



**Universidade Federal de Mato Grosso
ICET/FAET/FAMEV/IB/ICHS
Programa de Pós-Graduação em Recursos Hídricos**

JULIANA KAWANISHI BRAGA

**Biodegradação do diurom e do sulfato de
endossulfam e sua influência na cinética de
crescimento de microrganismos edáficos**

**Cuiabá
2009**

*Isaac
Sandes*

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JULIANA KAWANISHI BRAGA
(Bióloga)

Biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam e sua
influência na cinética de crescimento de microrganismos
edáficos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Recursos Hídricos da
Universidade Federal de Mato Grosso como
parte dos requisitos necessários para a
obtenção do título de Mestre em Recursos
Hídricos.

Orientadora: Profa. Dra. Edna Lopes
Hardoim.

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana F. G. C.
Dores

Co-orientadora: Profa. Dra. Oscarlina Lúcia
dos Santos Weber

Cuiabá
2009

É concedida á Universidade Federal de Mato Grosso permissão para reproduzir cópias desta dissertação e emprestar ou vender tais cópias somente para propósitos acadêmicos e científicos. A autora reserva outros direitos de publicação e nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito da autora.

1.1 FICHA CATALOGRÁFICA

- B813b Braga, Juliana Kawanishi
Biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam e sua influência na cinética de crescimento de microrganismos edáficos / Juliana Kawanishi Braga. – 2009.
147f. : il. ; color. ; 30 cm.
- “Orientadora: Prof^a. Dr^a. Edna Lopes Hardoim”.
“Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana F. G. C. Dores”.
“Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Oscalina Lúcia dos Santos”.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, Pós-graduação em Recursos Hídricos, 2009.
- Bibliografia: f. 115-139.
1. Meio ambiente – Materiais nocivos. 2. Solo agrícola – Produtos químicos. 3. Recursos hídricos – Contaminação ambiental. 4. Pesticidas – Solo - agrícola. I. Título.

CDU – 504.054

Ficha elaborada por: Rosângela Aparecida Vicente Söhn – CRB-1/931

BRAGA, J.K. Biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam e sua influência na cinética de crescimento de microrganismos edáficos.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Edna Lopes Hardoim

Instituição: UFMT

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Milton Ricardo de Abreu Roque

Instituição: UFBA

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. Ricardo Dalla Villa

Instituição: UFMT

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dra. Carolina Lourencetti (suplente)

Instituição: UFMT

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dra. Selma Baia Batista (suplente)

Instituição: UFMT

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória: Aos meus pais Gaudio e Cleusa, e à minha irmã Tati, com amor, admiração e gratidão pela compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho. Por sempre me incentivarem nesta jornada e em outras que já passaram. Pelas

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho só foi possível, pois contou com a colaboração de inúmeras pessoas, que direta ou indiretamente participaram com pequenas e grandes contribuições, porém, igualmente valiosas. Gostaria de expressar minha gratidão a algumas instituições e pessoas, e pedir que aquelas aqui não mencionadas, que sintam-se igualmente lembradas.

Quero agradecer esta conquista:

A Deus, por instruir-me com sabedoria e discernimento perante as provas encontradas neste caminho, ajudando-me a encontrar forças suficientes para não sucumbir neste percurso.

Aos meus pais Gáudio Soares Braga e Cleusa Akemi Kawanishi, dos quais me orgulho intensamente e sempre recebi e ainda recebo tudo o que preciso na vida para ser feliz. Agradeço por serem a minha referência de amor, honestidade, generosidade e responsabilidade.

À minha querida irmã Tatiana, com quem compartilho diariamente longas horas de alegria e aprendizado, que renovam minhas forças para continuar sempre em frente.

À Prof^ª. Dra. Edna Lopes Haroim, do LATEMAS/IB/UFMT que me recebeu de braços abertos em seu laboratório, me orientando em alguns trabalhos nele realizado, sempre contribuindo com valiosos ensinamentos que levarei para o resto de minha vida, e o mais importante agradeço pela confiança em mim depositada e por sua grande amizade.

À Prof^ª. Dra. Eliana F. G. C. Dores, Coordenadora do PPG em Recursos Hídricos/UFMT por aceitar me co-orientar neste precioso trabalho colaborando sempre que possível com seu tempo, conhecimento e amizade, além de apoiar-me nos testes de degradação.

À Prof^ª. Dra. Oscarlina Lúcia S. Weber, da FAMEV/UFMT por também aceitar me co-orientar neste trabalho, contribuindo com as análises físicas e químicas do solo além de colaborar sempre que possível com seu conhecimento e amizade.

Ao Prof. Msc. Alcício Pinto, do LARB/Dept^o. Química/UFMT pelos inúmeros ensinamentos, carinho, amizade e pelos grandes e essenciais auxílio nas coletas das amostras no campo.

À Dra. Selma Baia Batista do LATEMAS/IB/UFMT pelo apoio e ajuda com seus ensinamentos e sua amizade, sempre disposta e disponível a ajudar-me.

À Dra. Carolina Lourencetti do LARB/Dept^o. Química/UFMT por ajudar-me nos testes de degradação, sempre dispondo seu tempo e seus conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Amorim da FAMEV/UFMT pela ajuda com as análises estatísticas dos meus dados, estando sempre disponível com seus conhecimentos e sua amizade.

À todos os professores do Programa de Pós Graduação em Recursos Hídricos/UFMT, que muito me acrescentaram nessa longa jornada e que levarei eternamente comigo nos caminhos seguintes que vierem aparecer.

À Prof^a. Dra. Maria Bernadete A. Varesche Silva e a Dra. Isabel Kimiko Sakamoto (LPB/EESC) pelo total apoio no estágio e nas análises moleculares, sempre mostrando humildade e paciência nos ensinamentos das técnicas e também pela amizade que me proporcionou durante minha estadia em São Carlos.

Ao técnico do Laboratório de Taxonomia e Ecologia de Microorganismos Aquáticos e Simbiontes, Nilton José de Pinho, por me ajudar sempre que precisei e pela grande amizade.

Agradeço a todos do LATEMAS (Zaryf e Karen minhas amigas desde a graduação e eternas em meu coração), pelos ensinamentos, apoios, amizade e pelas risadas que juntos já passamos nesse laboratório.

Às minhas verdadeiras amigas, que conheci nessa jornada e que desde o começo estiveram ao meu lado, Carol Malheiros, Luciana Beneciuti, Maria Benedita. Sem vocês o mestrado não teria a mesma graça, obrigado por existirem.

À amizade verdadeira que se desenvolveu no decorrer do curso e que hoje se iguala às minhas amigas do coração, Osmar, Isaltino, Flávia, Samantha, Lú, Gaby e Etiene.

À todos os colegas da primeira turma do nosso programa pelos prazerosos momentos juntos, cada um será eternamente lembrado com muito carinho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Mato Grosso - FAPEMAT, pelo auxílio, por meio da bolsa de estudos concedida para o período de 1,5 anos e auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

À todos os servidores do Instituto de Biociências/UFMT, que sempre me ajudaram quando foi preciso.

Finalmente, agradeço às centenas de outras pessoas que também contribuíram de uma forma ou de outra na realização deste trabalho e também na minha formação profissional.

A todos, obrigada!!!

RESUMO

BRAGA, J.K. **Biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam e sua influência na cinética de crescimento de microrganismos edáficos.** 2009. 147p. Dissertação (Mestrado). PPG Recursos Hídricos, Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, Mato Grosso.

O uso de xenobiontes nos sistemas agrícolas traz preocupação sobre a permanência desses produtos químicos no ambiente, pois podem persistir por longos períodos, acumulando-se. Visando verificar a influência do diurom e do sulfato de endossulfam sobre o crescimento de comunidade microbiana, e testar sua biodegradação, coletaram-se amostras de Latossolo Vermelho Amarelo nos horizontes Ap e AB de solo agrícola. Para este estudo, incubaram-se seis amostras desses horizontes, com umidade a 50% da capacidade de campo e a 30 °C. Adicionou-se em cada amostra 1 µg de sulfato de endossulfam ou de diurom por grama de solo. A cinética de crescimento microbiano foi analisada nos tempos 0, 8 e 64 dias. Plaqueou-se amostras nos meios CPS e MM com os xenobiontes como únicas fontes de carbono. Realizaram-se contagens de 24 a 144 horas após incubação a 30°C. Isolou-se 6 estirpes a partir do MM. Para identificação específica, empregou-se as técnicas de Coloração de Gram, testes bioquímicos e motilidade, MIDI e molecular (PCR/Sequenciamento). Realizou-se teste de viabilidade (48h) com os xenobiontes (5 µgmL⁻¹) com as 6 estirpes isoladas do MM para posterior análise de degradação (CG/ECD), cinética de crescimento (DO600) e retenção celular (extração dos resíduos retidos nas células utilizando acetato de etila) para diferenciação entre a real e a aparente degradação. Foram testadas duas concentrações, sendo 5 e 50 µgmL⁻¹ do diurom e 3 e 33 µgmL⁻¹ do sulfato de endossulfam. O maior crescimento microbiano foi observado nos tratamentos-controle (sem contaminação), variando de 1,32x10⁵ a 4,3x10⁵ UFCs e registrou-se um menor crescimento no meio MM, tanto para o horizonte Ap quanto para o AB. O crescimento microbiano em MM em presença do sulfato de endossulfam foi inferior àquele obtido no MM suplementado com diurom em ambos horizontes sem, contudo, haver uma diferença significativa, aplicado o teste de Kruskal-Wallis. Com relação aos diferentes tempos de incubação e diferentes contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam) e o controle, nos tempos 0 e 64 dias de incubação, não houve diferença significativa entre os meios de culturas utilizados. Das estirpes isoladas, *Bacillus cereus* teve seu crescimento em MM suplementado, ora com diurom ora com sulfato de endossulfam, mais expressivo quando comparada com as demais. A cinética de crescimento mostrou melhor resultado quando *B. cereus* foi cultivada na maior concentração do diurom. Contrariamente, com o sulfato de endossulfam esta espécie mostrou crescimento exponencial mais acentuado no tratamento de menor concentração. A degradação do diurom foi maior no ensaio com 50 µgmL⁻¹ (54%) quando comparado com o de 5 µgmL⁻¹ (47,9%). No estudo de biodegradação do metabólito a eficiência foi maior na concentração de 3 µgmL⁻¹ (15,6%), contra 22,6% no meio mais concentrado (33 µgmL⁻¹). O maior percentual de retenção do diurom em *B. cereus* foi observado em 50 µgmL⁻¹ (15,49%). Já em 5 µgmL⁻¹ obteve-se 9,77% de retenção celular. Assim como no tratamento com diurom, observou-se um maior percentual de retenção de sulfato de endossulfam no ensaio de 50 µgmL⁻¹ (19,06%) e no de menor concentração foi de 11,01% de retenção celular.

ABSTRACT

BRAGA, J.K. **Diuron and endosulfan sulfate biodegradation and their influence in the kinetic of the growth soil's microorganisms.** 2009. 147p. Dissertação (Mestrado). PPG Recursos Hídricos, Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, Mato Grosso.

The use of xenobiotics in the agricultural systems cause concerns about the permanence of these chemical products in the environment since they can persist for long periods, pilling up. To verify the diuron and endosulfan sulfate influence on the growing of microorganisms communities and their subsequent biodegradation, samples of Latossolo Vermelho Amarelo in the Ap and A/B's layers were collected. For this study six samples of these layers were incubated with a 50% humidity of the field capacity and at 30°C. One $\mu\text{g g}^{-1}$ of sulfate endosulfan or diuron were added at each sample. The microorganisms growing kinetic was analyzed in the times 0, 8 and 64 days. Samples were cultivated in the CPS and MM mediums with the xenobiotics as the single sources of carbon. Countings were realized from 24 to 144 hours after incubation at 30°C. Six bacteria strains were isolated from MM. For specific identification techniques like Gram's staining, biochemicals and motility's tests, MIDI and molecular (PCR/Sequence) were used. Viability tests (48 hours) were realized with the xenobiotics ($5\mu\text{g mL}^{-1}$) with the 6 bacteria isolates of MM for subsequent degradation analysis (GC/ECD), growing kinetics and cellular retention (extraction of the retained residues in the cells using etil acetate) for distinction between the real and apparent degradation. Two concentrations were tested, 5 and $50\mu\text{g mL}^{-1}$ of diuron and 3 and $33\mu\text{g mL}^{-1}$ of the endosulfan sulfate. The largest growing was registred at the control-treatments (without pesticide contamination), varying from $1,32 \times 10^5$ to $4,3 \times 10^5$ FCUs and the smallest growing was related in the medium MM, both for layer Ap and for A/B. The growing of the microorganisms in MM in the presence of endosulfan sulfate was lower than that observed in MM added with diuron in both layers, however, without a significant difference when applying the Kruskal-Wallis test. About the different incubation's time and different contaminants (diuron and sulfate endossulfan) and the control, at T0 and T64, there was no significant difference between the cultures mediums used. Among the isolated bacteria strains, *Bacillus cereus* had the most expressive growth in MM added, with diuron or endosulfan sulfate, when compared with the others lineages. The kinetic of growth showed a better result when *B. cereus* was cultivated in the largest concentration of diuron. Unlike, with the endosulfan sulfate this species showed exponential growing more accentuated in the treatment with the lowest concentration. The diuron's degradation was largest in the $50\mu\text{g mL}^{-1}$ (54%) essay, when compared with the $5\mu\text{g mL}^{-1}$ (47, 9%). In the study of metabolites biodegradation the largest efficiency was found in the concentration of $3\mu\text{g mL}^{-1}$ (15, 6%), against 22,6% in the most concentrated ($33\mu\text{g mL}^{-1}$) medium. The largest cellular retention percentual of diuron in *B. cereus* was registred in $50\mu\text{g mL}^{-1}$ (15,49%). In the $5\mu\text{g mL}^{-1}$ treatment, a 9,77% cellular retention was obtained. Like in the treatment with diuron, a largest retential percentual was observed in the endosulfan sulfate in the $50\mu\text{g mL}^{-1}$ essay (19,06% were retained) and in the smallest one was 11,01% of cellular retential.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do diurom [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia].....	29
Figura 2 – Trajetória da degradação do diurom por microrganismos aeróbicos (SCRIBNER et al., 2000).....	30
Figura 3 – Degradação química do endossulfam em sulfato de endossulfam.....	32
Figura 4 – Esquema simplificado do comportamento dos pesticidas no ambiente (BATISTA, 2003).....	36
Figura 5 – Principais processos de interação entre os pesticidas e o solo (GHISELLI, 2001).....	40
Figura 6 – Micro-bacia do Córrego Chico Nunes, Dom Aquino, Mato Grosso.....	51
Figura 7– Localização da área de estudo, município de Dom Aquino, Mato Grosso.....	52
Figura 8 – Mapa de Localização e vias de acesso da área de estudo, Município de Dom Aquino – MT. (Fonte: PEREIRA, 2005).....	52
Figura 9 – (A-B) – Fazenda localizada no município Dom Aquino, Mato Grosso.....	53
Figura 10 – Trincheira aberta para coleta de solo.....	54
Figura 11 – Perfil do Latossolo Vermelho Amarelo da micro-bacia do Córrego Chico Nunes.....	54
Figura 12 – (A) Esquema da montagem do experimento; (B) Câmara de germinação.....	56
Figura 13 – Esquema das diluições, tempo e meios utilizados (Protocolo de Costa, 2002).....	57
Figura 14 – (A-C) Processamento do solo e diluições.....	58
Figura 15 – Técnica de isolamento de esgotamento por riscas (A) seguida de estria (B).....	61
Figura 16 – Características coloniais observadas (Fonte: NEDER, 1992).....	62
Figura 17 – Técnica de análise de ácidos graxos utilizando kit de extração Instant Fame™, de acordo com as recomendações do fabricante (MIDI, Newark, DE).....	64
Figura 18 – Esquema da visualização de microrganismos em um agregado de solo típico.....	74
Figura 19 – Esquema dos horizontes Ap e A/B na área de estudo com detalhes de algumas características físicas, químicas e biológicas registradas.....	76
Figura 20 – Relação entre as médias de UFCs, meios de cultura e horizontes estudados.....	80
Figura 21 – Média de UFCs nos meios de cultura, nos horizontes Ap e AB nos tempos de incubação do solo T0, T8 e T64.....	82
Figura 22 – Relação entre número de UFCs, tempo de incubação do solo e tempo de leitura (contagem).....	84
Figura 23 –(A-D) Placas CPS com crescimento de 144 horas.....	86

Figura 24 – (A-D) Placas MM com crescimento de 144 horas.....	86
Figura 25 – Cepas isoladas do MM+contaminantes.....	87
Figura 26 – (A) cepa 19, (B) cepa 26, (C) cepa 51, (D) cepa 55, (E) cepa 60 e (F) cepa 69...	89
Figura 27 – Extração do DNA das culturas isoladas em gel de Agarose a 1%.....	92
Figura 28 – Crescimento de <i>B. cereus</i> em diferentes concentrações de dextrose (5, 50, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).....	94
Figura 29 – Presença acentuada de endósporos em <i>Bacillus cereus</i>	96
Figura 30 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM+5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom e sua degradação em 394 horas.....	98
Figura 31 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM+50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom e sua degradação em 394 horas.....	98
Figura 32 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM (3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.....	104
Figura 33 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM (33 $\mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.....	104
Figura 34 – Relação entre a degradação do diurom por <i>Bacillus cereus</i> no tempo.	108
Figura 35 – Relação entre a degradação do sulfato de endossulfam por <i>Bacillus cereus</i> no tempo.....	109
Figura 36 – Relação entre o crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM+diurom no tempo.....	110
Figura 37 – Relação entre o crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM+sulfato de endossulfam no tempo.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Estimativa do Mercado de Defensivos Período Jan- Outubro - 2007 vs 2008 (Milhões R\$). (SINDAG, 2008).....	27
Tabela 2 - Classificação de persistência de pesticidas baseada no tempo de meia vida.....	41
Tabela 3 - Alguns microrganismos utilizados em estudo de degradação de pesticidas.....	47
Tabela 4 - Tratamentos nos dois horizontes do solo.....	57
Tabela 5 – Primers utilizado na técnica de PCR.....	65
Tabela 6 - Reagentes e suas concentrações.....	66
Tabela 7 – Propriedade granulométrica dos horizontes do solo C orgânico.....	75
Tabela 8 – Propriedades Física e química dos horizontes AP e AB.....	77
Tabela 9 – Concentrações iniciais de s. de endossulfam e diurom no solo.....	79
Tabela 10 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias entre meio de cultura, horizonte e pesticida.....	81
Tabela 11 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de incubação, meio de cultura e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam)....	83
Tabela 12 - Maiores valores obtidos do crescimento microbiano (UFCs).....	83
Tabela 13 – Menores valores obtidos do crescimento microbiano (UFCs).....	83
Tabela 14 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de incubação, horizonte do solo e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam)..	85
Tabela 15 – Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de leitura, meio de cultura e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam).....	85
Tabela 16 – Resultados dos testes bioquímicos aplicados às cepas isoladas.....	91
Tabela 17 - Espécies identificadas pelos testes bioquímicos.....	91
Tabela 18 - Similaridade da sequência de DNA com o banco de dados NCBI.....	93
Tabela 19 – Crescimento (DO 600) de <i>Bacillus cereus</i> em MM (5 µg mL ⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.....	97
Tabela 20 – Crescimento (DO 600) de <i>Bacillus cereus</i> em MM (50 µg mL ⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.....	97
Tabela 21 – Concentrações de diurom retida nas células de <i>B. cereus</i> (em 10 mL de meio), registradas em replicatas de MM, suas médias se desvios padrões.....	99
Tabela 22 – Concentrações do diurom (µg mL ⁻¹) nos processos de degradação real e aparente por <i>Bacillus cereus</i>	100

Tabela 23 – Porcentagem de retenção do diurom nas células de <i>Bacillus cereus</i>	101
Tabela 24 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM suplementado com sulfato de endossulfam ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sua degradação em 394 horas.....	102
Tabela 25 – Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em MM ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.....	103
Tabela 26 – Concentrações do sulfato de endossulfam retida nas células de <i>B. cereus</i> (em 10 mL de meio), registradas em replicatas de MM, suas médias se desvios padrões.....	105
Tabela 27 – Concentrações do sulfato de endossulfam ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos processos de degradação real e aparente por <i>Bacillus cereus</i>	106
Tabela 28 – Porcentagem de retenção do sulfato de endossulfam por <i>Bacillus cereus</i>	107

LISTA DE ABREVIATURAS

- AB – 2 ° horizonte do solo (30-38cm)
Ap – 1° horizonte do solo (0-30cm)
AN – Agar nutriente
CG – Cromatografia gasosa
COT – C-carbono orgânico total
CPS – Meio rico em nutrientes indicado para bactérias edáficas.
CVC – *Citrus Variegated Chlorosis*
DNA – Ácido desoxirribonucléico
D.O. – Densidade óptica
ECD – Detector de captura de elétrons
EMB – Eosina azul de metileno
EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
EUA – Estados Unidos da América
FAMES – Ésteres metílicos de ácidos graxos
Fe – Ferro
HPLC-DAD – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjos de diodos
Hz – Horizonte do solo.
IS – Índice de similaridade
J.E. – Jones e Edington (meio de cultura)
LPB – Laboratório de Processos Biológicos
LVA – Latossolo Vermelho Amarelo
MM – Meio mineral ou mínimo.
MM3 – Meio mínimo suplementado com $3\mu\text{g mL}^{-1}$.
MM33 – Meio mínimo suplementado com $33\mu\text{g mL}^{-1}$.
MM5 – Meio mínimo suplementado com $5\mu\text{g mL}^{-1}$.
MM50 – Meio mínimo suplementado com $50\mu\text{g mL}^{-1}$.
MO – Matéria Orgânica
MT – Mato Grosso
nm – Nanômetro
pb – Pares de bases
PCR – *Reação em Cadeia* da Polimerase (“Polynmerase Chain Reaction”)

PD – Plantio direto

pH – *Potencial hidrogeniônico*

PI – padrão interno

PRODEAGRO – Programa de Desenvolvimento do Agronegócio.

PTFE – Politetrafluoretileno

rpm – Rotação por minuto

SDVB – Co-polímero de estireno divinil benzeno

Trat. – Tratamento

TSA – Trypticase Soy Agar

TTC – Triphenyl-tetrazolumchloride

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

VP – Vogues Paskeur

YPS – Meio de cultura com extrato de levedura, peptona e sais.

°C – Celsius

SUMÁRIO

2		
	INTRODUÇÃO.....	19
	1.1 Justificativa.....	23
	1.2 Objetivo Geral.....	23
	1.3 Objetivos Específicos.....	24
3	REVISÃO	DE
	LITERATURA.....	25
	2.1 Solo.....	25
	2.2 Pesticidas.....	26
	2.2.1 Diurom.....	28
	2.2.2 Sulfato de endossulfam.....	31
	2.3 Utilização de pesticidas na agricultura.....	33
	2.4 Transformação de pesticidas.....	39
	2.5 Diversidade microbiana.....	42
	2.6 Limitações das atividades microbianas pelos pesticidas e sua biodegradação.....	44
	2.7 Histórico e características da área de estudo.....	49
4	MATERIAL	E
	MÉTODOS.....	52
	3.1 Área de estudo.....	52
	3.2 Coleta e caracterização química e física do solo.....	54
	3.3 Preparo da solução e da suspensão para contaminação dos solos.....	55
	3.4 Experimento de degradação em solo.....	55
	3.5 Tratamento das bactérias edáficas.....	58
	3.6 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos microrganismos do solo.....	58
	3.7 Análises estatísticas.....	60
	3.8 Isolamento e caracterização das cepas.....	60
	3.8.1 Isolamento.....	60
	3.8.2 Caracterização e identificação das cepas.....	61
	3.8.2.1- Análises morfo-tintoriais.....	61
	3.8.2.2 Caracterização bioquímica.....	62

3.8.2.3 Identificação das bactérias por análise de ácidos graxos.....	63
3.9 Análises moleculares.....	64
3.9.1 Extração de DNA de bactérias.....	64
3.9.2 Eletroforese em gel de Agarose.....	65
3.9.3 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S DNA do solo (PCR).....	65
3.9.4 Sequenciamento de um fragmento de um gene 16S das bactérias com potencial de biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam.....	66
3.10 Utilização do diurom e do sulfato de endossulfam como fonte de carbono.....	67
3.11 Determinação das concentrações de sulfato de endossulfam e de diurom inicial no solo.....	68
3.11.1 Sulfato de endossulfam.....	68
3.11.2 Diurom.....	69
3.12 Preparo das soluções dos padrões do diurom e do sulfato de endossulfam.....	70
3.12.1 Padrão Interno.....	70
3.12.2 Preparo de solução e padrões para a curva analítica.....	70
3.13 Condições cromatográficas.....	71
3.14 Degradação de Pesticidas por bactérias em meio de cultura.....	71
3.14.1 Teste de viabilidade.....	71
3.14.2 Teste de degradação.....	72
3.15 Extração líquido-líquido.....	72
3.16 Determinação da concentração de diurom e sulfato de endossulfam retida na célula bacteriana.....	73
3.17 Crescimento de <i>Bacillus cereus</i> em diferentes concentrações de dextrose.....	73
5 RESULTADOS	E
DISCUSSÕES.....	74
4.1 Granulometria e análises química e física do solo.....	74
4.2 Concentrações de sulfato de endossulfam e de diurom inicial no solo.....	79
4.3 Crescimento microbiano nos meios CPS e MM+pesticida.....	79
4.4 Identificação das bactérias por análise de ácidos graxos.....	87
4.5 Análise morfo-tintorial, caracterização colonial e testes bioquímicos.....	88
4.6 Análises moleculares.....	92
4.7 Escolha da cepa para o estudo de degradação em meio de cultura.....	93

4.8 Teste de degradação.....	93
4.8.1 Crescimento <i>Bacillus cereus</i> isolada em diferentes concentrações de dextrose.....	93
4.8.2 Degradação do diurom por <i>Bacillus cereus</i>	95
4.8.3 Degradação do sulfato de endossulfam por <i>Bacillus cereus</i>	101
4.8.4 Regressão em função do tempo.....	108
6 CONCLUSÕES.....	1
12	
7 RECOMENDAÇÕES.....	1
14	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXOS.....	140

1 INTRODUÇÃO

O atual sistema de produção agrícola exige a utilização intensiva de insumos químicos, dentre eles destacam-se os pesticidas. Estas substâncias utilizadas no controle de plantas daninhas, insetos e microrganismos nocivos às culturas possibilitam a produção e colheita de grandes quantidades de alimentos, minimizando, assim, os prejuízos para o agricultor. Com o crescimento demográfico, a demanda de alimentos aumentou e, portanto, para garantir alimentos suficientes e de qualidade à população, faz-se o uso de pesticidas (SANCHES et al., 2003). Esses compostos são aplicados em quantidades significativas e em áreas extensas tendo como principal destino o meio ambiente.

A contaminação por pesticidas ocorre tanto pontualmente como nas áreas adjacentes, podendo atingir até mesmo locais mais distantes do ponto de aplicação. Dependendo de suas características os pesticidas podem permanecer em diferentes compartimentos ambientais, tais como atmosfera, solo, água de superfície e subterrânea. Por meio das suas propriedades físico-químicas, pode-se estimar seu comportamento no meio ambiente, desde a aplicação até o destino final, assim como as interações com o solo e o transporte, quando dissolvidos em água ou associados ao sedimento (BARCELÓ et al., 2003; SILVA; FAY, 2004).

Alguns pesticidas podem ser degradados por vias químicas, fotólise ou ação de microrganismos. Entretanto, as moléculas com alta persistência (baixa taxa de degradação) podem permanecer no ambiente sem sofrer qualquer alteração (SANCHES et al., 2003).

Apesar da importância dos pesticidas para a agricultura seu uso pode acarretar sérios problemas ao meio ambiente e à saúde humana. Na tentativa de minimizar estes problemas, buscam-se moléculas que apresentem baixa persistência e baixo potencial de lixiviação no ambiente, alta especificidade, eficiência em pequenas doses e baixa toxicidade para organismos não alvos (DAMIN, 2005).

Os recursos hídricos são os mais afetados devido à agricultura exigir um suprimento de água, o que conduz o desenvolvimento dessa atividade próximo a rios e lagos (CARVALHO et al., 2000; LOURENCETTI et al., 2005).

A contaminação de fontes de águas subterrâneas ou superficiais é um dos problemas que deve ser enfrentado pela humanidade, constituindo-se num problema de saúde coletiva. A avaliação do potencial de contaminação do ambiente por pesticidas propicia informações úteis para que políticas de regulamentação destes compostos possam ser formuladas, embasando ações que minimizem o impacto ambiental.

O comprometimento destes recursos naturais pode gerar graves prejuízos à saúde humana, principalmente quando estes são utilizados como fonte para abastecimento público (PARAIBA et al, 2003; WORRAL et al., 2004). Tal situação exige controle e estudos que possibilitem o monitoramento de pesticidas no meio ambiente.

Os recursos hídricos agem como integradores dos processos biogeoquímicos de qualquer região. Sendo assim, quando pesticidas são aplicados, particularmente na agricultura, os recursos hídricos, sejam superficiais ou subterrâneos, são os principais destinos dos pesticidas. Programas de monitoramento ambiental, realizados por meio de estudos de campo bem planejados, são considerados por diversos autores como o melhor procedimento de avaliação, gerando informações que subsidiem ações para minimizar a poluição da água subterrânea (AZEVEDO et al., 2000; FILIZOLA et al., 2002).

O solo, por sua vez, é o principal receptor dos pesticidas utilizados na agricultura. A interação pesticida-solo depende, principalmente, das características físico-químicas tanto do solo quanto do pesticida. Em função disso, o pesticida poderá seguir diferentes rotas no solo: ser retido na fração orgânica e/ou mineral; sofrer degradação fotoquímica, química ou biológica; ser volatilizado; ser lixiviado para as camadas mais profundas do solo, podendo alcançar as águas subterrâneas ou ser carregado superficialmente e atingir as águas superficiais ou ser absorvido por plantas (MARTINS, 2006).

No ambiente edáfico os resíduos passam por transformações ou processos físicos, químicos, biológicos, ou combinação deles que podem determinar desde seu desaparecimento, até o aparecimento de metabólitos mais tóxicos do que o composto originalmente aplicado ou, ainda, maior persistência nesse ambiente. Porém, reconhece-se atualmente que a grande variedade de microrganismos presentes no solo é potencialmente capaz de biodegradar pesticidas até produtos simples que podem entrar nos ciclos biogeoquímicos da natureza (ANDREA, 2003).

O termo biodegradação tem sido utilizado para a descrição de transformações de todos os tipos, incluindo aqueles que originam produtos menos tóxicos que o composto original, pela sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa mineralização até CO₂, H₂O

(MUSUMECCI, 1992) ou formação de metabólitos, muitas vezes mais tóxicos que o produto original.

Os microrganismos compreendem muito da biodiversidade terrestre e desempenham funções importantes nos ciclos biogeoquímicos e no funcionamento dos ecossistemas (BELL et al., 2005). Além dessas “funções” ambientais, microrganismos e seus derivados têm grande potencial biotecnológico, tais como bioinoculantes para produção agroflorestal, controle biológico, biorremediação, produção de fármacos como antibióticos, enzimas, corantes entre outras substâncias químicas. Contudo, a magnitude da biodiversidade microbiana ainda não é conhecida e, conseqüentemente, seu potencial a ser explorado.

O consumo anual de pesticidas no Brasil tem sido superior a 300 mil toneladas de produtos comerciais. Expresso em quantidade de ingrediente-ativo (i.a.), são consumidas anualmente no país cerca de 130 mil toneladas; representando um aumento no consumo de pesticidas de 700% nos últimos quarenta anos, enquanto a área agrícola aumentou 78% nesse período (SPADOTTO et al., 2004).

A rápida evolução da remoção da vegetação nativa no Centro-Oeste brasileiro, sem prévio zoneamento agroecológico, passou a constituir uma grave ameaça à sustentabilidade dos agrossistemas implantados, principalmente pela perda de biodiversidade e dos recursos naturais do solo, fauna e flora. Na década de 1970, extensas áreas de matas e cerrados foram removidas e ocupadas com exploração agropecuária, com expressiva utilização de pesticidas (VIEIRA et al., 2001).

Atualmente, o Estado de Mato Grosso se destaca, em nível nacional, na produção agropecuária, e novas opções econômicas estão sendo implantadas e em franco desenvolvimento como a indústria, os agros-negócios e o setor de serviços. Mato Grosso abriga três importantes biomas: o cerrado, o pantanal e a floresta amazônica, inseridos nas três mais importantes bacias hidrográficas da América do Sul, a Amazônica (Rios Juruena, Teles Pires, Xingu, Araguaia, etc), a Platina onde o Rio Paraguai é o seu principal formador, e a Tocantins-Araguaia, despertando a necessidade dos cuidados com sustentabilidade desses ambientes.

Os cerrados apresentam-se como uma das alternativas com maior potencial para expansão agrícola brasileira. Por suas características de localização geográfica, clima e extensão, cerca de 112 milhões de hectares de terras aráveis são potencialmente aptos para o cultivo (PERES et al., 1992).

No Estado de Mato Grosso são cultivadas espécies de grande importância econômica, como o algodão, a soja, o milho entre outras. Para a manutenção dos altos níveis de sua produtividade, o uso de pesticidas no manejo destas culturas tem sido uma prática amplamente utilizada, principalmente na cultura do algodoeiro, em que são aplicadas expressivas quantidades de pesticidas. Nesta cultura, o número de aplicações varia de 10 a 12 aplicações por safra, remetendo à maior possibilidade de contaminação dos recursos naturais (MARTINS, 2006).

A região centro sul do Estado de Mato Grosso tem uma vasta área ocupada por lavouras que, durante muitos anos, tem sido utilizada para monoculturas, predominantemente a cultura da soja, com milho sendo cultivado no período da entressafra. A manutenção da monocultura exigiu o desenvolvimento e utilização de grandes quantidades de insumos agrícolas, como os pesticidas, que foram intensamente empregados durante anos nas grandes propriedades da região.

A agricultura, a pecuária e a indústria extrativa de madeiras, fizeram o Estado se destacar no cenário nacional. Com tecnologia, capacidade técnica e gerencial, a produção e a produtividade colocaram o Estado em um patamar importante para o País.

Entretanto, como toda medalha que tem duas faces, este mundo contemporâneo, com crescente aumento populacional necessita de energias vitais, mas a preservação da natureza fica ameaçada, fazendo-se necessária a geração de mecanismos culturais e fiscalizadores voltados à conservação do ambiente. Neste contexto, a água e o solo despontam como as grandes preocupações deste século e precisam ser cuidadas com interesse maior.

Entre os produtos agrícolas cultivados em Mato Grosso, a cultura do algodão se destaca. A cada nova safra, aumenta-se a produção e em conseqüência, um aumento na quantidade de pesticidas aplicados no combate a antigas e novas pragas e doenças, que podem ser carregados para cursos de água e represas e dentre as conseqüências indesejáveis do uso das mesmas, podem ser citadas a presença de resíduos no solo, água e ar, nos tecidos vegetais e animais e como decorrência destruição de microrganismo do solo, efeitos prejudiciais sobre organismos não alvos, mortalidade de insetos que ocupam importantes nichos e presença de resíduos em alimentos, além da contaminação ocupacional (DORES, 2001).

Para esta proposição, consideramos a grande quantidade de agroquímicos que vem sendo utilizada anualmente - 75 mil toneladas em 2008, segundo IBGE, para manutenção das vastas áreas de lavoura, principalmente de soja, milho e algodão, na região centro sul do Estado.

1.1 Justificativa

Mato Grosso tem sua economia baseada na agricultura onde predomina a monocultura desenvolvida em grandes extensões, altamente tecnificada e dependente do uso de insumos químicos como fertilizantes e pesticidas. Quantidades elevadas destes últimos têm sido usadas no Estado, sem que se tenha uma avaliação do risco de contaminação ambiental decorrente deste uso.

A incipiência de informações sobre a persistência destes pesticidas no solo, em águas superficiais ou subterrâneas da região e o potencial de periculosidade para o meio ambiente, por si, já justificaria este tipo de estudo.

Trata-se de projeto com relevância para o Estado de Mato Grosso, que tendo uma vasta área ocupada por lavouras é o 2º maior produtor agrícola do país (SINDAG, 2008). O desenvolvimento das técnicas de plantio direto de culturas como soja, algodão e milho levaram a uma mudança no espectro dos produtos utilizados, resultando na adoção de produtos químicos, alguns dos quais persistentes por longo período no sedimento e em água (DORES et al., 2004), o que também justifica o tipo de pesquisa desenvolvida, que poderá subsidiar futuros monitoramentos e ações de bioremediação em solo e cursos d'água de regiões agrícolas no estado.

Estes estudos são necessários pelas diversas e crescentes demandas de desenvolvimento de linhas de pesquisa em gestão de recursos naturais que possam lidar com os problemas ambientais e prevenir futuros. No plano sócio-econômico, o presente projeto pode responder à demanda de formação de profissionais qualificados neste domínio.

O pesticida diurom e o metabólito sulfato de endossulfam foram estudados devido à ampla utilização deste composto (diurom) na agricultura mato-grossense e a presença marcante de ambos na área de estudo escolhida (DORES et al., 2009).

1.2 Objetivo Geral

- Promover bioprospecção de espécies bacterianas com potencial de biodegradação de diurom e sulfato de endossulfam.

1.3 Objetivos Específicos

- Isolar e quantificar microrganismos heterotróficos aeróbios e facultativos totais cultiváveis em amostras de solo de área agrícola.
- Sequenciar um fragmento de um gene 16S de estirpes isoladas com potencial de biodegradação.
- Estudar a degradação do pesticida diurom e do metabólito sulfato de endossulfam por bactérias edáficas isoladas de horizontes de solo tropical.
- Correlacionar a curva de degradação do diurom e do sulfato de endossulfam com a curva de crescimento bacteriano (*Bacillus cereus*) *in vitro*, visando verificar o potencial degradador da estirpe isolada.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Solo

A grande inquietação da agricultura atual está na busca da sustentabilidade da exploração agrícola tanto no âmbito social quanto ambiental, ou de uma nova condição de equilíbrio do sistema de produção, o que envolve vários fatores, entre eles o manejo adequado do solo (SOARES et al., 2005).

No estado natural, os solos possuem características químicas e físicas definidas, em razão da rocha matriz, dos processos da pedogênese, da vegetação e da topografia. Inevitavelmente, o desflorestamento e a mecanização continuada podem desequilibrar o sistema solo e o meio e modificar suas propriedades químicas, físicas e biológicas, limitando sua utilização agrícola e tornando-o mais suscetível à erosão (CENTURION et al., 2001).

Solos de boa estabilidade estrutural estão menos sujeitos à compactação e à erosão (RUSSEL, 1973). Os atributos do solo que determinam a estabilidade estrutural estão ligados à textura, à mineralogia das argilas, à matéria orgânica, ao material inorgânico não-cristalino, à composição de fluidos do meio poroso, às plantas e organismos do solo e à profundidade do perfil do solo (KAY; ANGERS, 1999).

Sabe-se que a maior parte da fração orgânica no solo é estável e chamada de fração húmica (FASSBENDER, 1980), que irá formar agregados estáveis e persistentes no solo (TISDALL; OADES, 1982).

Muitos autores citam a importância de sistemas de manejo do solo que visam ao menor tráfego de máquinas, menor revolvimento do solo e aumento do teor de carbono orgânico (CO), como o plantio direto e o pousio, como medidas para recuperar as propriedades físicas do solo (CAMPOS et al., 1995; CASTRO FILHO et al., 1998; SILVA; MIELNICZUK, 1997).

Bactérias e fungos são capazes de unir a fração mineral do solo em agregados estáveis, porém cada microrganismo tem uma eficiência específica quando se trata de agregar partículas (HARRIS et al., 1966). GUGGENBERGER et al. (1999) verificaram que o crescimento da

comunidade fúngica proporcionado pela adição de fontes de energia levou à aproximação de partículas primárias por enlases de hifas que formaram agregados. Dados semelhantes foram encontrados por MOLOPE et al. (1987), que também verificaram que, quando a comunidade bacteriana cresce, há decréscimo da comunidade fúngica.

Das três classes de partículas primárias do solo, a argila é o fator mais importante para a estabilidade de agregados (RUSSEL, 1973). A fração argila exerce domínio sobre o comportamento do solo em virtude de sua pequena dimensão, o que aumenta de maneira significativa sua superfície específica, e da presença de cargas negativas permanentes.

Mbagwu et al. (1993) verificaram que solos com grandes quantidades de areia fina e silte dispersam-se facilmente e que solos com boa estabilidade de agregados estão relacionados com a soma dos teores de argila e areia grossa, bem como a estabilidade de agregados tem relação com o teor de argila e areia grossa.

Já Boix-Fayos et al. (2001) observaram que apenas a fração argila se correlacionava positivamente com os índices de agregação do solo. Segundo Dutartre et al. (1993), a fração areia somente formou agregados, quando suas partículas estavam “cimentadas” por microagregados de origem orgânica ou mineral.

2.2 Pesticidas

A legislação brasileira utiliza o termo agrotóxico enquanto o termo pesticida tem sido mais utilizado nos textos científicos.

