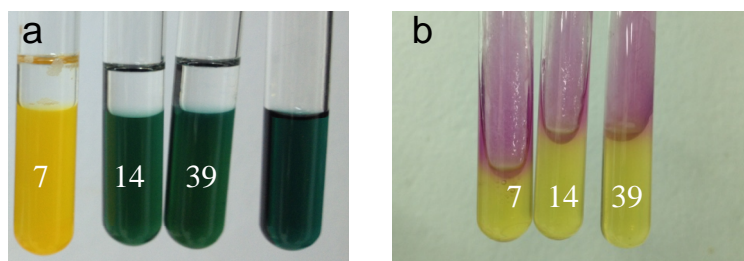


Figura 08: Ensaio de fermentação e oxidação (a) 7,14, controle, isolados e uréase (b), nos isolados 7,14,39. Da esquerda para direita. Foto:Carolina Rebière 2013.

Para o ensaio de utilização do citrato, todos os isolados foram positivos (figura 09-b). Para a utilização de lactose todos foram negativos. No ensaio de utilização de distintas fontes de carboidratos (Figura 09-a), para a fonte de arabinose os isolados 4, 22 e 27 foram negativos os demais isolados foram positivos, para a fonte de dulcitol, todos os isolados foram positivos, para o ensaio com inositol os isolados 4 e 27 foram negativos os demais isolados foram positivos.

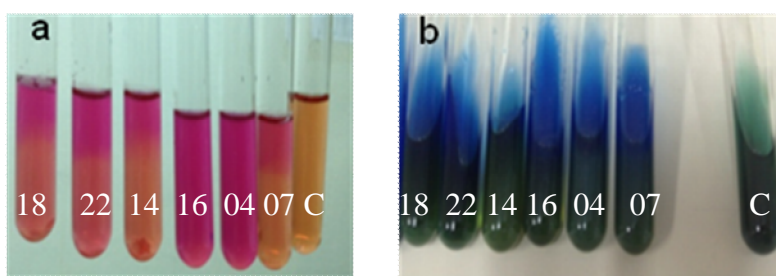


Figura 09: Utilização de distintas fontes de carbono(a) e citrato (b) nos isolados 18,22, 14,16,04,07 e controle( da esquerda para direita). Foto: Carolina Rebière 2013

Para o ensaio de degradação do amido todos os isolados foram negativos (Figura 10).

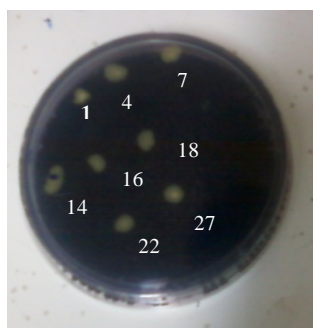


Figura 10: Determinação da atividade enzimática da amilase nos isolados. Foto: Carolina Rebière 2013. Crescimento bacteriano em meio BDA acrescido 2% de amido para os isolados 1,4, 7, 14,16,18,22, 27.

Para os ensaios de hemólise bacteriana os isolados 4, 16, 39, 42 e 44 (Figura 11-a) foram negativos, os isolados 1, 18, 22, 27 apresentaram hemólise parcial enquanto que os isolados 7, 14, apresentaram hemólise total (Figura 11-b).

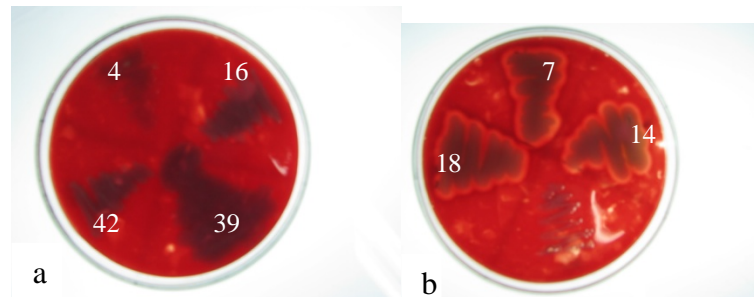


Figura 11: Hemólise bacteriana nos isolados 04, 16, 42 39, não hemolíticos (a), Beta ( $\beta$ ) hemólise em isolados 07, 14, 18 (b). Placas em ágar sangue de carneiro desfibrinado a 7%. Foto: Carolina Rebière 2013.

Tabela 04: Identificação fenotípica dos isolados

<b>Isolados</b>	1	4	7	14	16	18	22	27	39	42	44
<b>Forma</b>	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	c
<b>Gram</b>	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<b>Oxidase</b>	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
<b>Catalase</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Oxidação</b>	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<b>Fermentação</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Motilidade</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>H<sub>2</sub>S</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Indol</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Urease</b>	+	-	+	+	-	+	+	-	+	+	+
<b>Citrato</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Lactose</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Hemólise</b>	$\alpha$	-	B	B	-	$\alpha$	$\alpha$	$\alpha$	-	-	-
<b>Arabinose</b>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<b>Dulcitol</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Inositol</b>	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
<b>Amilase</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Resultado + = positivo, - = negativo, B= bastão, C =coco, hemólise  $\alpha$ = parcial, B= total

Os 11 isolados foram observados em microscópio de contraste de fase para analisar a presença de cristais (Figura12). Também pode ser observada a presença de esporos, dos 11 isolados oito apresentaram esporos, 1, 4, 7, 14, 18, 22, 27, 39. O tamanho aproximado dos bastões, encontrou-se entre 2.59 e 5.0  $\mu\text{m}$ .

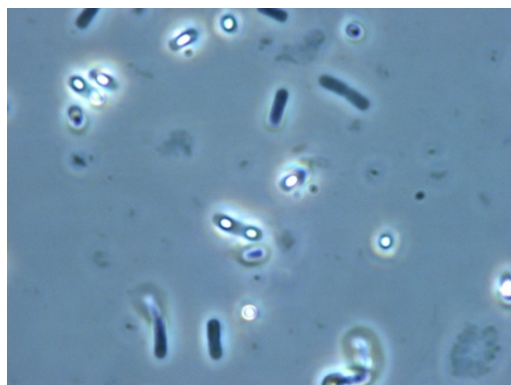


Figura 12: Presença de esporos, observados no microscópio de contraste de fase. Fonte: Rebière 2013

A partir das características fenotípicas utilizou-se o Manual de Bergeys (VOS et al., 2009) para identificar os isolados a nível de gênero e espécies. Os isolados 14,16,18,27,39 e 42 foram identificados como *Bacillus sphaericus* utilizando-se a chave de *Bacillus spp*. Os isolados 1,4 e 7 foram identificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*.

O isolado 22 foi identificado como *Pseudomonas sp*, utilizando a chave de identificação dos Bastões Gram negativos. O isolado 44 não foi possível ser identificado em nível de espécie a partir da utilização da chave da família Enterobacteriaceae, sendo identificada como *Enterobacter sp*.

A identificação fenotípica dos *Bacillus* tem sido considerada complicada (GREEN, 1975; KING e PHILLIPS, 1978) apesar das chaves propostas para essa identificação. Essa dificuldade ocorre, pois o gênero possui muitas características, e é um grupo taxonômico grande, existindo grande variação de características entre linhagens. Além dos meios propostos que são caros, de preparo demorado e ingredientes incomuns além de se obter o resultado após 14 dias.

Em 1952 Smith et al. identificaram os *Bacillus* com base nas características dos esporos, tamanho e localização no interior do esporângio considerando essas características modificou o número de espécies. Anteriormente a classificação ocorria a partir das características fisiológicas e ecológicas chegando ao número de 1000 estirpes após essa mudança, diminui o número de espécies para 19.

O gênero *Bacillus* é considerado um grupo altamente heterogêneo de bactérias Gram-positivas e negativas o que gera muita complexidade em sua classificação taxonômica. Com recentes estudos da sistemática bacteriana muitas espécies desse grupo foram reclassificadas, principalmente com uso do gene completo 16S rRNA (YOON et al., 2003; LOGAN e VOS, 2009; SCHMIDT et al., 2011), porém devido a elevada variabilidade genética muitas espécies de *Bacillus* continuam sem classificação (LOGAN e VOS, 2009).

Um exemplo de reclassificação é o gênero *Lysinibacillus* inicialmente nomeado como *Bacillus*, gênero este que foi criado para agrupar bactérias que apresentavam características distintas de outras espécies do grupo *Bacillus*, classificado por Ahmed *et al.* em 2007 .

O *Bacillus thuringiensis* é uma bactéria entomopatogênica, pois em sua fase de esporulação sintetizam proteínas que se acumulam na periferia dos esporos na forma de cristais. Tais cristais são altamente tóxicos para insetos. (LERECLUS, 1988; HÖFTE e WHITELEY, 1989; PEFERÖEN, 1997). A partir da visualização em microscópio de contraste de fase do isolados foi



possível rejeitar a identificação dos *Bacillus* da espécie *Thurigiensis*, pois os isolados não apresentaram cristais.

### 5.5 Ensaio de sensibilidade antimicrobiana (TSA)

Foram realizados ensaios de sensibilidade antimicrobiana nos nove isolados Gram positivo TSA, para doze antibióticos, conforme a tabela 06 (Figura 13).

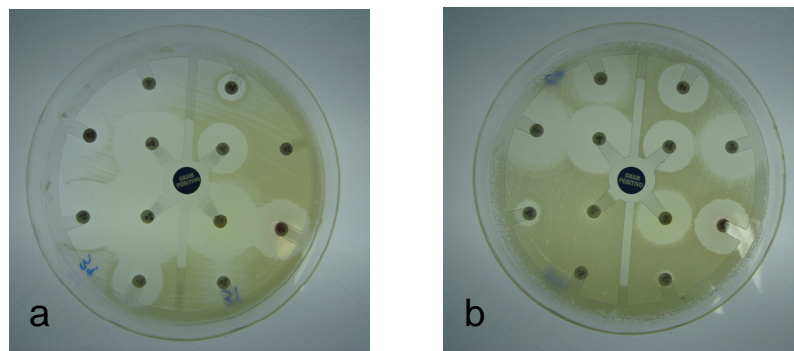


Figura 13: Antibiograma realizado nos isolados 16 (a) e 27(b). Fonte: Carolina Rebière 2013.

Tabela 05: Ensaio de sensibilidade antimicrobiana á antibióticos nos isolados Gram positivos.

Antibióticos	1	4	7	14	16	18	27	39	42
Oxacilina	R	R	R	R	R	R	R	S	R
Penicilina	R	R	R	MS	R	R	R	S	R
Sulfatrozin	R	S	R	R	S	R	R	S	S
Cepéfime	R	S	R	MS	SS	R	MS	R	S
Clindamicina	S	R	S	S	S	S	S	MS	S
Vancomicina	S	R	S	S	S	S	S	MS	S
Eritromicina	S	R	S	S	S	S	S	S	S
Clorafenicol	SS	S	S	SS	S	S	SS	R	SS
Rifampicina	S	MS	S	S	S	S	S	S	S
Tetraciclina	S	S	S	S	S	SS	S	S	SS
Gentamicina	S	MS	S	S	M	S	S	S	M
Ciprofloxacina	S	S	SS	SS	S	S	SS	S	S

Legenda: R sem halo, PS até 10 mm pouco sensível, M 10-20mm moderadamente, S 20-30mm Sensível, SS > 30 mm

Severamente sensível .

A oxacilina, penicilina e sulfatozin foram os antibióticos em que os isolados mais apresentaram resistência. Em contraste para os antibióticos vancomicina, clindamicina e eritromicina apenas o isolado 4 apresentou resistência. Para o clorafenicol apenas o isolado 39 foi resistente, todos os demais foram sensíveis. Com exceção dos isolados 14, 39,42, os demais apresentaram resistência igual ou superior a 3 antibióticos, caracterizando múltipla resistência antimicrobiana.

Os isolados apresentaram um alto percentual de resistência aos antibióticos oxacilina (88,88%), penicilina (77,77%) e sulfatozina (55.55%), seguido do antibiótico cepefime (44.44%). Todos os isolados foram sensíveis aos antibióticos rifampicina, tetraciclina, gentamicina e ciprofloxacina (Tabela 07).

Tabela 06: Percentual de resistência dos á antibióticos dos 9 isolados.

Antibióticos	Concentração µg	Resistência dos isolados %
Oxacilina	1	72,72(8)
Penicilina	10	63,63(7)
Sulfatozina	25	54,54(6)
Cepefime	30	45,45 (5)
Clindamicina	2	28,09(3)
Vancomicina	30	28,09 (3)
Eritromicina	15	18,18 (2)
Clorafenicol	10	9,09 (1)
Rifampicina	30	0
Tetraciclina	30	0
Gentamicina	10	0
Ciprofloxacina	5	0

Legenda: ( ) numero absoluto de isolados

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. A resistência pode ser originada em mutações que ocorrem no microrganismo durante seu processo reprodutivo e resultam de erros de cópia na sequência de bases que formam o ácido desoxirribonucléico cromossômico, responsável pelo código genético.

A outra origem da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível. Esta resistência faz-se através dos mecanismos de transdução, transformação e conjugação e, frequentemente, envolve genes situados em plasmídios e transposons. (TRABULSI, 1973; CUNHA, 1998).

A transferência de genes de resistência de bactérias não-patogênicas ou de baixa patogenicidade para microrganismos patogênicos provavelmente é um fenômeno comum, como exemplo bactérias de intestino de animais com bactérias de solo. Atualmente se tem uma grande preocupação com a resistência das bactérias Gram positivas, pois vem se tornando um problema terapêutico. (SAUNDERS, 1984).

A oxacilina pertence à classe das penicilinas e seu mecanismo de ação é a inibição da biossíntese da parede celular bacteriana. Esses dois antibióticos foram testados nos isolados os quais apresentaram resistência a ambos. A oxacilina é ativa contra a maioria dos cocos Gram-positivos, no entanto a ANVISA (2006), evidenciou que três mecanismos podem estar envolvidos na resistência à oxacilina, em *Staphylococcus aureus* com características fenotípicas distintas.

As bactérias Gram positivas são sensíveis a vancomicina, isto ocorre devido à presença da parede celular que facilita a passagem de moléculas do antibiótico por ser composta com menos lipídeos comparada à Gram negativa (TRABULSI, 2004). Os isolados ensaiados a droga foram sensíveis com exceção do isolado 4. No entanto para penicilina 7 isolados foram resistentes.

O cloranfenicol é um antimicrobiano de amplo espectro, bacteriostático, inibindo a síntese protéica microbiana (CARVALHO, 2002). A droga impede a ligação do RNA mensageiro ao ribossomo, por fixar-se na fração 30S do ribossomo, competindo com o ácido nucléico. Outra ação mais importante é sobre a unidade 50S na qual compete com a enzima peptidil transferase, bloqueando a união dos aminoácidos na formação de polipeptídeos (TAVARES, 2001). Apenas o isolado 39 foi resistente ao cloranfenicol, este isolado também foi o que apresentou maior tolerância ao xenobiótico.

Em relação à múltipla resistência observada na tabela 06, resultados similares de múltipla resistência foram encontrados por Matyar (2012) em isolados de três regiões do mar mediterrâneo os quais seus isolados apresentaram resistência a ampicilina, cefazolina e estreptomicina.

## 5.6 Caracterização molecular

O DNA foi extraído conforme descrito no item 5.1 pelo protocolo fenol-clorofórmio, e para sua visualização foi utilizado gel de agarose a 0.8% corada com brometo de etídio. Para verificação do tamanho do fragmento utilizou-se padrão de peso molecular lambda ( $\lambda$ ), 50 ngml<sup>-1</sup>(Figura 14).