A Lei Federal n.º 7 802, de 11/07/89, regulamentada pelo Decreto n.º 98 816, no seu artigo 2, inciso I, definiu o termo “agrotóxico” da seguinte forma: “Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

A utilização e comercialização de pesticidas no Brasil estão disciplinadas na Lei n.º 7.802, de 11 de janeiro de 1989, e regulamentadas no Decreto n.º 98.816, de 11 de janeiro de

1990. Esse decreto classificou os pesticidas em função da sua utilização, modo de ação e potencial ecotoxicológico ao ser humano e aos demais organismos vivos presentes no ambiente. Foram estabelecidas quatro classes de toxicidade: I, II, III, IV, que se referem a extremamente tóxicos, altamente tóxicos, medianamente tóxicos e pouco tóxicos, respectivamente.

A Portaria Normativa nº 139, de 21 de dezembro de 1994, do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com base no Decreto no 98.816/90, classificou os pesticidas quanto ao potencial de periculosidade ambiental, levando-se em consideração as seguintes variáveis: bioacumulação, persistência, toxicidade a diversos organismos, potencial mutagênico, carcinogênico e teratogênico. Os produtos foram classificados em I, II, III, IV, respectivamente, altamente perigoso, muito perigoso, perigoso e pouco perigoso.

Os pesticidas podem ser classificados quanto à finalidade (aficida, ovicida, larvicida, raticida, formicida, acaricida, inseticida, entre outros) e quanto ao modo de ação (ingestão, contato, microbiano e fumegante) sendo possível o enquadramento em mais de uma classe. Quanto à origem, a divisão envolve os compostos inorgânicos (compostos de mercúrio, bário, enxofre e cobre), os pesticidas de origem vegetal, bacteriana e fúngica (piretrinos, antibióticos e fitocidas), e os pesticidas orgânicos (SANCHES et al., 2003).

O consumo de pesticidas pela agricultura brasileira apresenta quantidades expressivas, inclusive no Estado de Mato Grosso (Tabela 1). O *ranking* da importação de pesticidas é liderado pelos herbicidas, seguido pelos fungicidas, inseticidas, acaricidas e outros (SINDAG, 2008).

Tabela 1 Estimativa do Mercado de Defensivos Período Jan-Outubro - 2007 vs 2008 (Milhões R\$). (SINDAG, 2008)

Mercado (Estimativa em milhões R\$)			
Segmentos	2007	2008	% Var.
Herbicidas	3,446	4,643	35%
Fungicidas	1,728	2,173	26%
Inseticidas	2,244	2,944	31%
Acaricidas	145	176	21%
Outros	257	309	20%
TOTAL	7,821	10,246	31%

As principais características físico-químicas citadas pela literatura para o pesticida diurom e o metabólito sulfato de endossulfam aqui estudados são descritas a seguir.

A preocupação com a contaminação de ambientes aquáticos aumenta, principalmente, quando a água é usada para o consumo humano. A Comunidade Económica Europeia estabeleceu em $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ a concentração máxima admissível de qualquer pesticida em águas destinadas para consumo humano e em $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para o total de resíduos, sem deixar claro se deve-se, ou não, considerar também produtos de transformação (BARCELÓ, 2003).

Este limite tem sido motivo de questionamento uma vez que não considera a toxicidade de cada produto, e ainda, as metodologias analíticas disponíveis para alguns compostos não atingem limites de detecção desta ordem de grandeza (WALLS et al., 1996).

Por outro lado, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) (BARCELÓ, 2003) e a Organização Mundial da Saúde estabelecem níveis máximos para pesticidas individuais em água destinada ao consumo humano, baseados em estudos toxicológicos e epidemiológicos.

No Brasil, a portaria nº 357/CONAMA 2005, estabelece limites máximos de contaminantes em águas dependendo de seu destino; sendo que, dentre estes, estão alguns pesticidas organoclorados, organofosforados e carbamatos.

A Portaria 518 de 2004 do Ministério da Saúde (Padrão de Potabilidade de Água Destinada ao Abastecimento de Populações Humanas) estabelece limites de pesticidas em águas destinadas ao consumo humano. No entanto, estas legislações não contemplam a maioria dos pesticidas em uso atualmente como, por exemplo, inseticidas piretróides e a maioria dos herbicidas.

Os pesticidas constituem um largo espectro de produtos químicos utilizados na agropecuária para controlar insetos, doenças de plantas e animais e combater plantas invasoras de culturas e pastagens. No Brasil, utilizam-se com o mesmo significado os termos biocidas, pesticidas, defensivos agrícolas, praguicidas e agrotóxicos, e a utilização destes produtos está disciplinada e regulamentada, respectivamente, pela Lei nº 7.802 de 11/01/1989 e pelo Decreto nº 98.816 de 11/01/1990.

2.2.1 Diurom

O diurom [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia] (Figura 1), pertencente ao grupo químico das feniluréias, é recomendado para aplicação em diversas culturas no Brasil, sendo intensivamente aplicado na cultura de cana-de-açúcar (MUSUMECI et al., 1995). Apresenta alta persistência e adsorção ao solo, podendo contaminar solos agrícolas e o ambiente urbano. Segundo Nitschke e Schüssler (1998), em municípios da Alemanha, o diurom representa 80% do total de herbicidas encontrados nos efluentes de estação de tratamento de água.

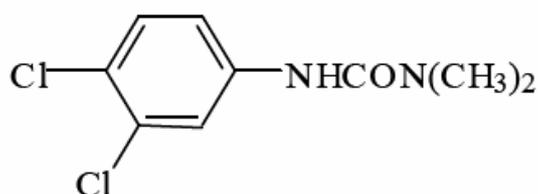


Figura 1 Estrutura química do diurom [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia].

Outra característica do diurom é a toxicidade a organismos do solo e aquáticos. Nebeker e Schuytema (1998) estudaram o efeito crônico do diurom em peixes e invertebrados e constataram que a sobrevivência e reprodução de *Daphnia pulex* foi reduzida significativamente quando a concentração de diurom na água era de 7,7 mg L⁻¹. Nemes-Kósa e Cserhádi (1995); Canna-Michaelidou e Nicolaou (1996) estudaram os efeitos tóxicos e genotóxicos do diurom em fungos e bactérias.

Nas plantas suscetíveis, tem-se como mecanismo de ação a inibição da reação de Hill durante a fotossíntese, causando a clorose seguida de necrose das folhas. Esse herbicida é adsorvido pelos colóides do solo, sendo pouco lixiviável em solos argilosos, mas lixiviável nos arenosos (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998).

A bactéria *Acinetobacter baumannii* demonstrou capacidade para crescer e utilizar o herbicida diclofopmethyl como fonte de carbono e energia, conforme Smith-Greiner e Adkins (1996).

As principais características desta molécula relacionadas ao seu comportamento são a baixa solubilidade em água (40 mg L⁻¹ a 25°C) (MONTGOMERY, 1997); logK_{ow} de 2,85 (LUCHINI, 1987) e persistência relativa nos solos (meia-vida de dissipação de 90 a 180 dias) (CULLINGTON; WALKER, 1999). Quando aplicados em baixas doses os resíduos fitotóxicos

do herbicida são dissipados, geralmente, em alguns meses, porém aplicações em doses mais elevadas favorecem a persistência destes resíduos por mais de um ano (KIDD; JAMES, 1991).

A principal forma de dissipação do diuron no solo é a degradação microbiológica. A fotodegradação é significativamente importante apenas quando a molécula permanece na superfície do solo por vários dias ou semanas (HESS; WARREN, 2002).

O diuron é degradado sob condições aeróbicas pelos microrganismos, que realizam N-dimetilação do grupo uréia e, posteriormente, a hidrólise podendo transformar-se nos seguintes metabólitos, N-(3,4-diclorofenil)-N-metiluréia (DCPMU), 3,4-diclorofeniluréia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (DALTON et al, 1966). Sob condições anaeróbia, ocorre a formação do produto declorinado N-(3-clorofenil)-N-metilureia (mCPMU). O produto tóxico, mutagênico e potencialmente carcinogênico de condensação do DCA, 3,3',4,4'-tetracloroazobenzeno, também é um metabólito potencial do diuron (FIELD et al., 1997). A trajetória de degradação do diuron e seus metabólitos é mostrada na figura 2.

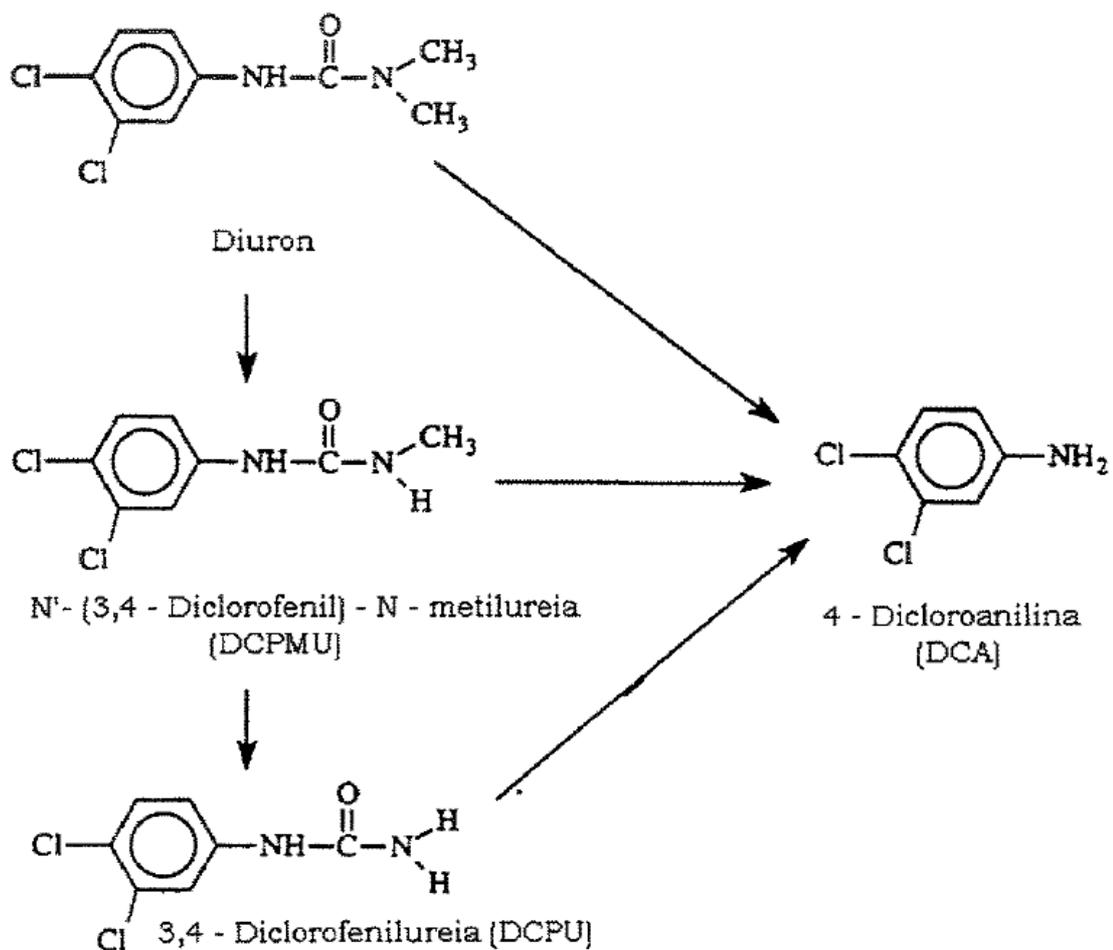


Figura 2 Trajetória da degradação do diuron por microrganismos aeróbicos (SCRIBNER et al., 2000)

Pertence à Classe Toxicológica III (medianamente tóxico) e Classe Ambiental II (ANVISA, 2009).

O diurom, quando aplicado nas doses recomendadas, apresenta persistência média de quatro a oito meses, dependendo do tipo de solo e das condições climáticas. Quando aplicado em doses altas, persiste no solo por mais de um ano e, em doses esterilizantes, podem manifestar sintomas de fitotoxicidade por alguns anos. Sua degradação é, sobretudo, microbiana, sendo sensível à fotodecomposição e, moderadamente, à volatilização quando exposto na superfície do terreno por vários dias, sob condições de temperatura alta e baixa umidade (RODRIGUES; ALMEIDA, 1998; WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA, 2002).

Sumpono et al. (2003) verificaram o efeito de diurom em bactérias aquáticas, em pequeno lago de tratamento de águas residuais em escala piloto, dando ênfase a *Aeromonas* spp., por serem consideradas bactérias indicadoras do estado higiênico da água. Após a contaminação com diurom, ocorreu aumento das bactérias totais, das bactérias cultivadas (em 30 vezes) e *Aeromonas* spp., por um período de duas semanas, voltando, posteriormente, para os valores iniciais. A quantidade de bactérias cultiváveis relativa à bactéria total foi de 0,2% no controle e 1,2% na lagoa tratada, enquanto a porcentagem de *Aeromonas* spp., relativo à bactérias cultivável diminuiu de 6% a 10% para 2%. Os resultados sugerem que o diurom mantém o desenvolvimento de bactérias cultiváveis devido à nova fonte de carbono derivada da decomposição de microrganismos fotossintéticos que foram inativados pelo diurom; porém, essa nova fonte de carbono não favorece especificamente o crescimento de *Aeromonas* spp.

Widehem et al. (2002) isolaram e caracterizaram a linhagem de bactéria, *Arthrobacter* sp. N2, isolada de solo contaminado com diuron por vários anos, a qual foi capaz de transformar, quantitativamente, diuron em 3,4-dicloroanilina.

2.2.2 Sulfato de endossulfam

O endossulfam é comercializado como uma mistura de dois isômeros (70% do isômero α e 30% do β), sendo que no ambiente a meia-vida do isômero β é bem maior que a do α (DORES et. al., 2005).

O sulfato de endossulfam (Figura 3) é o principal produto de degradação química, resultado da oxidação dos isômeros, cuja toxicidade se assemelha a dos dois isômeros. Este

metabólito foi observado em plantas e é mais persistente que os compostos originais, constituindo cerca de 90% dos resíduos após 11 meses (EXTOXNET, 1996). Em solos secos, a formação do sulfato pode ser suprimida e, sob condições anaeróbicas, a meia-vida dos isômeros alfa e beta e do sulfato de endossulfam são semelhantes (ANJOS, 2005).

As principais características desta molécula são: Peso molecular de 422,9 g mol⁻¹, solubilidade em água de 117-220 (25°C) µg.L⁻¹ e pressão de vapor de 1x10⁻⁵ (25°C) mmHg, segundo Corrêa (2005).

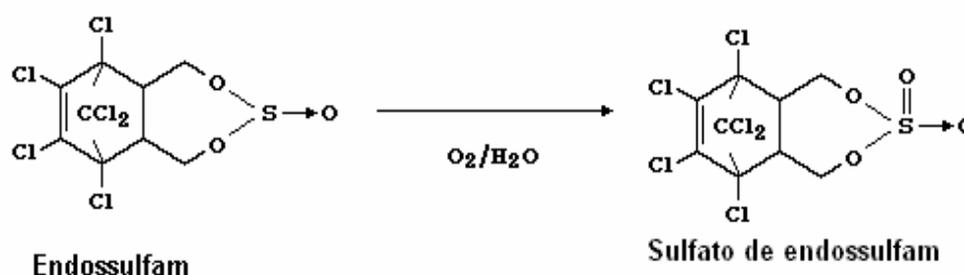


Figura 3 Degradação química do endossulfam em sulfato de endossulfam.

A umidade e a temperatura do solo são os fatores que mais influenciam a degradação dos isômeros parentais e do sulfato de endossulfam. A degradação do isômero alfa endossulfam é mais afetada pelas mudanças no conteúdo de água no solo enquanto o beta endossulfam é mais influenciado pela temperatura (GHADIRI; ROSE, 2000).

O sulfato de endossulfam também pode ser formado em muitos ambientes naturais a partir de oxidação biológica, é degradado lentamente e é o principal resíduo de endossulfam em ambientes aquáticos aeróbicos (ANJOS, 2005).

Endossulfam é reconhecidamente muito tóxico para peixe e outros organismos aquáticos. A concentração letal a 50 % da população (CL50) do endossulfam, em laboratório, para peixes é de cerca de 1 mg L⁻¹ e a concentração mínima com efeito observado (CEO) para estes organismos é 0,4 mg L⁻¹ (DORES et. al., 2005).

2.3 Utilização de pesticidas na agricultura

Os pesticidas constituem, hoje, um largo espectro de produtos químicos utilizados na agropecuária para controlar insetos, doenças de plantas e animais e combater ervas invasoras de culturas e pastagens. Pela eficácia desses pesticidas, ocorreu crescente demanda setorial, com o objetivo de aumentar a produtividade dos agrossistemas direcionados para a produção de alimentos, o que viabilizou rapidamente a atividade industrial. Os efeitos imediatos e reflexos de contaminação humana e ambiental foram durante muitos anos negligenciados ou considerados de baixa relevância (VIEIRA et al., 2001).

Uma vez utilizados, os pesticidas podem seguir diferentes rotas no meio ambiente, os quais estão relacionados diretamente às suas propriedades físico-químicas, à frequência e às quantidades aplicadas, aos métodos de aplicação, às características bióticas e abióticas do ambiente e às condições meteorológicas (LAVORENTI, 1996; FRIGHETTO, 1997; MARQUES et al., 2002; FILIZOLA et al., 2002; LAABS et al., 2002).

O uso de xenobiontes nos sistemas agropecuários traz preocupação a respeito da permanência desses produtos químicos no ambiente, pois podem persistir por longos períodos de tempo, acumulando-se. Substâncias mais persistentes são, sobretudo, as lipofílicas, que se incorporam facilmente a outras substâncias apolares da matéria orgânica do solo ou do sedimento, a lipídeos de membranas celulares, entre outros, e por sua vez não ficam expostas a enzimas ou processos químicos de degradação, garantindo assim alta persistência e longevidade no meio ambiente, como acontece com o DDT (LANGENBACH, 1994).

O destino dos pesticidas no ambiente é complexo. Entre os vários fatores e processos que estão relacionados ao seu comportamento no ambiente, inclui-se a sorção, a lixiviação, a volatilização, a degradação, a bioacumulação, etc. Estes dependem dos atributos do solo e das condições climatológicas, além das propriedades dos pesticidas (RAMSAY et al., 1955; FRIGHETTO, 1997).

Quando um pesticida é inserido no ambiente seu destino mais provável é o solo, seja por aplicação direta ou pela incorporação de restos culturais. Uma vez no solo pode sofrer processos de retenção, transformação e transporte, a extensão em que estes processos ocorrem determina seu destino, persistência e eficiência agrônômica. Os principais fatores que influenciam estes processos são: as condições climáticas, as propriedades físico-químicas do produto e as características físicas, químicas e microbiológicas do solo (DAMIN, 2005).

Os pesticidas atingem o solo não só pela incorporação direta na superfície, como também através do tratamento de sementes com fungicidas e inseticidas, no controle de fungos patogênicos no solo, ou pela eliminação de ervas daninhas por herbicidas. Esses compostos podem, ainda, atingir o solo de forma indireta, pela pulverização das partes verdes dos vegetais e pela queda de frutos ou folhas que receberam aplicação de agrotóxicos (MUSUMECI, 1992). Uma vez no solo, podem ser transportados em grandes quantidades, pelas águas das chuvas, que levam a cobertura vegetal e parte do solo, atingindo, principalmente, águas superficiais como rios e lagos.

A contaminação dos solos pelo uso de pesticidas pode comprometer os ecossistemas ambientais e a saúde do ser humano. Estudos têm evidenciado que os pesticidas podem permanecer no ambiente durante longo tempo, causando grandes mudanças ecológicas e efeito ambiental negativo (SOLOMONS, 1989; ANDRÉA, 2004). Para prevenir contaminações do ambiente é preciso conhecer com certo detalhe a dinâmica e o destino dos pesticidas após sua aplicação, que é bastante influenciada pelo mecanismo de sorção (retenção) às partículas do solo. Para compreender os mecanismos de sorção de um pesticida ao solo é fundamental conhecer as características físicas e químicas do solo e da molécula.

A detecção freqüente de pesticidas hidrofóbicos no meio ambiente, como a trifluralina e o endossulfam, que são extremamente tóxicos para organismos aquáticos (HARTLEY; KIDD, 1987), aponta para uma maior mobilidade dessas substâncias em ambientes tropicais devido à maior volatilização (ALEGRIA; SHAW, 1999). Esses resultados evidenciam a necessidade de aprofundar as pesquisas nesse assunto, principalmente as relacionadas à distribuição de pesticidas, à acumulação e às concentrações máximas no ambiente, especialmente, quando se leva em consideração que os dados sobre bioacumulação e concentrações após tempestades em rios inexistem completamente para a bacia do Pantanal.

Sabe-se que os pesticidas lixiviados para a camada sub-superficial do solo estão sujeitos à degradação mais lenta em relação à camada superior (FOMSGAARD, 1995). Em áreas de planalto tropical, o lençol freático está geralmente situado mais próximo à superfície do que em regiões temperadas, exceto em áreas de platô onde o lençol é mais profundo. Assim, a determinação da degradação de pesticidas e de sua mobilidade no subsolo é de grande importância para a avaliação da contaminação de águas subterrâneas em regiões tropicais. Entretanto, praticamente inexistem informações sobre a mobilidade, persistência e estoque de pesticidas no subsolo sob áreas agrícolas.

Aparentemente, a rápida dissipação de pesticidas a partir da superfície de solos tropicais pode somente em parte ser atribuída a uma maior degradação. Ela também é causada pela saída substancial de pesticidas da área alvo por carreamento superficial, lixiviação e perdas para a atmosfera (RACKE et al., 1997). Especialmente no caso dos pesticidas voláteis (por exemplo, trifluralina e endossulfam), as altas concentrações encontradas em águas de chuva, em combinação com sua rápida dissipação durante o primeiro dia após sua aplicação, apontam a volatilização como o principal caminho de saída de pesticidas a partir de sua área de uso sob clima tropical (LAABS et al., 2002).

Deve-se ressaltar que alguns produtos, ao se dissipar, geram metabólitos tão ou mais tóxicos que a molécula original. Alguns exemplos desse fenômeno são: o fungicida clorotalonil, o herbicida atrazina e o inseticida endossulfam (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A atividade humana pode causar modificações significativas nos fatores químicos e físicos do solo, seja pela adição ou remoção de elementos (adubação, calagem, exportação por colheita), seja por práticas de cultivo (plantio convencional, direto) que causarão impacto na comunidade biológica (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

As características do solo também influenciam no comportamento das moléculas dos pesticidas nos diversos compartimentos do ambiente. A capacidade de campo, a fração da porosidade do solo preenchida com ar, a densidade do solo, a fração de matéria orgânica e a constituição mineralógica são variáveis integrantes nos estudos que visam avaliar a dinâmica dos pesticidas no ambiente (RAO et al., 1985; GUO et al., 2000; MATSUI et al., 2003).

Além dos fatores supracitados, as propriedades meteorológicas como a recarga líquida, a pluviosidade e a temperatura exercem profunda influência no comportamento de contaminantes no ambiente (KANAZAWA, 1989; MANGELS, 1991; MATTOS; SILVA, 1999). O nível do lençol freático também é um fator importante nesta avaliação, pois a profundidade do lençol determina a espessura da coluna de solo pelo qual os pesticidas deverão percorrer até atingir a porção superior do lençol freático, contaminando-o (RAO et al., 1985).

Vários autores, em outros países, estão também preocupados com os impactos dos pesticidas sobre a fauna aquática (MUIRHEAD- THOMSON, 1987; MURTY, 1988; NRIAGU). Outros cientistas estão interessados em quantificar a carga de pesticida em bacias hidrográficas proveniente da agropecuária, determinar concentrações letais, subletais e os efeitos que podem alterar a dinâmica das cadeias alimentares aquáticas (KASAI; HANAZATO, 1995; MONTAÑÉS; HATTUM, 1995; GHOSH; BATTACHARAYA, 1994;

MAUND et al.,1997; SIEFERT et al., 1989). Outros pesquisadores estão estabelecendo modelos estatísticos capazes de identificar variáveis naturais e antropogênicas que estão relacionadas com as concentrações de biocidas agrícolas em bacias hidrográficas (BATTAGLIN; GOOLSBY, 1997).

Os pesticidas podem se infiltrar no solo, atingindo as águas subterrâneas e ser encontrados em poços utilizados para abastecimento de água para uso doméstico ou para dessedentação de animais. A importância relativa dessas duas formas de transporte depende, em grande parte, do tipo de solo e do relevo da região (RIGITANO; BARBOSA, 1994; MOREIRA; CRUZ, 1996).

A contaminação dos recursos hídricos por moléculas organossintéticas, como os pesticidas, ocorre pelo escoamento superficial, “run off”, e pelo transporte de fluxo de massa através do solo até atingir a zona de saturação (lixiviação), exemplificado na figura 4. No transporte por fluxo de massa é necessário que o pesticida esteja na solução do solo. Assim, todos os processos relacionados à disponibilidade destas moléculas na solução do solo devem ser considerados (BARIZON, 2004).

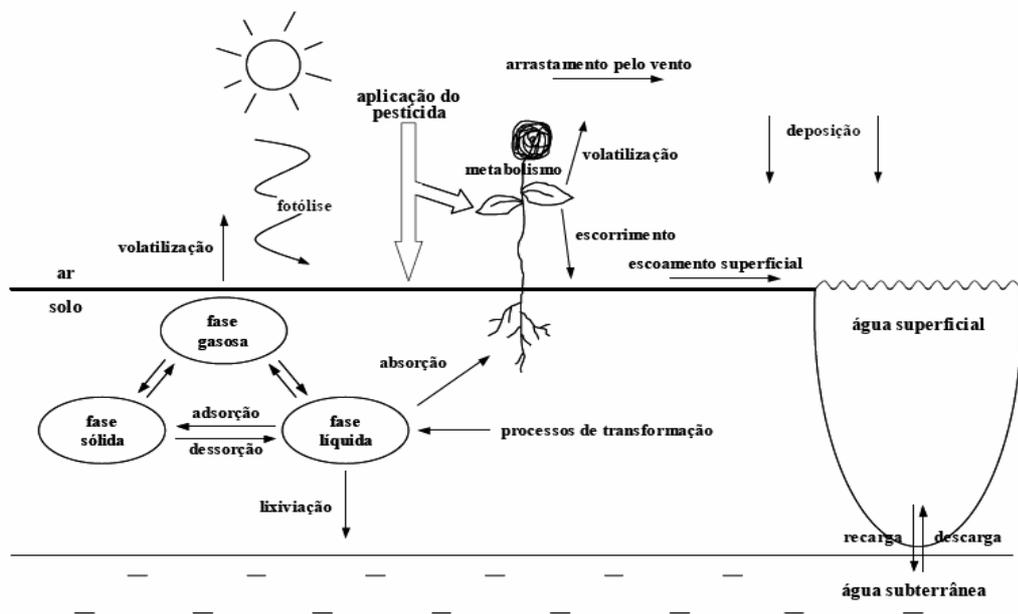


Figura 4 Esquema simplificado do comportamento dos pesticidas no ambiente (BATISTA, 2003).

A contaminação das águas superficiais (MURTY, 1988) e subterrâneas (CLOSE, 1996) por pesticidas usados na agropecuária é um problema mundial. No Quênia, Mwanthi (1998)

demonstrou que na estação chuvosa as águas que drenam áreas agrícolas são fontes potenciais de pesticidas para as águas superficiais e subterrâneas.

A preservação da qualidade da água subterrânea vem sendo amplamente debatida em todas as partes do mundo, frente à diversidade de fontes poluidoras a que esse recurso natural está exposto. Vários trabalhos mostram que a lixiviação de pesticidas nos solos pode resultar em contaminação dos reservatórios de águas subterrâneas (PAPA et al., 2004; MATSUI et al., 2003; BOUMAN et al, 2002; SPADOTTO et al., 2001; YEN et al, 2001).

Na Índia, Ghosh e Battacharaya (1994) demonstraram, experimentalmente, que o organofosforado meta-ácido 50 e o carbamato carbaryl causaram efeitos deletérios aos peixes expostos em níveis subletais.

Hanazato (1998), revisando a literatura, verificou que o inseticida carbaryl, mesmo em baixas concentrações, pode afetar indiretamente a dinâmica das populações e a estrutura das comunidades zooplancônicas. Os resultados evidenciaram que o estresse causado pelos inseticidas reduziu o tamanho médio dos organismos e a eficiência dos processos de transferência de energia, aumentou o tamanho da cadeia alimentar e, em alguns casos, aumentou a riqueza em espécies (HANAZATO, 1998).

Segundo Garmouma et al. (1997), vários estudos revelaram a presença de atrazinas em águas subterrâneas. Ainda segundo estes autores, foram encontrados resíduos de quatro tipos de triazinas nas águas do Mèlarches (França): atrazina, simazina, ametrina e terbutrina nos anos de 1991 a 1993.

É de extrema importância o conhecimento da origem dos pesticidas detectados na água subterrânea, podendo aquela ser tanto pontual ou localizada, como não-pontual ou difusa. Inúmeros estudos têm identificado problema de poluição de águas superficiais e subterrâneas decorrentes do uso de pesticidas em regiões temperadas (SOLOMON et al.,1995; KREUGER, 1998). Nos Estados Unidos, em 1988, um estudo revelou que mais da metade dos estados americanos possuíam águas subterrâneas contaminadas (PARSONS; WITT, 1989, UETA et al, 2004). No estado da Geórgia (EUA) foi detectada a presença de pesticida tanto na água de escoamento superficial quanto no fluxo descendente de água no solo (INOUE et al., 2003). Na ilha da Martinica (França), foram encontrados resíduos de triazinas (simazina e ametrina) em rios (BOCQUENÉ; FRANCO, 2005). Um dos principais problemas existentes é o risco de deterioração dos aquíferos em decorrência do crescimento das fontes de poluição pontuais e difusas.

A concentração da maioria dos pesticidas em água é baixa em parte devido ao fato de serem geralmente pouco solúveis em água e em parte devido ao efeito de diluição (HIGASHI, 1991). Isto, no entanto, não exclui a possibilidade de que concentrações muito altas venham a ocorrer após pesadas chuvas, especialmente quando as áreas ao redor de um pequeno córrego tenham sido recentemente tratadas com altas doses de pesticidas.

Mesmo em concentrações baixas, os pesticidas representam riscos para algumas espécies de organismos aquáticos, que podem concentrar estes produtos até 1000 vezes. Não existe nível seguro previsível para pesticidas em água quando pode ocorrer biomagnificação (EICHELBERGER, 1971).

Vários pesquisadores estão preocupados com os impactos dos pesticidas sobre a fauna aquática, outros estão interessados em quantificar a carga desses pesticidas em bacias hidrográficas provenientes da agropecuária, determinar concentrações letais, subletais e os efeitos que podem alterar a dinâmica das cadeias alimentares aquáticas (KASAI; HANAZATO, 1995; MONTAÑES; HATTUM, 1995; GHOSH; MAUND et al., 1997; SIEFERT et al., 1989).

O crescimento da agropecuária na Bacia do Alto Taquari (BAT, MS), área aproximada de 29 mil km², intensificada a partir dos anos 70, passou a representar uma seria ameaça a estabilidade principalmente dos ecossistemas aquáticos do Pantanal que estão a jusante, face a elevada carga de pesticidas utilizados (VIEIRA et al, 1999).

O Pantanal é uma das mais importantes reservas ecológicas do mundo (PAIVA, 1984) abrangendo três países (Brasil, Bolívia e Paraguai), com área de 168.000 km² no Brasil (CARVALHO, 1984). Entretanto, pouco se sabe sobre o potencial e a estrutura de funcionamento dos mecanismos naturais de defesa do ambiente existentes no Pantanal e em sua área de influência diante de eventuais lançamentos de poluentes químicos, como no caso de pesticidas. O risco de acidentes ambientais pode aumentar com a intensificação das atividades antrópicas a montante do Pantanal (AB'SABER, 1988; RESENDE et al., 1994). Diante do perigo, a desestimulação de atividades dependentes de pesticidas à montante do Pantanal é sugerida (RESENDE et al., 1994).

Braga (2007) ao estudar a influência de pesticidas na desmidioflórula verificou que quando observada a presença da atrazina em concentração maior que nas outras campanhas (0,06 µg mL⁻¹) a população algal diminui notavelmente, corroborando com Frighetto (1997), que mostrou que a presença da atrazina (herbicida) ocasiona a diminuição da atividade e de populações de bactérias e algas. Justificando, então, o ocorrido nesse estudo, uma vez que este pesticida teve sua presença marcante se comparada com os demais meses.

A trifluralina é o herbicida de pré-emergência mais utilizado na cultura da soja em São Gabriel D'Oeste/MS. Quando aplicada em dose superior a recomendada seus resíduos fitotóxicos podem permanecer no solo por um período de quatro anos. Apresenta toxicidade para as algas mesmo quando há incorporação ocasional nos sistemas aquáticos, e quando ocorre entrada contínua, e tóxica para as algas e para os peixes. Há também um potencial de contaminação em níveis subletais, pois se sabe que nestes níveis muitos pesticidas afetam a relação predador-presa, hábitos alimentares, sucesso reprodutivo e o metabolismo geral dos peixes (VIEIRA et al, 1999).

2.4 Transformação de pesticidas

O processo de degradação dos agrotóxicos no solo dependem tanto das características do próprio solo como das características físicoquímicas das substâncias. Moléculas de alto peso molecular, contendo halogênios e/ ou anéis aromáticos condensados, como é o caso dos agrotóxicos organoclorados, são mais persistentes (MUSUMECI, 1992; ANDRÉA, 2004). Os solos argilosos, por exemplo, com alto teor de matéria orgânica, tendem a reter resíduos por maior tempo, facilitando, assim, a persistência dos pesticidas (MOREIRA; CRUZ, 1996).

O solo é o compartimento do agroecossistema considerado mais complexo e cuja probabilidade de contaminação por pesticidas é a maior, exatamente porque é onde as aplicações são feitas, ou onde cai a folhagem tratada ou água de chuva que lavou a superfície dessa folhagem tratada. Os resíduos podem interagir com as fases sólida, líquida e gasosa, e com a porção viva do solo, isto é, com a microbiota. Estas interações determinarão a ocorrência de diferentes processos que envolvem transformações químicas, físicas, biológicas ou a combinação dessas transformações.

Como consequência, pode-se detectar o desaparecimento do composto ou o aparecimento de metabólitos mais tóxicos que o produto original, a persistência aumentada, que irão determinar a utilidade do composto, efeitos prejudiciais causados pela persistência mais longa do que seria necessário para o controle, e ainda, transporte maior ou menor no próprio solo.

O exemplo mais importante de transformação físico-química de resíduos de pesticidas é o que envolve o processo de adsorção da molécula do pesticida na matéria particulada do solo (matéria orgânica e argila, principalmente), reduzindo a concentração do composto na solução e, conseqüentemente, diminuindo a disponibilidade do composto para o ataque microbiano.

Além disso, o processo de adsorção, por imobilizar mesmo que temporariamente o composto, pode também diminuir o transporte das substâncias por lixiviação.

Como efeito de transformação química cita-se o efeito do pH, que determina, muitas vezes, a prevalência de degradação da molécula por processo puramente químico. Mas o pH do solo também tem efeito bioquímico, pois influencia a atividade microbiana e, desta forma, conforme o pH do meio, haverá ou não predominância de atividade microbiana atuando sobre a degradação de pesticidas.

Os processos de transformação e desaparecimento dos pesticidas no solo dependem da interação entre os pesticidas e o solo (Figura 5), das características do próprio solo, como das características físico-químicas das substâncias, pois moléculas de peso molecular muito alto ou elementos halogênios e/ou anéis aromáticos altamente condensados, por exemplo, são mais persistentes. A taxa pela qual o composto está disponível na solução do solo pode ainda determinar maior ou menor persistência por influenciar nos processos bióticos ou abióticos de degradação (ANDRÉA, 2003).

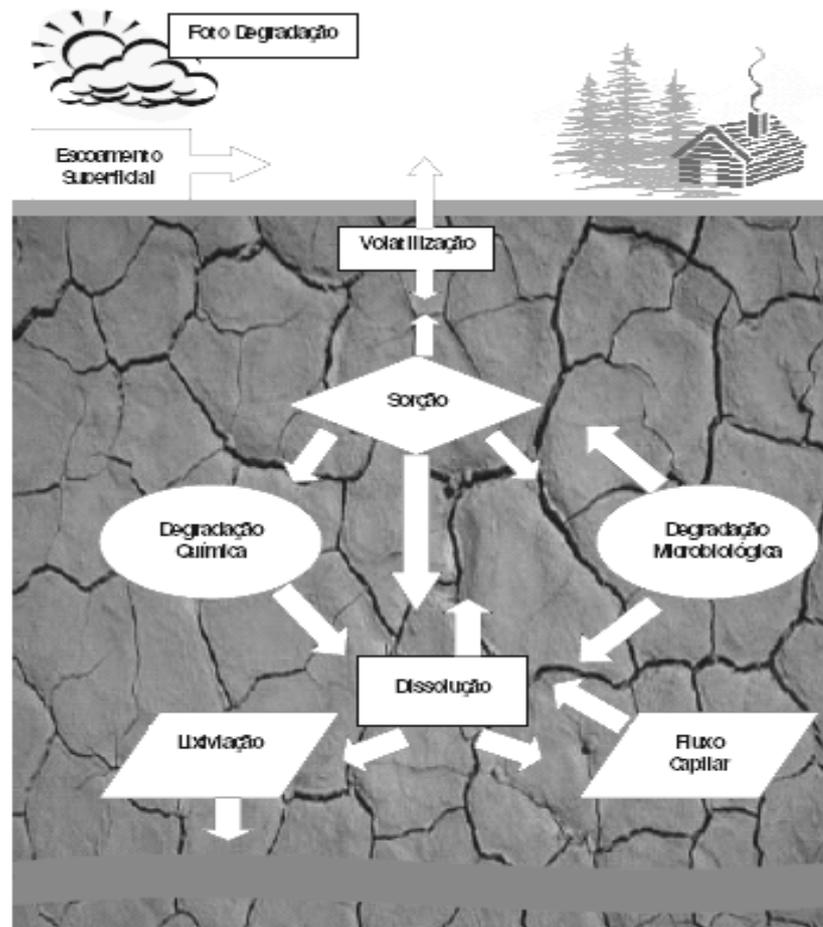


Figura 5 Principais processos de interação entre os pesticida e o solo (GHISELLI, 2001).

A persistência do pesticida no solo depende também da eficiência de processos físicos de transformação, como evaporação, lixiviação, erosão e absorção pelas raízes das culturas. Fatores ambientais como temperatura, conteúdo de matéria orgânica, acidez, umidade e tipo de solo influenciam, também, as taxas de degradação de pesticidas. Reações químicas, como hidrólise, podem ser pré-requisitos para o ataque microbiano. Percebe-se, então, que pode haver interação dos agentes físicos, químicos e biológicos na degradação dos pesticidas (BAILEY; WHITE, 1970; ANDRÉA, 2004).

A degradação microbiológica é causada por fungos e bactérias ou outros microrganismos que utilizam os pesticidas como fonte de carbono. A maior parte da degradação microbiológica desses compostos ocorre no solo, onde condições como umidade, temperatura, aeração, pH e conteúdo orgânico afetam a taxa de degradação. Da mesma forma, a frequência da aplicação do pesticida pode influenciar a sua biodegradação. A degradação acelerada pode ocorrer quando os compostos são aplicados repetidamente, estimulando o crescimento de microrganismos capazes de degradar este xenobionte. Assim, conforme a população microbiana degradadora do pesticida aumenta, a degradação aumenta e a quantidade disponível para o controle químico é reduzida (LUCHINI, 2003).

Semple e Fermor (1995) afirmaram que a maioria dos pesticidas é transformada, predominantemente, por processos biológicos por meio de enzimas existentes em animais, plantas e microrganismos. As transformações bióticas dos pesticidas resultam na degradação da estrutura molecular em formas mais simples (CHENG, 1990).

O principal mecanismo de reação química importante na transformação de pesticidas no solo é a hidrólise. Ela é influenciada, no solo e na água, pelo valor do pH, temperatura e pela sorção do pesticida (ARMSTRONG et al., 2001; WOLFE et al., 1990).

O $t_{1/2}$ (tempo de meia-vida) dos pesticidas pode ser utilizada para classificar os pesticidas quanto à sua persistência no ambiente (Tabela 2). Pesticidas com $t_{1/2}$ menor que 30 dias são considerados não persistentes.

Tabela 2 Classificação de persistência de pesticidas baseada no tempo de meia vida.

Número	Meia-Vida (dias)	Classificação
1	<30	Não persistente
2	30-180	Medianamente persistente
3	180-360	Persistente
4	>360	Altamente persistente

Fonte: IBAMA, 1990.

2.5 Diversidade microbiana

Os microrganismos são essenciais para o meio ambiente e contribuem para a estabilidade de ecossistemas, sendo também responsáveis pela ciclagem dos compostos químicos, incluindo a degradação de poluentes ambientais. Apesar de sua grande importância na manutenção da biosfera, estima-se que menos de 10% dos microrganismos existentes no planeta tenham sido caracterizados e descritos (STEINLE, 1998)

Estima-se, em níveis globais, que a diversidade de microrganismos exceda, em algumas ordens de magnitude, a diversidade de plantas e animais. Levantamentos estimados da década de 90 propuseram que dos 5% da diversidade de fungos conhecida, apenas 69.000 espécies estavam descritas (HARDOIM, 2002). Entretanto, Hawksworth (2006), com auxílio da ferramenta molecular atualizou as estimativas da diversidade de fungos para 75.000 espécies.

Para procariotos, incluindo bactérias e arqueas, são conhecidas 6.373 espécies, alocadas em 1.069 gêneros, correspondendo entre 0,1 a 12% da diversidade do grupo. Protozoários e vírus apresentam cerca de 30.800 e 5.000 espécies descritas, correspondendo a 31% e 4% do número de espécies estimado, respectivamente (MANFIO, 2003).