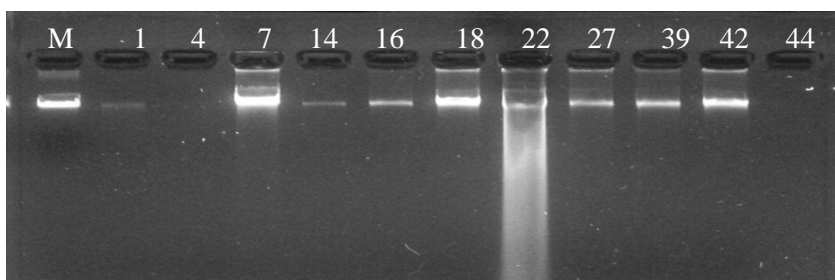


Figura 14: Visualização do DNA bacteriano genômico, em gel de agarose 0,8%, marcador molecular lambda (M) 50ngmL-1. Foto: Carolina Rebière 2012.

O DNA extraído foi amplificado por PCR para amplificação do gene 16 S rRNA gerando fragmentos de tamanho de 1000 pares de bases. Sendo a comparação realizada com marcador de peso molecular de 1 Kb da marca PROMEGA (Figura 15).

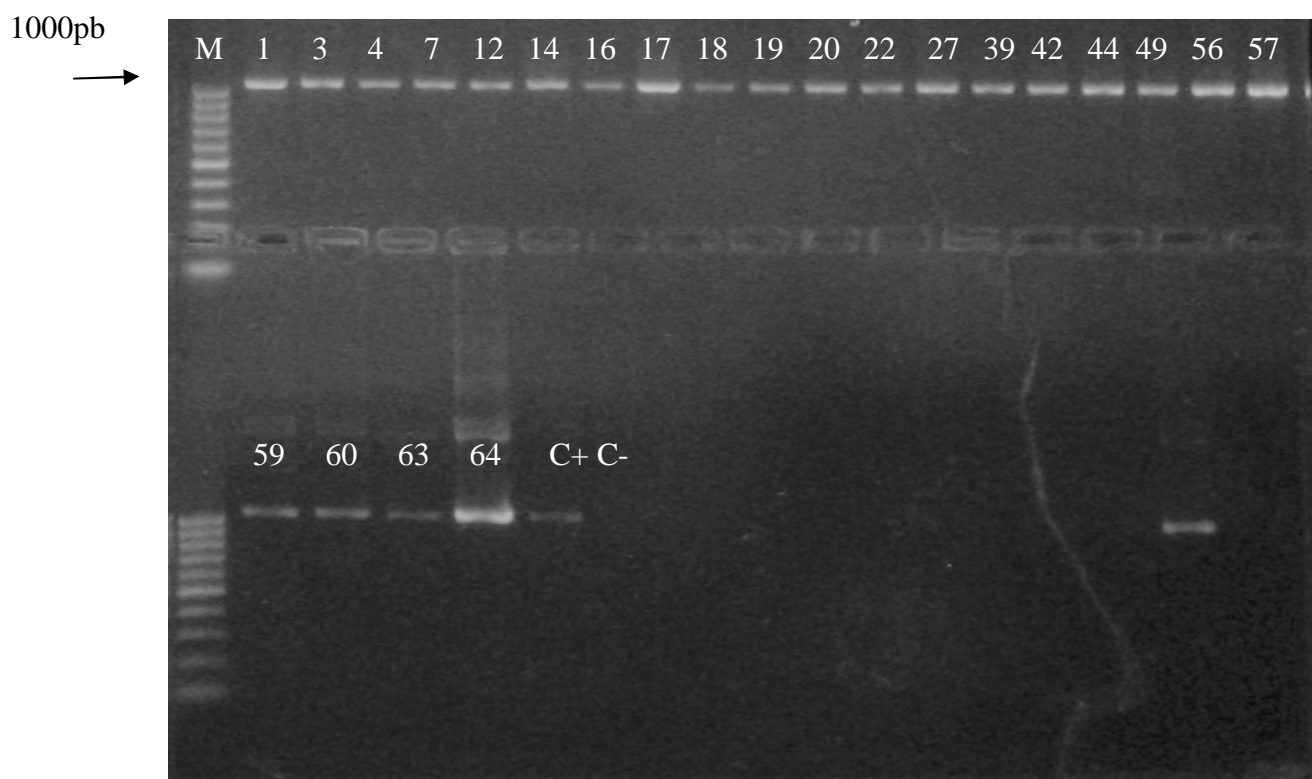


Figura 15: Visualização da amplificação do gene 16S rRna por PCR, em gel de agarose 0,8% , M= marcador molecular PROMEGA 1 Kb. De 1 a 64 = bandas de produto da PCR dos isolados, C<sup>+</sup>= Controle positivo *E. coli* ATCC 25922,C<sup>-</sup> = controle negativo água deionizada. Foto: Carolina Rebière 2012.

## 5.7 Análise das sequências

Após a etapa de extração e amplificação realizou-se o sequenciamento com o gene 16 S rRNA, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências do banco público GENBANK. A partir dessas os 23 isolados, foram identificadas: 4 famílias, *Bacillaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, e *Legionelaceae*, 86,95% (9 isolados) são pertencentes a família *Bacillaceae*, 4,34% (1 isolado) da família *Pseudomonadaceae*, e 4,34%, (1 isolado) da família *Enterobacteriaceae*, *Legionelaceae* 4,34% (1 isolado), (Tabela 04).

Tabela 07: Resultados da identificação com o 16 S rRNA dos isolados de solo.

Isolados	Família	Espécie	% Cobertura	% ID	Gen bank
1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	94	KC188670.1
3	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	63	87	JX028237.1
4	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	99	KC188670.1
7	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	99	KC211310.1
12	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	54	92	FJ817483.1
14	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	95	93	FR821104.1
16	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus pumillus</i>	100	99	NR074977.1
17	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	95	90	JN975194.1
18	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	100	99	KC211310.1
19	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	73	84	HM566654.1
20	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	61	88	HM057846.1
22	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	100	99	JF293317.1
27	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	97	98	AB126753.2
39	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	100	99	KC414719.1
42	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus aerophilus</i>	100	99	KC414720.1
44	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter sp</i>	100	99	KC236536.1

49	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	81	97	KC691285.1
56	<i>Bacillaceae</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	82	95	JX185526.1
57	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillales bacterium</i>	98	99	DQ520806.1
58	Nao identificada	<i>Bacterium JNP22</i>	96	98	KC602258.1
60	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	98	99	HM566998.1
63	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus safensis</i>	99	99	JX849661.1
64	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus pumillus</i>	87	97	JX094922.1

A partir da identificação molecular juntamente com as características fenotípicas concluiu-se que uma técnica complementa a outra. Dentre os isolados 20 foram identificados como pertencentes à família *Bacillaceae*.

Estudos demonstraram que *Bacillus spp*, pelo fato de serem bactérias Gram positivas e produzirem endósporos, possuem uma resistência maior às adversidades do meio ambiente, como alta temperatura, do que bactérias Gram negativas, como *Pseudomonas spp*. (GAMLIEL e STAPLETON, 1993), nessa pesquisa o as bactérias Gram positivas foram mais abundantes que as Gram negativas, fato que pode ser explicado pelo fator ambiente.

### **Família *Bacillaceae***

Esta família abrange atualmente mais de 60 espécies, e geralmente possui células em forma de bastonetes com dimensões que variam 0,5 x 1,2 a 2,5 x10 µm e, são capazes de produzir endósporos podendo ser cilíndricos elipsoidais ou esféricos. Ocorrendo em células únicas, em pares ou em cadeias. Podem ser móveis ou imóveis, aeróbios ou anaeróbios facultativos, ou aerotolerante, geralmente Gram positivos, mas algumas espécies são variáveis, todas as fontes de carbono são fermentadas por essas bactérias, a produção de gases pode ser visível em algumas



espécies. Raramente produzem pigmentos. Algumas espécies são capazes de crescer a temperaturas de 55°C. São principalmente saprófitos, geralmente encontrado em solos (VOS et al., 2009).

*Bacillus spp* são citadas por outros autores por estarem envolvidas em processos de degradação de substâncias xenobióticas. Ashutosh et al (2011) isolaram de solos contaminados com diesel uma nova cepa identificada como *Lysinibacillus sphaericus* DMT-7. Em ensaios realizados no laboratório essas cepas se mostraram capazes de degradar o diesel a um percentual de 60% em quinze dias, além desse composto a *L. sphaericus* DMT7 possui a capacidade de utilizar uma ampla gama de substratos como única fonte de enxofre, 3,4-benzo DBT, 4,6-dimethyl DBT, e 4,6-dibutyl DBT.

Bo Liang (2009) isolou esta mesma espécie em solos contaminados com o herbicida fomesafen, estes mostraram potencial de degradação em 81,32% após sete dias de incubação em meio mineral sendo o herbicida a única fonte de carbono. Do mesmo modo SMIT et al. (2013) estudaram a degradação de cypermetrina por *Bacillus sp* ISTDS2, isolados de solos contaminados com esse produto e verificou a completa mineralização da cipermetrina. O grande potencial da cepa sem gerar nenhum produto tóxico revelou-a como um forte agente biológico para descontaminação de solos contaminados.

### **Características do gênero *Bacillus***

Esse gênero possui células esféricas, algumas vezes formam cadeias, capazes de produzir endósporos. A motilidade ocorre por flagelos ou pode não ocorrer. Podem ser Gram positivos, algumas espécies podem se Gram negativos. Usualmente proteínas são decompostas com

produção de amônia. Os carboidratos geralmente são fermentados com pouco ou muita produção de ácido, a produção de gases é pouco visível. Catalase positiva, aeróbico, ou anaeróbico facultativo. Temperaturas de crescimento são muito variáveis tanto dentro da mesma espécie quanto entre linhagens.

Habitat são ubíquas, sendo encontrados em solos e água, podendo ser isolados a partir de diversos nichos ecológicos, todavia fazendo parte da microbiota intestinal dos seres humanos e de outros animais. Alguns membros podem ser termofílicos e psicrófilico crescendo em temperaturas elevadas, como 75°C ou baixas, como - 5°C. O desenvolvimento destas também é variável em pH 2 a 10, acidez e alcalinidade extrema (VOS et al., 2009 ).

Este gênero possui uma série de importantes mecanismos que estimulam o desenvolvimento da planta, produzindo diversos antibióticos. Colonizam rapidamente as raízes das plantas e favorecem a multiplicação das raízes, induz resistência sistêmica através da produção de compostos orgânicos voláteis. Promove o crescimento da planta e das raízes pela produção de fitohormônios e enzimas extracelulares, diminui os níveis de etileno na planta.

Ongena (2005) mostrou a capacidade de *Bacillus subtilis* M4 em estudos em nível de campo e casa de vegetação em ativar mecanismo de defesa da planta contra anthracnose (*Colletotrichum lagenarium*), em pepino a partir da medição em percentual dos níveis de lesão causada por esse fungo, após duas semanas de inoculação do *B. subtilis* no solo. Os níveis de redução da doença atingiram até 40%.

## **Família Enterobacteriaceae**

Bactérias em formas de bastões, móveis com a presença de flagelos ou não móveis. Gram negativo, bom crescimento em meio artificial. Todas as espécies utilizam glicose produzindo ácidos visíveis ou não, algumas espécies utilizam alginatos e pectinas. Quebram o nitrato a nitrito (exceto *Erwinia*). Muitas espécies vivem no intestino do homem e outros animais frequentemente causando distúrbios intestinais. Enquanto outras são parasitas e ou pragas de plantas causando podridão mole. Ainda outras espécies são saprófitas promovendo a decomposição de materiais orgânicos (VOS et al., 2009 ).

Senhem (2009) isolou bactérias do gênero *Enterobacter* de solos contaminados com Tebuconazole, um fungicida sistêmico, demonstrando degradação deste composto em consórcios bacterianos. Este trabalho salientou que este gênero apesar de ser citado como um gênero de predominância entérica foi encontrado em solo e realizando biodegradação.

## **Família Pseudomonadaceae**

Possuem células alongadas em formas de bastões, ocasionalmente em forma de cocos. Sua mobilidade é dada por flagelos polares, poucas espécies não são móveis. Possuem crescimento bastante rápido no meio de cultura, são aeróbias, sua fisiologia é oxidativa mais pode ser fermentativa. Usualmente encontradas no solo ou nas águas do mar (VOS et al., 2009 ).

Baida et al. (2001) salientou que o gênero *Pseudomonas* é um dos mais estudados por apresentar um papel importante na associação com raízes de plantas. A associação bactéria-planta é geralmente benéfica para ambos os sócios. A superfície de raízes constitui um ambiente onde

nutrientes liberados pela planta na forma de exsudados de raiz estão disponíveis aos microrganismos. Em troca, algumas bactérias podem melhorar crescimento de planta e podem exercer um papel protetor contra patógenos. Estas atividades e o uso potencial de microrganismos na agricultura incitaram um interesse crescente no estudo de interações de planta-microrganismo além de ser um gênero metabolicamente versátil, capaz de utilizar compostos orgânicos simples e complexos.

Munees et al. (2012) observaram a tolerância da *Pseudomonas putida* aos fungicidas tebuconazole, hexaconazole, metalaxyl e kitazin em diferentes concentrações em ágar mínimo de sal. *Pseudomonas putida* PS9 mostrou maior tolerância ao fungicida metalaxyl na dose de  $3200\mu\text{gml}^{-1}$  e menor resistência ao tebuconazole  $1400\mu\text{gml}^{-1}$ . Os níveis de tolerância encontrados neste trabalho foram bastante superiores aos relatados por outros autores Hashem et al. (1997) a tolerância de *Bradyrhizobium sp* USDA 3456 ao benomyl, captan, thiram e vitavax foram superiores a 950, 350, 450, e  $75\mu\text{gml}^{-1}$  respectivamente.

Procópio (2007) isolou microrganismos resistentes ao propanil, em concentrações de  $25\text{mgL}^{-1}$ , dentre eles destacou-se o gênero *Pseudomonas sp*, como mais abundante 94%. Foram avaliados o potencial biotecnológico e 62% dos isolados apresentaram potencial de fixação biológica de nitrogênio, solubilização de fosfato e produção de auxina. Também foi avaliado a mineralização do propanil, que ficou em torno de 20% quando utilizado o isolado AF7 e 18% sem o isolado.

Além disso, foi avaliado o potencial de colonização de raízes de arroz pelo isolado AF7 e o comportamento deste isolado nas raízes e a formulação de um produto com este isolado para aplicação em campo, mostrando a necessidade e a importância da aplicação deste produto em lavouras de arroz irrigado. A tolerância e ou resistência é um processo complexo regulado tanto a

nível fisiológico como genético, sendo assim podemos encontrar resultados bastante diversos para a mesma espécie.

As abordagens fenotípica e molecular possibilitaram a identificação taxonômica de todos os 11 isolados. A partir dos resultados foram identificados: 3 famílias, 6 gêneros e 11 espécies, apenas o isolado 58 não foi identificado, tendo similaridade com *Bacterium* MTJ22. As características fenotípicas observadas corroboraram os gêneros citados pelo sequenciamento do gene 16S rRNA. A família *Bacillaceae* foi a mais representativa neste estudo, todas as famílias e os gêneros identificados possuem referências com biodegradação de pesticidas.

### **5.8 Concentração inibitória mínima (CIM)**

Realizou-se o ensaio de concentração inibitória mínima, nas concentrações de  $0.00011\text{mgL}^{-1}$  a  $62,5\text{mgL}^{-1}$ , do fungicida. Usou-se como parâmetro para análise as concentrações aplicadas no campo de acordo com o bula do produto (Dithane NT\*) 2 a  $3\text{kg ha}^{-1}$  ou  $0,43\text{g L}$  (Tabela 08).