A maior diversidade do solo parece ser o grupo bacteriano. Porém a maioria permanece desconhecida visto que as técnicas tradicionais de plaqueamento em meios de cultivo disponíveis permitem cultivar somente uma pequena percentagem de microrganismos, e/ou determinadas comunidades para estudos mais detalhados. Assim sendo, a grande maioria não pode ser distinguida de outros membros da comunidade.

Com o advento da tecnologia do DNA recombinante na ecologia microbiana, evidenciou-se que conhecemos somente parte pequena da diversidade microbiana. O termo biodiversidade tem sido definido de várias formas. Em termos microbianos, descreve o número de diferentes espécies e sua relativa abundância em uma dada comunidade e um hábitat. Em termos ecológicos-moleculares, ele pode ser definido como o número e forma de distribuição de diferentes tipos de sequências presentes no DNA extraído da comunidade no hábitat (GARBEVA et. al, 2004). Apesar de refletir o potencial genético total da comunidade microbiana, a diversidade genética também pode refletir mudanças nas condições ambientais quando relacionada com crescimento seletivo e processos de sucessão (JOHNSEN et al., 2001).

O relato de Hardoim et al. (2001) em levantamento das pesquisas sobre a microbiota de Mato Grosso e sobre a manutenção da biodiversidade nos diferentes ecossistemas mato-grossenses nos biomas Pantanal, Cerrado e Amazônia, reforça a necessidade da conservação de uma ampla variedade de habitats, apontando como premente a investigação dos diferentes processos biológicos e os seus ajustes às flutuações ambientais, como nível da água no Pantanal, observando-se os benefícios que a sazonalidade pode ocasionar. O estudo da relação entre os fatores intervenientes, por intermédio de uma abordagem sistêmica, permitirá a compreensão da dinâmica reguladora das populações microbianas.

Sabe-se que a maioria dos compostos orgânicos adicionados ou que atingem o solo terá taxas de degradação diminuídas na ausência de microrganismos, mas, de modo geral, o ambiente edáfico oferece condições para proliferação de grande variedade de microrganismos. Estes, ainda que presentes em baixas concentrações, como no subsolo, podem exercer grandes efeitos catalíticos, pois o consórcio de várias espécies contém diferentes enzimas que podem atuar em diferentes etapas da degradação das moléculas xenobióticas (ANDREA, 2003).

O solo é um sistema vivo e heterogêneo composto de muitas associações microbianas. Estas associações são sensíveis a modificações físicas químicas tais como alterações no modo de cultivo, adição de pesticidas ou de substâncias biologicamente ativas que podem afetar o equilíbrio microbiano (ARAÚJO, 2002).

A fração orgânica do solo é uma mistura complexa de tecidos vivos ou mortos e de substâncias orgânicas e inorgânicas transformadas ou em estado original. São materiais complexos e em constante transformação, mas que podem ser separados em frações com características distintas. Em torno de 98% do carbono orgânico do solo, encontra-se como matéria orgânica morta, principalmente na forma de húmus, enquanto a fração viva geralmente não ultrapassa 1 a 5% do total de material orgânico do solo. Da fração viva, de 5 a 10% são raízes, 60 a 80%, são microrganismos e de 15 a 30% são componentes da macrofauna (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006)

A comunidade microbiana nos solos é influenciada pelo ambiente. As modificações ambientais provocadas pela flutuação estacional das condições climáticas também podem influenciar as populações na comunidade microbiana (WARDLE; PARKINSON, 1990).

Nos ecossistemas naturais, a cobertura vegetal permanente proporciona proteção contínua do solo, além de adicionar grandes quantidades de nutrientes principalmente através de resíduos. Seus efeitos sobre a comunidade microbiana podem interagir com os efeitos provocados pelas flutuações hídricas e térmicas que ocorrem durante o ano, influenciando em

menor ou maior grau as populações microbianas, através da determinação da atividade e das taxas de crescimento das diversas populações na comunidade microbiana (TSAI et al., 1992).

A atividade dos microrganismos afeta diretamente os atributos químicos e físicos do solo e a meso e macrofauna, contribuindo, ativamente, para sustentabilidade dos sistemas agrícolas. Dentre os fatores limitantes à atividade microbiana estão a disponibilidade de água, energia e nutrientes, a temperatura, a radiação e a distribuição dos agregados do solo (STOTZKY, 1997). No plantio direto, os macroagregados do solo são mantidos, preservando o hábitat principal dos microrganismos; além disso, ocorre maior disponibilidade de matéria orgânica, fonte de energia e nutrientes para os microrganismos (COLOZZI-FILHO; BALOTA, 1999).

Nos estudos comparativos que foram realizados até o presente momento, no Brasil, em geral foi constatado que a biomassa microbiana é maior em solos sob o sistema de plantio direto (PD) do que sob plantio convencional (CATTELAN; VIDOR, 1990; CARVALHO, 1997; CATTELAN et al., 1997b; BALOTA et al., 1998, 2003, 2004; FRANCHINI et al., 2007). O PD também favorece quantitativamente alguns microrganismos de importância agrícola, como bactérias diazotróficas (FERREIRA et al., 2000) e fungos micorrízicos arbusculares (COLOZZI-FILHO; BALOTA, 1999).

Também foram relatados benefícios na microbiota do solo pela inclusão de leguminosas e/ou outros adubos verdes no sistema PD (FERREIRA et al., 2000; FRANCHINI et al., 2007), embora nem sempre tenham sido constatadas diferenças estatísticas (BALOTA et al., 1998, 2003). É importante salientar que, com frequência, os atributos microbiológicos relacionados à microbiota do solo são capazes de detectar alterações pelo manejo do solo e das culturas em um estágio anterior ao das mudanças nos atributos químicos e físicos, levando à proposta de sua utilização como bioindicadores de qualidade do solo (BALOTA et al., 1998, 2003, 2004; FRANCHINI et al., 2007).

2.6 Limitações das atividades microbianas pelos pesticidas e sua biodegradação

De acordo com Avila Neto (2007) que, estudando a presença da Trifluralina (herbicida) em solo de cultivo de milho e soja em Mato Grosso, verificou que este exerce uma forte influência sobre a comunidade microbiana, podendo ser um possível fator limitante ao seu crescimento. Outras pesquisas indicaram ainda, que a presença de pesticidas em ambientes aquáticos pode interagir com organismos vivos e causar variadas alterações, dependendo do

tempo e da quantidade de exposição, como malformações, mudanças nas taxas de crescimento, reprodução e mudanças fisiológicas.

Um trabalho de DeLorenzo et al. (1999) mostra como pequenas concentrações de pesticida podem afetar os microrganismos, cujos tratamentos feitos em substratos artificiais na água utilizando baixas concentrações de endossulfam (de 1µg a 10 µg) geraram alterações estruturais nas comunidades e reduziu a produtividade dos microrganismos

Da avaliação em campo realizada por Silva e Fay (2003), o paclobutrazol também demonstrou efeito tóxico nos microrganismos de solo. Coletando amostras compostas de 0-20 cm, por período de aplicação (8 µg i.a. g⁻¹), e utilizando método de contagem em placa, eles observaram que o número de colônias bacterianas foi reduzido em 58%, e fungos e actinomicetos reduziram 28%, em comparação do solo controle sem tratamento com paclobutrazol.

Os efeitos dos xenobiontes sobre os microrganismos pode ser a inibição do crescimento, interferindo nos processos bioquímicos destes. Mas não é raro encontrar xenobiontes que podem estimular o crescimento, principalmente aqueles que estiverem adaptados à presença da molécula, utilizando esta como fonte de algum benefício nutricional, conforme verificado por Palma (2007). Portanto, populações microbianas do solo podem ser eliminadas, significativamente reduzidas ou alteradas (SILVA; FAY, 2003).

Visando essa preocupação é que a ciência recorre a formas alternativas de resolução, tais como a biodegradação e a biorremediação. Ambas envolvem a presença de compostos xenobiontes e de microrganismos, atuando na transformação química dessas moléculas estranhas e não pertencentes naturalmente àquele ambiente. A biorremediação é o processo mais utilizado atualmente para recuperar áreas contaminadas e tem como estratégia o emprego de microrganismos ou de suas enzimas para desintoxicar contaminantes em águas subterrâneas, cursos d'água e seus sedimentos e em solos de origem agrícolas. Esta técnica consiste basicamente na transformação do contaminante a formas que não ofereçam riscos ambientais (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A degradação microbiológica é causada por fungos e bactérias ou outros microrganismos que utilizam o herbicida como fonte de alimento. A maior parte da degradação microbiológica de herbicidas ocorre no solo, onde condições como umidade, temperatura, aeração, pH e conteúdo orgânico afetam a taxa de degradação. Da mesma forma, a frequência da aplicação do herbicida pode influenciar a biodegradação de herbicidas. Degradação acelerada de herbicidas pode ocorrer quando os compostos são aplicados repetidamente, estimulando o

crescimento de microrganismos capazes de degradar o herbicida. Assim, conforme a população microbiana degradadora do herbicida aumenta, a degradação aumenta e a quantidade do herbicida disponível para o controle químico é reduzida (LUCHINI, 2003).

A biodegradação ocorre em função da produção de enzimas por microrganismos degradadores de pesticidas, as quais, em contato com essas moléculas, dentro ou fora das células dos microrganismos, participam de uma série de reações, como: oxidação, redução, hidrólise, desalquilação, dextracarboxilação, hidroxilação, metilação, desalcoilação etc (LAVORENTI, 1996).

Roque e Melo (2000) selecionaram a estirpe *Acinetobacter baumannii* para estudar a cinética de crescimento em meio mineral contendo Diurom nas concentrações de 5, 10 e 20 mg mL⁻¹. Apresentando um crescimento exponencial entre 0–48 horas. Esposito et al. (1998) estudaram a degradação de diurom em solo de compostagem esterilizado e inoculado com diversos actinomicetos isolados e capazes de degradar até 37% desse pesticida (MELO et al., 2001).

Kumar e Philip (2006) estudaram o consórcio de duas bactérias na mineralização do endossulfam sem a formação de todos os metabólitos intermediários relatados por investigadores precedentes. Também, a cultura podia reproduzir-se em ambientes aeróbio e anaeróbios facultativos. A espécie *Staphylococcus* sp. utilizou mais o beta endossulfam no sistema anaeróbio facultativo, visto que o *Bacillus circulans* preferiu mais o alfa endossulfam no sistema aeróbio. A adição de dextrose aumentou a eficiência da degradação do endossulfam em sistemas aeróbios e anaeróbios facultativo, sendo que estes consórcios microbianos podem eficazmente ser usados para degradar endossulfam dos solos, dos sedimentos, e das águas contaminadas.

Issa e Wood (1999) estudaram o potencial para a degradação da atrazina na zona não saturada de duas perfurações. Os resultados mostraram que a superfície e a zona não saturada profunda conteve os microrganismos capazes de degradar a atrazina. A taxa de degradação era muito mais rápida na superfície do solo do que na maioria dos materiais não saturados de ambas as perfurações. Uma quantidade relativamente pequena de atrazina foi perdida das amostras esterilizadas, sugerindo um papel significativo para a degradação microbiana.

A decomposição do aldicarbe em solos tropicais atinge valores acima de 50% após 26 dias da aplicação (PIFFER; RIGITANO, 1991), mas por apresentar baixo coeficiente de partição, têm grande mobilidade e oferece grande risco de contaminação dos mananciais hídricos. Apesar de não ser completamente entendida, a degradação do aldicarbe é realizada

por várias bactérias como *Pseudomonas aeruginosa*, espécies dos gêneros *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Nocardia*, *Arthrobacter*, e espécies fúngicas de *Fusarium* e *Penicillium*, que degradam com facilidade esse produto no solo.

A degradação da atrazina é predominantemente biológica, ocorrendo por descloração, desalquilação e posterior quebra do anel. Isso é feito por vários microrganismos como *Agrobacterium* e *Klebsiella* por metabolismo oxidativo e por *Rhodococcus*, através de co-metabolismo. *Agrobacterium radiobacter*, isolado de campos de milho em Nebraska (EUA), mineralizou mais de 90% da atrazina em 12 horas em meio de cultura (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Como podemos observar na tabela 3, muitos estudos estão sendo desenvolvidos utilizando microrganismos na degradação de compostos xenobiontes, entre eles os pesticidas e seus metabólitos.

Tabela 3 Alguns microrganismos utilizados em estudo de degradação de pesticidas.

Microrganismo	Pesticida	Autores
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Carbofuran	Ambrosoli et al (1996)
<i>Leifsonia</i> sp.	Imidacloprid	Anhalt et al. (2007)
<i>Arthrobacter</i> sp. + <i>Delftia acidovorans</i>	Diuron	Bazot et al. (2007)
<i>Aspergillus niger</i>	Endossulfam	Bhalerao; Puranik (2007)
<i>Pseudomonas</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i>	Carbofuran	Cain; Head (1991)
<i>Pseudomonas putida</i>	Vinclozolin	Cain; Mitchell (1996)
<i>Nocardioides</i> sp.	Mefenacet	Harada et al. (2006)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Mefenacet	Harada et al. (2006)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Mefenacet	Harada et al. (2006)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	Sulfato de endossulfam	Kown et al. (2005)
<i>Staphylococcus</i> sp. + <i>Bacillus circulans</i>	Endossulfam	Kumar; Philip (2006)
<i>Pseudomonas</i> sp.	Sulfato de endossulfam	Lee et al. (2006)
<i>Bacillus</i> sp.	Lindane, simazine 2 dimetoate	López et al (2005)
<i>Micrococcus luteus</i>	Methylparathion	López et al (2005)
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	Simazine	López et al (2005)
<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Atrazina	Moreira; Siqueira (2006)
<i>Kochia scodaria</i>	Atrazina	Perkovich et al (1996)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aldicarb	Piffer; Rigitano (1991)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	4-nitroaniline	Qureshi et al. (2007)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Diuron	Roque; Melo (2000)
<i>Chaetomium globosum</i>	Alachlor	Tiedje; Hagedorn (1975)

<i>Arthrobacter globiformis</i>	Diurom	Turnbull et al. (2001)
<i>Rhizoctonia solani</i>	Diurom	Vroumsia et al. (1996).
<i>Pseudomonas oleovorans</i>	Acetochlor	Xu et al. (2006)
<i>Paracoccus</i> sp.	Chlorpyrifos e 3,5,6-trichloro-2-pyridinol	Xu et al. (2008)
<i>Bacillus cereus</i>	Metolachlor	Morais (2008)
<i>B. subtilis</i>	Metolachlor e Diurom	Morais (2008)
<i>Micrococcus luteus</i>	Diurom (comercial)	Lopes (2008)
<i>Bacillus cereus</i>	Diurom (comercial)	Lopes (2008)
<i>Rhodococcus</i> sp.	<i>p</i> -nitrophenol (PNP)	Zhang et al. (2009)

A transformação abiótica de pesticidas, em alguns casos, pode dar origem a moléculas com estruturas químicas maiores que a original. O processo de polimerização é um exemplo disso e diz respeito a rearranjos entre moléculas proporcionados por reações fotoquímicas. Como exemplos, têm-se as anilinas substituídas e os pentaclorofenóis (LAVORENTI et al., 2003).

A maioria das moléculas de pesticidas é transformada pela ação do metabolismo dos microrganismos no solo. Assim, o termo biodegradação, tipicamente, refere-se à transformação microbiológica de um composto orgânico em outra forma, sem se referir à extensão (MONTEIRO, 1998).

A transformação microbiana pode acontecer por reações metabólicas diretas, consideradas primárias, ou por efeitos indiretos dos microrganismos com as propriedades físicas e químicas do solo, resultando em transformações secundárias. Dessa forma são quatro os processos envolvidos nas transformações microbianas de pesticidas no solo:

Catabolismo: o pesticida deve ser como fonte de energia e de nutrientes para o crescimento e desenvolvimento dos microrganismos degradadores.

Cometabolismo: o pesticida é transformado por reações metabólicas, mas não serve como fonte primária de energia e de nutrientes para o microrganismo. Normalmente, a molécula não é transformada completamente. Por meio da adição de materiais orgânicos ao solo, pode-se evidenciar a transformação cometabólica de pesticidas no solo.

Polimerização ou Conjugação: a molécula original do pesticida ou de um de seus metabólitos se combina com compostos naturais do solo, como aminoácidos ou carboidratos, ou com outra molécula de pesticida.

Acúmulo: ocorre quando a molécula de um pesticida é incorporada ao microrganismo, sem que seja transformada. O acúmulo de moléculas por microrganismos pode ocorrer por um

processo ativo ou passivo e traz uma grande preocupação, uma vez que essa interferência microbiana significa apenas a remoção temporária da molécula.

2.7 Histórico e características da área de estudo

Desde 1970, o panorama econômico da região Centro Oeste do Brasil tem sofrido rápidas mudanças, devido aos subsídios fornecidos pelo governo para a ocupação da Região Amazônica, principalmente para a agricultura. O modo de ocupação desta região favoreceu a instalação de grandes latifúndios que possuíam condições econômicas para desenvolver a tecnologia necessária para a exploração do cerrado cujas principais características eram a topografia plana, que favorecia a mecanização, e os solos ácidos deficientes em nutrientes, que necessitavam de produtos químicos (DORES; DE-LAMONICA-FREIRE, 2001).

Assim, o rápido crescimento das áreas de agricultura em Mato Grosso introduziu a monocultura com lavouras altamente dependentes de insumos químicos, incluindo pesticidas. Devido aos processos naturais de movimento das águas superficiais é provável que resíduos destes produtos sejam transportados para compartimentos de acumulação no ambiente, contaminando recursos hídricos importantes (ALBANIS et al., 1998).

Nas últimas três décadas, um grande aumento nas atividades agrícolas ocorreu no Cerrado, e a vegetação nativa foi substituída por áreas cultivadas para produção de alimentos, fibra e energia. Os Latossolos representam 46 % dos solos no Cerrado, com conteúdo médio de MO entre 2,5 e 3,0 dag kg⁻¹ no solo. São solos ácidos, com baixa fertilidade natural, que apresentam boas condições para mecanização; o seu potencial de produção está condicionado ao uso de corretivos e fertilizantes, que necessitam do revolvimento do solo para sua plena distribuição e reação. A mobilização do solo, por proporcionar a incorporação de resíduos orgânicos, pode elevar a biomassa microbiana a curto prazo, por disponibilizar substrato orgânico com a quebra dos agregados, mas, a longo prazo, pode ter efeitos negativos, como a diminuição dos teores de matéria orgânica (RESCK, 1998).

A extensão territorial do Estado de Mato Grosso e a grande distância entre as diversas áreas agrícolas inviabilizam a otimização de um processo de amostragem, estatisticamente representativo, para um estudo de monitoramento abrangendo todas as regiões produtoras e, ainda, a capacidade operacional dos laboratórios da Universidade Federal de Mato Grosso seria insuficiente para processar a grande quantidade de amostras necessárias para validar um estudo de tal abrangência.

No Estado de Mato Grosso, as regiões de cerrado são constituídas, na sua grande maioria, de grandes áreas de solos latossólicos. São solos profundos, porosos, bem drenados, apresentando relevo suave ondulado a plano, possibilitando práticas de operações mecanizadas, e, conseqüentemente, a exploração de culturas de alto valor econômico submetidas a níveis de manejo intensivo.

Segundo o PRODEAGRO (1997), a região estudada apresenta clima tropical continental alternadamente úmido e seco no decorrer do ano. Além do fator continentalidade é muito importante o controle climático exercido pelo relevo e a altitude, no caso sendo os maiores responsáveis pela diversidade climática no Estado de Mato Grosso. A região do Planalto dos Guimarães apresenta como característica fundamental temperatura relativamente baixa, condicionada pelo alto topográfico, cujo caráter mesotérmico se traduz no traço mais importante. Com a redução do calor, há diminuição das taxas de evapotranspiração, atestado por registrar valores menores de deficiência hídrica anual, oscilando entre 100 e 200 mm.

Na área são encontradas duas formações vegetais: cerrado e matas ciliares. O cerrado é constituído de arvoretas relativamente baixas, com troncos e galhos retorcidos, disseminados entre numerosas e variadas plantas lenhosas anãs e herbáceas, com predomínio da espécie denominada localmente como Lixeira.

As matas ciliares ocorrem nas margens dos cursos d'água geralmente associadas às planícies aluvionais (áreas de várzea), onde as deposições quaternárias se renovam constantemente. Observa-se também a presença de formações pioneiras de influência fluvial, subdivididas em arbustivas e herbáceas.

Áreas antropizadas predominam na região objeto correspondendo às áreas de atividades agrícolas, culturas cíclicas e atividades agropecuárias. A micro-bacia do Córrego Chico Nunes (Figura 6), é representada por uma forma de relevos predominantes, caracterizado por colinas amplas, apresentando interflúvio extenso e aplainado, com leve caimento em direção ao fundo de vale (PEREIRA, 2005).

Foram detectadas por Dores et al. (2003) em algumas amostras de poços tubulares na mesma região estudada as seguintes substâncias: metil paration, metolaclor, imidacloprid, clorpirifós, endossulfam, carbofuran e diuron, as quais embora tenham ocorrido em concentrações menores neste compartimento do que em outros, alerta para o risco de contaminação de águas subterrâneas.

Casara (2008) ao estudar a influência da temperatura na degradação do sulfato de endossulfam de amostras de solo em Dom Aquino, MT, verificou que a temperatura influencia na degradação do s. de endossulfam. A autora constatou que os diferentes horizontes também

influenciaram na degradação do sulfato de endossulfam, sendo observado uma maior persistência deste na primeira camada do solo e que a matéria orgânica existente em maior quantidade na primeira camada do solo adsorve o pesticida, deixando-o menos disponível para degradação.

Segundo DORES (2001), no ano de 1997 em Primavera do Leste, as chuvas mais intensas ocorrem nos meses de novembro a abril coincidindo com a safra das principais lavouras e, por consequência, também com a época de aplicação de pesticidas.



Figura 6 Micro-bacia do Córrego Chico Nunes, Dom Aquino, Mato Grosso.

A cobertura pedológica é dominada por Latossolo Vermelho Amarelo, que ocupa praticamente toda a vertente; somente em sua porção terminal, junto ao fundo do vale pode-se observar a passagem para o Plintossolo e deste para Gleissolo, que se encontram bem individualizados (PEREIRA, 2005).

Estudos realizados anteriormente, com a descrição dos solos e a abordagem morfopedológica, através do estudo de uma topossequência permitiu interpretar o funcionamento hídrico da vertente situada a margem esquerda do Córrego Chico Nunes, mostrando uma tendência maior de infiltração vertical na porção superior da vertente, tendência esta que decresce na porção inferior da mesma com um aumento no escoamento superficial e sub-superficial, até que no final da vertente há uma predominância do escoamento superficial em relação ao vertical, onde ocorre o surgimento de um horizonte argiloso com material plíntico (DORES et al., 2005).

Dores et al. (2003) ao estudarem a mesma região em estudo detectaram as moléculas com maior frequência, níveis mais elevados e que possuem maior toxicidade a seres vivos e/ou ecotoxicidade, foram aldicarb, carbofuran, cipermetrina, clorpirifós, diuron, endossulfam, metil paration, metolaclor, monocrotofós, lufenuron, teflubenzuron e triazofós.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo

Para os ensaios de degradação foram feitos usando amostra de Latossolo Vermelho Amarelo (LVA), que foi coletado em áreas de cultivo de algodão, na microbacia do Córrego Chico Nunes, Município de Dom Aquino (Figura 7), afluente do Rio das Mortes, situado na Fazenda Jurity, com área total de 476, 337 ha, no Estado de Mato Grosso (coordenadas de 15° 25' S e 54° 32' O).

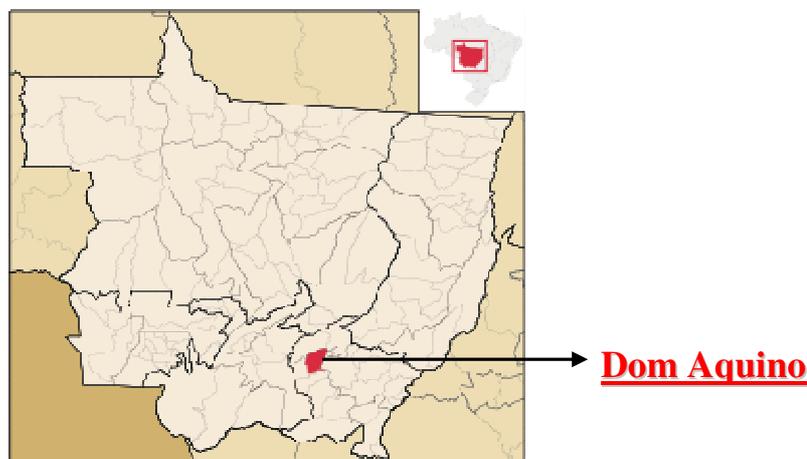


Figura 7 Localização da área de estudo, município de Dom Aquino, Mato Grosso.

Está a 195 km de distância da capital Cuiabá, 48 km da cidade de Primavera do Leste, 70 km da cidade de Campo Verde e a 65 km de Dom Aquino-MT como mostra a figura 8.

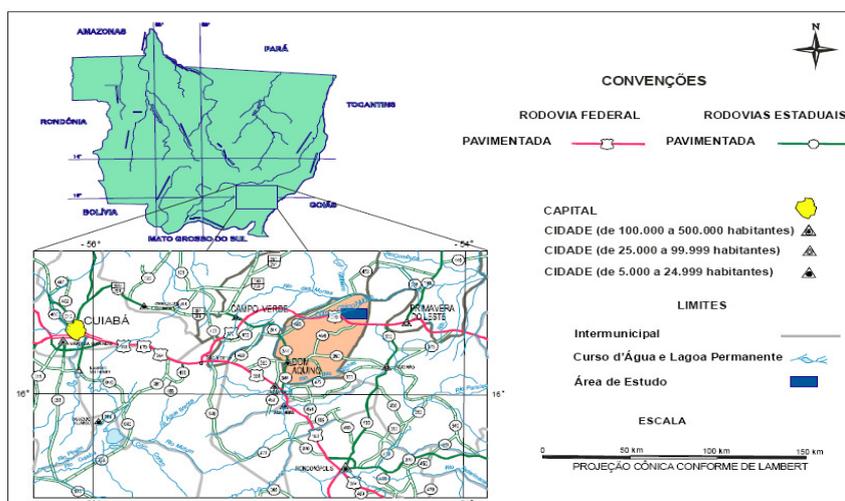


Figura 8 Mapa de Localização e vias de acesso da área de estudo, Município de Dom Aquino – MT. (Fonte: PEREIRA, 2005).

A área foi escolhida para o estudo por apresentar solos característicos da região e do Estado e por ser cultivada com algodão próximo a um curso d'água, apresentando assim, potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (Figura 9).

O LVA é predominante no Estado, numa extensão de 261.997,32km², principalmente em sua porção centro norte, por sobre o Planalto dos parecis, desde Brasnorte a oeste até São Félix do Araguaia e Cocalinho a leste, e de Peixoto de Azevedo a norte, até Nova Mutum e Diamantino, a sul.

Ocorrem também sobre o Planalto dos Guimarães, na região de Campo Verde, Primavera do Leste, Novo São Joaquim e General Carneiro estendendo-se para leste até Barra do Garças e Araguaiana. Distribuem-se também em manchas no extremo noroeste do Estado, na Chapada dos Dardanelos, entre Juína e Aripuanã; no noroeste de Aripuanã e em Apiacás, entre os rios Juruena e Teles Pires; além de manchas esparsas na região do Pantanal, como em Cáceres e Poconé. (JACOMINE et al, 1995)

A micro-bacia do Córrego Chico Nunes, é representada por uma forma de relevo predominante, definido com colinas amplas, caracterizadas por apresentar interflúvio mais extenso e aplainado, com leve caimento em direção ao fundo de vale, o qual apresenta forma aplainada (DORES et al., 2003).



Figura 9 (A-B) Fazenda localizada no município Dom Aquino, Mato Grosso. (Coordenadas: 15° 25' S e 54° 32' O).

Este compartimento de colinas amplas está associada à Latossolo Vermelho Amarelo, tem um horizonte retilíneo a ligeiramente convexo, em toda área, a declividade não ultrapassa

os 10%. Com relação ao substrato geológico, observa-se material argilo-arenoso, com presença de crostas ferruginosas (DORES et al., 2003).

Este Latossolo (LVA) possui boas condições físicas, que aliadas ao relevo plano ou suavemente ondulado, favorecem a utilização com diversas culturas adaptadas ao clima da região. As principais limitações decorrem da acidez elevada e da fertilidade baixa, agravados nos solos de textura média que são mais pobres. Requerem um manejo adequado com correção da acidez e fertilização com base em resultado de análise dos solos e controle de erosão, sobretudo nos solos de textura média que são mais susceptíveis à erosão. A deficiência de micronutrientes pode ocorrer, sobretudo nos solos de textura média.(JACOMINE et al, 1995)

3.2 Coleta e caracterização química e física do solo

As amostras para o experimento de degradação dos pesticidas foram coletadas em trincheira (Figura 10) aberta em área de Latossolo Vermelho Amarelo (LVA) em áreas de cultivo de algodão (Figura 11) cujos atributos físicos, químicos e hídricos já foram caracterizados em estudos anteriores (DORES et al., 2003 e 2005). Os solos foram acondicionados em sacos plásticos estéreis, mantidos sobre refrigeração, até a chegada ao laboratório. Os horizontes coletados foram Ap (0-30 cm) e AB (30-38 cm).



Figura 10 Trincheira aberta para coleta de solo.



Figura 11 Perfil do latossolo vermelho amarelo da micro-bacia do Córrego Chico Nunes.

Inicialmente, para a avaliação dos atributos químicos e físicos, as amostras de solo foram coletadas nas camadas superficiais e subsuperficiais do perfil pedológico, as quais foram secas em estufa de circulação de ar forçado a 60°C, destorroadas e peneiradas em tamiz de malha de 2 mm. O solo LVA foi caracterizado no Laboratório de Solos da Universidade Federal de Mato Grosso por Dores et al. (2005). A determinação dos atributos dos solos foi realizada conforme EMBRAPA (1997), cujas metodologias analíticas encontram-se anexo.

3.3 Preparo da solução e da suspensão para contaminação dos solos

Considerando dados de trabalhos desenvolvidos na área de estudo por Dores et al. (DORES et al., 2003; 2005; 2009) elegeu-se o diurom e o sulfato de endossulfam por suas concentrações e/ou constância detectadas.

As soluções trabalho, para a contaminação das amostras, foram preparadas a partir dos padrões primários do pesticida diurom e do metabólito sulfato de endossulfam.

Sendo o sulfato de endossulfam pouco solúvel em água pura (solubilidade 22 mg L⁻¹), a solução de trabalho deste biocida foi preparada em 2 mL de etanol. Para o diurom (solubilidade de 42 mg L⁻¹) a dissolução prévia foi realizada em 2 mL de acetona, uma vez que as solubilidades destes pesticidas nestes solventes são maiores que em água pura.

Na solução de trabalho do sulfato de endossulfam formou-se uma suspensão, que aquecida a ± 40 °C em banho-maria no momento da utilização para aumentar a sua solubilidade.

A concentração final das soluções de trabalho utilizadas nesta etapa do experimento foi 9,09 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.4 Experimento de degradação em solo

O estudo da degradação dos pesticidas foi feito por meio da incubação de amostras de solo contaminado com concentrações semelhantes às usadas no campo, em condições de umidade e temperatura controladas. Para incubação, alíquotas de 50 g de solo foram pesadas e adicionadas a pequenas caixas de alumínio (altura 3 cm, comprimento 8 cm, largura 6 cm).

Alíquotas de 0,6 mL da solução de trabalho do sulfato de endossulfam (83 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e do diurom (103,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram adicionadas ao solo (Amostras dos horizontes Ap e A/B) em

cada caixa, de modo a fornecer uma concentração de 1 μg do pesticida por grama de solo. Foi acrescentado à essa bateria, um controle de cada horizonte, ou seja, solo sem adição de pesticidas (Figura 12).

As amostras de solo em cada caixa foram homogeneizadas visando distribuir uniformemente o pesticida, por todo o solo. As caixas foram fechadas com tampas com 6 furos de 2 mm para manter a condição aeróbica.

As amostras foram então colocadas em incubação em câmara climática com condições controladas de umidade em 50 % da capacidade de campo e temperaturas de 30°C.

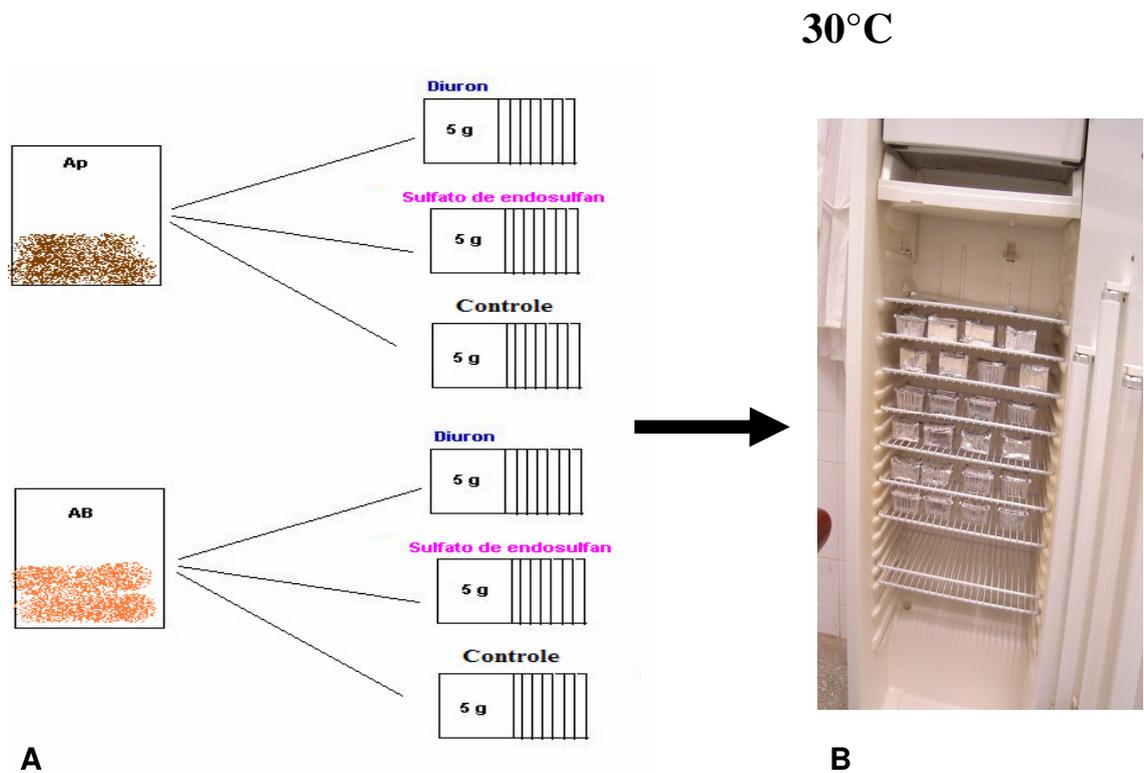


Figura 12 (A) Esquema da montagem do experimento; (B) Câmara de germinação.

As amostras foram analisadas, quanto ao crescimento microbiano, nos tempos: 0, 2, 4, 8, 16, 32, 64 e 100 dias após o início do tratamento (Figura 13).

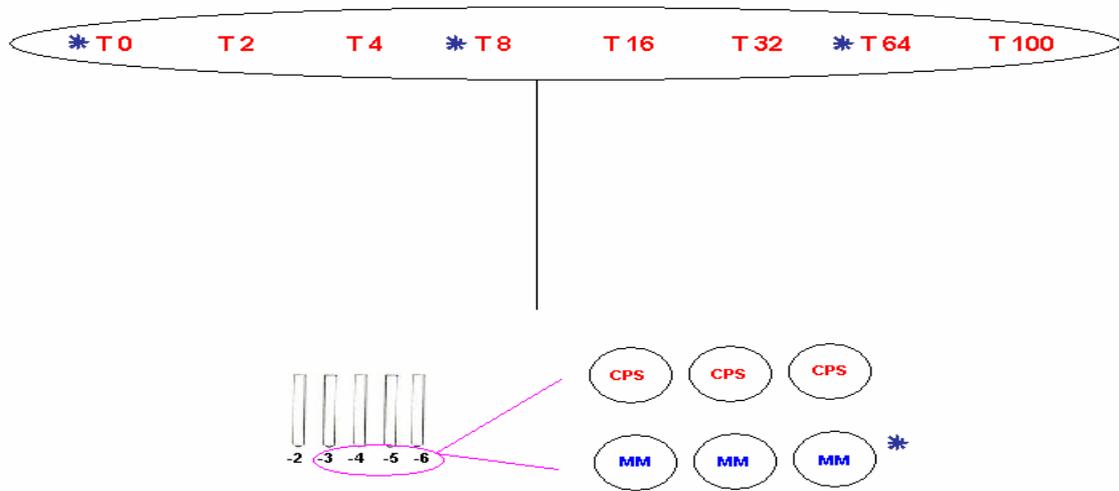


Figura 13 Esquema das diluições, tempo e meios utilizados (Protocolo de Costa, 2002).

Totalizou-se 4 experimentos, sendo dois horizontes do solo, o pesticida diurom e o metabólito sulfato de endossulfam e dois controles (Tabela 6).

Tabela 4 Tratamentos nos dois horizontes do solo

Tratamentos	Horizonte do solo	Pesticida
E1	Ap	Diurom
E2	Ap	S. endossulfam
E3	AB	Diurom
E4	AB	S. endossulfam
E5	Ap	-
E6	AB	-

*E=Experimento

3.5 Tratamento das bactérias edáficas

Visando a obtenção de estirpes bacterianas de solo, foi empregado o protocolo de Costa (2002), que preconiza pesagem de 5 g de solo em enlarmeyer estéril com pérolas de vidro e adicionados 45 mL de solução estéril de Tween 80 à 0,1% e Pirofosfato de Sódio à 0,1%. A solução-amostra foi mantida sob agitação em mesa orbital a 220 rpm por 20 min. Após a homogeneização, a solução-amostra foi diluída em solução salina (0,9% NaCl) estéril dentro das potências 10^{-2} a 10^{-6} (Figura 14).

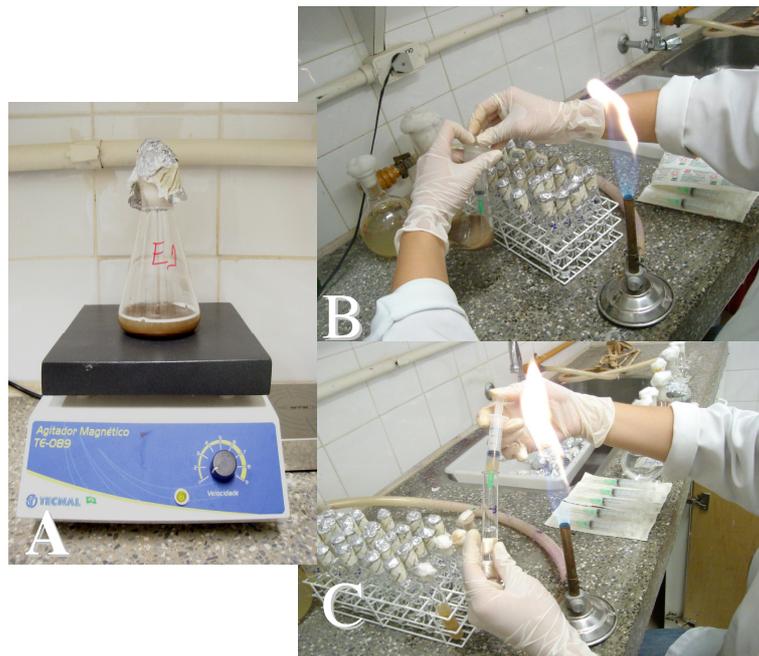


Figura 14 (A-C) Processamento do solo e diluições.

3.6 Contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC) dos microrganismos do solo

Dos diversos métodos empregados para se avaliar o número de bactérias do solo, o mais utilizado baseia-se na contagem de colônias em placas de Petri, no qual se verifica uma significativa variação das condições utilizadas, basicamente o meio de cultura, a diluição do inóculo, a temperatura e o tempo de incubação.

Diferentes meios de cultura têm sido utilizados, e sua composição varia de salina, como os meios mínimos, de Thorton e de Winogradsky, à complexa, como o meio CPS e de TSA (VIEIRA, NAHAS, 2000).

As técnicas de enriquecimento e plaqueamento são utilizadas no isolamento de microrganismos em solos contaminados por pesticidas (BARBIERI, 1994; AISLABIE; LLOYDJONES, 1995; apud ROQUE, 2000).

Foi inoculado 0,1mL das diluições 10^{-2} a 10^{-6} , em trélicas, utilizando a técnica de *pour plate* em meios CPS (20ml) e MM (20ml), e incubadas em estufa de cultura a 30 °C. As colônias foram contadas (contagens coloniais diárias totalizando 144 horas) com o auxílio de contador de colônias Quebec equipado com placa de vidro, com diâmetro compatível com o das placas utilizadas, dividido milimetricamente em quadrantes com 1 cm² de área e com iluminação artificial uniforme. O contador de colônias tem capacidade para aumento de 1 a 2 vezes, com dispositivo de regulagem de altura para melhor ajuste do foco, dispendo de sistema eletrônico de registro das contagens. As contagens foram realizadas nas placas que apresentaram um número de UFCs (Unidades Formadoras de Colônias) num intervalo de 1 a 300.

No cálculo das contagens, o resultado final foi expresso em UFC.mL⁻¹, levando-se em conta a diluição empregada, da seguinte maneira:

$$R = a \times 10^b \text{ UFC.mL}^{-1}$$

R = resultado

a = os dois primeiros algarismos, números de 0 a 9

b = expoente (diluição)

UFC = unidade formadora de colônias

mL= mililitro

Foi calculada a média aritmética dos resultados encontrados das trélicas de mesma diluição e o valor foi multiplicado pela diluição correspondente. Posteriormente, foi calculada a média entre as diluições, somando os resultados obtidos na primeira etapa e dividindo pelas quatro diluições utilizadas neste trabalho.

3.7 Análises estatísticas

Os testes estatísticos são fundamentalmente utilizados em pesquisas que tem como objetivo comparar condições experimentais. Existe uma série de testes estatísticos que podem auxiliar as pesquisas. Os testes estatísticos fornecem um respaldo científico às pesquisas para que estas tenham validade e tenham aceitabilidade no meio científico.

Conforme Callegari-Jacques (2003), nos testes paramétricos os valores da variável estudada devem ter distribuição normal ou aproximação normal. Já os testes não-paramétricos, também chamados por testes de distribuição livre, não têm exigências quanto ao conhecimento da distribuição da variável na população.

Para as variáveis qualitativas do ensaio de crescimento microbiano do solo aplicou-se teste de média, sendo o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis (5% de significância), uma vez que os dados brutos não apresentam normalidade. Utilizou-se o pacote estatístico STATISTICA 6.0.

Existem vários procedimentos de comparações múltiplas como complemento da análise de variância, porém em se tratando de um fator quantitativo, o procedimento mais adequado é a análise de regressão. Utilizou-se análise de regressão em função do tempo para estudar o comportamento de cada condição de estudo no decorrer do período de incubação.

Para análise das variáveis quantitativas do ensaio de biodegradação utilizou-se análise de regressão em função com auxílio do pacote estatístico SPSS 15.0.

3.8 Isolamento e caracterização das cepas

3.8.1 Isolamento

Para a obtenção de culturas puras repicou-se as cepas para ágar nutriente (A.N.) empregando-se a técnica de esgotamento por riscas seguida de estrias, incubando-as por 24 horas a 30°C (Figura 15).

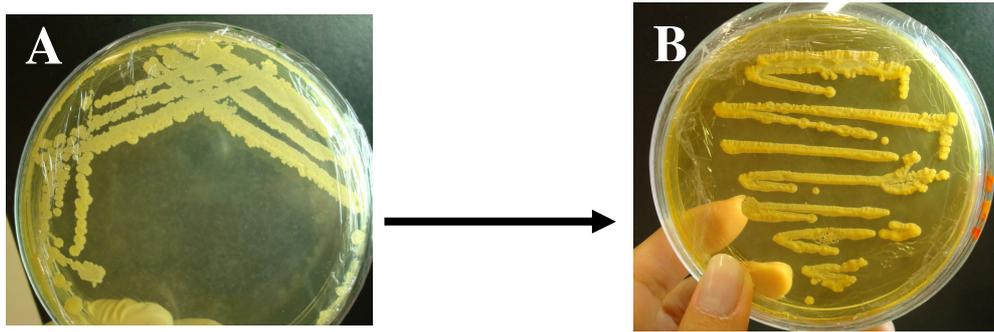


Figura 15 Técnica de isolamento de esgotamento por riscas (A) seguida de estria (B).

Utilizou-se meios seletivos (Agar manitol salgado, Agar Mc Connkey e EMB) para auxiliar no isolamento de algumas cepas.

3.8.2 Caracterização e identificação das cepas

3.8.2.1- Análises morfo-tintoriais

- Morfologia segundo técnica de Gram

Empregou-se, nas culturas de 24h em A.N., a técnica de Coloração Diferenciação de Gram (GRAM, 1884 apud BIER, 1990), para análise de suas características morfotintoriais e verificação da obtenção de culturas puras.

- Teste de Motilidade

O objetivo desse teste é verificar se o microrganismo possui flagelos, (estruturas responsáveis pela motilidade da célula no meio de cultura) (BIER, 1990). Inoculou-se a cultura em ágar semi-sólido, acrescido do reagente TTC - Triphenyl-tetrazolumchloride a 1% em “picada” e incubar por 48 horas a 35°C. A reação foi positiva quando a bactéria cresceu além da linha de picada e negativa quando o meio permaneceu límpido ou houve crescimento só no local do inóculo.

- Caracterização Colonial

Foram observadas e anotadas as colônias diferentes em cada diluição e observadas 5 características coloniais (tamanho, forma, elevação, bordos, estrutura, brilho, coloração e aspecto) segundo NEDER (1992) (Figuras 16).

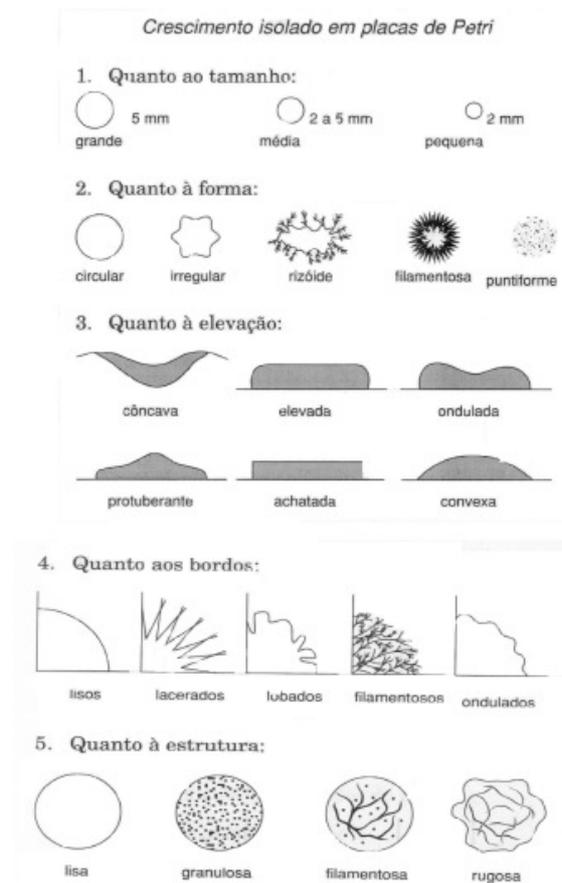


Figura 16 Características coloniais observadas
(Fonte: NEDER, 1992)

3.8.2.2 Caracterização bioquímica

A investigação das atividades metabólicas das bactérias auxiliam o bacteriologista a identificar bactérias em nível de família, gênero ou espécie por meio da verificação das transformações químicas que ocorrem em determinado meio especial empregado, provocadas por ação enzimática definida geneticamente.

Foram realizados os testes bioquímicos (ANEXO): urease, slime, produção de amilase, catalase, *triple sugar iron* (TSI), citrato, indol, VP, crescimento em 7% de NaCl e

fermentações dos carboidratos manitol, glicose, maltose, xylose, lactose, dextrose, sacarose com as estirpes isoladas da água e do solo - (MaC FADIN 1976; ALEF 1986; NEDER 1992; KONEMAN et al.1999; HOLT et al., 2000).

3.8.2.3 Identificação das bactérias por análise de ácidos graxos.

As análises de ácidos graxos foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, da Universidade Federal de Viçosa. Os ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) foram preparados utilizando-se o kit de extração Instant Fame™, de acordo com as recomendações do fabricante (MIDI, Newark, DE) (Figura 17).

As bactérias foram cultivadas em Trypticase Soy Broth Agar (TSBA) BBL, pelo método das estrias cruzadas e incubadas a 28° por 24hs. As colônias foram transferidas para tubos de ensaio com rosca. As amostras foram saponificadas com 1,0 mL de reagente de saponificação e homogeneizadas durante 10 segundos em agitador.

Após isso, os tubos foram colocados em banho-maria (100 °C) por 5 minutos, as amostras foram agitadas novamente por 10 segundos e submetidas a 100 °C durante 25 minutos. Em seguida, foram adicionados às amostras 2,0mL de reagente de metilação seguido de agitação (10 segundos) e incubação a 80°C por 10 minutos.

Os ácidos graxos (fase orgânica) foram separados da fase aquosa com a adição de 1,25mL de reagente de extração. A fase aquosa foi descartada e adicionados à fase orgânica 3,0mL do reagente de lavagem, que tem por finalidade fazer a limpeza da fase orgânica a ser analisada. Esta, contendo os FAMES, foi transferida para tubos apropriados para a análise cromatográfica.

As amostras foram submetidas à análise por cromatografia gasosa, utilizando-se o cromatógrafo Agilent 7890. Os resultados foram comparados com a Biblioteca de referência ITSA 1.0.

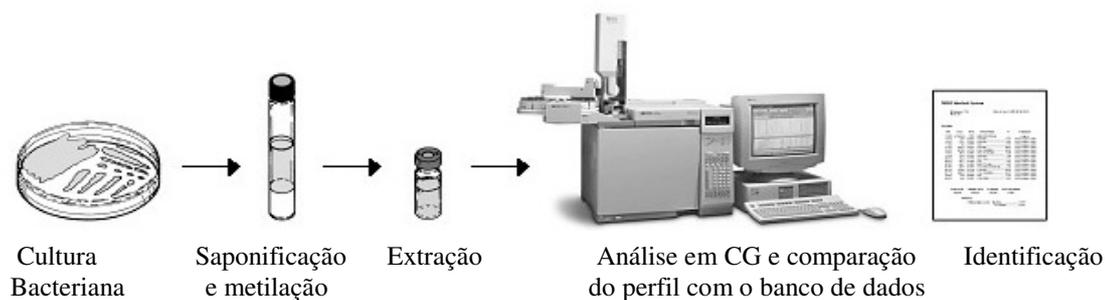


Figura 17 Técnica de análise de ácidos graxos utilizando kit de extração Instant Fame™, de acordo com as recomendações do fabricante (MIDI, Newark, DE).

3.9 Análises moleculares

3.9.1 Extração de DNA de bactérias

O sítio ativo da síntese de proteínas ocorre em todos os microrganismos; como este gene possui trechos altamente conservados (16S) é possível, então, “desenhar” *primers* e usá-los para amplificar, via PCR, as seqüências internas do gene, contendo regiões variáveis (COUTINHO 1999). A extração do DNA foi realizada segundo Griffith et al. (2000) modificado. A extração do DNA das bactérias foi realizada no Laboratório de Processos Biológicos da USP/São Carlos, sob a supervisão das Dras. Isabel Kimiko Sakamoto e Profa. Maria Bernadete Amâncio Varesche.

As culturas puras de bactérias foram crescidas em caldo nutriente por 48 h a 30 °C e após o crescimento das culturas bacterianas elas foram centrifugadas em tubos Falcon (15 mL) a 6000 rpm por 10 minutos. Utilizou-se aproximadamente 0,5 g de amostra (*pellet*), que foi lavada com 10 mL de tampão PBS (1X), agitando no vórtex. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado em seguida. Os tubos foram colocados no gelo e adicionados à amostra: 0,5g de *glass beads* (bolinhas de vidro 150-212 µm); 1mL de tampão PBS (1X); 1mL de fenol tamponado (equilibrado com Tris) e 1mL de clorofórmio.

As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 80 segundos (foi realizado um teste com quatro velocidades anteriormente para saber qual a melhor) e centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante (DNA+PBS) foi transferido (800 µL) para um “ependorfe” de 2,0 mL acrescidos de 650 µL de fenol (tamponado com Tris). As amostras

foram homogeneizadas no vórtex por 3 segundos para formar uma emulsão e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (500 µL) foi transferido para outro “eppendorfe” e adicionado o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 3 segundos e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante (400 µL) foi transferido para outro “eppendorfe” e adicionado o mesmo volume de clorofórmio. As amostras foram homogeneizadas no vórtex por 3 segundos e centrifugadas a 10000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante (100 µL) foi transferido para outro “eppendorfe”. O DNA das amostras foi armazenado a -20°C.

3.9.2 Eletroforese em gel de Agarose

A Eletroforese em gel de Agarose foi realizada no Laboratório de Processos Biológicos da USP/São Carlos, sob a supervisão das Dras. Isabel Kimiko Sakamoto e Profa. Maria Bernadete Amâncio Varesche. Para verificar o produto da extração utilizou-se a técnica da Eletroforese em gel de Agarose a 1% (m:v) preparada em solução tampão TAE 1X (Figura 22). Utilizou-se 5,0 µL de amostra mais 2,0 µL de Blue Green Loading Dye (corante fluorescente). As misturas foram colocadas nas cavidades do gel utilizando o aparelho Pharmacia Biotech GNA 100 para a corrida, sendo a programação 70V por 40 minutos. Adicionou-se o marcador High DNA Mass Ladder (composto por uma mistura equimolar de 6 fragmentos de DNA com: 1000, 2000, 3000, 4000, 6000 e 10000 pb). E por fim foi feita a leitura do gel na a câmara do transiluminador UV (Strata gene – Eagle Eye II).

3.9.3 Amplificação dos fragmentos dos genes 16S DNA do solo (PCR)

O gene 16S rDNA das bactérias isoladas de amostras de solo agrícola foi amplificado por reação de PCR utilizando o conjunto de iniciadores universais 27F/1100R para o domínio Bacteria (Tabela 5).

Tabela 5 Primers utilizado na técnica de PCR.

DOMÍNIO	INICIADOR	SEQUÊNCIA	REFERÊNCIA
Bacteria	27F	5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	LANE, 1991
Bacteria	110R	3' AGGGTTGCGCTCGTTG	CIANTAR, 2005

O DNA obtido a partir das amostras de solo é amplificado pela reação de polimerização em cadeia (PCR) usando pares de iniciadores (*primers*) de acordo com a região-alvo a ser amplificada. O gene 16S rDNA dos microrganismos presentes nas amostras de solo foi amplificado por reação de PCR utilizando o conjunto de iniciadores 27F/1100R.

As condições de corrida no Termociclador foi de 35 ciclos, sendo 5 minutos a 94 °C; 1,5 minutos a 94 °C; 45 segundos a 96 °C; 1,3 minutos a 72 °C; 7 minutos a 72 °C; finalizando a 4 °C. Os produtos de PCR foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 70 Volts por 40 minutos e foi observado em um transluminador UV (Strata gene – Eagle Eye II).

Utilizou-se para a reação de PCR os seguintes reagentes (Tabela 6):

Tabela 6 Reagentes e suas concentrações.

Reagentes	01 Amostra
H ₂ O ultrapurificada	36µL
10 x Tampão PCR (50 mM MgCl ₂)	5 µL 1,5µL
dNTP (2mMcada)	5 µL
Primer forward (100 pmol/l)	0,5µL
Primer reverse (100 pmol/l)	0,5µL
Taq DNA polymerase (5 U/µl)	0,5µL
Template (50-100ng)	1,0 µL
Total	50 µL

3.9.4 Sequenciamento de um fragmento de um gene 16S das bactérias com potencial de biodegradação do diurom e do sulfato de endossulfam.

O sequenciamento dos fragmentos de um gene 16S das bactérias isoladas foi realizado no Laboratório DNA-Consult em São Carlos/SP. Para o sequenciamento a partir dos produtos do PCR utilizou-se o MegaBACE 750 - GE Healthcare, no laboratório DNA-consult em São

Carlos/ SP. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 750 DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090 e analisadas pelo software *Sequence Analyser* utilizando o *Base Caller Cimarron*.

Os produtos de PCR foram purificados e quantificados e só então submetidos à reação de sequenciamento, conforme instruções do fabricante do kit (DYEnamic ET Dye Terminator Kit, código US81090).

A purificação pós-reação foi feita por precipitação com Acetato de Amônio e Etanol. Seguindo o protocolo abaixo:

1. Adição de 1 µL de Acetato de Amônio 7,5 M e 28 µL de Etanol 100% a cada reação. Agitação dos tubos para homogeneizar. A concentração final do Etanol foi de 70%. Não é necessário utilizar etanol gelado ou incubar a baixas temperaturas para a precipitação. Manter os tubos à temperatura ambiente por 15 minutos (em ambiente escuro).

2. Centrifugação dos tubos à temperatura ambiente em microcentrífuga por 15 minutos em rotação máxima (aproximadamente 13.000 rpm).

3. Remoção do sobrenadante por aspiração (utilize micropipeta). Adicione 170 µL de Etanol 70% para lavar o *pellet*. Centrifugue nas mesmas condições descritas anteriormente.

4. Remoção do sobrenadante por aspiração e deixe o *pellet* secar ao ar (em ambiente escuro).

5. Ressuspensão do *pellet* em 10 µL de Loading Solution. Agitação em vortex (3s) e manter a 4°C protegido da luz.

3.10 Utilização do diurom e do sulfato de endossulfam como fonte de carbono

Na solução salina estéril, inoculou-se 0,1mL das diluições 10^{-3} a 10^{-6} , em trélicas, utilizando a técnica de *pour plate* em meio sólido ($K_2HPO_4=0,5$ g; $(NH_4)_2SO_4=0,5$ g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O=0,5$ g; $FeCl_2 \cdot 1H_2O=10$ mg; $CaCl_2=10$ mg; $MnCl_2=0,1$ mg; $ZnSO_4=0,01$ mg; (Figura 23) ágar=15,0 g, por litro de água destilada, Jones ; Edington, (J.E.) 1968 (ROQUE e MELO, 2000) acrescido de soluções individuais dos pesticidas ($5\mu g \cdot mL^{-1}$), e realizou-se contagem até 144h, objetivando posterior comparação com o crescimento em meio CPS.

3.11 Determinação das concentrações de sulfato de endossulfam e de diurom inicial no solo

3.11.1 Sulfato de endossulfam

Para a análise do sulfato de endossulfam no solo foi utilizado o método descrito por Laabs et al. (2000).

Adicionou-se a 25 g de amostra, 50 mL de solução extratora (água:acetona:acetato de etila 1:2:2 v/v/v) procedendo-se à agitação por 4 horas (agitador horizontal regulado em 90 rpm). Em seguida, foi feita filtração em funil de vidro com papel de filtro, transferindo a maior parte possível da amostra para o funil. O papel de filtro foi lavado por duas vezes com 5mL da solução extratora e, em seguida, foi adicionado 5 gotas de tolueno e concentrou-se em rotavapor (40°C, 80 rpm, 400 mbar).

O concentrado foi então transferido para um funil de separação com capacidade de 100 mL ao qual acrescentou-se 30 mL de solução saturada de NaCl. Foram adicionados 30 mL de diclorometano ao balão de rotaevapor (divididos em 3 porções), que após agitação vagarosa foram transferidos para o funil de separação. Agitou-se o funil vigorosamente por 10 minutos, deixando-o em repouso por 10 a 15 minutos, para melhor separar as fases.

A fase aquosa foi drenada e transferida para um balão de rotaevapor passando através de um final com sulfato de sódio. O processo de adição de diclorometano ao funil de decantação, agitação e separação da fase orgânica foi repetido duas vezes e as fases orgânicas separadas foram combinadas no balão. Adicionou-se à solução de diclorometano três gotas de tolueno e concentrou-se em rotaevapor. O eluato foi retomado com alíquotas de tolueno, de modo a não ultrapassar o volume final de 2 mL, que é a capacidade do frasco de amostrador automático. A esse mesmo frasco adicionou-se 50 µL de uma solução 100 µg mL⁻¹ do padrão interno α-HCH (50 µL de uma solução 100 µg mL⁻¹).

O extrato foi submetido à análise quantitativa por cromatografia a gás com detector de captura de elétrons (CG/ECD) modelo HP 6890, equipado com uma coluna HP5-MS (5% fenilmetilsiloxano), capilar, 30,0 m x 250 µm diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de fase estacionária.

Para obter uma boa resolução cromatográfica, as seguintes condições de análise foram utilizadas: volume injetado: 1 µL; gás de arraste: nitrogênio; fluxo do gás: coluna capilar 1,0

mL min⁻¹ e make-up 20,0 mL min⁻¹; programação da temperatura do forno: 92 ° C (2,5 min), gradiente de 15 ° C min⁻¹ até 175 ° C (13 min), gradiente de 20 ° C min⁻¹ até 280 ° C (10 min).

3.11.2 Diurom

Pesou-se 15 g de solo em um tubo de centrífuga e adicionou-se 40 mL da solução extratora (acetona: acetonitrila: tampão pH 2, 2:2:1, v/v/v), sendo o tampão pH 2 preparado com 250 mL de KCl 0,2 mol L⁻¹ e 65 mL de HCl 0,2 mol L⁻¹. Deixou-se em processo de agitação no agitador orbital por 03h30min.

Em seguida realizou-se a centrifugação, rotação de 1600 rpm, decantou-se o sobrenadante para um balão concentrando-o em evaporador rotatório. Transferiu-se o concentrado, lavando-se o balão com 180 mL de água deionizada, para um béquer de 200 mL onde se ajustou o pH entre 7,0 e 7,5. Usando um sistema de extração a vácuo (20 mmHg) percolou-se o extrato em um cartucho de extração em fase sólida, contendo fita de PTFE (politetrafluoretileno) e 0,2 g da fase sólida SDVB (co-polímero de estireno divinil benzeno), previamente condicionado com 5 mL de metanol e 5 mL de água destilada.

Após a percolação da amostra pelo cartucho, este foi centrifugado e posteriormente o diurom foi eluído com duas porções de 10 mL cada e uma porção de 5 mL de metanol:acetonitrila (7:3), sendo o eluato recolhido recolhidas em balão. Após concentração em rotaevapor até quase a secura. O concentrado foi retomado com acetonitrila e transferido para um frasco de amostrador automático de 2,0 mL com tampa rosqueada com batoquete de teflon, contendo 50 µL do padrão interno terbutilazina (100 µg mL⁻¹). O mesmo foi armazenado em refrigerador (-6°) até análise cromatográfica

A quantificação do diurom nos extratos foi efetuada em cromatógrafo líquido de alta eficiência Varian com detector ultravioleta com arranjos de diodos (HPLC-DAD). Para determinação do analito, foram injetados 10 µL do extrato em coluna OmniSpher C18 de 25 cm de comprimento; 4,6 mmid e tamanho de partícula 5 µm. O sistema de eluição constou de uma mistura de dois solventes: água e acetonitrila num fluxo de 1 mL min⁻¹ programados inicialmente com 40% de água e 60% de acetonitrila até os 6 minutos, 20% e 80% aos 10 minutos, 100% de acetonitrila aos 12 minutos permanecendo até os 15 minutos, finalizando a eluição das amostras.

3.12 Preparo das soluções dos padrões do diurom e do sulfato de endossulfam

3.12.1 Padrão Interno

Utilizou-se como padrão interno, para o ensaio do diurom, o α -HCH, sendo que 0,5 mL de uma solução a $98,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e seu volume ajustado com acetato de etila. Em seguida 1 mL foi diluído em 4 mL de acetato de etila.

Para o ensaio com o sulfato de endossulfam utilizou-se $25 \mu\text{L}$ ($98,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) do mesmo padrão utilizado para o diurom.

3.12.2 Preparo de solução e padrões para a curva analítica

Foram preparadas soluções estoques a partir do padrão primário do diurom (Pestanal 99,5% de pureza), com concentração de $103,40 \mu\text{g mL}^{-1}$, em acetato de etila.

As soluções de trabalho, para a curva analítica, foram preparadas a partir das soluções estoque, diluindo-se as alíquotas apropriadas com acetato de etila, utilizando-se o α -HCH como padrão interno. As concentrações das soluções de trabalho foram: 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Durante a realização deste estudo, obteve-se boa linearidade para o intervalo de trabalho estudado. As equações das curvas analíticas obtidas, assim como os coeficientes de correlação estão apresentadas abaixo.

$$Y=0,0008x-0,0031 \quad R^2=0,9991$$

$$Y=0,0005x+0,0193 \quad R^2=0,9919$$

$$Y=0,0004x+0,0111 \quad R^2=0,9989$$

Foi preparada solução estoque a partir do padrão primário do sulfato de endossulfam (Pestanal 97,7% de pureza), com concentração de $98,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, em acetato de etila. As soluções estoques foram conservadas em freezer por até seis meses.

As soluções de trabalho, para a curva analítica, foram preparadas a partir da solução estoque, diluindo-se as alíquotas apropriadas com acetato de etila, utilizando-se o α -HCH como padrão interno. As concentrações das soluções de trabalho foram: 0,1; 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; $15,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Durante a realização deste estudo, obteve-se boa linearidade para o intervalo de trabalho estudado. As equações das curvas analíticas obtidas, assim como os coeficientes de correlação estão apresentadas abaixo.

$$Y=0,3135x-0,0337 \quad R^2=0,9922$$

$$Y=0,3174x-0,0529 \quad R^2= 0,9907$$

$$Y=0,3023x-0,043 \quad R^2= 0,9808$$

$$Y=0,2462x-0,0473 \quad R^2=0,9966$$

3.13 Condições cromatográficas

Foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo HP 6890 com detector de captura de elétrons, equipado com uma coluna HP5-MS (5% fenilmetilsiloxano), capilar, 30,0 m x 250 μm diâmetro interno x 0,25 μm de espessura de fase estacionária.

Para obter uma boa resolução do pesticida, as condições de análise foram as seguintes: volume injetado de 1 μL , gás de arraste: Nitrogênio, fluxo do gás: coluna 1,0 mL min^{-1} e make-up 20,0 mL min^{-1} , programação da temperatura do forno: 92 $^{\circ}\text{C}$ (2,5 min), gradiente de 15 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 175 $^{\circ}\text{C}$ (5 min), gradiente de 25 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$ (5 min).

3.14 Degradação de pesticidas por bactérias em meio de cultura

3.14.1 Teste de viabilidade

No presente estudo, considerando o objetivo principal de verificar o potencial de utilização de pesticidas por algumas estirpes que foram isoladas, foram utilizados dois dos pesticidas detectados na área de estudo por outros autores (DORES et al., 2005; HARDOIM et al., 2007) como única fonte de carbono em meio mínimo.

As estirpes bacterianas isoladas foram cultivadas em Agar nutriente (20mL), por 24 horas. Após este período, uma colônia foi inoculada em meio mineral J.E. acrescido de 5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dextrose, por 48 horas. Em seguida, 100 μL foram inoculados em meio mineral

J.E. acrescido de soluções individuais (5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos pesticidas estudados, por mais 48 horas.

3.14.2 Teste de degradação

Após esse pré-cultivo 500 μL do inóculo da linhagem foi introduzido em 50 mL de meio mineral J.E. suplementado com o pesticida (5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As avaliações de crescimento foram realizadas pela absorbância em espectrofotômetro (600 nm) nos intervalos de 0, 12, 24, 48, 72, 96, 144, 192, 226 e 394 horas (17 dias), após a incubação em estufa (35°C), conforme descrito em literatura (SHIVARAMAIAH.; KENNEDY, 2008, Modificado). As concentrações dos pesticidas estudados foram determinadas nos mesmos intervalos de tempo de incubação.

A determinação das concentrações do diurom e do sulfato de endossulfam incorporado ao meio (antes e durante cultivo das bactérias) foi realizada por extração líquido-líquido seguida por Cromatografia gasosa (HP 6890), com um detector de captura de elétrons (CG/ECD) no Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas/Depto. de Química-UFMT sob a supervisão da Dra. Eliana Dores. Embora o GC/ECD apresente menor sensibilidade de resposta para o diurom, quando comparado com o HPLC-DAD, o mesmo foi utilizado devido à problemas técnicos.

3.15 Extração líquido-líquido

Os pesticidas, diurom e sulfato de endossulfam, presentes no meio mínimo foram extraídos do mesmo por extração líquido-líquido com acetato de etila seguindo procedimento apresentado na literatura e considerando a solubilidade de ambos os pesticidas neste solvente.

Das amostras do meio mínimo suplementado com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MM5) transferiu-se 8 mL para tubos de ensaio (20 mL) de rosca e adicionou-se 3 mL do solvente orgânico acetato de etila. Já das amostras do meio mínimo suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (MM50) transferiu-se 5 mL para tubos de ensaio (20 mL) de rosca e adicionou-se 2 mL do solvente orgânico acetato de etila. Tais condições e diluições foram utilizadas considerando o intervalo de trabalho das concentrações dos pesticidas.

Os tubos foram homogeneizados por um minuto em vórtex, após total separação das fases transferiu-se 1 mL da fração orgânica para um vial (15 mL). Em seguida 1 mL (MM5) e 100 μL (MM50) foram transferidos para frasco de amostrador automático (vial) com capacidade de 1,5 mL (com tampa rosqueada com septo de teflon) que continha 20 μL de uma solução de padrão interno $\alpha\text{-HCH}$ a $0,985 \mu\text{g mL}^{-1}$, o qual foi armazenado em refrigerador até a sua injeção no cromatógrafo a gás com detector de captura de elétrons.

3.16 Determinação da concentração de diurom e sulfato de endossulfam retida na célula bacteriana

No último dia de incubação das amostras (T=394h) centrifugou-se 10 mL do meio por 15 minutos, descartando em seguida o sobrenadante. Adicionou-se 2 mL do solvente orgânico acetato de etila, em seguida os tubos foram homogeneizados em vórtex por 1 minuto em velocidade média. Após total separação das fases transferiu-se 1 mL da fração orgânica para um vial acrescido de 25 μL do padrão interno $\alpha\text{-HCH}$ ($98,5 \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.17 Crescimento de *Bacillus cereus* em diferentes concentrações de dextrose

Para a definição das concentrações de pesticidas a serem testadas no processo de degradação, próxima etapa, foram feitas análises dos dados de crescimento bacteriano em meio mínimo contendo diferentes concentrações de dextrose (5, 50, 100 e $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$) como única fonte de carbono e, posteriormente, realizadas leituras em D.O. (densidade óptica) a 600nm, nos intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. O critério para a escolha deste carboidrato foi baseado nos testes bioquímicos, sendo que *B. cereus* teve um crescimento mais evidente em meio contendo dextrose.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Granulometria e análises química e física do solo

Os dados da composição granulométrica (Tabela 7) mostram predomínio da fração areia em ambos horizontes. Os teores de argila variaram de 316 (Ap) a 450 (A/B) dag kg⁻¹ e os de silte de 26 (A/B) a 60 (Ap) dag kg⁻¹.

Ainda com relação à granulometria, no perfil estudado ocorreu aumento do teor de argila em profundidade com redução da areia, conforme já constatado por Dores et al. (2005) e corroborando com o que disse Araujo (2004), que a argila tende a aumentar, em profundidade. Esta variação leva à maior retenção de água resultando, no aumento da probabilidade de retenção de poluentes.

Os agregados e suas argilas influenciam a interação das enzimas com seus substratos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006). Quando consideramos a partícula de solo como *hábitat* de microrganismos é importante considerar sua natureza (Figura 18, modificada de ATLAS; BARTHA, 1987). Colóides de argila diferem significativamente em suas propriedades físicas e químicas, sendo assim, estas diferenças influenciam quali e quantitativamente na comunidade microbiana, que podem ocupar um *hábitat* particular no solo (ATLAS; BARTHA, 1987).

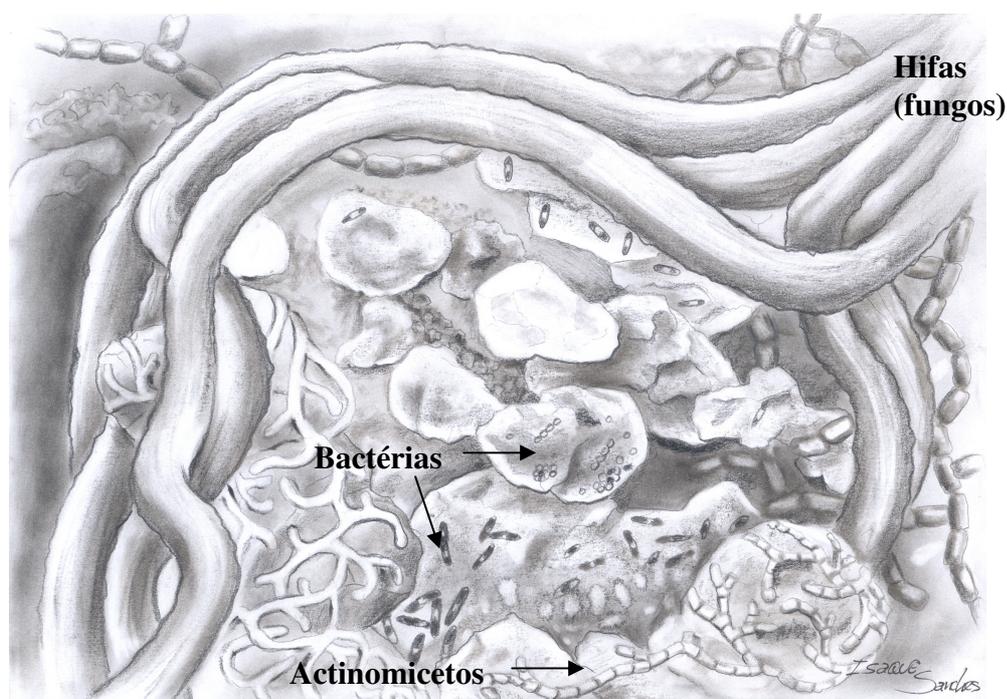


Figura 18 Esquema da visualização de microrganismos em um agregado de solo típico. Modificada de ATLAS; BARTHA, 1987

Embora os horizontes Ap e AB difiram em suas variáveis físicas e químicas (argila, silte, areia, C orgânico), com relação ao substrato biológico, ou a litologia, o solo é formado por material argilo-arenoso e por crostas ferruginosas. Essas características propiciam o desenvolvimento de microbiota específica definida pelas condições ambientais registradas. A textura dos solos é uma importante propriedade na ecologia dos microrganismos; maiores teores de argila ou areia determinam a área superficial disponível para a colonização e multiplicação da microbiota. Solos argilosos possuem maior área superficial que solos arenosos (ATLAS; BARTHA, 1987).

Alguns latossolos apresentam agregados muito estáveis e a condutividade hidráulica, em muitos casos, é considerável. As propriedades do solo que afetam a sorção de pesticidas são variáveis e dependem também da composição específica do produto. Entretanto, a literatura indica a matéria orgânica como sendo a mais importante propriedade do solo que afeta a sorção de pesticidas (SPADOTTO, 2001).

Tabela 7 Propriedade granulométrica dos horizontes do solo e C orgânico.

Horizonte	Argila	Silte	Areia	C orgânico (g.kg⁻¹)
Ap (0-30cm)	316	60	624	11,8
AB (30-38)	450	26	524	7,8

Fonte: Dores et al. (2005)

O equilíbrio dinâmico das populações nas comunidades microbianas dos solos também pode sofrer modificações influenciadas pelas interações benéficas e/ou antagônicas dos microrganismos, determinando a sua composição qualitativa e quantitativa (RAVERKAR; KONDE, 1988).

No presente estudo, o pH dos horizontes Ap e AB apresentaram-se semelhantes, sendo 4,63 e 4,99 respectivamente (Tabela 8). Segundo Kämpf (2000b), o pH pode influenciar tanto na disponibilidade de nutrientes quanto na biologia dos microrganismos do substrato. Além do pH, a capacidade de troca de cátions está diretamente relacionada à sua disponibilidade e à redução nas perdas por lixiviação (FERMINO, 1996). Essa característica, favorece a nitrificação realizada por nitrificadores heterotróficos, que ocorre em valores de pH menores que 4,0 e são mais tolerantes à acidez que os autotróficos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

A matéria orgânica foi alta para ambos os horizontes, 20,33% e 13,2%, correspondendo aos horizontes Ap e AB, respectivamente, uma vez que que 5% já é considerado um bom padrão, conforme Vargas e Hungria (1997). Ávila-Neto (2007) e Scatena (2007) em estudos

desenvolvidos em região agrícola próxima a deste trabalho também encontraram elevado teor de matéria orgânica e de carbono orgânico, justificados pelo tipo de manejo do solo.

A origem do material húmico envolve predominantemente degradação microbiana de polímeros orgânicos a constituintes monoméricos, como o fenol, quinose, aminoácido e açúcares; e sua subsequente polimerização pelas reações químicas espontânea, autoxidação e oxidação catalisada pelas enzimas como a laccase, polifenoloxidase e peroxidase (ATLAS; BARTHA, 1987).

Os microrganismos também apresentam uma distribuição de cargas eletronegativas em torno de suas células devido, principalmente, aos grupos COO^- de macromoléculas da parede celular e/ou cápsula. Nesta condição, os microrganismos podem interagir diretamente com as micelas coloidais do solo através de adsorção. Neste processo inclui mecanismos de troca iônica, protonação e principalmente formação de pontes de hidrogênio. Além disso, alguns cátions divalentes, tais como Mn^{2+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} podem atuar como verdadeiras pontes divalentes nos processos de adsorção dos microrganismos e partículas coloidais do solo (Figura 19).

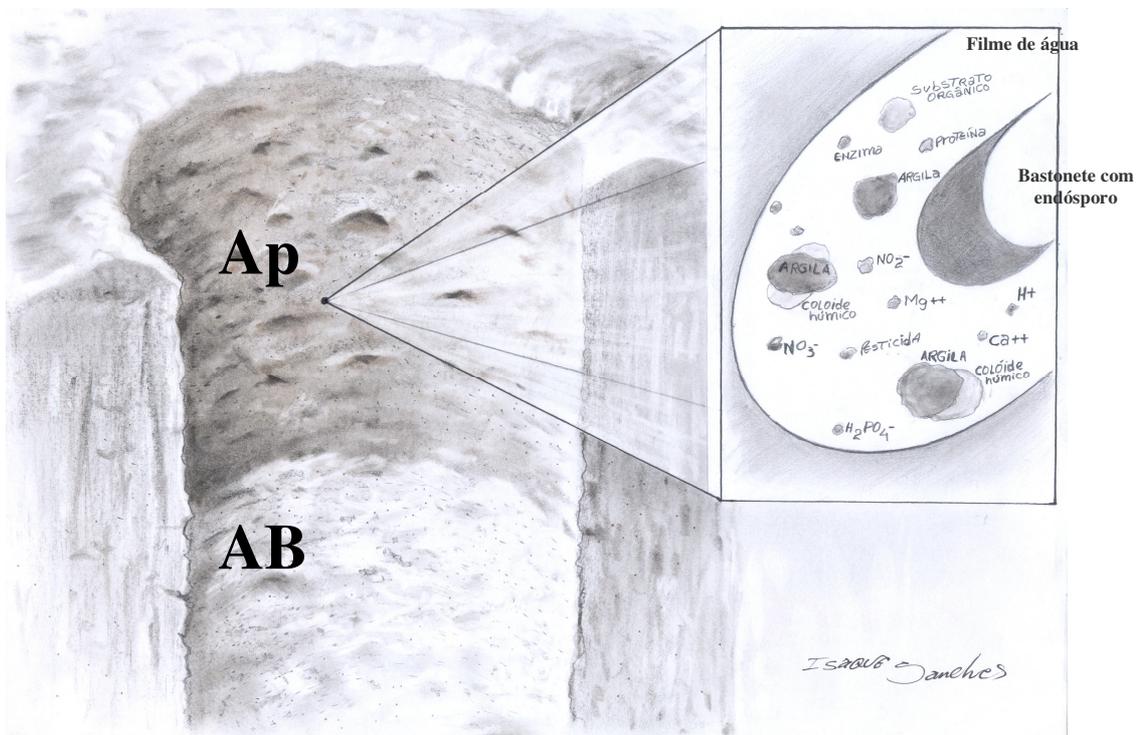


Figura 19 Esquema dos horizontes Ap e AB na área de estudo com detalhes de algumas características físicas, químicas e biológicas registradas.

As partículas do solo variam bastante com relação a sua área superficial específica. Essas superfícies variam também em propriedades como a capacidade de troca de cátions e o tipo dominante de carga (+, - ou neutro) importantes em sua interação com microrganismos. Estes, por sua vez, têm propriedades superficiais específicas relacionadas ao tipo de carga dominante, à natureza dos compostos orgânicos excretados e à existência de grupos ionogênicos da superfície celular que determinam o tipo de ligação com as partículas (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Tabela 8 Propriedades Física e química dos horizontes AP e AB.

Hz	pH	cmol/dcm ³							MO
		Al	H ⁺ Al	Ca ⁺ Mg	Ca	Mg	K	P	
	CaCl ²	cmolc/kg				MG dm ³		%	
Ap	4,63	0,8	1,19	3,1	2,5	0,6	1,93	5,46	20,33
AB	4,99	0,12	0,35	3,7	2,6	1,1	4,82	4,16	13,2

Constatou-se maior teor de fósforo no primeiro horizonte (Ap) 5,46 mg dm³ contra 4,16 mg dm³ no segundo (AB). Conforme Raij (1981), os teores de fósforo nos solos tropicais são muito reduzidos, e seu acúmulo, principalmente, nas camadas superficiais do sistema plantio direto, explica-se pela baixa mobilidade e solubilidade de seus compostos, principalmente em solos de natureza ácida que contenham altos teores de argila. Mas, de acordo com Sá (1993) e Muzilli (1981, 1985), o acúmulo superficial de fósforo estaria estreitamente relacionado com a presença de material orgânico na superfície.

O acúmulo de P na superfície do solo é decorrente da decomposição dos resíduos de plantas, diminuição da fixação em função do seu menor contato com os constituintes inorgânicos do solo e de aplicações anuais de fertilizantes fosfatados, de acordo com Moraes (1993). O conteúdo e o fluxo de P por meio da biomassa microbiana desempenham importante papel como reservatório de P, podendo atingir valores equivalentes ou, às vezes, superiores à absorção desse nutriente pelas plantas (BROOKES et al., 1984; SINGH et al., 1989 apud CARNEIRO et al., 2004).