Tabela 08: Resultados da concentração inibitória mínima nos isolados bacterianos

Isolados	0.00011	0.00023	0.00047	0.00095	0.0019	0.0038	0.007	0.015	0.030	0.061	0.122	0.244	0.488	0.976	1.952	3.904	7.808	15.616	31,232	62,464
Controle	*	*	*	*	*	*	*	*												
1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-
12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
17	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-
22	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
39	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-
42	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
56	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
57	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
58	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
60	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
63	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
64	*	*	*	*	*	*	*	*	*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Legenda: Concentração inibitória mínima nas variando de 0,00011 a 62,464mgmL<sup>-1</sup>, \* Crescimento da bactéria, – não houve crescimento, controle *Chromobacterium violaceum* CVMO3.

A tolerância aos antimicrobianos é definida como a capacidade de a bactéria mostrar-se sensível à concentração inibitória mínima (CIM) do xenobiótico, apresentando maior capacidade de sobreviver na presença da droga.

No ensaio do CIM, *Cromobacterium violaceum* CVMO3, utilizada como controle mostrou crescimento na concentração de 0,015mgmL, resultado inferior ao dos 11 isolados testados. Os isolados apresentaram os seguintes resultados: *Bacillus sp* (27), *Bacillus altitudinis* (39) e *Bacillus sp* (14) evidenciaram maior tolerância ao fungicida com crescimento nas concentrações de 0,976  $\mu\text{gmL}^{-1}$ . Para os isolados *Lysinibacillus sphaericus* (4), *Bacillus pumillus* (16) e *Lysinibacillus sphaericus* (18) a concentração em que se observou crescimento foi 0,244  $\text{mgmL}^{-1}$ . *Bacillus aerophilus* (42) e *Lysinibacillus sphaericus* (1), e *Pseudomonas sp* (22), crescimento na concentração de 0,122  $\text{mgmL}^{-1}$ . *Enterobacter sp* (44) na concentração de 0,061  $\text{mgmL}^{-1}$ .

Os resultados sugerem que os isolados *Bacillus sp* (27), *Bacillus altitudinis* (39) e *Bacillus sp* (14) toleram a concentrações superiores a encontradas no campo. *Lysinibacillus sphaericus* (7), com crescimento em concentração 0,244 $\text{mgmL}^{-1}$ , tolera o pesticida a concentrações similares a usadas no campo. *Enterobacter sp* (44), *Lysinibacillus sphaericus* (1), *Pseudomonas sp* (22) e *Bacillus aerophilus* (42) seriam inibidos nas concentrações de campo (Tabela 09).

Tabela 09: Identificação dos isolados e resultados do CIM

Isolados	Família	Identificação 16 S Rna	Concentração mg/mL
3	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	0,03
49	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	0,03
56	<i>Bacillaceae</i>	<i>Brevibacillus brevis</i>	0,03
57	<i>Bacillaceae</i>	Não identificada	0,03
60	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	0,03
63	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus safensis</i>	0,03
64	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus pumillus</i>	0,03
1	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0,061
12	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	0,061
17	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0,061
19	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	0,061
20	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	0,061
44	<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter sp</i>	0,061
58	Não identificada	Bacterium JMP22	0,061
22	<i>Pseudomonadaceae</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	0,122
42	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus aerophilus</i>	0,122
4	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0,244
16	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sp</i>	0,244
18	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus fusiformes</i>	0,244
7	<i>Bacillaceae</i>	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	0,488
14	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus pumillus</i>	0,976
27	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus sp</i>	0,976
39	<i>Bacillaceae</i>	<i>Bacillus altitudinis</i>	0,976



Os isolados *Bacillus sp* (27) , *Bacillus Pumillus* (14) , *Bacillus Altitudinis* (39) tiveram tolerância a concentrações de 0,976 mgmL<sup>-1</sup>. Seguido de *Lysinibacillus sphaericus* (7) apresentou crescimento na concentração de 0,488 mgmL<sup>-1</sup>. Os isolados *Lysinibacillus fusiformes* (18), *Lysinibacillus sp* (16), *Lysinibacillus sphaericus* (04), mostraram tolerância na concentração de 0,244 mgmL<sup>-1</sup>. Os isolados e identificados como *Bacillus aerophillus* (42) e *Pseudomonas sp* (22), apresentaram tolerância ao fungicida na concentração de 0,122 mgmL<sup>-1</sup>.

Isolados com a mesma identificação para o gênero e espécie, tiveram resultados de crescimento distintos para as mesmas concentrações do xenobiótico, inferindo que existe diversidade de tolerância para a mesma espécie.

### 5.9 Ensaios em meio mínimo acrescido do fungicida

O resultado para o crescimento em meio M9 com apenas a fonte de carbono do fungicida não foi positivo para nenhum dos 23 isolados, no entanto quando se adicionou outra fonte de carbono todos os isolados cresceram, o meio Luria Bertani foi utilizado como controle (Tabela 10).

Tabela 10: Crescimento bacteriano em meio M9 acrescido de fungicida e glicose.

Meios	Consórcio	1	3	4	7	12	14	16	17	18	19	20	22	27	39	42	44	49	56	57	58	60	63	64
<b>1</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>2</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>3</b>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Legenda: 1, Luria Bertani 2, M9+ Fungicida 50µg, 3, Meio M9+ Fungicida 50µg + glicose 0,5, consórcio com todos os isolados.

A complexidade dos processos metabólicos necessários a essa degradação leva à formação de consórcios, com microrganismos de diferentes gêneros e espécies, cada um especializado em degradar uma ou várias moléculas do xenobiótico. Esse consórcio tem demonstrado maior eficiência que as culturas puras podendo mineralizar completamente estes compostos devido à complementaridade metabólica entre seus membros.

Senhem (2009) isolou de solos contaminados com tebuconazole, fungos e bactérias. Os resultados mostraram que para 40 fungos isolados apenas 11 mostraram crescimento em concentrações de  $100\mu\text{gml}^{-1}$ , sendo o crescimento mais lento que comparado com o meio sem fungicida. Isolados bacterianos identificados como *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter sakazaii*, foram capazes de degradar o tebuconazole. Foram montados em três grupos para realização dos ensaios de degradabilidade. A *Serratia marcescens* e *Enterobacter sakazaii* foram capazes de reduzir em 39% o produto, *E. sakazaii* e *Pseudomonas* apresentaram 18% de degradação, e o gênero *Serratia* obteve 8% de degradação. Conclui-se que o consórcio com gêneros diferentes foi superior quando comparado com os de gêneros iguais, sendo que mereceu destaque ao agrupamento de gêneros *Serratia* e *Enterobacter*.

As bactérias possuem um enorme potencial genético bioquímico, o qual lhe confere uma enorme troca de material genético como, por exemplo, o uso dos transposons e plasmídeos (FREITAS, 1989). A transferência gênica entre bactérias ocorre, principalmente, por conjugação e por transdução, que permitem a passagem de material genético para indivíduos da mesma espécie, de espécies diferentes e até mesmo de gêneros diferentes (GRIFFITHS, 2000). Os mecanismos de resistência bacteriana sempre refletem mudanças genéticas que podem ser

classificadas como intrínsecas, ou seja, da própria da espécie, ou adquiridas, ou seja, resultantes de mutações ou alguma forma de transferência gênica (ALTERTHUM e TRALULSI, 2004).

Neste contexto destaca-se a importância dos plasmídeos nesse processo, através da conjugação; portando o fator de transferência F e o fator de resistência R podem ser transferidos com facilidade e podem se combinar formando super plasmídeos que portam genes de resistência para várias drogas, levando bactérias à multi-resistência (TORTORA, 2000).

Resultados similares envolvendo perda de plasmídeos foram encontrados por Chica Cardona (2009) quando trabalhou com isolados bacterianos para a obtenção da degradação do metamidofós, durante a realização de suas pesquisas esses autores observaram que as bactérias perderam a capacidade de crescimento no meio utilizando o metamidofós como única fonte de carbono.

O solo é um ambiente com uma vasta diversidade de microrganismos, no entanto pouco conhecimento se tem sobre essa diversidade, principalmente devido aos métodos tradicionais de isolamento e cultivo dos microrganismos (RANJARD, 2000). Infere-se que uma pequena fração de aproximadamente 0,1% ou 10% no máximo dos microrganismos são cultiváveis a partir de técnicas microbiológicas tradicionais em laboratórios. Isto se deve basicamente às limitações inerentes às técnicas de plaqueamento e cultivo, uma vez que todos os meios de cultura são seletivos em maior ou menor extensão para os diversos grupos de microrganismos e, na maioria das vezes, incapazes de reproduzir as condições encontradas no ambiente (AMANN et al., 1995).