Também devemos considerar que nos Latossolos, grande parte dos fosfatos presentes não são móveis e sim fixados, ou seja, tornam-se não assimiláveis pelos vegetais (FREGONEZI, 2008). Este comportamento já havia sido relatado anteriormente por Carneiro et al (2004), ao estudarem a assimilação de P pela biomassa microbiana em uma área de Latossolo Vermelho-

Amarelo argiloso, no Distrito Federal. Estes mesmos autores registram uma variação da concentração de P no solo de 0,9 a 22,4 mg kg⁻¹ e na biomassa microbiana a variação foi de 2 a 20 µg g⁻¹. Além dos fatores já mencionados, deve-se considerar que este tipo de solo é originado a partir de rochas pobres neste elemento (FREGONEZI, 2008).

Os teores de cálcio (Ca²⁺) e magnésio (Mg²⁺) foram considerados baixos (< 3,0 e < 3 cmol_c dm⁻³, respectivamente) e, dessa forma, considerando Araujo et al. (2004), restritivos à nutrição mineral de plantas. A acidez na quase totalidade dos solos varia entre forte a moderada com os teores de Al³⁺, onde os teores de cátions como Ca²⁺, Mg²⁺ e K⁺ são reduzidos, aumentando o distrofismo dos solos e induz limitações ao desenvolvimento da maioria das culturas (SMYTH, 1996).

A importância dos microrganismos está relacionada com o efeito adesivo de polissacarídeos extracelulares provindos de hifas e de bactérias, que diminuem a destruição de agregados por aumentar sua resistência ao umedecimento (GUGGENBERGER et al., 1999), ou de “colas” provenientes de resíduos orgânicos adsorvidos à fração argila (HART et al., 1988, apud DEGENs et al., 1994).

As enzimas extracelulares, secretadas pela biomassa do solo, têm como principais funções: solubilizar ou metabolizar substratos externos à célula; produzir nutrientes necessários aos microrganismos; detoxificar contaminantes ambientais; e, modificar o micro nicho, com o objetivo de aumentar a probabilidade de sobrevivência da célula. Por isso, a estabilidade da enzima é importante, e geralmente ela ocorre através da ligação com partículas do solo. Tate (1995) descreveu que grande parte da atividade enzimática resultou de enzimas ligadas ou adsorvidas na matéria orgânica e a uma condição ótima de temperatura, pH e equilíbrio iônico.

Nos agroecossistemas, o preparo e o cultivo do solo influenciam as populações da comunidade microbiana, principalmente devido alterações na aeração e na disponibilidade de nutrientes no solo. A calagem e a adubação são técnicas alternativas utilizadas para corrigir a elevada acidez e a baixa fertilidade dos solos de cerrados. Entretanto, as alterações do pH e da disponibilidade de nutrientes podem influenciar a comunidade microbiana de maneira direta através da atuação sobre processos microbianos, fisiológicos e bioquímicos específicos, ou, indiretamente através da disponibilidade de nutrientes e da neutralização de elementos tóxicos (KAMEL et al., 1989).

4.2 Concentrações de sulfato de endossulfam e de diurom inicial no solo

Não se detectou a presença do diurom nos horizontes estudados, apenas do sulfato de endossulfam (Tabela 9), diferentemente dos registrados por outros autores em estudos anteriores conduzidos na mesma área de estudo.

Tabela 9 Concentrações iniciais de s. de endossulfam e diurom no solo.

Horizonte	Diurom	Sulfato de endossulfam
Ap	-	60,7 $\mu\text{g Kg}^{-1}$
AB	-	12,28 $\mu\text{g Kg}^{-1}$

4.3 Crescimento microbiano nos meios CPS e MM + contaminante

Como ocorre com qualquer meio de cultura, existe um grau de seletividade para um ou outro grupo de microrganismo, pois não detêm de fontes energéticas/nutricionais adequadas ao crescimento de todos os grupos microbianos presentes no ambiente. O maior crescimento microbiano foi observado nos tratamentos-controle (sem contaminação por pesticida), variando de $1,32 \times 10^5$ a $4,3 \times 10^5$ UFCs. O horizonte AB é mais pobre em matéria orgânica (13,2%), justificando a menor abundância e crescimento registrados. Neste horizonte, o MM evidenciou um crescimento microbiano discreto (Figura 20), inferior ao Ap (20,33% de matéria orgânica), como esperado. Sabe-se que pesticidas lixiviados para a camada sub-superficial do solo estão sujeitos à degradação mais lenta em relação à camada superior (FOMSGAARD, 1995).

Registrou-se um menor crescimento no meio MM, tanto para o horizonte Ap quanto para o AB, uma vez que sua composição possuía uma única fonte de carbono. Demoling et al. (2007) observaram que, na maioria dos 28 solos testados, a baixa concentração de carbono limitou o crescimento bacteriano, sendo que sua taxa aumentou de 1,5 a 2 vezes quando acrescida glicose como fonte extra de carbono.

Moreira e Siqueira (2006) afirmaram que a atividade biológica do solo situa-se, de modo geral, na camada de 0 a 20 cm de profundidade, onde ocorre maior acumulação da matéria orgânica pela deposição de material vegetal, utilização de fertilizantes e outros insumos químicos em áreas agrícolas, além do efeito das raízes, corroborando com este estudo,

no qual o primeiro horizonte do solo (Ap) proporcionou melhor crescimento das colônias (UFCs) durante todo o tempo de leitura (0-144 horas).

Como pode ser observado na figura 36, o meio CPS, por ser rico em fontes energéticas, propiciou um crescimento dos microrganismos edáficos mais elevado nos dois primeiros tempos de leituras, apresentando uma queda em seguida. Já no MM a dinâmica de crescimento manteve um comportamento mais homogêneo, embora tenha atingido um pico menos elevado.

Em CPS (Figura 20) o crescimento exponencial foi menos acentuado do que em MM, embora tenha apresentado maior número de colônias de bactérias totais. Vieira e Nahas (2000) encontraram resultados semelhantes quando quantificaram bactérias totais dos meios TSA e Thorton, este último apresentando menor valor nutricional.

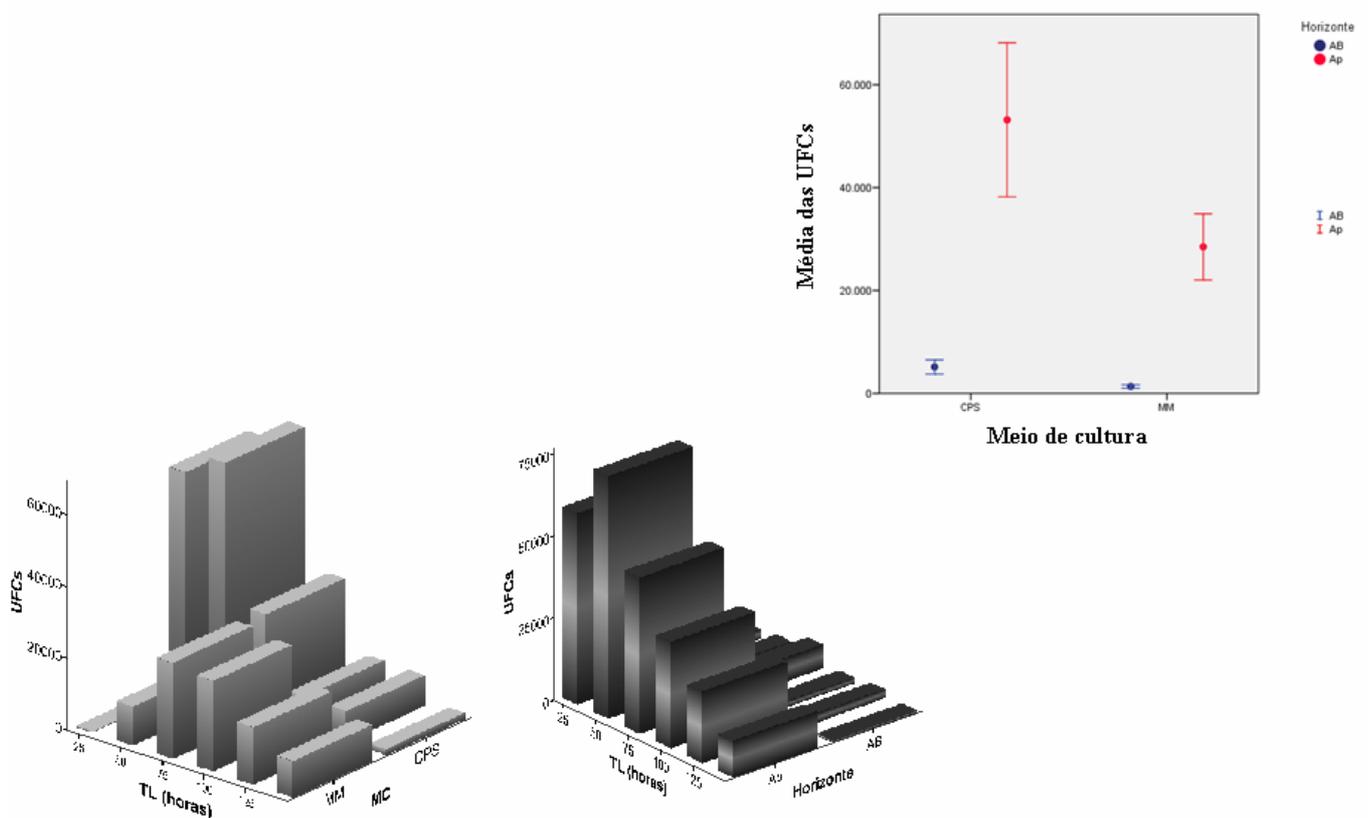


Figura 20 Relação entre as médias de UFCs, meios de cultura e horizontes estudados.

Conforme esperado, o solo controle (sem adição do diurom/sulfato de endossulfam) propiciou um melhor crescimento, totalizando assim, um maior número de colônias microbianas nesse tratamento. O número de UFCs, quando cultivados em CPS foi superior no solo contaminado com o pesticida diurom, quando comparado com o solo tratado com o sulfato de endossulfam não tendo havido diferença significativa quando aplicado o teste de Kruskal Wallis (Tabela 10).

O crescimento microbiano em MM em presença do sulfato de endossulfam foi inferior àquele obtido no MM suplementado com diurom em ambos horizontes (Figura 20) sem, contudo, haver uma diferença significativa (Tabela 10). Prado e Airoidi (2001) também verificaram influência negativa na atividade microbiana de Latossolo Vermelho na presença do herbicida diurom, tanto em concentrações elevadas ($66,67 \mu\text{g mL}^{-1}$) quanto em concentrações mais baixas ($1,67 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O número de UFCs obtido em CPS a partir da amostra do solo contaminado com sulfato de endossulfam foi próximo àquele registrado no controle do MM, indicando uma possível influência negativa deste metabólito sobre o crescimento microbiano. Além da molécula original, os metabólitos ou produtos de degradação dos agrotóxicos devem ser considerados no monitoramento. O comportamento ambiental e a toxicidade e ecotoxicidade dos produtos de degradação do agrotóxico podem diferir enormemente da molécula-mãe. Alguns produtos de degradação podem ser mais tóxicos que o ingrediente-ativo original, como é o caso do sulfato de endossulfam, metabólito do princípio ativo endossulfam (SPADOTTO et al. 2004).

Com relação à influência dos pesticidas no crescimento microbiano do solo, no MM, eles diferiram apenas do controle no primeiro horizonte. Já no CPS essa diferença foi observada apenas no segundo horizonte, não havendo, no entanto, diferença significativa entre diurom e sulfato de endossulfam (Tabela 10).

Tabela 10 Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias entre meio de cultura, horizonte e pesticida.

Tratamento	Hz	Meio de Cultura	
		UFCs MM	UFCs CPS
Diurom	Ap	53041 Aa*	7962000 Aa
	A/B	19148 Ba	20847 Ba
Sulfato de endossulfam	Ap	62537 Aa*	195400 Aa
	A/B	25861 Ba	27833 Ba
Controle	Ap	162000 Ab*	196500 Aa
	A/B	32185 Ba	88639 Bb

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa entre os horizontes a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis

Médias seguidas de mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa entre os tratamentos a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis

Médias seguidas de asterisco (*) não apresentam diferença significativa entre os meios de culturas a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

O atraso e a redução na atividade microbiana total edáfica afetam a decomposição dos resíduos da agricultura e matéria orgânica do solo que é uma contribuição essencial para o processo dos ciclos de nutrientes. Em geral, pesticidas que têm efeitos tóxicos na atividade microbiana edáfica, como o diurom, aumentam a possibilidade de consequências adversas, em longo prazo, na fertilidade do solo (MOORMAN, 1989; BROMILOW et al., 1996). Entretanto, deve-se destacar que neste trabalho o crescimento microbiano em presença do diurom, foi, em geral, superior ao do sulfato de endossulfam.

Cabe destacar que o eventual desconhecimento da distribuição dos dados reforçou a necessidade e a importância da análise dos resultados desta pesquisa empregando o teste de Kruskal Wallis que mostrou diferenças significativas (5% de significância) de médias de UFCs no crescimento microbiano entre os meios de cultura (MM e CPS) no horizonte Ap, o que já era esperado em face a diferença de nutrientes dos meios, bem como evidenciou diferença não significativa no segundo horizonte (AB) no três tempos de incubação do solo (Figura 21).

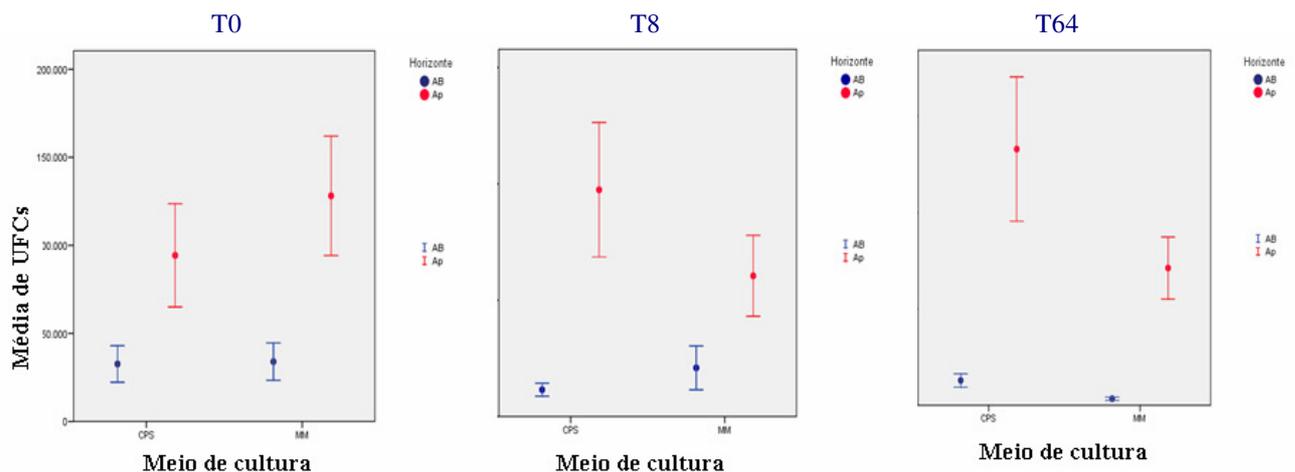


Figura 21 Média de UFCs nos meios de cultura, nos horizontes Ap e AB nos tempos de incubação do solo T0, T8 e T64.

Com relação aos diferentes tempos de incubação e diferentes contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam) e o controle, no T0 e no T64, não houve diferença significativa entre os meios de culturas utilizados. Todavia, em T8 registrou-se diferença entre os tratamentos contaminados e o controle no MM. Os meios de cultura não diferiram entre si nos tempos T0 e T8, apresentando diferença apenas no T64 para o MM (Tabela 11).

Tabela 11 Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de incubação, meio de cultura e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam).

Tratamento	MC	Tempo de incubação (Dias)		
		UFCs	UFCs	UFCs
		T0	T8	T64
Diurom	MM	48889 Aa	48028 Aa	11367 Ab*
	CPS	52139 Aa	82222 Aa	25917 Ab*
Sulfato de endossulfam	MM	75306 Aa	46889 Aa	10403 Ab*
	CPS	77722 Aa	70667 Aa	22250 Ab
	MM	119000 Aa	149300 Ba	22972 Ab*
Controle	CPS	60583 Aab	174100 Aa	39306 Ab

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa entre os tratamentos a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis

Médias seguidas de mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa entre os tempos de incubação a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis; Médias seguidas de asterisco (*) não apresentam diferença significativa entre os meios de culturas a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Ambos os valores (maior e menor) de crescimento em MM registrados foram obtidos nas amostras do horizonte Ap e AB respectivamente, sem contaminação *in vitro* (controle), independente do tempo de incubação, diferindo apenas em sua ordem de grandeza, mais elevada em T64. Diferentemente do MM, no meio CPS não foi observado um padrão de crescimento microbiano tendo os menores e os maiores valores variado entre o tempo de incubação e os tratamentos (Tabelas 12 e 13).

Tabela 12 Maiores valores obtidos do crescimento microbiano (UFCs).

Meio	Hz	Trat.	T0	T8	T64
MM	Ap	C	$1,4 \times 10^5$	$1,3 \times 10^4$	$2,6 \times 10^5$
CPS	Ap	C	-	$1,9 \times 10^6$	$4,3 \times 10^5$
CPS	Ap	D	$8,1 \times 10^5$	-	-

Trat.=tratamento

Tabela 13 Menores valores obtidos do crescimento microbiano (UFCs).

Meio	Hz	Trat.	T0	T8	T64
MM	AB	C	$3,3 \times 10$	$0,33 \times 10$	1×10^3
CPS	AB	C	$2,4 \times 10^4$	-	-
CPS	AB	S	-	4×10^4	-
CPS	AB	D	-	-	4×10^4

Trat.=tratamento

Estes resultados não surpreendem, pois diferentes condições de crescimento permitem respostas distintas de contagem, como observado no presente estudo. As diferentes condições de cultivo empregadas para quantificar o número de bactérias do solo devem-se ao fato de haver uma elevada diversidade microbiana, sendo praticamente impossível propiciar o crescimento de todos os microrganismos em uma única situação de cultivo (KENNEDY; GEWIN, 1997).

Há relatos de efeitos inibitórios sobre microrganismos em meio de cultura acrescido do pesticida glifosato (QUINN et al., 1988; GORLACH-LIRA et al., 1997), havendo também casos de estímulo ao crescimento microbiano heterotrófico (ROSLYCKY, 1982). Pampulha et al (2007) observaram que ao contaminar um solo com o herbicida glifosato-amônia, a atividade microbiana foi severamente inibida, e concluíram que a utilização deste no campo pode possibilitar efeitos deletérios nos microrganismos e em suas atividades. A toxicidade exercida pelo glifosato pode alterar a estrutura da comunidade microbiana e ocasionar uma perda na sua diversidade.

Analisando o crescimento microbiano com relação ao tempo de incubação, T0 foi igual ao T8 em quase todos os tratamentos, diferindo ambos na tendência da curva do T64 (Figura 22), ou seja, um modelo quadrático nos dois primeiros tempos e linear no T64. Contrariamente, no meio CPS-controle o tempo de incubação T0 foi significativamente igual ao T8 e T64, estes últimos diferindo apenas entre si.

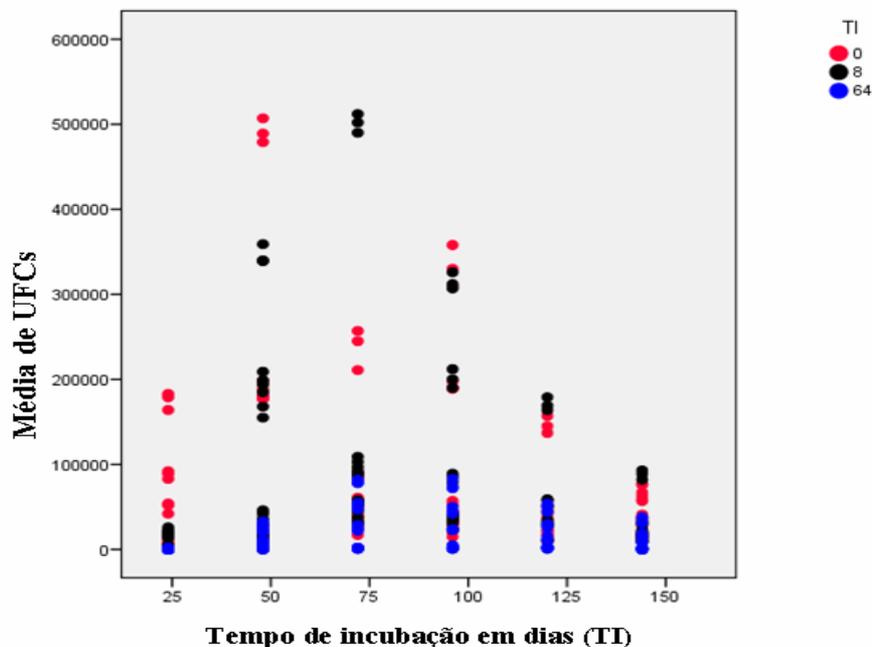


Figura 22 Relação entre número de UFCs, tempo de incubação do solo e tempo de leitura (contagem).

Em todos os tratamentos observados com o MM, o tempo de incubação das amostras T0 foi igual ao T8, diferindo apenas do T64. Já com relação aos horizontes em estudo, eles foram significativamente diferentes entre si, confirmando a influência dos nutrientes do solo para o crescimento de microrganismos edáficos.

Para o horizonte Ap nos tempos de incubação T0 e T8, entre o diurom e o sulfato de endossulfam não teve diferença significativa, ambos diferindo do controle. Entretanto, para o

horizonte AB nos tempos T0 e T8 não se detectou diferença significativa entre os tratamentos mencionados na Tabela 14.

Tabela 14 Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de incubação, horizonte do solo e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam).

MM		Tempo de incubação (Dias)		
Pesticida	Hz	UFCs	UFCs	UFCs
		0	8	64
Diurom	Ap	59639 Aa*	104800 Aa*	34533 Bab*
	A/B	41389 Aab	25472 Aa	2750 Bab
Sulfato de endossulfam	Ap	114900 Aa*	96667 Aa*	29694 Bab*
	A/B	38139 Aa	20889 Aa	2958 Bab
Controle	Ap	159200 Ab*	272400 Ab*	58250 Bb*
	A/B	20417 Ab	51028 Aa	4028 Ba

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa entre os tempos de incubação a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis; Médias seguidas de mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa entre os tratamentos a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis Médias seguidas de asterisco (*) não apresentam diferença significativa entre os horizontes a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

A contagem de UFCs diferiu ao longo do tempo de leitura entre os tratamentos como pode ser observado na Tabela 15, sendo que médias seguidas de mesma letra não difere entre si pelo teste de Kruskal-Wallis a 5%, mostrando a importância de leituras mais rigorosas e em tempo superior ao comumente descrito em literatura, ou seja, máxima de 72 horas (BARROTI; NAHAS, 2000).

Tabela 15 Teste estatístico de Kruskal-Wallis de comparação de médias de UFCs entre o tempo de leitura, meio de cultura e contaminantes (diurom e sulfato de endossulfam).

		Tempo de leitura (Horas)					
Pesticida	MC	UFCs	UFCs	UFCs	UFCs	UFCs	UFCs
		24	48	72	96	120	144
Diurom	MM	7622 Ba*	66167 Aa*	54000 Aa	37778 Aa	26167 Aa	24833 ABa
	CPS	115700 Aa	115600 Aa	39389 Aba	27667 Ba	11278 Ca	10944 Ca
Sulf. Endossulfam	MM	48056 Aab*	78444 Aa*	42722 Aab	55528 Aab	22722 Aa	17722 Aa
	CPS	105300 Aab	129900 Aab	42667 Ba	28000 Ba	16611 Ca	18833 Ca
Controle	MM	11778 Ab*	150100 Ba*	151400 Bb	159800 Bb	72722 Bb	36778 AB
	CPS	234500 Ab	90611 ABb	90611 Bb	142800 BCb	35222 CDb	7944 Db

Médias seguidas de mesma letra maiúscula não apresentam diferença significativa entre os tempos de leitura a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis; Médias seguidas de mesma letra minúscula não apresentam diferença significativa entre os tratamentos a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis Médias seguidas de asterisco (*) não apresentam diferença significativa entre os meios de cultura a 5% pelo teste de Kruskal-Wallis.

Nas quatro diluições empregadas, observou-se um padrão de crescimento de colônias, sendo maior número de UFCs nas menores diluições (10^{-3} e 10^{-4}) e menor número de UFCs nas maiores (10^{-5} e 10^{-6}), como registrado nas Figuras 23 e 24.

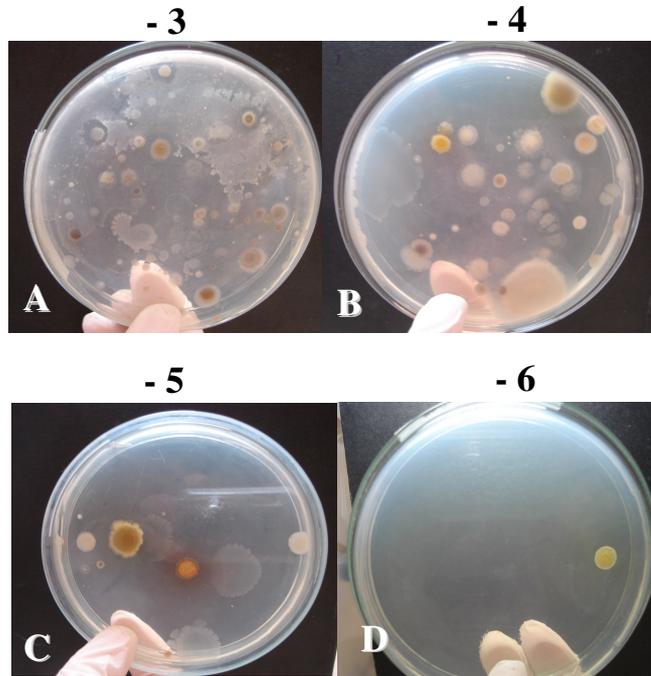


Figura 23 (A-D) Placas CPS com crescimento de 144 horas.

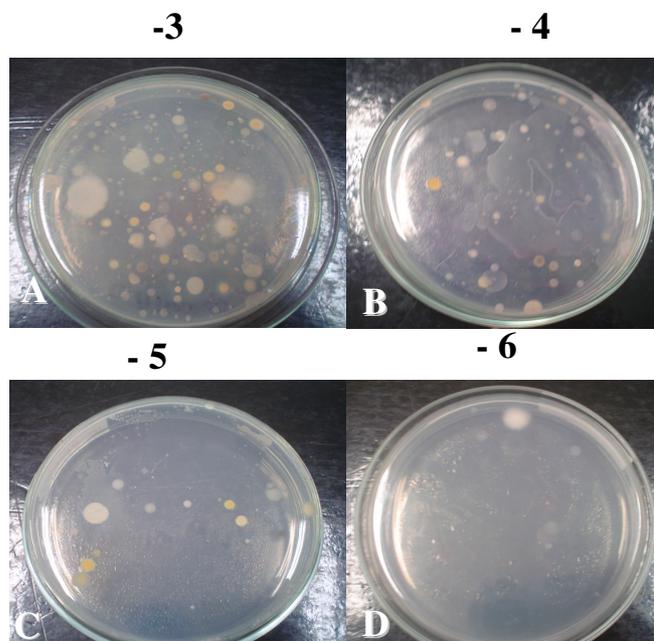


Figura 24 (A-D) Placas MM com crescimento de 144 horas

Vieira e Nahas (2000), ao quantificarem bactérias totais e esporuladas do solo utilizando diferentes meios, observaram que as contagens no meio de TSA foram superiores 1,3 a 1,6

vezes às obtidas no meio de Thorton, quando se incubou as placas à temperatura de 30°C e de 1,3 a 3,2 vezes a 25°C.

A partir do Meio Mínimo isolou-se seis cepas (Figura 25) para testar a viabilidade em caldo J.E. suplementado com diurom ou sulfato de endossulfam, dependendo do tratamento, para posterior teste de degradação empregando a cepa que apresentou melhor crescimento em cada um dos meios.

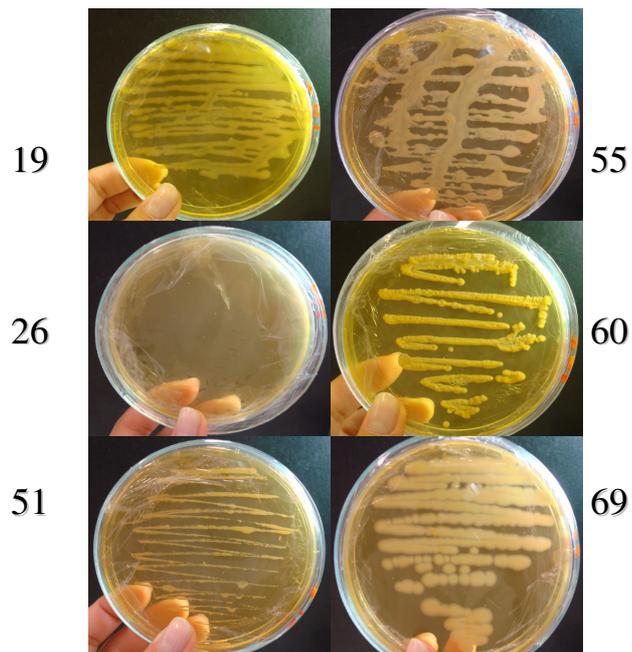


Figura 25 Cepas isoladas do MM + contaminantes

4.4 Identificação das bactérias por análise de ácidos graxos.

As bactérias sintetizam uma grande variedade de ácidos graxos, e em geral, esses ácidos graxos são constantes para uma espécie em particular. Um sistema comercial foi desenvolvido para separar ácidos graxos celulares e os comparar a perfis de ácidos graxos de organismos conhecidos (TORTORA et al. 2005).

Lançando-se mão desta tecnologia, encaminhou-se ao Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente, da Universidade Federal de Viçosa, para a identificação duas cepas, onde foi comparada a similaridade entre elas e as da biblioteca Sherlock Microbial Identification System (SASSER, 2006). A análise de ácidos graxos para

identificação tem sido utilizada extensivamente para caracterizar comunidades bacterianas de solo (RITCHIE, et al., 2000).

Empregou-se a técnica de indentificação bacteriana pela análise de ácidos graxos nas cepas isoladas 55 e 69. A cepa 55 apresentou como resultado cinco possibilidades de espécie, *Staphylococcus-saprophyticus* (IS=0,491), *Staphylococcus-arlettae* (IS=0,478), *Staphylococcus-simulans* (IS=0,452), *Staphylococcus-cohnii-cohnii* (IS=0,400), e *Staphylococcus-aureus-aureus-GC* subgroup A (IS=0,386). A cepa 69 foi identificada como *Bacillus-cereus-GC* subgroup A com um índice de similaridade IS=0,527. O IS acima de 0,300 é considerado como indicativo de identificação. No caso de mais de uma opção, a identificação mais provável é a que apresenta maior IS.

No entanto, a identificação precisa deve ser confirmada por algum teste (p. ex. bioquímico, arranjo, etc.) suficiente para discriminar entre as opções fornecidas.

Na literatura vários estudos utilizaram os ácidos graxos para identificação de bactérias, tais como a diversidade de *Pseudomonas* sp. de raízes de canola em campo (MISKO;GERMIDA, 2002); bactérias isoladas de sementes, folhas e solo de beterraba (THOMPSON et al., 1993); de bactérias endofíticas de algodão e milho e *Acetobacter diazotrophicus* endofítica de colmo de cana-de-açúcar (DONG et al., 1995).

Ndowora et al. (1996) avaliaram a composição de ácidos graxos na distinção entre linhagens de *Streptomyces* patogênicos e antagônicos produtores de antibióticos, evidenciando o sucesso desta técnica.

4.5 Análise morfo-tintorial, caracterização colonial e testes bioquímicos

As características morfológicas têm auxiliado os taxonomistas na classificação de organismos nos últimos 200 anos (TORTORA et al., 2005).

Um dos primeiros passos na identificação das bactérias é a coloração diferencial. A maioria das bactérias é gram-positiva ou gram-negativa. Essa coloração tem como base a composição química da parede celular e, portanto, não são úteis na identificação de bactérias sem parede celular ou das arqueobactérias que possuam paredes diferentes do padrão (DAHROUG, 2007).

Todas as espécies isoladas eram Gram positiva, sendo quatro com forma de bastonetes (Figura 26 A, B, E e F) e duas cocos (Figura 26 C e D).

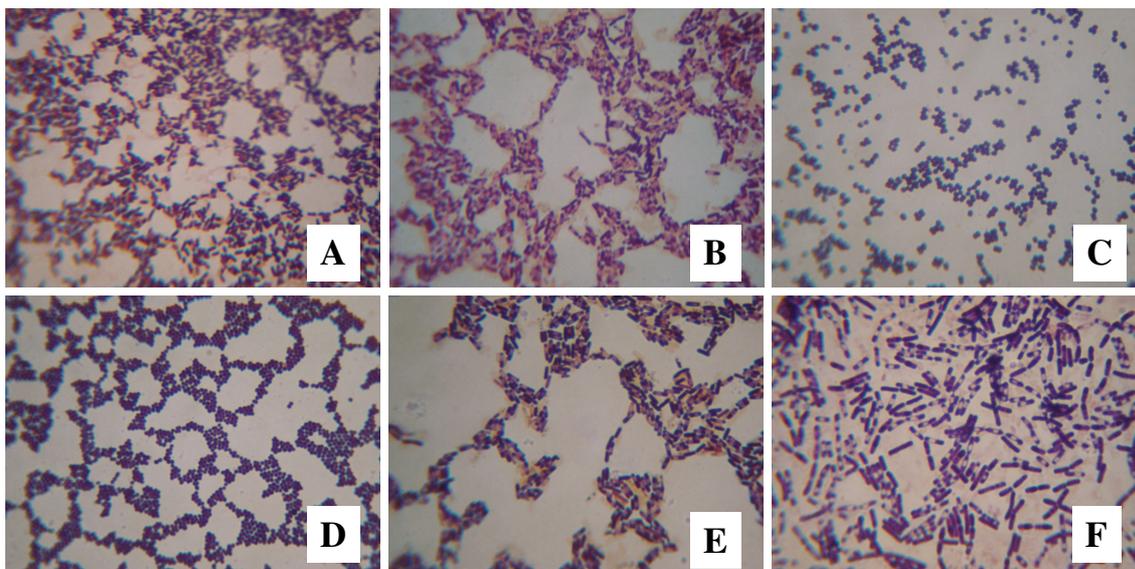


Figura 26 (A) cepa 19, (B) cepa 26, (C) cepa 51, (D) cepa 55, (E) cepa 60 e (F) cepa 69.

Algumas espécies bacterianas, em meio de cultura sólido, formam colônias. As características coloniais, são de extrema importância para a identificação das bactérias, uma vez que cada bactéria possui sua característica colonial peculiar. Destaca-se que em diferentes meios de cultura, a mesma bactéria pode se apresentar em colônias diversificadas.

As estirpes isoladas foram caracterizadas colonialmente conforme Neder (1992), evidenciando uma riqueza consideravelmente alta, como pode se observar abaixo:

Tamanhos: Grande; Média; Pequena.

Formas: Circular; Irregular; Rizóide; Filamentosa; Puntiforme.

Elevações: Côncava; Elevada; Ondulada; Protuberante; Achatada; Ondulada; Convexa.

Bordos: Liso; Lacerado; Ondulado; Lobado; Filamentoso.

Estrutura: Lisa; Granulosa; Filamentosa; Rugosa.

Brilho: Transparente; Translúcida; Opaca.

Cor: Incolor; Pigmentada (bege, branca, salmão, amarela, laranja).

Embora mais recentemente os testes bioquímicos venham sendo substituídos pelos moleculares para uma certeza maior quanto à identificação taxonômica, em alguns laboratórios ainda não há esta possibilidade, restando, assim, ao uso de provas convencionais, clássicas, que ainda nos permitem chegar com certa segurança ao nível específico. Contudo, reconhece-se a necessidade de mais testes moleculares para confirmação das espécies aqui apresentadas.

De acordo com o estudo de MANFIO (2003), o emprego de metodologias para caracterização molecular e métodos independentes-de-cultivo para o estudo de comunidades microbianas complexas no meio ambiente e para a caracterização da diversidade genética infra-específica foi identificado em apenas seis grupos de pesquisa no país, ainda em estágio de formação e consolidação de equipes.

Como muitas vezes um determinado microrganismo possui um sistema enzimático específico, promovendo transformação bioquímica específica, as provas bioquímicas podem ser utilizadas na prática para a sua caracterização (HARDOIM et al., 2006). Assim, este tipo de método possibilita interpretar as transformações metabólicas ocorridas em algumas provas bioquímicas empregadas para identificação de bactérias.

Embora mais recentemente os testes bioquímicos venham sendo substituídos pelos testes moleculares, para uma certeza maior quanto à identificação taxonômica, em alguns laboratórios ainda são utilizados para a identificação das cepas com certa segurança (HARDOIM et al., 2006).

Os testes empregados permitiram a identificação de três cepas como pertencentes ao gênero *Bacillus* de acordo com o esquema de identificação de MacFaddin (1980) que separa inicialmente as bactérias gram positivas pela forma e pela reação da catalase (+/-) além de outros testes como o requerimento de O₂, que neste caso foi aeróbico ou facultativo confirmando o gênero.

Os testes bioquímicos demonstraram prevalência de cepas catalase positiva e motilidade positiva. Todas as estirpes analisadas foram urease, malonato, DNase e indol negativas.

Por definição, fermentação é um processo metabólico de óxido-redução que ocorre em meio anaeróbico. Nas provas bioquímicas, esse processo é detectado pela observação da mudança de cor por indicadores de pH como consequência da formação de produtos ácidos. A acidificação do meio de prova pode ocorrer através da degradação de carboidratos por vias diferentes que não a fermentação, ou pode haver em alguns meios componentes diferentes de carboidratos que resultem em produtos finais ácidos.

Embora a maioria das bactérias que metabolizam carboidratos seja anaeróbia facultativa, a utilização pode nem sempre ocorrer em condições estritamente anaeróbias. As bactérias são diferenciadas pelo tipo de carboidrato que metabolizam e pelos tipos e quantidade de ácidos produzidos (TRABULSI et al., 1991).

Os testes de fermentação tiveram resultados variados entre as diferentes cepas, percebendo-se uma maioria de glicose positivas e de xylose e lactose negativas (Tabela 16).

Tabela 16 Resultados dos testes bioquímicos aplicados às cepas isoladas.

	19	26	51	55	60	69
Gram	+	+	+	+	+	+
Localiz. Esporos	C	C	-	-	C	C
Motilidade	+	+	-	-	+	+
Glicose	+	+	+	+	+	+
Xilose	-	-	+	-	-	-
Manitol	+	-	-	+	+	-
Lactose	-	-	+	-	-	-
Maltose	-	+	+	-	-	+
Dextrose	-	-	+	+	+	+
Crescimento 42°C	+	+	-	-	+	+
Slime	+	-	+	+	-	-
Hidrólise Amido	-	-	-	-	+	+
CN 6% NaCl	+	-	+	-	+	+
VP	-	-	-	-	+	-
Urease	+	+	+	+	+	+
Catalase	+	-	+	+	+	+
Indol	-	-	-	-	-	-
Citrato	-	+	+	+	+	+
TSI (Sup/Fund)	A/-	A/-	A/-	A/-	A/-	A/A

(+) reação positiva; (-) reação negativa; (A) ácido

Com esses testes foi possível identificar quatro cepas pertencentes ao gênero *Bacillus*. Sendo 19 *Bacillus pumilus*, 26 *Bacillus* sp., 60 *Bacillus subtilis* e 69 *Bacillus cereus* (Tabela 17). As espécies do gênero *Bacillus* têm ampla distribuição no ar, na água e todos os demais ambientes. As espécies de *Bacillus* podem desenvolver-se a partir de uma variedade de nichos ecológicos (KONEMAN et al. 1999).

Tabela 17 Espécies identificadas pelos testes bioquímicos.

Cepa	Espécie
19	<i>Bacillus pumilus</i>
26	<i>Bacillus</i> sp.
51	<i>Staphylococcus</i> sp.
55	<i>Staphylococcus</i> sp.
60	<i>Bacillus subtilis</i>
69	<i>Bacillus cereus</i>

4.6 Análises moleculares

Para a extração do DNA, foram escolhidas as seis cepas (19, 26, 51, 55, 60 e 69) isoladas do MM+pesticida, para estudar na próxima etapa seu potencial de biodegradação. A extração foi realizada com sucesso no Laboratório de Processos Biológicos (LPB) da USP/São Carlos (Figura 27). Todas as amostras obtiveram mais de 10.000 pares de bases indicado pelo marcador à esquerda.

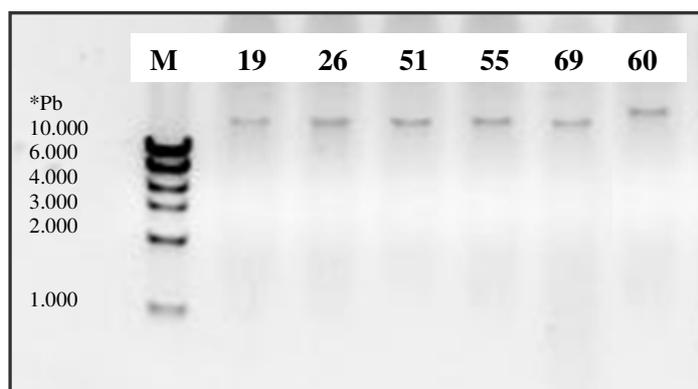


Figura 27 Extração do DNA das culturas isoladas em gel de Agarose a 1%.