Além disso, os microrganismos vivem sob a forma de consórcios, onde uma espécie depende de produtos do metabolismo de outras espécies para sua sobrevivência e multiplicação, no interior de outros organismos. Ou seja, os métodos clássicos limitam o conhecimento sobre as

interações ecológicas entre esses dificultando e impedindo a compreensão dos processos dinâmicos que ocorrem no ambiente (ATLAS e BARTHA, 1997).

A grande diversidade de microrganismos não cultiváveis estimulou o desenvolvimento de ferramentas que permitissem os estudos destes, porém sem cultivá-los. Metodologias moleculares desenvolvidas nas últimas décadas foram otimizadas e adaptadas para superar as limitações impostas pela abordagem clássica de estudo de populações microbianas, evitando o isolamento e cultivo dos microrganismos, e desencadearam uma série de estudos de ecologia microbiana que mudaram drasticamente a perspectiva da diversidade microbiana.

Estes métodos envolvem a lise de células microbianas na matriz do solo, a extração dos ácidos nucléicos a partir desta matriz e a análise de seqüências alvo nas amostras mistas de DNA de organismos diversos (metagenoma), utilizando para isso sondas ou *primers* os. Esta estratégia foi adotada como ferramenta padrão para analisar a diversidade de muitos ambientes diferentes, revelando a descoberta de novos grupos de organismos, nunca antes cultivados (HUGENHOLTZ,1998). Entretanto, estas metodologias podem limitar o acesso ao potencial metabólico destes novos organismos, uma vez que as etapas de isolamento e cultivo são suprimidas dos estudos.

No presente trabalho as bactérias foram isoladas em meio onde a única fonte de carbono foi o agrotóxico na concentração 10 vezes superior a recomendada em campo ( $3,6\text{gL}^{-1}$ ). No entanto, após alguns repiques em meio LB sem a adição do agrotóxico, as mesmas perderam a capacidade de degradar este composto. Este resultado pode ter sido decorrente dos inúmeros repiques realizados nas bactérias, podendo ter ocorrido à perda de plasmídeos, fato muito comum entre as bactérias.

Além disso, microrganismos vivem sobre influência mútua, participando de uma série de simbioses, interações e dinâmicas envolvendo diversos organismos no ambiente. Desta forma quando as bactérias são isoladas rompe-se esse sistema, o que pode vir a prejudicar o desenvolvimento das mesmas que poderiam estar sendo auxiliadas por esses outros microrganismos a fim de degradar o agrotóxico.

## **6 CONCLUSÃO**

Obteve-se a partir de solos com histórico de aplicação do fungicida, uma coleção de microrganismo, capazes de crescerem em meio sintético em diferentes concentrações do fungicida Mancozeb. Essas condições de crescimento caracterizam as bactérias como tolerantes a este produto em concentrações superiores a encontradas no campo. A coleção de microrganismos decorrentes da realização dessa pesquisa poderá servir para estudos futuros envolvendo a biodegradação de xenobióticos

## 7 REFERÊNCIAS

AHMED, IFTIKHAR; YOKOTA, AKIRA; YAMAZOE, ATSUSHI; FUJIWARA, TORU  
Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis*  
to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus*  
comb. nov. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.57  
p.1117-1125, 2007.

ALTERTHUM, Flávio; TRABULSI, Luiz Rachid. **Microbiologia**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu,  
2004.

ALVAREZ V. **Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais**,  
Viçosa 359 p,1999.

AMANN R, SPRINGER N, LUDWIG W, GÖRTZ HD, SCHLEIFER KH. Phylogenetic  
identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation,  
*Microbiological Reviews*,v.59, p. 143–169, 1995.

ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos **Revista Saúde Pública**, 40 No. 2, p.361-363,  
2006.

ANVISA. Agrotóxicos: Anvisa discute o controle de resíduos no Senado, 2009 disponível em:  
<<http://amarnatureza.org.br/site/agrotoxicos-anvisa-discute-o-controle-de-residuos-no-senado.23595/>>. Acesso em: 03 jun.2012.

ARCANJO, M. **Monitoramento do agrotóxico mancozebe no solo em diferentes sistemas de plantio de tomate**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, Uerj, RJ, , 116p, 2007.

ASHUTOSH BAHUGUNA, MADHURI K. LILY, ASHOK MUNJAL, RAVINDRA N,  
SINGH KOUSHALYA, Dangwal, Desulfurization of dibenzothiophene (DBT) by a novel strain

Lysinibacillus sphaericus DMT-7 isolated from diesel contaminated soil Biodegradation of fomesafen by strain Lysinibacillus sp. ZB-1 isolated from soil, **Journal of environmental sciences** v.23,p. 975-982, 2011.

ATLAS RM, BARTHA R. Microbial **Evolution and Biodiversity-The origins of life**. 4 ed, p. p.37-39, 1997.

AZEVEDO J. L., MELO I. S. **Microbiologia ambiental** capítulo 4, 6, 7, 17, Jaguariúna Embrapa CNPMA, 440p. ,1997.

AZEVEDO, L.A.S. de **Proteção integrada de plantas com fungicidas: teoria, prática e manejo**. São Paulo, 230p, 2001.

BAIDA, N. et al. Pseudomonas brenneri sp. nov., a new species isolated from natural mineral waters. **Reviews Microbiological**, v. 152, p. 493-502, 2001.

BANDO, SILVIA YUMI Taxonomia Bacteriana. In: Trabulsi, Luiz Rachid, Alterthum, F. **Microbiologia**. Atheneu, São Paulo. p. 51-55, 2008.

BATISSON ISABELLE A, OLIVIER CROUZET A, PASCALE BESSE-HOGGAN B, MARTINE SANCELME, JEAN-FRANÇOIS MANGOT A, CLARISSE MALLET A, JACQUES BOHATIER Isolation and characterization of mesotriene-degrading Bacillus sp. from soil , **Environmental Pollution**,v. 157 p.1195–1201, 2009.

BORNEMAN, JAMES; TRIPLET, ERIC W. Molecular Microbial Diversity in Soils from Eastern Amazonia: Evidence for Unusual Microorganisms and Microbial Population Shifts Associated with Deforestation. Brock Institute for Environmental Microbiology and the Department of Agronomy, University of Wisconsin-Madison, Madison. V.63, p.2647-2653, 1997.

BRASIL. Lei Nº 7.802, de 11 de julho de 1989, Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil], Brasília, DF, 1989.

CAIRES, M.S.; CASTRO, J.G. Levantamento dos Agrotóxicos usados por produtores rurais no município de Alta Floresta MT. **Revista Biologia e Ciência da Terra**, v.2, n.1, 2002.

CARVALHO, F.L.Q. Lincosamidas, tetraciclina e cloranfenicol. **Farmacologia**, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 6 ed, p. 1050-1057, 2002.

CASARINO, Impactos dos agrotóxicos na biologia, Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento. Curitiba, 2008.

CASTRO S., MARTA VINOCUR, MARCELA PERMIGIANI CARLOS HALLE, TANIA TAURIAN, ADRIANA FABRA, Interaction of the fungicide mancozeb and Rhizobium sp. in pure culture and under field conditions. **Biol Fertil Soils**, v.25 p.147-151, 1997.

CHICA CARDONA A procura de bactérias degradadoras de metamidofós, dissertação de mestrado, Instituto Butantan, p.151, 2011.

COCCO PIERLUIGI, On the rumors about the silent spring Review of the scientific evidence. linking occupational and environmental pesticide exposure to endocrine disruption health effects. **Cadernos de saúde pública**, Rio de Janeiro, v.18, p.379-402, 2002.

CUNHA BA., Antibiotic resistance. **Drugs of Today** Infectious Disease Division Winthrop-University Hospital, Mineola v.34, p. 691-698, 1998.