*Pb: Pares de bases

Na sequência, realizou-se a reação em cadeia de polimerase (PCR), a qual multiplicou as moléculas de DNA por mais de um bilhão de vezes, grandes quantidades de genes específicos foram fornecidas para as análises de seqüências do DNA (sequenciamento). O princípio desta técnica baseia-se no tratamento da molécula de DNA em diferentes temperaturas, em ciclos repetitivos de desnaturação do DNA alvo, anelamento dos iniciadores à molécula e posterior extensão dos iniciadores pela enzima DNA polimerase (PEPPER, 1996, MADINGAN, et al., 1997, COSTA, 2001) em um aparelho chamado Termociclador.

Para a reação do sequenciamento utilizou-se o mesmo *primer* da reação do PCR (27F e 1100R). Obtendo-se 638 pb para a amostra 19, 746 pb para a 26, 752 pb para a 51, 290 pb para a 55, 645 pb para a 60 e 615 pb para a 69. A taxa de similaridade das seqüências de fragmentos de DNA das bactérias com o banco de dados do NCBI é dada a seguir (Tabela 18):

Tabela 18 Similaridade da sequência de DNA com o banco de dados NCBI

Cepa	Bactéria	Similaridade (%)
19	<i>Bacillus pumilus</i>	99
26	<i>Bacillus</i> sp.	98
51	-	-
55	-	-
60	<i>Bacillus subtilis</i>	99
69	<i>Bacillus cereus</i>	100

4.7 Escolha da cepa para o estudo de degradação em meio de cultura

Por razões técnicas selecionou-se uma cepa (69 - *Bacillus cereus*) para estudo de biodegradação sendo a que apresentou melhor crescimento mediante ambos os tratamentos (MM+diurom e MM+sulfato de endossulfam), medido o crescimento em espectrofotômetro (DO 600) no intervalo de 0 a 144 horas.

A utilização de cultura pura de linhagens bacterianas é importante para a elucidação do metabolismo microbiano, incluindo transporte para dentro da célula, liberação de enzimas extracelulares, ou ainda, os genes envolvidos na degradação (AISLABIE; LLOYD-JONES, 1995).

O estudo da degradação em laboratório pode representar um risco ao entendimento do processo metabólico, principalmente pelas condições ótimas de crescimento e pelo mínimo de interações ecológicas. Entretanto, o isolamento de cultura pura, pode servir como uma condição ideal de estudo para as bases genéticas e moleculares da degradação, como a atividade das enzimas degradadoras (ROQUE, 2000).

4.8 Teste de degradação

4.8.1 Crescimento *Bacillus cereus* em diferentes concentrações de dextrose

Diferentes concentrações de dextrose (5, 50, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram testadas com *B. cereus* (Figura 28), e acompanhado o crescimento bacteriano por densidade óptica (600 nm) ao longo de 120 dias. Tendo os tratamentos, com exceção do 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, traçados de curvas

semelhantes. Esse resultado serviu de base para a escolha das concentrações de pesticidas a serem empregados neste estudo de degradação, uma vez que grande parte da literatura utiliza diferentes concentrações para os ensaios de degradação (ROQUE; MELO, 2000; LOPEZ, et al., 2003; LEE et al. 2006).

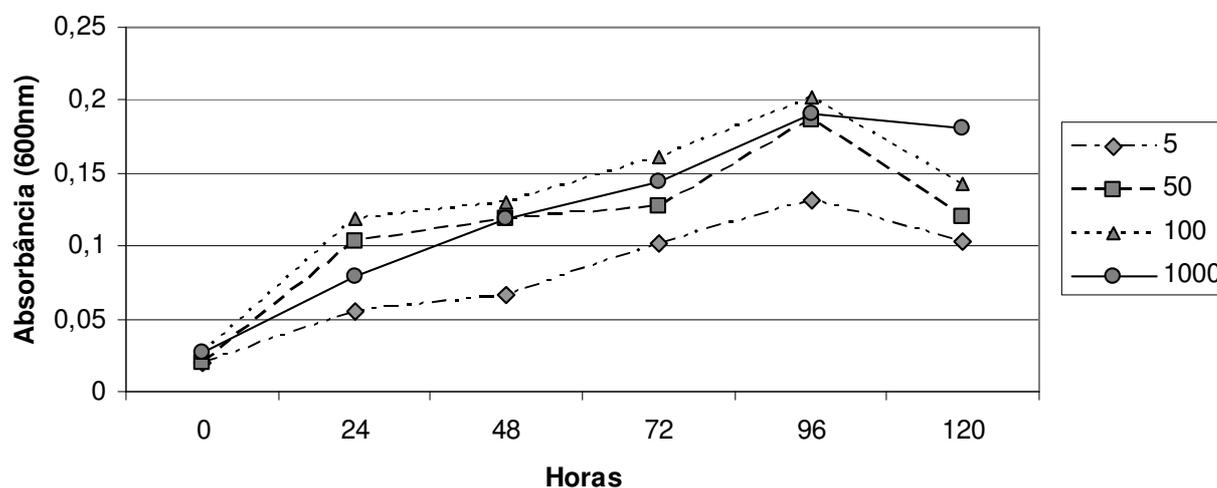


Figura 28 Crescimento de *B. cereus* em diferentes concentrações de dextrose (5, 50, 100 e 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

Zhang et al. (2009), ao estudarem a dinâmica de crescimento de *Rhodococcus* sp. (monitorado pela absorbância de 600nm), acrescentaram ao meio mineral vários suplementos de carbono (dextrose, glicose, maltose, sacarose e amido solúvel) e nitrogênio (nitrato de sódio, nitrato de amônio e sulfato de amônio), 0,5 e 1,0 g L^{-1} , respectivamente, para encontrar o efeito destes na degradação do *p*-nitrophenol (PNP). *Rhodococcus* sp. degradou 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de PNP em 12 horas. Concomitantemente, incrementou sua biomassa, de 0,051 unidades de DO a 0,348 unidades de DO. Comparado com o controle, o meio com glicose (1 g L^{-1}) apresentou o maior incremento de biomassa (0,645 unidades DO).

Diferentes concentrações de dextrose usadas por Zhang et al. (2009) reduziram o tempo requerido para a degradação completa do PNP por *Rhodococcus* sp., acelerando a taxa do seu metabolismo.

4.8.2 Degradação do diurom por *Bacillus cereus*.

O crescimento microbiano é influenciado diretamente por fatores ambientais (físicos, químicos e ou biológicos). E se traduz em manifestações fisiológicas como a capacidade de mobilizar enzimas e outros fatores que permitem a sua sobrevivência.

Neste estudo, a cinética de crescimento da bactéria mostrou melhor resultado quando a linhagem de *Bacillus cereus* foi cultivada na maior concentração do pesticida ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Esse resultado sugere que há um estímulo para produção enzimática nas maiores concentrações, semelhante ao obtido por Zhang et al. (2009) ao submeterem *Rhodococcus* sp. a diversas concentrações de diferentes suplementos.

O crescimento de *Bacillus cereus* no meio menos concentrado ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) observado na Tabela 19, mostrou-se baixo quando comparado com outros estudos (KUMAR et al, 2007; LEE et al., 2006). Mostrando, talvez, a necessidade de um terceiro tratamento (diurom+outra fonte de carbono) elevando, assim, a disponibilidade de fontes de carbono, ou ainda, aumentando a concentração a ser utilizada, conforme evidenciado no tratamento $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 20).

Em ambos os tratamentos observou-se um crescimento exponencial bem acentuado até 48 horas e um decréscimo a partir de 144 horas. Nas Figuras 30 e 31 observa-se uma mesma tendência no comportamento da curva embora em intensidades diversas. Bazot et al. (2007) observaram o contrário, um atraso no crescimento (DO a 600 nm) de *Arthrobacter* sp. em meio contendo diurom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$) e o atribuíram a sua toxicidade. Entretanto, *Delfitia acidovorans* foi menos afetada quando testada nas mesmas condições anteriores. Estes autores encontraram um crescimento (DO a 600 nm) significativo de *Pseudomonas* sp. em meio suplementado com os pesticidas glifosato ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$) e diurom ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$), revelando que essa mistura estimulou significativamente o crescimento das células comparado com o meio livre de herbicida.

Cabe destacar que o crescimento evidenciado não esteve relacionado com o consumo equivalente de pesticida, cuja concentração foi de aproximadamente $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ nos primeiros intervalos de tempo. A análise microscópica das células evidenciou uma elevada presença de endósporos (Figura 29) que nos permite inferir que essas bactérias devem possuir reserva nutricional suficiente para mantê-las neste período, viabilizando sua sobrevivência.

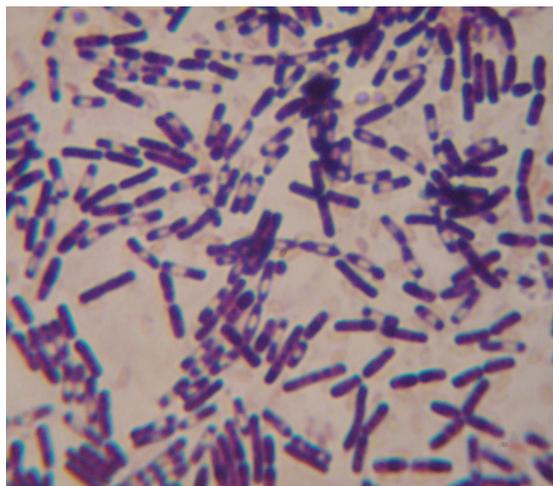


Figura 29 Presença acentuada de endósporos em *Bacillus cereus*.

Estudos de dinâmica de crescimento bacteriano com outras espécies e/ou substâncias têm sido conduzidos por diferentes autores. Lenz e Marchessault (2005) relatam que um poliéster natural foi descoberto por Maurice Lemoigne, na década de 20, enquanto tentava descobrir a causa da acidificação de uma suspensão aquosa contendo *Bacillus megaterium*. Este poliéster é sintetizado por alguns microrganismos como reserva de carbono e energia, o que aumenta a chance de sobrevivência dos microrganismos em um ambiente com escassez de nutrientes (LOPEZ et al., 1997).

Mccool et al. (1996) ao estudarem a dinâmica de crescimento de *Bacillus megaterium* em meio mínimo e meio rico pela análise dos grânulos, verificaram, que durante a fase lag ou de adaptação, os corpos de inclusão diminuía rapidamente em tamanho e número por células, possivelmente por elas estarem utilizando essa reserva como fonte de energia para adaptar-se melhor ao novo meio, como se suspeita que tenha ocorrido neste estudo.

Os resultados deste estudo de biodegradação do diurom pela espécie *Bacillus cereus* isolada do solo agrícola em estudo são apresentados nas Tabelas 19 e 20. A degradação do herbicida diurom foi maior no ensaio de concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 31) quando comparado com o de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e com o controle (Figura 30), apresentando uma degradação de aproximadamente 54%, no meio mais concentrado, contra 47,9% no menos concentrado.

Para que ocorra a degradação por bactérias do solo é necessário que enzimas intracelulares e principalmente extracelulares estejam envolvidas. Essas enzimas precisam de uma condição ótima que favoreça a reação enzimática (ROQUE, 2000).

Tabela 19 Crescimento (DO 600) de *Bacillus cereus* em MM (5 µg mL⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	144h	192h	226h	394h
DO (nm)	0,008	0,012	0,030	0,037	0,038	0,041	0,043	0,037	0,026	0,021
DO (nm) cont	0,007	0,009	0,007	0,008	0,008	0,009	0,010	0,010	0,010	0,011
D.P. DO	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,001
[diurom]	5,622	5,571	5,517	5,446	4,941	4,682	3,724	2,928	2,547	2,378
[diurom] cont	5,232	5,774	5,299	5,153	5,186	5,117	5,108	5,660	5,122	5,122
D.P. [diurom]	0,444	0,258	0,394	0,382	0,747	0,687	0,228	0,203	0,706	0,378

DO = densidade óptica

Nm = nanômetro

[diurom] = meio mínimo suplementado com 5 µg mL⁻¹ - concentração de diurom ao longo do tempo

D.P. = desvio padrão

cont. = controle

Tabela 20 Crescimento (DO 600) de *Bacillus cereus* em MM (50 µg mL⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	144h	192h	226h	394h
DO (nm)	0,013	0,020	0,057	0,080	0,087	0,087	0,087	0,079	0,059	0,039
DO (nm) cont	0,012	0,013	0,015	0,017	0,015	0,016	0,017	0,015	0,016	0,015
[diurom]	49,895	48,146	42,630	41,276	40,342	29,290	26,129	22,971	15,696	15,176
[diurom] cont.	51,087	50,893	49,010	50,410	51,384	50,661	49,912	49,411	50,148	50,148
D.P. DO	0,002	0,001	0,002	0,002	0,002	0,001	0,002	0,004	0,002	0,001
D.P. [diurom]	1,415	1,776	1,477	1,226	0,782	0,659	0,926	0,575	0,836	1,171

DO = densidade óptica

Nm = nanômetro

[diurom] = meio mínimo suplementado com 50 µg mL⁻¹ - concentração de diurom ao longo do tempo

D.P. = desvio padrão

cont. = controle

A biodegradação do diurom e a avaliação do crescimento para o fungo *Rhizoctonia solani* foi obtida por Vroumsia et al. (1996). Os autores observaram que o tempo de estabilização do crescimento foi de 120 horas, semelhante ao encontrado no trabalho de Roque e Melo (2000) para as linhagens bacterianas EMBRAPA-CNPMA D11-9, D12-12, D12-14, D12-18 e D16-12. A presença de uma fonte de carbono mais facilmente disponível, não alterou a fase inicial de crescimento.

Lópes et al. (2005) estudaram o potencial de degradação da atrazina por *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; do lindano, simazina e dimetoato por *Bacillus* sp.; a capacidade de

Micrococcus luteus foi testada em meio com methylparathion e a biodegradação do herbicida simazine foi testada com *Exiguobacterium aurantiacum*.

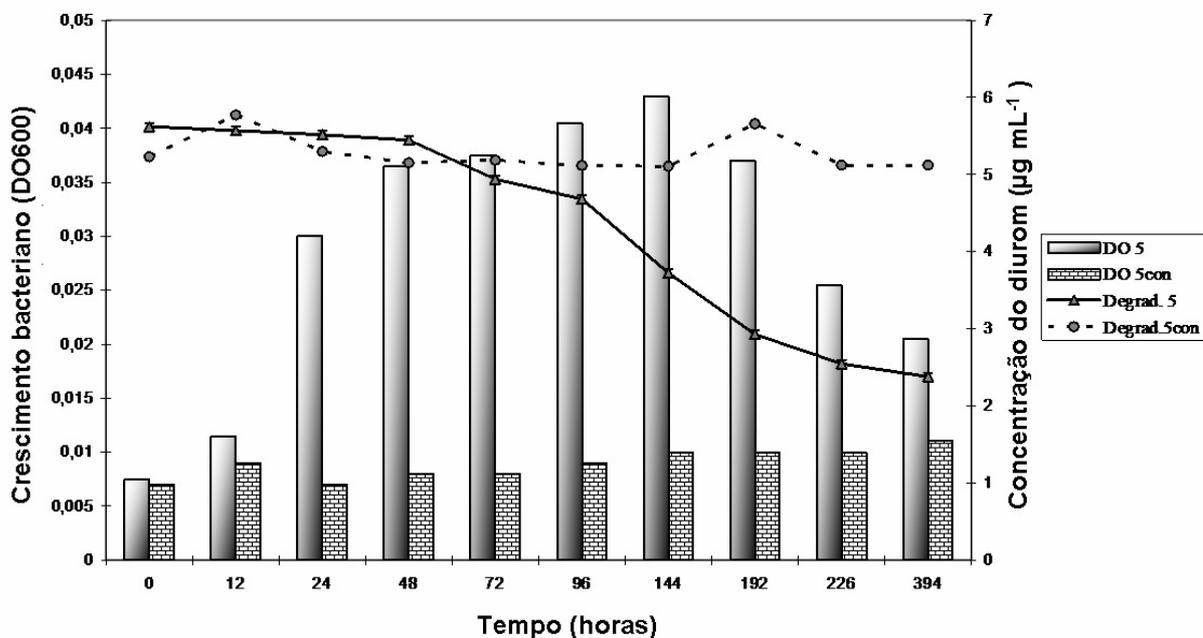


Figura 30 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM (5 µg mL⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.

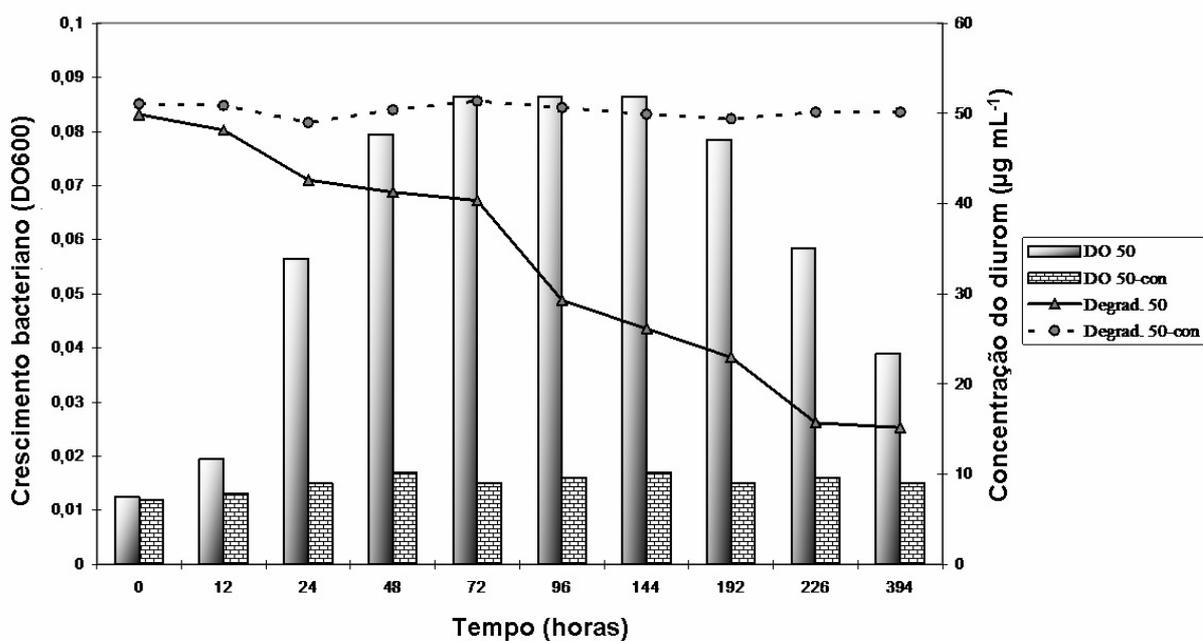


Figura 31 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM (50 µg mL⁻¹) de diurom e sua degradação em 394 horas.

O papel dos microrganismos na acumulação de pesticidas não é totalmente conhecido. Alguns microrganismos têm sido descritos com capacidade de acumular concentrações altas de inseticidas. Por exemplo, três espécies, sendo uma de fungo e duas de bactérias diferiram marcadamente na habilidade para bioconcentrar DDT e dieldrim de água destilada. Depois de 4 horas de incubação o fungo acumulou 83% do DDT e 75% do dieldrim (CHACKO et al., 1967).

Neste trabalho, como em relatos na literatura, parte do pesticida estudado ficou retida nas células bacterianas, comprovado por este estudo ou ainda, pode ter havido transporte passivo do pesticida para dentro da célula. Todavia, cabe ressaltar que a diferença entre a degradação aparente do pesticida e a sua degradação real é o valor da concentração retida pelas bactérias presentes em 10 mL de meio após a extração com o acetato de etila (Tabela 21).

Tabela 21 Concentrações de diurom retida nas células de *B. cereus* (em 10 mL de meio), registradas em replicatas de MM, suas médias se desvios padrões.

Cepa	[Diurom] ($\mu\text{g } 10\text{mL}^{-1}$)
5I	0,698
5II	0,401
Média [5]	0,549
D.P.[5]	0,210
50I	8,986
50II	6,471
Média [50]	7,729
DP[50]	1,779

5I - 1ª réplica do MM suplementado com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

5II - 2ª réplica do MM suplementado com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$

D.P.- Desvio padrão das réplicas

50I - 1ª réplica do MM suplementado com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$

Johnson e Kennedy (1973) observaram que a acumulação do DDT e do metoxicloro por células autoclavadas de *Aerobacter aerogenes* foi maior que por células vivas da bactéria. Eles sugeriram que a polaridade molecular e a solubilidade lipídica influenciam na acumulação de inseticidas em células de *A. aerogenes*. Uma conclusão similar foi descrita em estudos com *A. aerogenes*, *B. subtilis*, e *Saccharomyces cerevisiae*, onde a capacidade de acumulação nos organismos aumentava depois de fervidos (JONES et al., 1963; WARE et al., 1970).

Foi reportado em vários estudos que não apenas células microbianas vivas, mas células autoclavadas mostraram capacidade de acumular (uptakes) pesticidas, sendo estas últimas por transporte passivo (GRAY, 1954; RICE, 1973; CANTON et al., 1977; PAIS et al, 1977) que, aparentemente, indica que o fator metabolismo não está totalmente, ou sempre, envolvido no processo de acumulação (LAL; SAXENA, 1966).

Pode-se constatar, neste estudo, que havia presença do pesticida nas células bacterianas que, certamente, interfere nos cálculos de degradação do pesticida, sugerindo-se dessa forma, que os autores devam considerar esta variável no cálculo de degradação real (Tabela 22).

Tabela 22 Concentrações do diurom ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos processos de degradação real e aparente por *Bacillus cereus*.

	Tempo 0h	Tempo 394h	(0h-394h)	Parede	(0h-394h)-Parede	% degrad. Aparente	% degrad. Real
[5]-I	5,309	2,645	2,664	0,698	1,966	50,175	37,034
[5] II	5,936	2,110	3,826	0,401	3,424	64,449	57,689
MÉDIA	5,622	2,378	3,245	0,549	2,695	57,710	47,938
[5] con	5,232	5,122	0,110	-	-	2,095	-
[50] I	50,895	14,347	36,548	8,986	27,561	71,810	54,153
[50] II	48,894	16,004	32,890	6,471	26,419	67,268	54,033
MÉDIA	49,895	15,176	34,719	7,729	26,990	69,584	54,094
[50] con	51,087	50,148	0,939	-	-	1,839	-

[5] I-1^a replicata com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom; [5] II-2^a replicata com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom; [5] con - controle com $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom sem o inoculo; [50] con-controle com $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de diurom sem o inoculo.

O maior percentual de retenção do diurom em células de *Bacillus cereus* foi observado na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que 15,49% do pesticida não foi necessariamente degradado, mas incorporado às suas células. Já na menor concentração de estudo ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a porcentagem foi de 9,77% de retenção (Tabela 23).

Tabela 23 Porcentagem de retenção do diurom nas células de *Bacillus cereus*.

Replicata	% Retenção
[5]-I	13,141
[5]-II	6,760
Média [5]	9,773
[50]-I	17,657
[50]-II	13,235
Média [50]	15,490

5I - 1ª réplica do MM suplementado com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do diurom

5II - 2ª réplica do MM suplementado com 5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do diurom

50I - 1ª réplica do MM suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do diurom

50II - 2ª réplica do MM suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do diurom

As enzimas extracelulares são as mais importantes na biodegradação de macromoléculas orgânicas no solo. No entanto, apresentam baixa eficiência catalítica por sofrer grande influência do “microambiente microbiano”, (aproximadamente 8 μm^2) e por estarem circundados por um filme d’água, argila e colóides orgânicos, cátions inorgânicos e ânions repulsados (BURNS, 1986).

4.8.3 Degradação do sulfato de endossulfam por *Bacillus cereus*.

De acordo com estudos anteriores, a degradação do endossulfam por microrganismos do solo é de dois tipos: endossulfam convertido em sulfato de endossulfam por oxidação ou em endossulfam diol por hidrólise (SHIVARAMAIAH; KENNEDY, 2008).

Este estudo da cinética de crescimento da bactéria no meio contendo sulfato de endossulfam como única fonte de carbono mostrou melhor resultado quando a linhagem de *Bacillus cereus* foi cultivada na maior concentração do pesticida (33 $\mu\text{g mL}^{-1}$), semelhante ao ocorrido no tratamento anterior com o diurom (Tabelas 19 e 20).

Os resultados do estudo de biodegradação do sulfato de endossulfam pela espécie *Bacillus cereus* isolada de solo agrícola são apresentados nas Tabelas 24 e 25. A degradação

do metabólito, diferentemente do tratamento com diurom, foi maior no ensaio de concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ quando comparado com o de $33 \mu\text{g mL}^{-1}$. Apresentando uma degradação de aproximadamente 22,6%, no meio menos concentrado, contra 15,6% no mais concentrado.

A porcentagem de degradação observada no presente estudo foi inferior ao de Lee et al. (2006) que isolaram *Pseudomonas* sp. de meio mineral enriquecido com sulfato de endossulfam como única fonte de carbono. A taxa de degradação para endossulfam e sulfato de endossulfam foi 52% e 71%, respectivamente. O resultado sugere que *Pseudomonas* sp. tem potencial como biocatalizadora para usos em processos de bioremediação daquele metabólito.

O tratamento com diurom proporcionou uma taxa de degradação superior se comparada com a do sulfato de endossulfam. Shivaramaiah e Kennedy (2008), ao estudarem a degradação de sulfato de endossulfam por bactéria, revelaram que este metabólito é o produto final da oxidação. Seus resultados sugeriram que a formação do sulfato de endossulfam é devido à oxidação direta do composto principal e que ele não seria hidrolisado. O sulfato de endossulfam não foi degradado, assim, a bactéria que estes autores estudaram não foi eficiente na produção de outros metabólitos como endossulfam éter, endossulfam hidroxietéer e endossulfam lactone, por exemplo.

Tabela 24 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM suplementado com sulfato de endossulfam ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) e sua degradação em 394 horas.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	144h	192h	226h	394h
DO (nm)	0,009	0,018	0,045	0,199	0,155	0,143	0,141	0,136	0,102	0,098
DO (nm) cont.	0,008	0,010	0,010	0,011	0,010	0,009	0,010	0,009	0,010	0,011
D.P.	0,001	0,001	0,014	0,001	0,003	0,004	0,012	0,005	0,004	0,008
[sulfato] ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,630	2,840	2,795	2,780	2,750	2,740	2,620	2,565	2,475	2,415
[sulfato]cont. ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	3,300	3,700	3,340	3,500	3,110	3,040	3,310	3,230	3,220	3,160
D.P.	0,127	0,127	0,148	0,141	0,212	0,410	0,177	0,092	0,071	0,064

DO = densidade óptica

[sulfato] = meio mínimo suplementado com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração de s. de endossulfam ao longo do tempo)

D.P. = desvio padrão

cont. = controle

Tabela 25 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.

	0h	12h	24h	48h	72h	96h	144h	192h	226h	394h
DO (nm)	0,2035	0,2305	0,2495	0,2685	0,284	0,3027	0,3125	0,3025	0,3005	0,2998
DO (nm) cont.	0,230	0,246	0,240	0,230	0,210	0,220	0,240	0,230	0,240	0,220
D.P.	0,002	0,004	0,005	0,005	0,010	0,001	0,008	0,006	0,006	0,002
[sulfato] (μgmL^{-1})	31,890	26,845	26,375	23,325	22,355	21,475	21,647	21,080	20,980	20,830
[sulfato]cont. (μgmL^{-1})	31,890	26,845	26,375	23,325	22,355	21,475	21,647	21,080	20,980	20,830
D.P.	0,297	0,219	1,379	2,157	2,157	1,945	0,573	1,103	0,354	1,202

DO = densidade óptica

[sulfato] = meio mínimo suplementado com $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ - concentração de s. de endossulfam ao longo do tempo

D.P. = desvio padrão

cont. = controle

Em estudos de biodegradação realizados por Steinle (1998), Kim (2002) e Eker (2005), foi constatado que a degradabilidade de alguns pesticidas depende do número e posição dos halogênios presentes nos anéis aromáticos e, que altas concentrações de pesticidas podem inibir o crescimento microbiano. Neste caso, existem quatro átomos de cloro no anel benzênico do sulfato de endossulfam, o que pode ter dificultado o seu uso por *Bacillus cereus*, sendo necessários, entretanto, estudos mais detalhados.

No primeiro tratamento ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) observou-se um crescimento exponencial bem acentuado até 48 horas seguido de decréscimo, comportamento semelhante ao diurom na mesma concentração (Figura 32). Como pode-se observar na Figura 33 o segundo tratamento ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou um ritmo menos acentuado e com um pico mais tardio (144 horas).

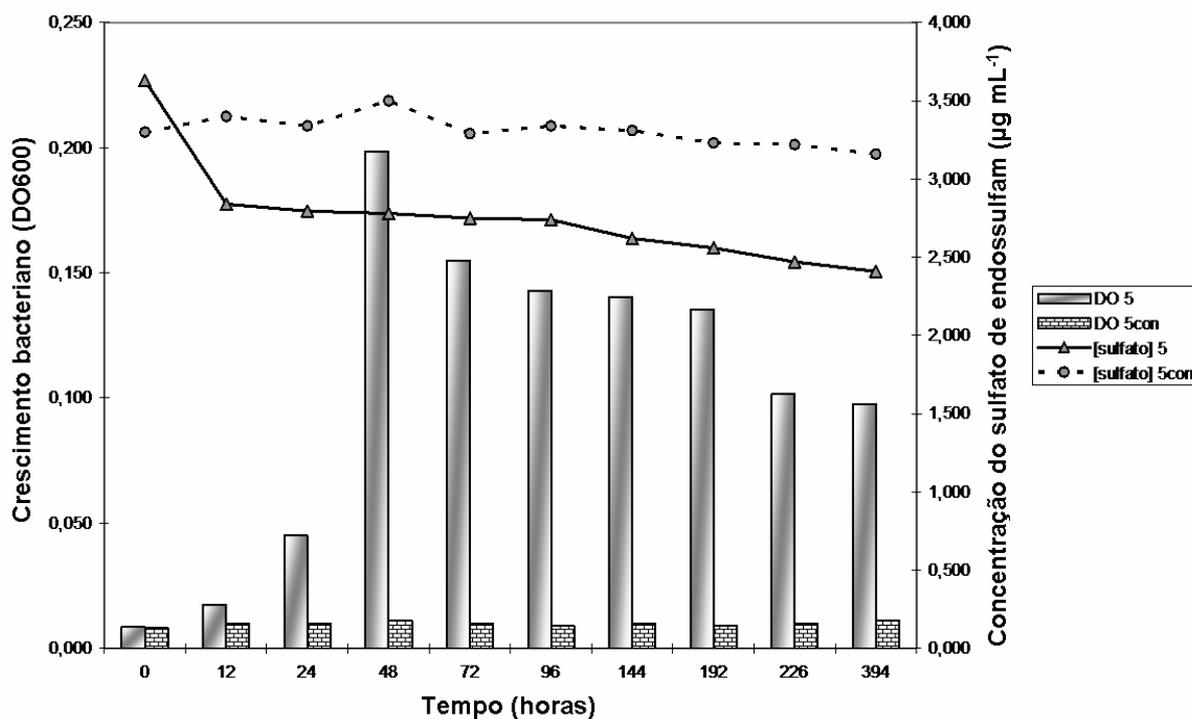


Figura 32 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.

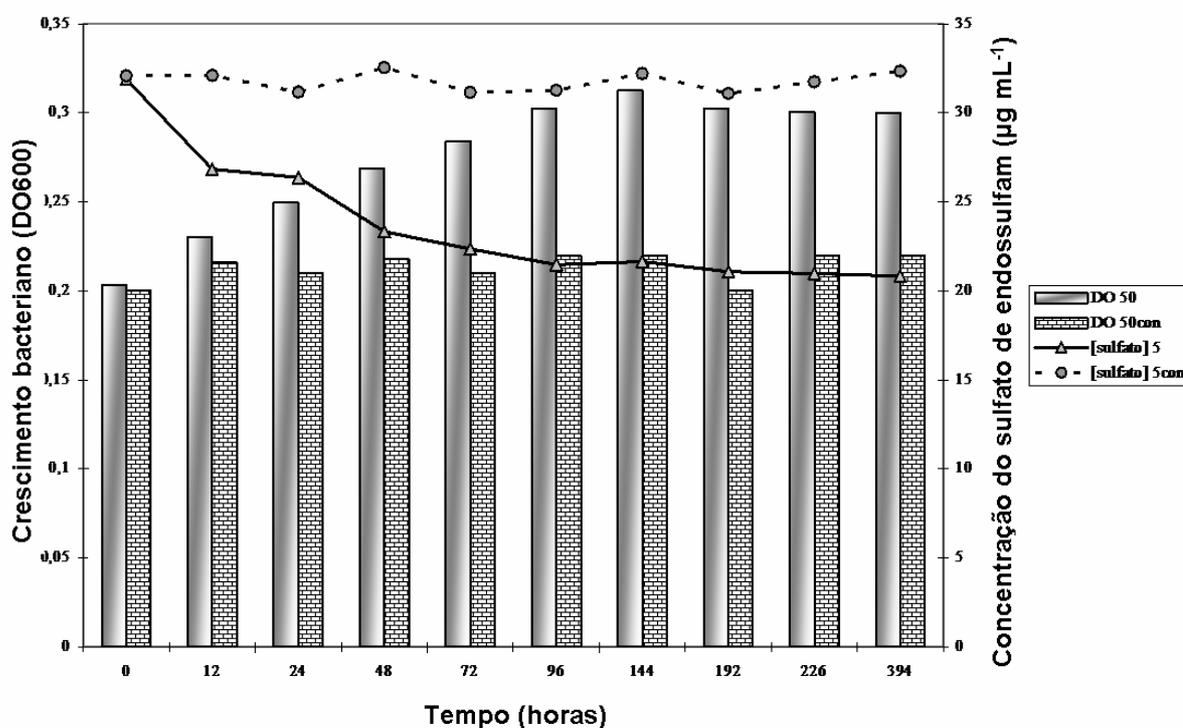


Figura 33 Crescimento de *Bacillus cereus* em MM ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$) de sulfato de endossulfam e sua degradação em 394 horas.

Assim como ocorreu no ensaio com o diurom, parte do pesticida estudado ficou retido na célula de *Bacillus cereus*. Entretanto, cabe ressaltar que a diferença entre a degradação aparente do sulfato de endossulfam e a sua degradação real é o valor da concentração retida pela bactéria após a lavagem com o solvente orgânico acetato de etila (Tabela 26), sendo que a extração do metabólito foi feita da mesma maneira com o diurom, a partir do *pellet* da bactéria decantada após centrifugação.

Tabela 26 Concentrações do sulfato de endossulfam retida nas células de *B. cereus* (em 10 mL de meio), registradas em replicatas de MM, suas médias se desvios padrões.

Replicata	[Sulfato de endos.] ($\mu\text{g } 10 \text{ mL}^{-1}$)
3I	0,93
3II	1,03
Média [3]	0,98
DP[3]	0,07
33I	5,31
33II	6,85
Média [33]	6,08
DP[33]	1,089

3I - 1ª réplica do MM suplementado com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

3II - 2ª réplica do MM suplementado com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

D.P.- Desvio padrão das réplicas

33I - 1ª réplica do MM suplementado com $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

A espécie *B. cereus* pode ser considerada uma espécie de capacidade degradativa média para este xenobiótico, com uma taxa de degradação variando entre 48,5 a 43,6%. No trabalho realizado por Wang et al. (2008), os autores testaram várias espécies do gênero *Bacillus* que exibiram diferentes taxas de degradação em diferentes temperaturas e concentrações do pesticida metolacloro. A espécie que apresentou o melhor resultado na degradação foi o *Bacillus thuringiensis* (63,4%).

Martins et al. (2007) ao estudarem a degradação do S-metolacloro por *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* constataram 99% de degradação mostrando uma alta eficiência dessa estirpe.

Enquanto muitos microrganismos têm mostrado capacidade de metabolizar o endossulfam em sulfato de endossulfam por oxidação, o endossulfam diol e outros metabólitos, por hidrólise, têm sido também, encontrados como produtos da degradação do endossulfam. Miles e Moy (1979) propuseram um caminho onde endossulfam é convertido em sulfato de endossulfam tão bem quanto endossulfam diol, endossulfam éter, endossulfam hidroxiéter e endossulfam lactone.

A formação desses metabólitos foi confirmada, também, por Katayma e Matsumura (1993) e Kullman e Matsumura (1996) trabalhando com fungos. Entretanto, Awasthi et al. (1997) reportaram a degradação aeróbica do endossulfam por uma co-cultura sem a formação de metabólitos. Katayma e Matsumura (1993) mostraram que a cultura de *Trichoderma harzianum* foi capaz de produzir endossulfam diol como principal metabólito. Eles sugeriram que a enzima hidrolítica sulfatase é responsável pela formação indireta de endossulfam diol pela hidrólise do sulfato de endossulfam.

Pôde-se observar neste estudo que houve retenção celular do pesticida o que indica que a degradação inicialmente calculada é apenas aparente (Tabela 27).

Tabela 27 Concentrações do sulfato de endossulfam ($\mu\text{g mL}^{-1}$) nos processos de degradação real e aparente por *Bacillus cereus*.

	Tempo 0h	Tempo 394h	(0h-394h)	Parede	(0h-394h)-Parede	% degrad. Aparente	% degrad. Real
[3]-I	3,54	2,36	1,180	0,93	0,250	33,333	24,001
[3]-II	3,72	2,46	1,260	1,03	0,230	33,871	21,237
Média [3]	3,63	2,41	1,220	0,98	0,240	33,609	22,590
[3]-con	3,3	3,16	0,140	-	-	4,242	-
[33]-I	32,1	20	12,100	5,31	6,790	37,695	21,153
[33]-II	31,7	22	9,900	6,85	3,050	31,230	9,621
Média [33]	31,9	20,83	11,070	6,080	4,990	34,702	15,643
[33]-con	32,09	32	0,090	-	-	0,280	-

[3] I-1^a replicata com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam; [3] II-2^a replicata com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam; [3] con - controle com $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam sem o inóculo; [33] – con controle com $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam sem o inóculo.

O maior percentual de presença do metabólito sulfato de endossulfam em *Bacillus cereus* foi observado na concentração $33 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que 19,06% não foi necessariamente degradado, mas, incorporado à célula. Já na menor concentração de estudo ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) a porcentagem de retenção foi de 11,01% (Tabela 28).

ROBERTS *et al.* (1993) sugeriram que a quebra da estrutura do anel, por ser mais resistente à degradação, ocorre lentamente, dificultando, talvez, a ação da bactéria na mineralização do sulfato de endossulfam.

Tabela 28 Porcentagem de retenção do sulfato de endossulfam por *Bacillus cereus*.

Réplica	% Retenção
[3]I	9,322
[3]II	12,634
Média [3]	11,019
[33]I	16,542
[33]II	21,609
Média [33]	19,060

3I - 1ª réplica do MM suplementado com 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

3II - 2ª réplica do MM suplementado com 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

33I - 1ª réplica do MM suplementado com 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

33II - 2ª réplica do MM suplementado com 33 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfato de endossulfam

Anhalt *et al.* (2007) utilizaram imidacloprid como o composto a ser degradado por bactérias e relatam haver uma relação entre a degradabilidade e a quantidade de carbono orgânico presente no ambiente. O mesmo estudo demonstra que houve uma maior degradabilidade do pesticida quando foram adicionadas novas fontes de carbono, chegando a uma degradação de até 58% em um período de 14 dias, utilizando consórcio de microrganismos, contendo inclusive fungos e bactérias.

Este relato mostra a necessidade de outros tratamentos, tanto associando fontes diversas de carbono como consórcios microbianos, como no trabalho de Xu *et al.* (2006) que isolaram *Pseudomonas oleovorans* capaz de degradar acetochlor, mas esta bactéria não transformou o pesticida eficientemente. Resultados de muitos estudos sustentam a hipótese de que o maior potencial genético para a biodegradação vem das comunidades microbianas atuando simbioticamente ao invés de organismos isolados (LIU *et al.* 1989; SUN *et al.*, 1990).

Hussain, *et al.* (2007) ao estudarem degradação de pesticidas por culturas puras revelaram que *Staphylococcus sp.* utilizou mais beta endossulfam comparado como o alfa endossulfam, enquanto que *Bacillus circulans*-I e *Bacillus circulans*-II utilizaram mais o alfa endossulfam se comparado com o beta endossulfam.

Verificou-se que a adição de Tween 80 (0,1 g L^{-1}) em experimento de degradação de pesticidas pode emulsificar o endossulfam, acarretando um incremento deste composto em

contato com as bactérias do solo. Surfactantes, também em baixas concentrações, podem aumentar as taxas de biodegradação de certos xenobióticos no solo (HAIGH; ALCOCK, 1996).

4.8.4 Regressão em função do tempo

A escolha dos modelos para análise dos dados de concentração do diurom e do sulfato de endossulfam em função do tempo foi baseada nas suas significâncias e nos coeficientes de determinação. Os símbolos representam os dados experimentais e as linhas, as equações obtidas por análise de regressão.