CYCÒN M. et al. Biodegradation of the organophosphorus insecticide diazinon by *Serratia* sp. and *Pseudomonas* sp. and their use in bioremediation of contaminated soil. **Chemosphere** 76 494-501, 2009.

DIREITO. C. N. **Detecção de genes degradadores de compostos aromáticos em solos de rizosfera sob manejo convencional e orgânico.** Dissertação de mestrado Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.

DROUIN PASCAL MOEZ SELLAMI, DANIELLE PRE´VOST, JOSE FORTIN, HANI ANTOUN, Tolerance to agricultural pesticides of strains belonging to four genera of Rhizobiaceae, **Journal of Environment Science and Health Part B**, v.45. p.780-788, 2010.

DUARTE M.L., Normas sobre uso de agrotóxicos, **Embrapa Amazônia oriental**, sistemas de Produção.01, ISSN 1809-4325.versão eletrônica, dez 2005.

DUVEILLER, E., FUCIKOVSKY, L. RUDOLPH, K.,**The bacterial diseases of wheat: concepts and methods of disease management.** México, DF, CIMMYT. 78 pp,1997.

FABRA A. J. ANGELINI, A. DONOLO, M. PERMIGIANI E S. CASTRO, Biochemical alterations in *Bradyrhizobium* sp USDA 3187 induced by the Fungicide Mancozeb, **Antonie van Leeuwenhoek journal**, v.73,p. 223–228, 1998.

FAWOLE O.B., ALUKO M. E OLOWONIHI T.E, Effects of A Carbendazim-Mancozeb Fungicidal Mixture on Soil Microbial Populations and Some Enzyme Activities in Soil, **Agrosearch** 10 N. 1 e 2,p. 65-74, 2009.

FAY E. F., C. M. M. de S. SILVA de MELO R. F. VIERIA, Degradação do fungicida clorotalonil por *Arthrobacter* spp, **Embrapa Meio Ambiente** 2004.

FEHLBERG LCC, LUTZ LV, MOREIRA AH. Agrotóxicos e seus efeitos sócio-culturais zona

rural do Valão de São Lourenço, Santa Tereza ES, **Brasil Revista natureza on line**, 2003.

FLOURNOY, D.J., WONGPARDIT S. SILBERG, S.L. Facilitating identification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae on Macconkey agar, **Proceedings of the Oklahoma Academy science**, v. 70, p.5-8, 1990.

FRANZOLIN, MARCIA REGINA. **Fundamentos da Identificação Bioquímica das Bactérias**. In: TRABULSI, L.R. Alterthum, F (Eds). Microbiologia. Atheneu, São Paulo. p. 463-476, 2008.

GAMLIEL, A; STAPLETON, J.J., Effect of chicken compost or ammonium phosphate and solarization on pathogen control, rhizosphere microorganisms, and lettuce growth. **Plant-Disease**, v.77, n.9, p. 886-891, 1993.

GAYLARDE C.C, BELINASSO M, MANFIO G, Biorremediação, **Biotecnologia ciência e desenvolvimento** n.34, jan/jun 2005.

GENTIL D. F. O. et al., Uso de agrotóxicos em unidades produtivas de hortaliças em Manaus. Amazonas, **Brasil Horticultura Brasileira**. v. 26, n. 2, 2008.

GESELL, M HAMMER, E; SPECHT, M FRANCKE, W SCHAUER, F. Biotransformation of biphenyl by Paecilomyces lilacinus and characterization of ring cleavage products. **Applied and Environment Microbiology**. v.67, n 4 p 1551-1557, 2001.

GÓES P. K. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de acefato**. Tese de doutorado, Usp, n 180 p, 2009.

GREEN, D. M. Anthrax bacillus. In Medical Microbiology. Edited by R. Cruickshank, J. P. Duguid, B. P. Marmion e R. H. A. Swain. Edinburgh, London e New York: Churchill Livingstone, v. 2, p. 449-453, 1975.

- GRIFFITHS, ANTHONY J. F. et al. **Introdução à Genética**. 7<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. P.194-197, p.344-345, 2000.
- GUVEN K., SONGUL TOGRUL, FIKRET UYAR, SIFA OZANT, DAVID I. DE POMERAI  
A comparative study of bioassays based on enzyme biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* exposed to heavy metals and organic pesticides. **Enzyme and Microbial Technology** v.32, p. 658–664, 2003.
- HASHEM F.M, SALEH S.A, VAN BERKUM P, VOLL M. Survival of *Bradyrhizobium* sp on fungicide treated peanut seed in relationship to plant growth and yield, **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 13, p. 335-340, 1997.
- HÖFTE, H.; WHITELEY, H.R. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews**, Washington, v.53, p.242-255, 1989.
- HUGENHOLTZ P, GOEBEL BM, PACE NR Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology** v.180, n.18, p.4765-4774, 1998.
- ITAMAR, S MELLO, Roque M.R. A. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida Diuron. **Scientia Agrícola**, v 57, n. 4, p. 723-728, out/set 2000.
- JOSIC, DRAGANA; POROBIC, MILAN; MILICEVIC, MITRA; VUKOVIC, DRAGOSLAV;  
PIVIC, RADMILA; ZDRAVKOVID, MIRJANA; CORIC, TATJANA RAPD Fingerprinting of Indigenous *Lysinibacillus fusiformis* Isolates from Stabilized Sludge and Oil-Polluted Soil. **International Meeting on Soil Fertility Land Management and Agroclimatology**. Turkey, p.927-933, 2008.
- KAVI KARUNYA E D.REETHA Efficency of bacterial isolates in the Degradation of

Malathion and Parathion. **International journal of Pharmaceutical and biological Archives**; v.3n.3, p. 659-665, 2012.

KING, A., PHILLIPS, The identification of pseudomonas and related bacteria in a clinical laboratory. **Journal of Medical Microbiology** v.11, p.165-176, 1978.

LERECLUS, D. Génétique et biologie moléculaire de *Bacillus thuringiensis*. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, Paris, v.86, p.337- 371, 1988.

LIU B. HUI LI, JIE ZHAO, HAO FENG, LILI HUANG, ZHENSHENG KANG. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action *Biological Control*. **Crop Protection**. v.49,p. 277–285, 2009.

LONDRES F. Agrotóxicos no Brasil um guia para a ação em defesa da vida-Rio de Janeiro AS-PTA **Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa**. 190 p., 2011.

LOPES ASSAD, M. L. Fauna do solo. In: VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. (Ed.) **Biologia dos solos do cerrado**. Planaltina: EMBRAPA, CPAC, cap. 7, p. 363 – 444, 1997.

MANDAL KOUSIK, BALWINDER SINGH , MONU JARIYAL , V.K.GUPTA Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. disponível on line 2013.

MADIGAN, MICHAEL T, MARTINKO, JOHN M.; PARKER, JACK; BROOK. **Biologia dos microrganismos**. 1011 pp, 2004.

MARIUSZ CYCON, ZOFIA PIOTROWSKA-SEGET, JACEK KOZDRÓJ. Responses of indigenous microorganisms to a fungicidal mixture of Mancozeb and dimethomorph added to sandy soils. **International Biodeterioration and Biodegradation** v.64 316-323, 2010.

MARSCHNER P., KANDELERB E.,MARSCHNER B., Structure and function of the soil

microbial community in a long-term fertilizer experiment, **Soil Biology and Biochemistry**, v.35, n 3, 1 p. 453–461, 2003.

MARTINEZ, MARINA BAQUERIZO; TADDEI, CARLA ROMANO. **Métodos de diagnóstico**. In: Trabulsi, Luiz Rachid Alterthum (Eds). Microbiologia. Atheneu, São Paulo. p. 117-125, 2008

MATYAR F. Antibiotic and Heavy Metal Resistance in Bacteria Isolated from the Eastern Mediterranean Sea Coast. **Springer Science Business Media** 89 p. 551-556, 2012.