Na interação entre *Bacillus cereus* e diurom, no ensaio de degradação, observou-se que regressão exponencial foi a que melhor se ajustou aos dados observados, cujos modelos são expressos pelas fórmulas (Figuras 34 e 36):

(1) Modelo de regressão exponencial para o ensaio de concentração $5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

$$*E(Yt) = 5,804 \times e^{-0,003t} \quad R^2 = 0,864; \rho < 0,001$$

(2) Modelo de regressão exponencial para o ensaio de concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$.

$$*E(Yt) = 46,112 \times e^{-0,003t} \quad R^2 = 0,872; \rho < 0,001$$

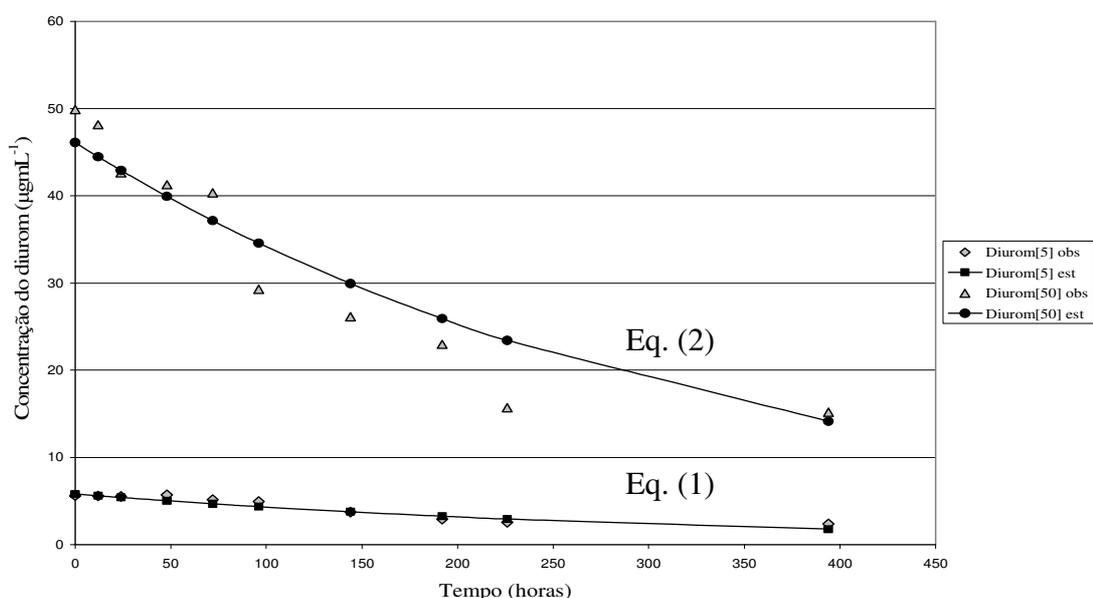


Figura 34 Relação entre a degradação do diurom por *Bacillus cereus* no tempo.

Na interação entre *Bacillus cereus* e sulfato de endossulfam, modelo que melhor se ajustou aos dados observados foi, também, a regressão exponencial, cujos modelos ajustados são expressos pelas fórmulas (Figura 55):

(3) Modelo de regressão exponencial para o ensaio de concentração $3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

$$*E(Y_t) = 2,912 \times e^{-0,001t} \quad R^2=0,539; \rho=0,009$$

(4) Modelo de regressão exponencial para o ensaio de concentração $33 \mu\text{g mL}^{-1}$.

$$*E(Y_t) = 25,970 \times e^{-0,001t} \quad R^2=0,442; \rho=0,001$$

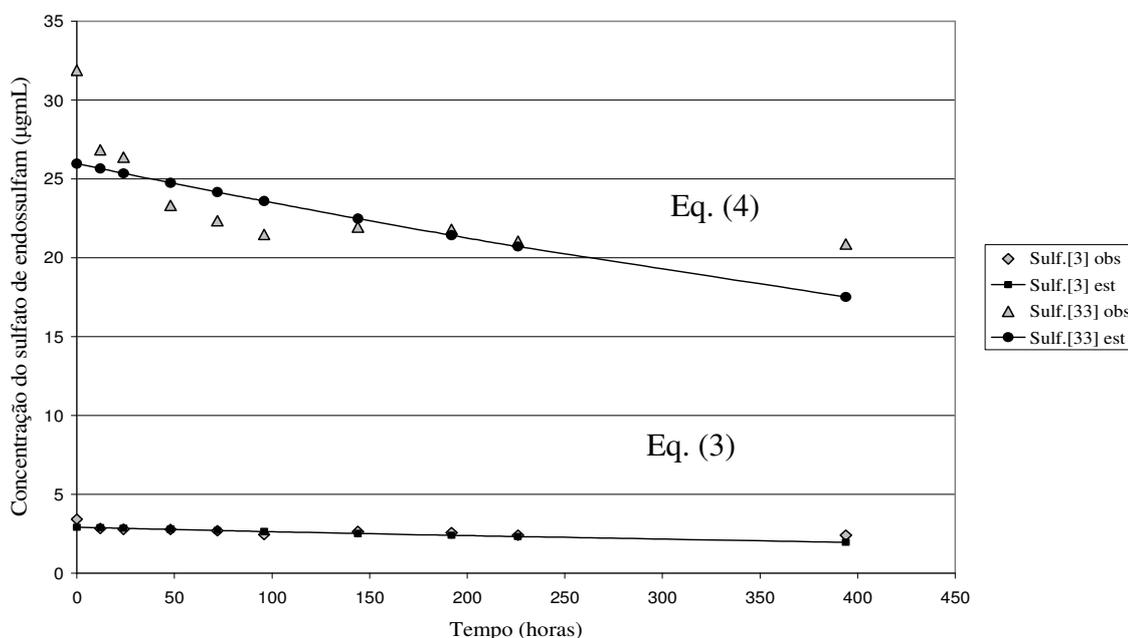


Figura 35 Relação entre a degradação do sulfato de endossulfam por *Bacillus cereus* no tempo.

O resultado dos ajustes mostrou uma relação significativa das variáveis: diurom em função do tempo, sendo que o primeiro decai à medida que aumenta o segundo em ambos os modelos. Para o sulfato de endossulfam, o modelo gerado apresenta-se com menor inclinação quando comparado com o diurom, indicando menor eficiência de degradação.

Para a análise de crescimento bacteriano (DO) de *Bacillus cereus*, o modelo de regressão objetivou traçar curvas de crescimento bacteriano durante o período de avaliação para os diferentes tratamentos avaliados. Embora tenha se detectado um valor baixo do

coeficiente de determinação, o modelo que melhor explica a tendência do crescimento bacteriano medido por DO600 é o modelo de regressão quadrático (Figura 36), semelhante à curva padrão de crescimento bacteriano, com as fases de adaptação, exponencial, de estabilização e declínio do crescimento da cultura.

Todavia, o crescimento bacteriano no meio com sulfato de endossulfam na concentração $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou um modelo cúbico de regressão (Figura 37), que indica uma oscilação inicial na curva de crescimento, provavelmente numa tentativa de adaptação celular à condição cultural até evidenciar uma estabilização.

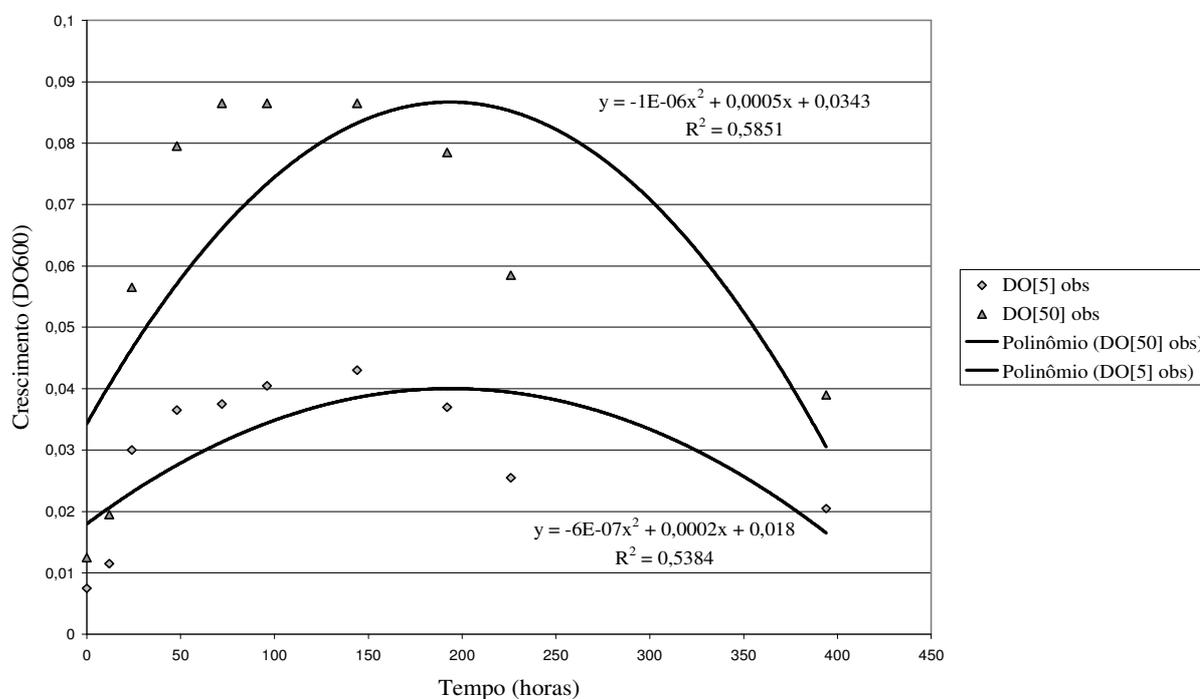


Figura 36 Relação entre o crescimento de *Bacillus cereus* em MM+diurom no tempo.

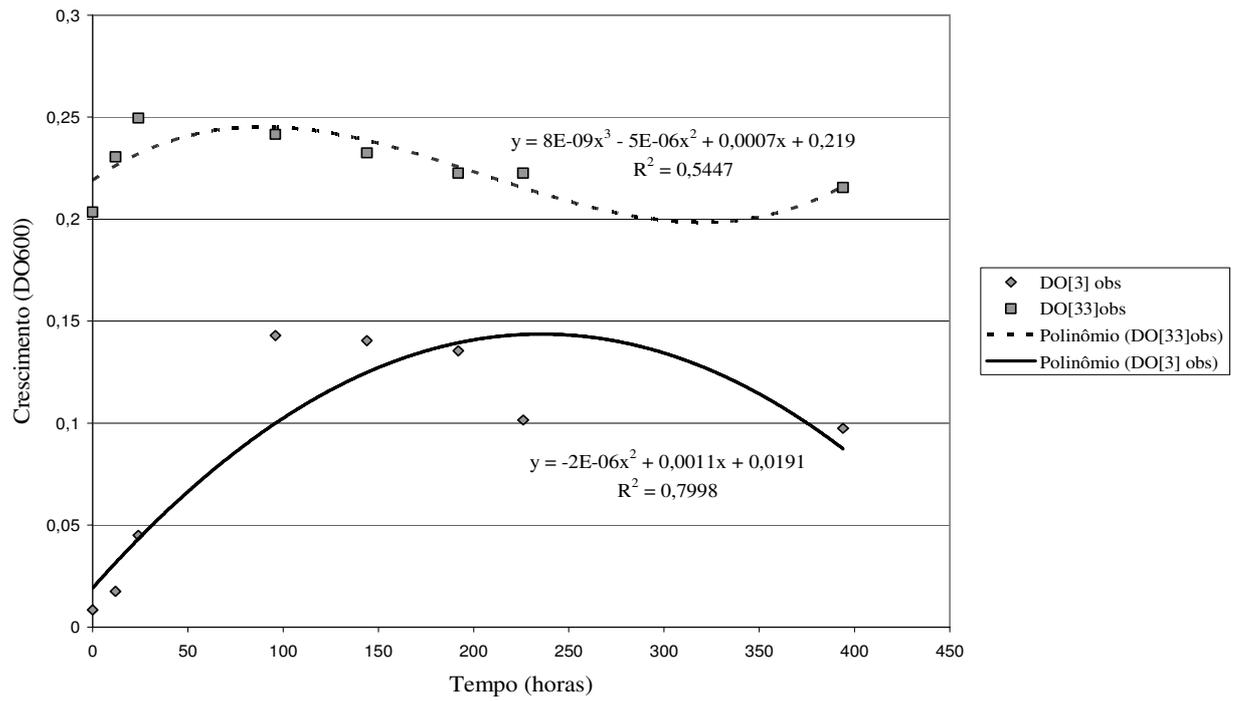


Figura 37 Relação entre o crescimento de *Bacillus cereus* em MM+sulfato de endossulfam no tempo.

5 CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que o diurom e o sulfato de endossulfam podem afetar inibindo ou estimulando o crescimento microbiano o que pode provocar consequências sobre a atividade microbiana do solo. O desenvolvimento deste trabalho possibilitou as conclusões que se seguem:

- O maior crescimento microbiano foi observado nos tratamentos-controle (sem contaminação), variando de $1,32 \times 10^5$ a $4,3 \times 10^5$ UFCs. E registrou-se um menor crescimento no meio MM, tanto no horizonte Ap quanto no AB.
- O crescimento microbiano em MM em presença do sulfato de endossulfam foi inferior àquele obtido no MM suplementado com diurom em ambos horizontes sem, contudo, haver uma diferença significativa aplicando o teste de Kruskal-Wallis.
- Com relação aos diferentes tempos de incubação e diferentes contaminantes (diurom ou sulfato de endossulfam) e o controle, no T0 e no T64, não houve diferença significativa entre os meios de culturas utilizados.
- A técnica molecular empregada mostrou-se satisfatória como ferramenta na identificação ao nível genérico para três das espécies trabalhadas. Sendo as técnicas de provas bioquímicas indispensáveis para confirmar a espécie.
- Dentre as seis estirpes isoladas do solo contaminado com pesticida, *Bacillus cereus* (cepa 69) teve seu crescimento, em MM suplementado ora com diurom ora com sulfato de endossulfam, mais expressivo quando comparada com as demais.
- A estirpe isolada de *Bacillus cereus* possui capacidade de degradação do diurom e do sulfato de endossulfam, confirmada pelos testes de viabilidade e pela dinâmica de crescimento em meio Mínimo, embora tivesse apresentado um baixo crescimento medido em DO600.
- O estudo da cinética de crescimento mostrou melhor resultado quando a linhagem de *Bacillus cereus* foi cultivada na maior concentração do diurom ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$). Inversamente, no ensaio com o sulfato de endossulfam a estirpe de *Bacillus cereus* teve um crescimento

exponencial mais acentuado no tratamento de menor concentração. A degradação do herbicida diurom por *Bacillus cereus* foi maior no ensaio de concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (54 %) quando comparado com o de $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (47,9 %). No estudo de biodegradação do metabólito sulfato de endossulfam a eficiência foi maior na concentração de $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ (15,6 %), contra 22,6 % no meio mais concentrado ($33 \mu\text{g mL}^{-1}$).

- O maior percentual de retenção do diurom em *Bacillus cereus* foi observado na concentração $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (15,49 %). Já na menor concentração de estudo ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) a porcentagem foi de 9,77% de retenção celular. Assim como no tratamento com diurom, observou-se um maior percentual de retenção de sulfato de endossulfam no ensaio de concentração $33 \mu\text{g mL}^{-1}$ (19,06% do pesticida incorporado nas células de *B. cereus*). Já na menor concentração de estudo ($3 \mu\text{g mL}^{-1}$) a porcentagem foi de 11,01% de retenção celular.
- O presente estudo mostrou que o diurom e o sulfato de endossulfam afetam a atividade microbiana do solo e é claro que o racional uso de pesticidas no campo é um importante passo preventivo no controle da contaminação ambiental, tanto do solo como da água, além de prejudicar a biota podendo causar distúrbios no ecossistema como um todo.

6 RECOMENDAÇÕES

- Ressalta-se a necessidade de estudos mais aprofundados sobre as vias metabólicas empregadas pelos microrganismos, assim como um estudo genético para a compreensão do maquinário enzimático microbiano envolvido nos processos degradativos.
- Desestimular a utilização de pesticidas na agropecuária como forma de contribuir para reduzir o risco de contaminação das cadeias alimentares, pelas possíveis alterações na estrutura e função dos ecossistemas.
- Implementar programas (orientação para o manejo do solo, educação ambiental, entre outros) por meio dos sistemas de assistência técnica e extensão rural que incentivem o controle biológico de pragas e doenças.
- Monitorar os níveis de resíduos de pesticidas, no solo, na água subterrânea, sedimento, peixes e outros indicadores biológicos de contaminação ambiental.
- Biorremediação é uma opção para o tratamento de ambientes contaminados e que pode ser realizada *in situ* ou utilizando biorreator. No sistema de biorremediação a escolha deve ser, preferencialmente, entre microrganismos indígenas ou, ainda, deve-se empregar cepas adaptadas para degradar compostos específicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOIM, M.C.R.; BARBOSA, J.C.; COUTINHO, H.L.C.; ROSADO, A.S. **Avaliação de diversidade microbiana em amostras de solos: técnica do PCR/DGGE.** (Protocolo Laboratorial) - Rio de Janeiro : Embrapa Solos - (Embrapa Solos. Documentos, n. 68). 2004. 31 p.

AB'SABER, A. N. **O Pantanal Mato-grossense e a teoria dos refúgios.** Revista Brasileira Geografia, v. 60, n.especial 1.2, 1988. p:9-57.

AISLABIE, J., LLOYD-JONES, G. **Bacterial degradation of pesticides.** Australian Journal of Soil Research. v. 33, 1995. p. 925-942.

ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). **Methods in applied soil microbiology and biochemistry.** London: Academic, 1995. 576 p.

ALEGRIA, H.; SHAW, T. **Rain deposition of biocides in coastal waters of the South Atlantic Bight.** Environ. Sci. Technol., v. 33, n. 6, 1999. p.850-856,

AMBROSOLI, R.; NEGRE, M.; DIVAPRA, M. G. **Indications of the occurrence of enhanced biodegradation of carbofuran in some italian soils.** University of Turin, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (To), Italy International Biodeterioration & Biodegradation 62 2008. p.51-56

ANDRÉA, M.M. **Contaminação do Solo por Pesticidas.** Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental Instituto Biológico. O Biológico, vol. 60, n° 2. 2003. Disponível em:
http://www.geocities.com/~esabio/agua/contaminacao_pesticidas.htm. Acesso em 25 de março de 2008.

ANDRÉA, M.M. **Contaminação do solo por pesticidas.** Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico. 2004. Disponível em:
http://www.geocities.com/~esabio/agua/contaminacao_pesticidas.htm. Acesso em 22 de fevereiro de 2008.

ANHALT, J. C.; MOORMAN, T. B.; KOSKINEN, W. C. **Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism.** Journal of Environmental Science and Health, Part B, 42:5, 2007. p. 509 – 514.

ANJOS, G. C. dos. **Qualidade da água freática e do solo na área desativada de uma fábrica de imunizantes para madeira, Ananindeua, PA.** Dissertação (Mestrado em Geologia e Geoquímica) - Centro de Geociências, Universidade Federal do Pará, Belém. 2005. 91 p.

ARAÚJO, A.S.F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos.** Dissertação. Universidade de São Paulo. 2002. 83p.

ARAUJO, E. A.; LANI, J. L.; AMARAL, E. F.; GUERRA, A. **Uso da terra e propriedades físicas e químicas de Argissolo Amarelo distrófico na Amazônia Ocidental.** Rev. Bras. Ciênc. Solo [online]. vol.28, n.2, 2004. p. 307-315. Available

Disponível em:

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010006832004000200009&lng=en&nrm=iso. ISSN 0100-0683. doi: 10.1590/S0100-06832004000200009. Acesso em 17 de agosto de 2008.

ARMSTRONG, D. E.; CHESTERS, G.; HARRIS, R. F. **Atrazine hydrolysis in soil**. Soil Science Society of America Proceedings, v. 31, 1967. p. 61-66.

ATLAS, R. M., e BARTHA R. **Microbial Ecology – Fundamentals and Applications**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., 3^a ed. 1993.

AVILA NETO, P.M. **Efeito do pesticida trifluralina sobre bactérias edáficas de região agrícola, Campo Verde, MT**. Cuiabá, MT: Instituto de Biociências/UFMT. Monografia de Conclusão de Curso. 2007. 41p.

AWASTHI, N.; MANIKAM, N.; KUMAR, A. **Biodegradation of endosulfan by a bacterial coculture**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 59, 1997. p. 928–934.

AZEVEDO, D. A.; LACORTE, S.; VINHAS, T.; VIANA, P.; BARCELÓ, D.; *J. Chromatogr., A* 2000, 879, 13.

BALOTA, E.L.; COLOZZI FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & DICK, R.P. **Long-term tillage and crop rotation effects on microbial biomass and C and N mineralization**. Soil Till. Res., 2004. 77:137-145.

BALOTA, E.L.; COLOZZI-FILHO, A.; ANDRADE, D.S. & HUNGRIA, M. **Biomassa microbiana e sua atividade em solos sob diferentes sistemas de preparo e sucessão de culturas**. R. Bras. Ci. Solo, 1998. 22:641-649.

BALOTA, E.L.; ANDRADE, D.S.; COLOZZI FILHO, A.; DICK, R.P. **Microbial biomass in soils under different tillage and crop rotation systems**. Biol. Fert. Soils, 2003. 38:15-20.

BARCELÓ, D.; **Environmetanl protection agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water**. J. Chromatogr. 1993, 643, 117.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace Determination of Pesticides and their degradation products in water**. 2nd ed., Elsevier: Amsterdam, 2003.

BARIZON, R.R.M. **Sorção e transporte de pesticidas sob condições de não-equilíbrio**. Tese de Doutorado – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2004. 107p.

BARROTI, G.; NAHAS, E. **População microbiana total e solubilizadora de fosfato em solo submetido a diferentes sistemas de cultivo**. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.35, n.10, 2000. p.2043-2050.

BATISTA, S. **Exposição da água subterrânea a pesticidas e nitratos em ecossistemas agrícolas do Ribatejo e Oeste e da Beira Litoral**. Tese de Doutorado, ISA, UTL, Lisboa, 2003. 464p.

BAILEY, D.A. et al. **Substrates pH and water quality**. Raleigh: North Carolina State University, Disponível em:
<<http://www.ces.ncsu.edu/depts/hort/floriculture/plugs/ph.pdf>>. Acesso em 12 de set. 2008.

BAILEY, G.W.; WHITE, J.L. **Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil**. Residue Reviews, v.32, 1970. p.29-92.

BATTAGLIN, W. A.; GOOLSBY, D. A. **Statistical modeling of agricultural chemical occurrence in midwestern rivers**. Journal of Hydrology, v. 196, n.1/4, p. 1-25, 1997.

BAZOT, S.; BOIS, P.; LEBEAU, T. **Mineralization of diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea] by co-immobilized *Arthrobacter* sp. and *Delftia acidovorans***. Biotechnol. Lett. Vol. 29, p. 749-754. 2007.

BELL, T., NEWMAN, J. A., SILVERMAN, B. W., TURNER, S. I., LILEY, A. K. **The contribution of species richness and composition to bacterial services**. Nature, V. 436, p. 1157-1160, 2005.

BHALERAO, T.S. PURANIK., P.R. **Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfam, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger***. International Biodeterioration and Biodegradation. 2007. 59:315–321.

BIER, O. **Microbiologia e imunologia**. 23ª edição. São Paulo: Ed. Melhoramentos. 1990

BOCQUENÉ, G.; FRANCO, A. **Pesticide contamination of the coastline of the Martinique**. Marine Pollution Bulletin. London, v. 51, p. 612-619. 2005.

BOIX-FAYOS, C.; CALVO-CASES, A.; IMESON, A.C. & SORIANO-SOTO, M.D. **Influence of soil properties on the aggregation of some Mediterranean soils and the use of aggregate size and stability as land degradation indicators**. Catena, 44:47-67, 2001.

BOUMAN, B. A. M.; CASTAÑEDA, A. R.; BHUIYAN, S. I. **Nitrate and pesticide contamination of groundwater under rice-based cropping systems: past and current evidence from the Philippines**. Agriculture, Ecosystems and Environment, v. 92, 185–199, 2002.

BRAGA, J. K.; HARDOIM, E. L.; DORES, E. F. G. C.; HECKMAN, C. W. **Pesticide influence on the desmid flora of a reservoir in an agricultural region at Campo Verde, Mato Grosso, Brazil**. Em prep. 2009.

BRENDA S. PERKOVICH, TODD A. ANDERSON, ELLEN L. KRUGER; JOEL R. COATS. **Enhanced Mineralization of [14C]Atrazine in *Kochia scrobaria* Rhizospheric Soil from a Pesticide-Contaminated Site**. *Pestic. Sci.*, 46, 391-396. 1996.

BROMILOW, R.; EVANS, A.A.; NICHOLS, A.; TODD, A.D.; BRIGGS, G.G. **The effect on soil fertility of repeated applications of pesticides over 20 years.** *Pestic. Scien.* 48:63-72. 1996.

BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e Venenos: Agrotóxicos no Brasil e no Terceiro Mundo.** Petrópolis, Vozes/OXFAN/FASE. 1986.

CAIN, R. B.; MITCHELL, J. A. **Enhanced Degradation of the Fungicide Vinclozolin : Isolation and Characterisation of a Responsible Organism** *Pestic. Sci.*, 48, 13-23. 1996.

CAIN R. B.; HEAD I. M. **Enhanced degradation of pesticides: its biochemical and molecular biological basis. In Pesticides in Soils and Water: Current Perspectives**, BCPC Monograph No. 47. (A. Walker, Ed.), pp. 2340, British Crop Protection Council, Farnham. *Soil Biol. Biochem.* Vol. 28, No. 12, pp. 1749-1752. 1991.

CALLEGARI-JACQUES, S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2003.

CAMARGO, O.A.; ALLEONI, L.R.F. **Compactação do solo e o desenvolvimento das plantas.** Piracicaba, 132p. 1997.

CAMPOS, B.C.; REINERT, D.J.; NICOLODI, R.; RUEDELL, J. & PETRERE, C. **Estabilidade estrutural de um Latossolo Vermelho-Escuro distrófico após sete anos de rotação de culturas e sistemas de manejo de solo.** *R. Bras. Ci. Solo*, 19:121-126, 1995.

CAMPOS JUNIOR, L. W. **Avaliação da influência de uma faixa de contenção de brachiária no carreamento superficial de sedimentos contaminados por pesticidas em área de cultura de algodão na micro-bacia de Córrego Chico Nunes.** Relatório Final de Projeto PIBIC/CNPq. 2005-2006 20p. Dados ainda não publicados.

CANNA-MICHAELIDOU, S.; NICOLAU, A. **Evaluation of the genotoxicity potential (by MutatoxTM test) of en pesticides found as water pollutants in Cyprus.** *The Science of the Total Environment*, v.193, p.27-35. 1996.

CANTON, J. H., G. J. VANESCH, P. A. GREVE, AND A. B. A. M. VAN HELEMOND. **Accumulation and elimination of a-hexachlorocyclohexane (a-HCH) by marine algae Chlamydomonas and Dunaliella.** *Water Res.* 11:11-115. 1977.

CARNEIRO, R.G.; MENDES, I.C.; LOVATO, P.E.; CARVALHO, A.M.; VIVALDI, L.J. **Indicadores biológicos associados ao ciclo do fósforo em solos de Cerrado sob plantio direto e plantio convencional.** *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.39, n.7, p.661-669, 2004.

CARVALHO, A. R.; SCHLITTER, F. H. M.; TORNISIELO, V. L. 2000. *Quim. Nova*, 23, 618.

CARVALHO, N. de O. **Hidrologia da Bacia do Alto Paraguai.** In: SIMPÓSIO SOBRE RECURSOS NATURAIS E SÓCIO-ECONÔMICOS DO PANTANAL, 1. Corumbá. Anais. Brasília: EMBRAPA-DDT, 1984. p. 91-103. (EMBRAPACAP. Documentos, 5).

CARVALHO, Y. **Densidade e atividade dos microrganismos do solo em plantio direto e convencional, na região de Carambeí – PR.** Curitiba, Universidade Federal do Paraná, (Tese de Mestrado). 1997. 108p.

CASSARA, K. P. **Influência da temperatura na degradação do pesticida sulfato de endossulfam.** Monografia apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso como requisito para obtenção do título de Bacharel em Química. 2008. 40 p.

CASTRO FILHO, C.; MUZILLI, O. & PODANOSCHI, A.L. Estabilidade de agregados e sua relação com o teor de carbono orgânico num Latossolo Roxo distrófico, em função de sistemas de plantio, rotações de culturas e métodos de preparo das amostras. R. Bras. Ci. Solo, 22:527-538, 1998.

CATTELAN, A.J. & VIDOR, C. Sistemas de culturas e a população microbiana do solo. R. Bras. Ci. Solo, 14:125-132, 1990.

CATTELAN, A.J.; TORRES, E.; SPOLADORI, C.L. Sistemas de preparo com a sucessão trigo/soja e os microrganismos do solo em Londrina. R. Bras. Ci. Solo, 21:303-311, 1997b.

CENTURION, J.F.; CARDOSO, J.P. & NATALE, W. Efeito de formas de manejo em algumas propriedades físicas e químicas de um Latossolo Vermelho em diferentes agroecossistemas. R. Bras. Eng. Agric. Amb., 5:254-258, 2001.

CHACKO, C. I., AND J. L. LOCKWOOD. Accumulation of DDT and dieldrin by microorganisms. Can. J. Microbiol. v.13:1123-1126. 1967.

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

CIANTAR, M.; NEWMAN, H.N.; WILSON, M.; SPRATT, D.A. Molecular identification of *Capnocytophaga* spp. via 16S rRNA PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol; 43:1894-901 2005.

CLOSE, M. E. Survey, pesticides in New Zealand groundwaters. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, v. 30, 1996. p. 455-461.

CHELIUS, M.K.; TRIPLETT, E.W. The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays*. Microbial Ecology, New York, v. 41, n.3, p. 252-263. 2001.

COLOZZI-FILHO, A.; BALOTA, E.L. Plantio direto: Microrganismos e processos. In: SIQUEIRA, J.O.; MOREIRA, F.M.S.; LOPES, A.S.; GUILHERME, L.R.; FAQUIN, V.; FURTINNI, A.E. & CARVALHO, J.G., eds. Soil fertility, soil biology and plant nutrition interrelationships. Lavras, SBCS/UFLA/DCS, p.487-508. 1999.

CORRÊA, C. M. D. Efeito de óleo de soja na persistência do endossulfam no ambiente. Tese (Doutorado em Ecologia de Agroecossistemas)- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005. 102 p.

CORRÊA, M.M. **Atributos físicos, químicos, mineralógicos e micromorfológicos de solos e ambiente agrícola nas várzeas de Souza - PB.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2000.

COSTA, R. **Protocolos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Taxonomia.** UFRJ 2002

COSTA, R. S. **Variabilidade e diversidade genética de comunidades bacterianas associadas a rizosfera de milho (*Zea mays* L. Merrill) em um agrossistema do Rio de Janeiro.** Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2001. p127.

COUTINHO, H. L. C. **Avaliação da biodiversidade do solo através do exame de DNA.** 1999. Disponível em: www.cnps.embrapa.br . Acesso em: 20 de abril de 2008

COUTINHO HLC, OLIVEIRA VM, MANFIO G P. **Diversidade microbiana em amostras ambientais.** In: Garay, I. & Dias, B. (Eds.) *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais.* Editora Vozes, Petrópolis. 2001. p. 215-232.

CRUZ, L.M.; DE SOUZA, E.M.; WEBER, O.B.; BALDANI, J.I.; DOBEREINER, J.; PEDROSA, F.D. **16S ribosomal DNA characterization of nitrogen-fixing bacteria isolated from banana (*Musa spp.*) and pineapple (*Anana comosus* (L) Merrill).** Applied and Environmental Microbiology. Washington, v. 67, n. 5, 2001. p. 2375-2379.

CULLINGTON, J.E.; WALKER, A. **Rapid biodegradation of diurom and other phenylurea herbicides by soils bacterium.** Soil Biology and Biochemistry. V.31, 1999. p 677-686.

DAMIM, V. **Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida ¹⁴C-Diurom em dois latossolos tratados com lodo de esgoto.** Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba-SP. 2005.

D’ANDRÉA, A.F.; SILVA, M.L.N.; CURI, N.; FERREIRA, M.M. **Atributos de agregação indicadores da qualidade do solo em sistemas de manejo na região dos Cerrados no sul do Estado de Goiás.** R. Bras. Ci. Solo, 2002. 26:1047-1054.

DA ROS, C.O.; SECCO, D.; FIORIN, J.E.; PETRERE, C.; CADORE, M.A. & PASA, L. **Manejo do solo a partir de campo nativo: Efeito sobre a forma de estabilidade da estrutura ao final de cinco anos.** R. Bras. Ci. Solo, 1997. 21:241- 247.

DEASAIN, S.; HARTMANN, A.; PAREKH, N.R.; FOURNIER, J.C. **Genetic diversity of carbofuran-degrading soil bacteria.** FEMS Microbiology Ecology, Amsterdam. V. 34, n.2, 2000. p. 173-180.

DEGENS, B.P.; SPARLING, G.P.; ABBOT, L.K. **The contribution from hyphae, roots and organic carbon constituents to the aggregation of a sandy loam under longterm clover-based and grass pastures.** Europ. J. Soil Sci., 1994. 45:459-468.

DEGENS, B.P. **Macro-aggregation of soils by biological bonding and binding mechanisms and the factors affecting these: a review.** Aust. J. Soil Res., 1997. 35:431-459.

DHAKEPHALKAR, P.K.; CHOPADEV, B.A. **High levels of multiple metals resistance and its correlation to antibiotic resistance in environmental isolates of *Acinetobacter***. *BioMetals*, v.7, 1994. p.67-74.

DONG, Z.; HEYDRICH, M.; BERNARD, K.; McCULLY, M.E. **Further evidence that the N₂-Fixing endophytic bacterium from the intercellular spaces of sugarcane stems is *Acetobacter diazotrophicus***. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, 1995. p.1843-1846.

DORES, E. F. G. C.; DE-LAMONICA-FREIRE, E.M. **Contaminação do ambiente aquático por pesticidas: Vias de contaminação e dinâmica dos pesticidas no ambiente aquático**. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v.9, 2001. p.1-18.

DORES, E. F. G. C.; WEBER, O. L. S.; VECCHIATO, A. B.; SHIRAIWA, S.; SALOMÃO, F. X.; CUTRIM, A. O.; GUIMARÃES, S. C.; PINTO, A. A.; PEREIRA, M. J. **Estudo da contaminação de pesticidas no ambiente e seu monitoramento em águas superficiais, subterrâneas e pluviais em regiões cotonícolas do Estado de Mato Grosso**. 1ª fase. Relatório técnico FACUAL, 2003. 112 p.

DORES, E. F. G. C. **Contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas em Primavera do Leste**. Tese de Doutorado. Araraquara, 2004. 282p.

DORES, E. F. G. C.; WEBER, O. L. S.; VECCHIATO, A. B.; SHIRAIWA, S.; SALOMÃO, F. X.; CUTRIM, A. O.; GUIMARÃES, S. C.; PINTO, A. A.; PEREIRA, M. J. **Estudo da contaminação de pesticidas no ambiente e seu monitoramento em águas superficiais, subterrâneas e pluviais em regiões cotonícolas do Estado de Mato Grosso**. 2ª fase. Relatório técnico FACUAL, 2005. 112 p.

DORES, E.F.G.C.; SPADOTTO, C.A.; WEBER, O.L.S.; CARBO, L.; VECCHIATO, A.B.; PINTO, A.A. **Environmental Behaviour of Metolachlor and Diuron in a Tropical Soil in the Central Region of Brazil**. *Water Air Soil Pollut* 2009. 197:175–183

DUTARTRE, P.; BARTOLI, F.; ANDREUX, F.; PORTAL, J.M.; ANGERS, A. **Influence of content and nature of organic matter on the structure of some sandy soils from West Africa**. In: BRUSSAARD, L.; KOOISTRA, M.J., eds. *Soil structure/soil biota interrelationships*. Amsterdam, Elsevier Science Publishers, 1993. p.459-478.

EICHELBERGER, J.W.; LICHTENBERG, J.J. **Persistence of pesticides in river water**. *Environ. Sci.Technol.* 1971, 5, 541.

EKER, S.; KARGI F. **Kinetics of 2,4-dichlorophenol degradation by *Pseudomonas putida* CP1 in batch culture**. *Int Biodeter Biodegrad* v 55 2005. p. 25–28.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA - EMBRAPA. – **Centro Nacional de Pesquisas de Solos. Manual de métodos de análise de solo**. Rio de Janeiro, 2ª ed. 1997. 212p.,

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA. **Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos**. Brasília: EMBRAPA, Produção de Informação. 1999. 412p.

EXTOXNET (Extension Toxicology Network). **Pesticides Information Profile: Endossulfam**. 1996. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/endosulf.htm>> Acesso em: 17 de outubro de 2008.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F., ALMEIDA, R., POTILHO, V. A., BARBOSA, T. A., TREVILATO, P. B., RAMALHO NETO, C. E., DUARTE COELHO, R. D., SILVA, D. W., BARTOLETI, L. A., HANNA, E. S., BROCCHI, M.; MANFIO, G. P. **Drug resistance in *Chromobacterium violaceum***. *Genetics and Molecular Research*, 3, 2004. 1: 134-147.

FASSBENDER, H.W. **Química de suelos con énfasis en suelos de América Latina**. San José, Costa Rica. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1980. 398 p.

FERMINO, M.H. **Aproveitamento de resíduos industriais e agrícolas como alternativas de substratos hortícolas**. Dissertação (Mestrado em Agronomia, Fitotecnia)–Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1996.

FERREIRA, M.C.; ANDRADE, D.S.; CHUEIRE, L.M.O.; TAKEMURA, S.M. & HUNGRIA, M. **Effects of tillage method and crop rotation on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean**. *Soil Biol. Biochem.* 2000. 32:627-637,

FIELD, J.A.; REED, R.L.; SAWYER, T.E.; MARTINEZ, M. **Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase extraction an in-vial elution**. *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 45, 1997. p.3897-3902.

FIGUEIREDO, J.E.F; QUINTÃO P.L. **Caracterização Molecular de Microrganismos Isolados do Ecossistema Agrícola do Cerrado**. ISSN 1679-0162 Outubro, 2003 Sete Lagoas, MG.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A. et al. **Monitoramento e avaliação do risco de contaminação por pesticidas em água superficial e subterrânea na região de Guaíra**. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*; v. 37, n. 5, 2002. p. 659-667.

FOMSGAARD, I. **Degradation of biocides in subsurface soils, unsaturated zone - a review of methods and results**. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 58, 1995. p. 231-245.

FRANCHINI, J.C.; CRISPINO, C.C.; SOUZA, R.A.; TORRES, E.; HUNGRIA, M. **Microbiological parameters as indicators of soil quality under various tillage and crop-rotation systems in southern Brazil**. *Soil Till. Res.*, 2007. 92:18-29.

FREGONEZI, G. A. F.; ESPINDOLA, C.R. **Perfil de manejo na identificação de modificações químicas do solo decorrentes do uso agrícola**. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 29, n.3, 2008. p. 485-498.

FREITAS-JÚNIOR, E.; LUCHIARI-JÚNIOR, A. **Manejo: aspectos físicos**. In: PEREIRA, V.P.; FERREIRA, M.E. & CRUZ, .C.P., eds. *Solos altamente suscetíveis à erosão*. Jaboticabal, FCAV, 1994. p.113-122.

FRIGHETTO, R. T. **Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas agrícolas**. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (eds.) *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA, cap. 17, 1997. p. 415-438.

GAILLARDON, P. **Influence of soil moisture on long-term sorption of diuron and isoproturon by soil.** Pesticide Science, v. 47, 1996. p. 347-354.

GARBEVA, P.; VEEN, J.E.; ELSAS, J.D. **Microbial diversity in soil: Selection of** Annual Review of Phytopathology. 2004. v. 42:243-270.

GARMOUMA, M. et al. **Seasonal transport of herbicides (triazines and phenylureas) in a small stream draining an agricultural basin: Mélarchez (France).** Water Research. New York, v. 31, n. 6, 1997. p. 1489-1503.

GHADIRI, H.; ROSE, C. W. **Degradation of endosulfam in a clay soil from cotton farms of western Queensland.** Journal of Environmental Management, v. 62, n. 2 2000. p.155-169.

GHOSH, H.S.; BATTACHARAYA, S. **Effect of pesticides on a non-target fish species (*Channa punctatus*).** Environmental Pollution, v.9, 1994. p.15-18.

GORLACH-LIRA, K.; STEFANIAK, O.; SLIZAK, W.; OWEDYK, I. **The response of forest soil microflora to the herbicide formulations Fusilade and Roundup.** Microbiological Research, v.152, 1997. p.319-329.

GRADWELL, M.W. **Soil moisture deficiencies in puddle pastures.** N. Z. J. Agric. Res., 1966. 9:127-136,

GRAY, P. H. H. **Effect of benzene hexachloride on soil microorganisms.** Can. J. Bot. 1954. 32:1-9.

GUGGENBERGER, G.; ELLIOTT, E.T.; FREY, S.D.; SIX, J.; PAUSTIAN, K. **Microbial contributions to the aggregation of a cultivated grassland soil amended with starch.** Soil Biol. Biochem., 1999. 31:407-419.

GUO, L.; JURY, W.; WAGENET, R. J. **Dependence of pesticide degradation on sorption: nonequilibrium model and application to soil reactors.** Journal of Contaminant Hydrology, v. 43, 2000. p. 45-62.

GUZZELA, L.; CAPRI, E.; CORCIA, A. Di, CARACCILOLO, A. B.; GIULIANO, G. **Fate of diuron and linuron in a field lysimeter experiment.** Journal Environment Quality, v. 35, 2006. p. 312-323.