MELO I. S. Bactérias aceleram o processo de biodegradação dos compostos de agrotóxicos agrícolas **Embrapa Meio Ambiente** Jaguariúna, fev, 2006.

MESQUITA C. M **Avaliação integrada do impacto do uso de agrotóxicos na microbiota do solo. Estudo de caso: Paty do Alferes- RJ** Dissertação de mestrado Escola Nacional de Saúde Pública- FIOCRUZ, 2005.

MUNEES AHEMAD , MOHAMMAD SAGHIR KHAN, Effect of fungicides on plant growth promoting activities of phosphate solubilizing *Pseudomonas putida* isolated from mustard (*Brassica campestris*) rhizosphere, **Chemosphere** v.86,p. 945–950, 2012.

NCCLS **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada - Sexta Edição, 2003.

OLIVEIRA FILHO F. M. et al Levantamento para diagnóstico da comunidade Nova Esperança- 4 Etapa Jorge Teixeira- Município de Manaus –Instituto de Desenvolvimento agropecuário e florestal sustentável do estado do Amazonas –IDAM SEPROR, 2009.

ONGENA M. F. DUBY. E. JOURDAN, T. BEAUDRY V. JADIN. J. DOMMES, P. OPAS/ANVISA/SVS Controle Interno da Qualidade para Testes de Sensibilidade a

antimicrobianos, 2006.

PEFERÖEN, M. Progress and prospects for field use of Bt genes in crops, **Trends in Biotechnology**, Cambridge, v.15, p.173-177, 1997.

THONART. *Bacillus subtilis* M4 decreases plant susceptibility towards fungal pathogens by increasing host resistance associated with differential gene expression **Applied Microbiol Biotechnology** v.67, p. 692–698, 2005.

PRIMAVESI, ANA. **Manejo Ecológico do Solo: a agricultura em regiões tropicais**. São Paulo: Nobel, 1980.

PROCÓPIO A. R. **Diversidade da comunidade bacteriana da rizosfera de arroz resistente a propanil e seu potencial de biodegradação** Tese de doutorado USP 146 p, 2007.

RANJARD L., FRANCK P., NAZARET S, Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: application to soil environment **Res. Microbiol.** 151 p.167–177, 2000.

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

RIBEIRO A. A. Agrotóxicos sua utilização e os indicadores de risco no estado do Rio de Janeiro Dissertação Mestrado Fundação Oswaldo Cruz p.143, 2002

RIBEIRO C.R., GUIMARRÃES P.C.G.,ALVAREZ V.H., Recomendação para o uso de adubos e fertilizantes em Minas Gerais, 5ª aproximação, Viçosa, Minas Gerais, 359p.,1999.

ROSA C.P. **Avaliação dos teores de resíduos do pesticida ditiocarbamato no solo de uma cultura de couve (*Brassica Oleracea* L.) utilizando cloridrato de L-cisteína para preservação das amostras** Dissertação de Mestrado UERJ, 2009.

ROUSSEAU, S. HARTMANN, A. LAGACHERIE, B. PIUTTI, S. ANDREAUX, F. SOULAS, G. Inoculation of an atrazine degrading strain *Chelobacter heintzii* in four different soils effects of different inoculum densities. **Chemosphere**, v. 51, p. 569-576, 2003.

SAJEDI, R. H, R.H.SAJEDIA, . MANESH H. N, KHAJEHA A.K., AHMADVANDB R, B. RANJBARA, ASOODEHA A., MORADIANA F.. A Ca-independent  $\alpha$ -amylase that is active and stable at low pH from the *Bacillus* sp. KR-8104. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 36, n. 7, p. 666-671, 2005.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANTOS, V. L. LINARDI, V. R. Biodegradation of phenol by a filamentous fungi isolated from industrial effluents identification and degradation potencial. **Process Biotechnology**, v. 39, n 8 p. 1001-1006, 2004.

SAUNDERS JR. Genetics and evolution of antibiotic resistance. **British Medical Bulletin** v.40, p.54-60, 1984.

SAVOY, **Classificação dos agrotóxicos, Biológico**, São Paulo, v.73, n.1, p.91-92, jan./jun., 2011.

SCHÄFFER A.A., THOMAS L.A.L. MADDEN, SHAVIRIN S., SPOUGE J. L.,WOLF Y. I. KOONIN E.V. ALTSCHUL. S.F. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements, **Nucleic Acids Research**, v. 29, n.14, p. 2994-3005, 2001.

SCHELEIFER, K.-H. WHITMAN, W.B, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 3. The Firmicutes.1450 pp, 2009.

SENHEM, NICOLE TEIXEIRA, **Avaliação da capacidade de biodegradação de tebuconazole por isolados microbianos de solos contaminados e de ambientes Amazônicos**,

Dissertação de mestrado em microbiologia agrícola e do ambiente, faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil, 89p, 2009.

SOUMIK SARKAR, SUBBIAH SEENIVASAN, ROBERT PREMKUMAR SAMUEL ASIR, Biodegradation of propargite by *Pseudomonas putida*, isolated from tea Rhizosphere, **Journal of Hazardous Materials** n.174 p. 295–298, 2010.

SCOPEL ANDRIGHETTI, MARÍLIA **Biodegradação de glifosato por bactérias isoladas de solos cultivados com macieira com diferentes históricos de aplicação deste herbicida**.

Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul Programa de pós graduação em microbiologia agrícola e do ambiente, 109 p., 2011.

SHAFIANI SHAHIN, ABDUL MALIK, Tolerance of pesticides and antibiotic resistance in bacteria isolated from wastewater-irrigated soil, **World Journal of Microbiology & Biotechnology** 19: 897–901, 2003.

SILVA F. **Manual de análise química de solos, plantas e fertilizantes** 2 ed. rev. Ampl. 627 p. Brasília, DF: Embrapa informação tecnológica, 2009.

SINGH KASHMIR, BALJINDER SINGH, JAGDEEP KAUR, , :Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU, *World J Microbiol Biotechnol* 28:1133–1141, 2012.

SMIT, E; LEEFLANG, P.; GOMMAS, S.; BROEK, J; WERNERS, K. Diversity and seasonal fluctuations of the dominant members of the bacterial soil community in a wheat field as determined by cultivation and molecular methods. **Applied and Environmental Microbiology**



67 v.5,p. 2284- 2291, 2001.

SMITA SUNDARAM, MIHIR TANAY DAS, INDU SHEKHAR THAKUR, Biodegradation of cypermethrin by *Bacillus* sp. in soil microcosm and in-vitro toxicity evaluation on human cell line, **International Biodeterioration and Biodegradation** 77, 39e44, 2013.

SILVA S. C. SILVA M.S., MELO I. S., MAIA A. H. N. e ABAKERLI R. B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim- **Pesquisa Agropecuária brasileira** V.34 n. 7 p. 1255-1264 jul 1999.

STOLTE R. E Sensibilidade de *Bipolaris sorokiniana* e de *Drechslera tritici-repentis*, A Fungicidas in vitro, Dissertação de mestrado Universidade de Passo Fundo, 2006.

TAVARES, W. Cloranfenicol e tianfenicol. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, São Paulo, Atheneu, 3 ed. p.721-733, 2001.

TORTORA, GERARD J. GERARD J. TORTORA, FUNKE B.R. E CHRISTINE L. CASE;

TRABULSI LR. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. *Revista de Microbiologia* São Paulo,1-30, 1973.

VOS, P.; GARRITY, G.; JONES, D; KRIEG, N.R.; LUDWIG, W. RAINEY, F.A. YOON, JUNG-HOON; KIM, IN-GI; KANG, KOOK HEE; Oh, TAE-KWANG; PARK, YONG-HA. *Bacillus marisflavi* sp. nov. and *Bacillus aquimaris* sp. nov., isolated from sea water of a tidal flat of the Yellow Sea in Korea, **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53:1297-1303, 2003.

ZAMBOLIM, L., VALE, F. X. R. do., MONTEIRO, A. J. A., COSTA, H. (Ed.). **Controle de doenças de plantas : fruteiras**. Viçosa, MG., v. 2, 1309 p, 2002.