HAIGH, S.D., ALCOCK, R. **A review of the interaction of surfactants with organic contaminants in sewage sludge.** Lancaster University, U.K. 185. 1996. 161-170.

HANAZATO, T. **Response of a zooplankton community to insecticide applications in experimental ponds: a review and the implications of the effects of chemicals on the structure and functioning of freshwater communities.** Environmental Pollution, v.101, n.3, 1998. p.361-373.

HARADAA, N.; TAKAGIB, K.; HARAZONOC, A.; FUJIIID, K.; IWASAKIE, A. **Isolation and characterization of microorganisms capable of hydrolysing the herbicide mefenacet.** Short communication. Soil Biology & Biochemistry. 2006. 38:173-179

HARDOIM, E. L. ; CARDOSO, A.M.C ; DELAMONICAFREIRE, E. M. ; DORES, E. F. G. C. ; PINTO, A. A. ; CENTOFANTE, L. ; DAHROUG, Z. K. A. ; BRAGA, J. K. ; PALMA, D. C. A. ; CAMPOS, G. C. F. ; SILVA, M. B. R. C. ; AVILA-NETO, P. M. ; MARTINS, O. M. ; MENDONCA-HAGLER, L. C. S. . **Validação de bactérias, cianobactérias, microalgas e protozoários como preditores da qualidade da água de rios: contribuição à conservação de espécies microbianas e à gestão ambiental em região agrícola mato-grossense..** 2007. (Relatório de pesquisa).

HARRIS, R.F.; CHESTERS, G. & ALLEN, O.N. **Dynamics of soil aggregation.** Adv. Agron., 1966. 18:107-169.

HARTLEY, D.; KIDD, H. **Agrochemicals Handbook.** Royal Society of Chemistry, Nottingham, England. 1987.

HAYES, V.M., WU, Y., OSINGA, J., MULDER, I.M., VAN DER VLIES, ELFFERICH, P., BUYS, C.H.C.M., HOFSTRA, R.M.W. **Improvements in gel composition and electrophoretic conditions for broad-range mutation analysis by denaturing gradient gel electrophoresis.** Nucleic Acids Research, 1999. 27 (20) 29.

HESS, D.; WARREN, F. **The herbicide handbook of the weed Science Society of America.** 8 ed. 2002. p 159-1961.

HERITAGE, J; EVANS, E.G.V.; KILLINGTON, R.A. **Introductory Microbiology.** Cambridge: Cambridge University Press. 1996. 234p.

HIGASHI, K. *Relatório do XV Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas,* (São Paulo) 1991, 68.

HIRASAWA, J.K. **Avaliação do metanogênese e sulfetogênese na presença de oxigênio, sob diferentes relações etanol/sulfato, utilizando técnicas de biologia molecular.** Tese (Doutorado em Hidráulica e Saneamento) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

HUSSAIN, S., ARSAD, M., SALEEM, M., KALID, A., **Biodegradation of alpha and beta endosulfan by soil bacteria.** 1(25), 2007. 120-138.

HAWKSWORTH, D.L. **Pandora`s mycological bos: Molecular sequences VS. Morphology in understanding fungal relationship and biodiversity.** Revista Ibero Americana de Micologia 23 (3) 2006. p. 127-133.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. **Manual de pesticidas para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos.** 2 ed. Brasília, 1990.

IBGE- **Estatística da produção agrícola.** 2009. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/servidor_arquivos_est/ Acesso em 12 jul 2009.

INOUE, M.H. et al. **Cr terios para avalia o do potencial de lixivia o dos herbicidas comercializados no estado do Paran .** Planta Daninha. Rio de Janeiro, v. 21, n. 2, 2003. p. 313-323.

ISSAS, S.; WOOD, M. **Degradation of atrazine and isoproturon in the unsaturated zone: a study from southern England.** Pestic. Sci. 1999. 55: 539-545.

JACOMINE, P. K. T. et al. **Guia para identifica o dos principais solos do Estado de Mato Grosso.** Cuiab : PNUD, PRODEAGRO. Ed. Brasil Ltda. 1995. 118 p.

JOHNSON, B. T., AND J. O. KENNEDY. **Biomagnification of p,p'-DDT and methoxychlor by bacteria.** Appl. Microbiol. 1973. 26:66-71.

JONES, B. R., AND J. B. MOYLE. **Populations of plankton animals and residual chlorinated hydrocarbons in soils of six Minnesota ponds treated for control of mosquito larvae.** Trans. Am. Fish Soc. 1963. 92:211-215.

KAMEL, Z.; KHALIL, M.S.; SHALABY, A.M. **Calcium and the biological activities of two Streptomyces species isolated, from the rhizosphere of soybean plants.** Journal of Basic Microbiology, Berlin, v.29, 1989. p.31-39.

K MPF, A.N. **Sele o de materiais para uso como substrato.** In: K MPF, A.N.; FERMINO, M.H. (Ed.). *Substrato para plantas: a base da produ o vegetal em recipientes.* Porto Alegre: G nesis, 2000b. p. 139-145.

KANAZAWA, J. **Relationship between the soil sorption constant for pesticides and their physico-chemical properties.** Environ. Toxicol. Chem, v. 8|1989. p. 477– 484.

KASSAI, F.; HANAZATO, T. **Effects of triazine herbicide, simetryn, on freshwater plankton communities in experimental ponds.** Environmental Pollution, v.89, n.2, 1995. p.197-202.

KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. **Degradation of organochlorine pesticides particularly endosulfan by Trichoderm Harzianum.** Environ. Toxicol. Chem. 12, 1993. 1059–1065.

KAY, B.D.; ANGERS, D.A. **Soil structure.** In: SUMNER, M.E., ed. Handbook of soil science. Washington, CRC Press, 1999. p. 229-276.

KELLER, M.; ZENGLER, K. **Tapping into microbial diversity.** Nature Reviews, v. 2, 2004. p. 141-150.

KENNEDY, A.C.; GEWIN, V.L. **Soil microbial diversity: present and future considerations.** Soil Science, v.162, 1997. p.607-617.

KENT, A. D.; TRIPLETT, E. W. **Microbial Communities and Their Interaction in Sol and Rizosphere Ecosystems.** Anual Rev Microbiol. N 56 2002. p.211-236.

KIDD, H.; JAMES, D.R. Eds: **The agrochemicals Handbook.** Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK. 1991.

KIM, H. S.; JEON, J. W.; LEE, H. **Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, from candida antarctica.** Biotechnology Letters v. 24, 2002. p. 225-229.

KREADER, C.A. **Relief of amplification inhibition in PCR with Bovine Serum Albumin or T4 Gene 32 Protein.** Applied and Environmental Microbiology. V.62. n. 3, 1996. p. 1102-1106.

KREUGER, J. **Pesticides in stream water within an a agricultural catchment in southern Sweden, 1990-1996.** Sci. Total Environ., 1998. 216:227-278.

KOHNKE, H. **Soil physics.** New York, Mac Grow-Hill, 1968. p.118-142.

KOZDRÓJ, J.; Van ELSAS, J. D. **Structural diversity of microorganisms in chemically perturbed soil assessed by molecular and cytochemical approaches.** Journal of Microbiological Methods, v. 43, n. 3, 2001. p. 197-212.

KULLMAN, S.W.; MATSUMURA, F. **Metabolic pathway utilised by *phanerochete chryso sporium* for degradation of the cyclodiene pesticide endosulfan.** Appl. Environ. Microbiol. 62, 1996. 593-600.

KUMAR, K. DEVI, S.S.; KRISHNAMURTHI, K.; KANADE, G.S.; CHAKRABARTI, T. **Enrichment and isolation of endosulfam degrading and detoxifying bacteria.** Chemosphere. Vol 68, 2007. p. 317-322.

KUMAR, M.; PHILIP, L. **Enrichment and Isolation of a mixed bacterial cultures for complete mineralization of endosulfan.** J. Envir. Sci. Healt. v.41, issue 1. 2006. 81-96.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M.. 2007. **Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the midi Sherlock microbial identification system.** Disponível em:
https://store.pda.org/bookstore/TableOfContents/ERMM_V3_Ch01.pdf . Acesso em 25 Ago. 2008.

KWON, G.S., KIM, J.E., KIM, T.K., SOHN, H.Y., KOH, S.C., SHIN, K.S., D.G., **Klebsiella pneumoniae KE-1 degrades endosulfan without formation of the toxic metabolite endosulfan sulfate.** FEMS Microbiol. Lett., 215, 2002. 255-289.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A. A.; ZECH, W. **Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions.** J. Environ. Qual., v. 31, 2002. p. 256-268.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. **Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian cerrados.** Chemosphere, v. 41, 2000. p. 1441-1449.

LAGACE, L.; PITRE, M.; JACQUES, M.; ROY, D. **Identification of the bacterial community of maple sap by using amplified ribosomal DNA (rDNA) restriction analysis and rDNA sequencing.** Applied and Environmental Microbiology, Washington, v. 70, n.4, 2004. p.2052-2060.

LAL, R.; SAXENA, D. M. 1982. Accumulation, Metabolism, and Effects of Organochlorine Insecticides on Microorganisms. *MICROBIOLOGICAL REVIEWS*. Mar., p. 95-127 Vol. 46, No. 1

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. *In* STACKEBRANDT, E., GOODFELLOW. M. (Eds.). **Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics**: New York (Wiley), p. 115–148, 1991.

LANGENBACH, T. **As Potencialidades e Os Limites da Biodegradação**. Mariangela Hungria; Ricardo Araujo. (Org.). *Microrganismos de importância agrícola*. Brasília: Embrapa. 1994.

LAVORENTI, A. **Comportamento dos herbicidas no meio ambiente**. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, Campinas. Anais. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1996. p. 81-115. (Embrapa-CNPMA. (Documentos, 5)

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J.B. **Comportamento de pesticidas em solosfundamentos**. In: *Tópicos em Ciência do Solo*. v.3, 2003. p.291-334.

LENZ, R.W.; MARCHESSAULT, R.H. **Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology**. *Biomacromolecules*, v.6, n.1. 2005. p1-8.

LIU, S.Y.; ZHENG, Z.; ZHANG, R. BOLLAG, J.M. **Sorption and metabolism of metolachlor by a bacterial community**. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 55, 1989. p. 733-740.

LOPES, V. P. **Linhagem bacteriana isolada de sedimento de área de nascente represada com potencial para degradação do pesticida diuron**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Mato Grosso, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso. 2008.

LÓPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; JUÁREZ, B.; MARTÍNEZ-TOLED, M.V.; GONZA´ LEZ-LO´ PEZ, J. **Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake with Pesticide Removal Capacities**. *Ecotoxicology*, 14, 2005. 299–312.

LOPEZ, N.I.; PETTINARI, M.J.; MENDEZ, B.S. **Detection of reserve polymer synthesis genes in natural bacterial populations**. *FEMS Microbiology Ecology*, v.22, 1997. p.129-136.

LOURENCETTI, C.; SPADOTTO, C. A.; SANTIAGO-SILVA, M.; RIBEIRO, M. L.; **Avaliação do potencial de contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: comparação entre métodos de previsão de lixiviação**. *R. Ecotox. e Meio Ambiente*. 15, 1. 2005.

LUCHINI, L. C. **Herbicidas Y Medio Ambiente - Comportamento de herbicidas no ambiente aquático**. XIV Congresso da Asociación Latinoamericano de Malezas - ALAM.. (Participações em eventos/Congresso). 1999.

_____. **Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diurom e 2,4D em seis solos brasileiros. Piracicaba**. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo. 1987. 91p.

_____. **Comportamento de herbicidas no ambiente aquático.** Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Proteção Ambiental Instituto Biológico. Disponível em: http://www.geocities.com/~esabio/agua/comportamento_de_herbicidas.htm Acesso em 21 jul 2008.

MACFADDIN, J.F. In **Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria.** Baltimore : **Williams and Wilkins.** 1980. Soil Biology & Biochemistry 39 (2007) 2485–2495 Comparison of factors limiting bacterial growth in different soils Fredrik Demoling, Daniela Figueroa, Erland.

MADINGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbial evolution, systematics and taxonomy.** In: Madingan, M. T.; Martiniko, J. M.; Parkers, j. (Eds). Brock – Biology of Microorganisms. Prentice-Hall Inc. Nova Jersey, EUA. 1997. p. 606-634.

MANGELS, G. **Behavior of the imidazolinone herbicides in soil: a review of literature.** In: SHANNER, D. L.; O’CONNOR, S. L. (Ed.). The imidazoline herbicides. Boca Raton: CRC Press, 1991. p. 191-209.

McINROY, J. A.; KLOEPPER, J. W. **Survey of indigenous bacterial endophytes from cotton and sweet corn.** Plant and Soil, v. 173, 1995. p.337-342.

MALIK, S.; BEER, M.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. **The use of molecular techniques to characterize the microbial communities in contaminated soil and water.** Environmet International. V. 34. 2008. p. 265-276.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal Mato-Grossense.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente do Instituto de Saúde Coletiva da Universidade Federal de Mato Grosso. Cuiabá, Mato Grosso. 2003. 90 p.

MARICONE, F. A. M. **Inseticidas e seu emprego no controle às pragas.** São Paulo, 1977. 2ª ed. Editora Nobel, 1976. p. 61-63

MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; QUEIROZ, M. E. R.; ORLANDA, J. F. F.; SOUSA, H. S. **Análise de pesticidas em amostras ambientais oriundos da barragem de Boa Esperança (PI/MA BRASIL): Avaliação preliminar.** Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v. 12, 2002. p. 13-30.

MARTIRANI, L., GUARDINA, P., MARZULLO, L. AND SANNIA, G. **Reduction of phenol content and toxicity in olive oil mill waste waters with the ligninolytic fungus Pleorotus ostreatus.** Water Res. 30, 1996. 1914–18.

MARTIN, J. P.; MARTIN, W. P.; PAGE, J. B.; RANEY, W. A.; MENT, J. D. **Soil aggregation.** Adv. Agron., 1955. 7:1-37.

MARTINS, E. L. **Previsão da lixiviação de pesticidas utilizados na cultura de algodão em Mato Grosso.** Cuiabá: UFMT, Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Agricultura Tropical da Universidade Federal de Mato Grosso para obtenção do Título de Mestre em Agricultura Tropical, Área de concentração em Recursos Naturais. 2006. 82f.

- MARTIN, J.K. **Comparison of agar media for counts of viable soil bacteria.** Soil Biology and Biochemistry, v.7, 1975. p.401-402.
- MATSUI, Y.; FUKUDA, Y.; INOUE, T.; MATSUSHITA, T. **Effect of natural organic matter on powdered activated carbon adsorption of trace contaminants: characteristics and mechanism of competitive adsorption.** Water Research, v. 37, 2003. p. 4413 – 4424.
- MATALLO, M. B.; SPADOTTO, C. A.; LUCHINI, L. C.; GOMES, M. A. F. **Sorption, degradation, and leaching of terbuthiuron and diurom in soil columns.** Journal of Environmental Science and Health, B40, 2005. p. 39-43,
- MATTOS, L. M.; SILVA, E. F. **Influência das propriedades de solos e de pesticidas no potencial de contaminação de solos e águas subterrâneas.** Revista Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 9, 1999. p. 103-124.
- MAUND, S. J.; SHERRATT, T. N.; STICKLAND, T.; BIGGS, J.; WILLIAMS, P.; SHILLABEER, N.; JEPSOM, P. C. **Ecological considerations in pesticides risk assesement for aquatic ecosystems.** Pesticide Science, v.49, n.2, 1997. p-185-190.
- MCCOOL, G. J.; CANNOM, M. C. **PhaC and PhaR are required for Polyhydroxyalkanoic Acid Synthase activity in *Bacillus megaterium*.** Journal of Bacteriology, v. 183, n.14, 1996. p.4235-4243.
- MBAGWU, J. S. C.; PICCOLO, A.; MBILA, M. O. **Water-stability of aggregates of some tropical soils treated with humic substances.** Pedologie, 1993. 43:269-284.
- MELO, V. F.; SILVA, J. R. C. **Propriedades físicas de um Latossolo Amarelo álico, em áreas sob cultivo e vegetação natural de Cerrado.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA DO SOLO, 25., Viçosa. Anais. Viçosa, MG, Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1995. p.1890-1892.
- MILES, J.R.W.; MAY, P. **Degradation of endosulfan and its metabolites by a mixed culture of soil microorganisms.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1979. p.13–16.
- MISKO, A.L.; GERMIDA, J.J. **Taxonomic and functional diversity of pseudomonads isolated from the roots of Field-grown canola.** FEMS Microbiology Ecology, v.42, 2002. p.399-407.
- MOLOPE, M.B.; GRIEVE, I.C.; PAGE, E.R. **Contributions by fungi and bacteria to aggregate stability of cultivated soils.** J. Soil Sci., 1987. 38:71-77.
- MONTAÑÉS, J., F., C.; VAN HATTUM, B. **Bioconcentration of chlorpyrifos by freshwater isopod *Asellus aquaticus* (L) in outdoor experimental ditches.** Environmental Pollution, v.88, 1995. p.137-146.
- MONTEIRO, R.T.R. **Degradação de pesticidas.** In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) Microbiologia ambiental, Jaguariúna: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. 1998. p.107- 124.

MONTGOMERY, J.H. **Agrochemicals Desk References**. (Ed.) Lewis, Publication, Boca Raton, FL. 1997.

MOORMAN, T. B. **A review of pesticide effects on microorganisms and microbial processes related to soil fertility**. *Prod. Agric.* 1989. 2:14-23.

MORAES, A. de. **Pastagem como fator de recuperação de áreas degradadas**. In: Simpósio sobre Ecossistema de Pastagem, 2, Jaboticabal. Anais... 1993. p.191-215.

MORAES, A.; LUSTOSA, S.B.C. **Efeito do animal sobre as características do solo e a produção da pastagem**. In: SIMPÓSIO SOBRE AVALIAÇÃO DE PASTAGENS COM ANIMAIS, Maringá. Anais. Maringá, Universidade Estadual de Maringá, 1997. p.129-149.

MOREIRA, L.F.; CRUZ, J.C.S., **Uso correto e seguro de fitossanitários**. Viçosa, MG: EMATER; DETEC; Departamento Técnico. Não paginado, 1996.

MOREIRA, F. M. S. e SIQUEIRA, J. O. **Microbiologia e Bioquímica do solo**. Editora: UFLA, 2ª ed. 729. 2006.

MORAIS, D. K. **Estudo de estirpes bacterianas isoladas no bacterioplancton de uma represa em área agrícola mato-grossense, com potencial de degradação de xenobiontes**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Mato Grosso, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso. 2008.

MOTA, S. **Preservação e conservação de recursos hídricos**. 2 ed. Rio de Janeiro: ABES, 1995. 200p.

MUIRHEAD-THOMSON, R. C. **Pesticide impact on stream fauna with special reference to macroinvertebrates**. New York: Cambridge University Press. 1987. 275p.

MURTY, A. S. **Toxicity of pesticides to fish**. N.W.: CRC Press, 1988a, v.1, 178p. Toxicity of pesticides to fish. N.W.: CRC Press, 1988, v.2, 143p.

MUSUMECI, M.P.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MATALLO, M.B.; ANDREA, M.M. **Degradação do diurom-¹⁴C em solo e em plantas de cana-de-açúcar (*Saccharum spp.*)**. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.30, 1995. p.775-778.

MUSUMECI, M.R., **Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo**. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (Ed.). Microbiologia do solo.1.ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo. 1992. p. 341-356.

MUZILLI, O. **Manejo da fertilidade do solo**. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ – IAPAR. *Plantio direto no Paraná*. Londrina: IAPAR, 1981. p. 43-57. (Circular, 23).

_____. **Fertilidade do solo em plantio direto**. In: FANCELLI, A. L.; TORRADO, P. V. *Atualização em plantio direto*. Campinas: Fundação Cargill, 1985. p. 147-160.

MWANTHI, M. A. **Occurrence of three pesticides in community water supplies, Kenya.** Bulletin Environmental Contamination. Toxicology, v. 60, 1998. p. 601- 608.

NAHAS, N. **Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas.** Solos e Irrigação. 61. 2002. p. 267-275.

NDOWORA, T.C.R.; KINKEL, L.L.; JONES, R.K.; ANDERSON, N.A. **Fatty acid analysis of pathogenic and suppressive strains of streptomyces species isolated in Minnesota.** Phytopatology, v.86, 1996. p.138-143.

NEBEKER, A. V.; SCHUYTEMA, G.S. **Chronic effects of the herbicide diurom on freshwater Cladocerans, Amphipods, Midge, Minnows, Worms and Snails.** Archives of Environmental Contamination and Toxicology, v.35, 1998. p.441-446.

NEDER, R.N. **Microbiologia: manual de laboratório.**São Paulo: Nobel, 1992.

NEMES-KÓSA, S.; CSERHÁTI, T. **Quantitative structure-activity relationship study on the inhibitory effect of some herbicides on the growth of soil micro-organisms.** Journal of Applied Bacteriology, v.79, 1995. p.483-491.

NRIAGU, J. O.; LAKSHMINARAYANA, J. S. S. **Aquatic toxicology and water quality management.** Wiley & Sons. V 22 on Advances in Environmental Science and Technology. New York. 1989. 292 p.

NITSCHKE, L.; SCHÜSSLER, W. **Surface water pollution by herbicides from effluents of waste water treatment plants.** Chemosphere, v.36, 1998. p.35-41.

OLIVEIRA, G.C. **Alterações estruturais e comportamento compressivo de um Latossolo submetido a diferentes sistemas de manejo por 20 anos no Cerrado.** Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2002. 78p. (Tese de Doutorado)

OLIVEIRA, V.M.; SETTE, L. D.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F. **Preservação e Prospecção de Recursos Microbianos.** MultiCiência. Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA). Campinas, SP. 2006.

PAIVA, M. P.. **Aproveitamento de recursos faunísticos do Pantanal de Mato Grosso: pesquisas necessárias e desenvolvimento de sistemas de produção mais adequados à região.** Brasília: EMBRAPA-DDT, 1984. 71p. (EMBRAPA-DPP. Documentos,7).

PAL, S.; CHOWDHURY, A.; MITRA, S.R. **Fate and behavior of diuron in the soils cooch Behar and kalyani, West Bengak.** India Journal of Agricultural Sciences, v. 55, n.12, 1985. p. 747-750.

PALMA, D. C. A. **Ensaio metodológico para verificação da influência de pesticida sobre comunidade bacteriana.** 2007. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Licenciatura Em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Mato Grosso, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Mato Grosso.

PAMPULHA, M. E.; FERREIRA, M. A. S. S.; OLIVEIRA, A. **Effects of a phosphinothricin based herbicide on selected groups of soil microorganisms** Journal of Basic Microbiology. 47, 2007. p.325–331.

PAIS, D. F., D. L. LEWIS, AND J. T. BARNETT. **Bioconcentration of toxaphene by microorganisms**. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1977. 17:564-574.

PAPA, E.; CASTIGLIONI, S.; GRAMÁTICA, P.; NIKOLAYENKO, V.; KAYUMOV, O.; CALAMARI, D. **Screening the leaching tendency of pesticides applied in the AmuDarya Basin (Uzbekistan)**. Water Research, v. 38, 2004. p. 3485–3494.

PARAÍBA, L. C. ; CERDEIRA, A. L. ; SILVA, E. F. ; MARTINS, J. S. ; COUTINHO, H. L. C. **Evaluation of soil temperature effect on the herbicide leaching potential into groundwater in the Brazilian Cerrado**. Chemosphere (Oxford), v. 53, n. 9, 2003. p. 1087-1095.

PARSONS, B.; WITT, J.M. **Pesticides in groundwater in the USA**. A report of a 1988 survey of US States. Corvallis, Oregon State University Extension Service. 1989.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções, Rio de Janeiro**. FGV, 1979.

PASCHOAL, A. D. **O ônus do modelo da agricultura industrial**. Revista Brasileira de Tecnologia. Brasília, 1983-b. 14 (1):28-40.

PEPPER, N. **PCR: applications for plant and soil microbes**: In: Manual of Environmental Microbiology. Eds. C. J. Hurst, G. R. Knudsen, M. J. McInerney, L. D. Stetzenbach and M. V. Walter. ASM Press, Washington, D. C. 1996.

PEREIRA, M. J. **Geofísica aplicada para a caracterização da cobertura pedológica de uma vertente na região de Dom Aquino- MT / Mário José Pereira**.- 2005. xix, 85p. : il. ; color. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e da Terra, 2005.

PERES, J.R.R.; SUHET, A.R.; VARGAS, M.A.T. **Fixação do N₂ em leguminosas cultivadas em solos de cerrados**. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). Microbiologia do solo. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.213-218.

PEZ, L.L.; POZO, B. C.; RODELAS, C. C.; JUA´ REZ, B.; MARTI´NEZ-TOLEDO, M.V.; GONZA´ LEZ-LO´, J.L. **Identification of Bacteria Isolated from an Oligotrophic Lake with Pesticide Removal Capacities**. Ecotoxicology. 2005. 14:299–312.

PIFFER, R.; RIGITANO, R.L.O. **Lixiviação e degradação do inseticida aldicarbe em dois diferentes solos**. Ciência e Prática, v.15, 1991. p.355-363.

POLLARD, S.J.T., HRUDEY, S.E. AND FEDORAK, P.M. **Biorremediation of petroleum and creosote contaminated soils: a review of constrains**. Waste Manage. Res. 12, 1994. 173–94.

PRADO, A.G.S.; AIROLDI, C. **The effect of the herbicide diuron on soil microbial activity.** Pesticide Management Science 57: 2001. 640-644.

PRADO, A.G.S.; AIROLDI, C. **The toxic on soil microbial activity by the free or immobilized pesticide diuron.** Thermochemica Acta, v. 394, 2002. p. 155-162.

PRODEAGRO. **Diagnóstico sócio-econômico-ecológico do estado do Mato Grosso. Governo do Estado de Mato Grosso.** Secretaria do Estado de Planejamento e Coordenação Geral. Cuiabá, Mato Grosso. 1997.

QUINN, J.P.; PEDEN, J.M.M.; DICK, R.E. **Glyphosate tolerance and utilization by the microflora of soils treated with the herbicide.** Applied Microbiology and Biotechnology, v.29, 1988. p.511-516.

QURESHI, A.; VERMA, V.; KAPLEY, A.; PUROHIT, H.J. **Degradation of 4-nitroaniline by *Stenotrophomonas* strain HPC 135.** International Biodeterioration & Biodegradation. 2007. 60:215-218.

RACKE, K. D.; SKIDMORE, M. W.; HAMILTON, D. J.; UNSWORTH, J. B.; MIYAMOTO, J.; COHEN S. Z. **Biocide fate in tropical soils (technical report).** Pure Appl. Chem., v. 69, n. 6, 1997. p. 1349-1371.

RAIJ, B. **Avaliação da fertilidade do solo.** Piracicaba: Instituto Potassa & Fosfato, 1981.

RAMSAY, C. A.; COGGER, C. G.; MACCONNELL, C. B. **Clean water for Washington-Protecting Groundwater from Pesticide Contamination. Cooperative Extension.** Washington State University 1955. Disponível:
<http://cru.cahe.wsu.edu/CEPublications/eb1644/eb1644.html>. Acesso em: 08 mai 2008.

RAO, P. S. C.; HORNSBY, A. G.; JESSUP, R. E. **Indices for ranking the potential form pesticide contamination of groundwater.** Soil and Crop Science Society FL Proceedings, v. 44, 1985. p. 1-8.

RAPPE, M. S.; GIOVANNONI, S. J. **The uncultured microbial majority.** Annu. Rev. Microbiol. 2003. 57:369-394.

RAVERKAR, K.P.; KONDE, B.K. **Effect of Rhizobium and Azospirillum lipoferum inoculation on the nodulation, yield and nitrogen uptake of peanut cultivars.** Plant and Soil, Dordrecht, v.106, 1988. p.294-252.

RESCK, D.V.S. **Agricultural intensification systems and their impact on soil and water quality in the Cerrados of Brazil.** In: LAL, R. Soil quality and agricultural sustainability. Michigan, Ann Arbor Press, 1998. p.288-300.

RESENDE, M.; SANDANIELO, A. ; COUTO, E. G. **Zoneamento agroecológico do Sudoeste do Estado de Mato Grosso Cuiabá:** EMPAER-MT; 1994, 130p. (EMPAER. Documentos, 04).

RICE, C. P., AND H. C. SICKA. **Fate of dieldrin in selected species of marine algae.** Bull. Environ. Contam. Toxicol. 1973. 9:116-123.

RICHAUME, A.; STEINBERG, C.; JOCTEUR-MONROZIER, L.; FAURIE, G. **Differences between direct and indirect enumeration of soil bacteria: the influence of soil structure and cell location.** Soil Biology and Biochemistry, v.25, 1993. p.641-643.

RIGITANO, R.L.O.; BARBOSA, T.M.L. **Influência da classe e profundidade do solo na degradação do inseticida-nematicida aldicarb.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.29, 1994p.955-960.

RITCHIE, N.J.; SHUTTER, M.E.; DICK, R.P.; MYROLD, D.D. **Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil.** Applied Environmental Microbiology, v.66, 2000. p. 1668-1675.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S. **Guia de herbicidas.** 4 ed. Londrina, 1998.

ROQUE, M.R.A. **Isolamento, caracterização e ecologia de *Acinetobacter baumannii* degradadora de herbicida diuron.** Rio Claro: Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, 119 f. Tese (Doutorado). 2000.

ROQUE, M. R. A.; MELO, I. S. **Isolamento e Caracterização de Bactérias degradadoras do herbicida diuron .** Sci. agric. vol.57 n.4 2000.

ROSLYCKY, E.B. **Glyphosate and the response of the soil microbiota.** Soil Biology and Biochemistry, v.14, 1982. p.87-92.

RUSSEL, E.W. **Soil conditions and plant growth.** 10.ed. London: Longman, 1973.

SÁ, J. C. M. **Manejo da fertilidade do solo no plantio direto.** Castro: Fundação ABC, 1993.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. **Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.** Science, v. 239, 1988. p. 487.

SANCHES, S.M., SILVA, C.H.T.P., CAMPOS, S.X., VIEIRA, E.M. **Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água.** Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13. 2003.

SASSER, M. **Identification of a bacteria by gas chromatography of cellular fatty acids.** Technical Note. 101. 2006.

SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A. R. **DNA sequencing with chain terminating inhibitors.** Proc. Natl. Acad. Sci, v. 74, 1977. p. 5463-5467.

SATOKARI, R.M.; VAUGHAN, E.E.; SMIDT, H.; SAARELA, M.; MÄTTÖ, J.; DE VOS, W.M. **Molecular approaches for the detection and identification of *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* in the human gastrointestinal tract.** Systematic Applied Microbiology. V. 26, 2003. p. 572-584.

SCATENA, C.M.C. **Riqueza bacteriana sazonal de solo adjacente à nascente do Rio São Lourenço, Fazenda Pirassununga, Campo Verde-MT.** Cuiabá, MT: Instituto de Biociências/UFMT. Monografia de Conclusão de Curso. 2007. 45p.

SCHLOTTER, M.; DILLY, O.; MUNSH, J.C. **Indicators of evaluating soil quality.** Agriculture, Ecosystems and Environment. 2003. 98: 255-262.

SCHLÜTER, P.M.; HARRIS, S.A. **Analysis of multilocus fingerprinting data sets containing missing data.** Molecular Ecology Notes. V. 6, 2006. p. 569-572.

SCRIBNER, E.A.; THURMAN, E.M.; ZIMMERMAN, L.R. **Análisis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of United States.** The Science of the Total Environment, v. 248, 2000. p. 157-167.

SEMPLE, K.; FERMOR, T. **The biorremediation of xenobiotic contamination by composts and associated microflora.** In: INTERNATIONAL CONGRESS ON THE SCIENCE AND CULTIVATION OF EDIBLE FUNGI, 14. Oxford. Proceedings. Oxford:Oxford University Press, 1995. p. 917-924.

SHALINI, S., DURGA, P., KUMAR, S. **Biodegradation of alpha and beta isomers of endosulfan and endosulfan sulfate in Indian soils.** J. Environ. Sci. Health B., **35**(3), 2000. p.337-46.

SHAN, G.; JIN, W.; LAM, E.K.H.; XING, X. **Purification of total DNA extracted from activated sludge.** Journal of Environmental Sciences. V. 20, 2008. p.80-87.

SHIVARAMAIAH, H. M.; KENNEDY, I. R. **Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes.** Journal of Environmental Science and Health, Part B. 2008. 41: 895 – 905.

SIEFERT, R. E.; LOZANO, S. J.; BRAZNER, J. C.; KNUTH, M. L. **Litoral enclosures for aquatic field testing of pesticides: effects of chlorpyrifos on a natural system.** Entomological. Society America. Miscellaneous Publications n. 75, 1989. p. 57-73.

SILVA, I.F.; MIELNICZUK, J. **Ação do sistema radicular de plantas na formação e estabilização de agregados.** R. Bras. Ci. Solo, 1997. 21:113-117.

SILVA; C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto ambiental do regulador de crescimento vegetal paclobutrazol.** Jaguariúna, SP. Embrapa Meio Ambiente, 2003.

_____. **Agrotóxicos Aspectos Gerais: Agrotóxicos e Ambiente.** EMBRAPA: Brasília. 2004.

_____. **Impacto Ambiental do Fungicida Mealaxil.** Embrapa meio ambiente, Jaguariúna, SP. 94p 1ª ed. 2006.

SIMPSON, A.J.G. **The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability.** Brazilian National Genome Project Consortium *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2003. 20: 11660–11665.

SIMPSON, A.J.G. et al. **The genome sequence of the plant pathogen *Xylella fastidiosa***. *Nature* 406(6792): 2000. 151-157.

SMITH-GREINER, L.L.; ADKINS, A. **Isolation and characterization of soil microorganisms capable of utilizing the herbicide diclofop-methyl as a sole source of carbon and energy**. *Canadian Journal Microbiology*, v.42, 1996. p.221-226.

SMYTH, T.J. **Manejo da Fertilidade do Solo para produção Sustentada de Cultivos na Amazônia**. In: O solo nos grandes domínios morfoclimáticos do Brasil e o desenvolvimento sustentado. ALVAREZ V, V.H.; FONTES, L.E.F.; FONTES, M.P.F. Viçosa, SBCS, 1996. p.71-93.

SINDAG. **Vendas 2008**. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola. Disponível em <http://www.sindag.com.br/>. Acesso em: 02 maio 2009.

SOARES, J.L.N.; ESPINDOLA, C.R.; CASTRO, S.S. **Alteração física e morfológica em solos cultivados sob sistema tradicional de manejo**. *R. Bras. Ci. Solo*, 29:1005–1014, 2005.

SOLOMONS, T.W.G. **Química orgânica**. 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1989.

SOLOMON, K.R.; BAKER, D.B.; RICHARDS, R.P.; DIXON, K.R.; KLAINE, S.J.; LA POINT, T.W.; KENDAL, R.J.; WEISSKOPF, C.P.; GIDDINGS, J.M.; GIESY, J.P.; HALL, L.W.; WILLIAMS, W.M. **Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters**. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1995. 15:31-76.

SOUZA, Z.M.; ALVES, M.C. **Movimento de água e resistência à penetração em um Latossolo Vermelho distrófico de Cerrado, sob diferentes usos e manejos**. *R. Bras. Eng. Agríc. Amb.*, 2003. 7:18-23.

SPADOTTO, C. A; FILIZOLA, H.; GOMES, M. A. F. **Avaliação do potencial de lixiviação de pesticidas em latossolo da região de Guairá, SP**. *Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 11, 2001. p. 127 – 136.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F.; LUCHINI, L. C.; ANDREA, M. M. **Monitoramento do risco ambiental de pesticidas: princípios e recomendações**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p. (Embrapa Meio Ambiente. Documentos, 42).

SPADOTTO, C. A. **Avaliações de riscos ambientais de pesticidas em condições brasileiras**. Embrapa Meio Ambiente. Jaguariúna, SP. 2006. 20p.

STALEY, J. **Microbial Diversity and the Biosphere**. 1998. Disponível em: ww.bdt.org.br/oea/sib/staley. Acesso em: 15 out 2008

STEINLE, P.; STUCKI, G.; STETTLER, R.; HANSELMANN, K. W. **Aerobic Mineralization of 2,6-Dichlorophenol by *Ralstonia* sp. Strain RK1**. *Appl. Environ. Microbiol.* V. 64. 1998. p. 25 - 66.

STOTZKY, G. **Soil as an environment for microbial life**. In: van ELSAS, J.D.; TREVORS, J.T. & WELLINGTON, E.M.H., eds. *Modern soil microbiology*. New York, Marcel Dekker, 1997. p.1-20.

SUMPONO; PEROTTI, P.; BELAN, A.; FORESTIER, C.; LAVEDRINE, B.; BOHATIER, J. **Effect of diurom on aquatic bacteria in laboratory-scale wastewater treatment ponds with special reference to *Aeromonas* species studied by colony hybridization**. *Chemosphere*, v. 50, 2003. p. 445-455.

SUN, H.L.; SHEETS, T.J. CORBIN, F.T. **Transformation of alachlor by microbial communities**. *Weed Scie.* V. 38, 1990. p. 416-420.

TATE, R. L. III. **Soil Microbiology**. John Wiley & Sons, Inc. NY. 1995. 398 p.

THOMPSON, I.P.; BAILEY, M.J.; ELLIS, R.J.; PURDY, K.J. **Subgrouping of bacterial populations by cellular fatty acid composition**. *FEMS Microbiology Ecology*, v.102, 1993. p.75-84.

TISDALL, J.M.; OADES, L.M. **Organic matter and water-stable aggregates in soil**. *J. Soil Sci.*, 1982. 33:141-163.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, L.C. **Microbiologia**. 8ªEd. ArtMed Editora, Porto Alegre 2005.

TORSVIK, V.; OVREAS, L., THINGSTAD, T. F. **Prokaryotic diversity – Magnitude, dynamics and controlling factors**. *Science*, v. 296, 2002. p. 1064-1066.

TRABULSI L. R. et al. **Microbiologia** 3ª edição. Atheneu, 2002. 586p.

TSAI, S.M.; BARAIBAR, A.V.L.; ROMANI, V.L.M. **Efeito de fatores do solo**. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p.59-72.

TSUKAMOTO, K.K; YAO, K.; KAMYIA, A.; YOSHIZAWA, S.; UCHYAMA, N.; KOGURE, K.; WADA, M. **Rapid identification of marine bioluminescent bacteria by amplified 16S ribosomal RNA gene restriction analysis**. *FEMS Microbiology Letters.*, Amsterdam, v. 256, 2006. p. 298-303.

TURNBULL, G.A.; CULLINGTON, J.E. A. WALKER J.A.W. MORGAN. **Identification and characterisation of a diurom-degrading bacterium**. *Biol Fertil Soils*. 2001. 33:472–476.

UETA, J. et al. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação – microrganismos degradadores do herbicida atrazina**. *Herbário – Toxicologia*. 2004. Disponível em: <http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>. Acesso em 25 de ago. 2008.

VAN SLUYS, M. A. et al. **Comparative Analyses of the Complete Genome Sequences of Pierce's Disease and Citrus Variegated Chlorosis Strains of *Xylella fastidiosa***. *Journal of Bacteriology*. 2003. 185 (3):1018-1026.

VASCONCELOS, A.T.R. et Brazilian National Genome Project Consortium Swine and Poultry Pathogens: **the Complete Genome Sequences of Two Strains of *Mycoplasma hyopneumoniae* and a Strain of *Mycoplasma synoviae***. Journal of Bacteriology, 187, 2005. n. 16: 5568-5577.

VIEIRA, F.C.S.; NAHAS, E. **Quantificação de bactérias totais e esporuladas no solo**. Scientia Agricola, v.57, n.3, 2000. p.539-545,

VIEIRA, L.V.; GALDINO, S.; PADOVANI, C.R. **Utilização de Pesticidas na Agropecuária dos Municípios da Bacia do Alto Taquari de 1988 a 1996 e Risco de Contaminação do Pantanal, MS, Brasil**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 53p. (Embrapa Pantanal. Circular Técnica, 27). 2001.

VIEIRA, L. M. ; GALDINO, S. ; PADOVANI, C. R. . **Contaminação potencial do Pantanal por pesticidas na Bacia do Alto Taquari (MS)**. In: GALDINO, S.; VIEIRA, L. M.; PELLEGRIN, L. A.. (Org.). Impactos ambientais e socioeconômicos na Bacia do Rio Taquari - Pantanal.. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2005, v. , p. 71-86.

VIEIRA, L.M.; GALDINO, S.; PADOVANI, C.R.; NUNES, V. da S. **Risco de contaminação do Pantanal por biocidas empregados na agropecuaria da Bacia do Alto Taquari, MS, Brasil**. Revista Brasileira de Toxicologia, Sao Paulo, v.12, n.1, ed. esp., 1999. p.43.

VIEIRA, M.J. **Propriedades físicas do solo**. In: FUNDAÇÃO INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. Plantio direto no Estado do Paraná. Londrina, 1981. p.19-30. (Circular, 23)

YANG, Y.H.; YAO, J.; WANG, M.C. **RAPD Marker and substrate utilization pattern applied to study microbial community diversity in the soil affected by agricultural chemicals**. Journal of Environmental Science and Health. V. 39, n. 1, 2004. p. 125-138.

YEN J. H.; TSAI, C. C.; SU, C. C.; WANG, Y. S. **Environmental dissipation of fungicide triphenyltin acetate and its potencial as a groundwater contamination**. Ecotoxicology and Environmental Safety, San Diego, v. 49, 2001. p. 164-170.

WANG, M.C.; LIU, Y.H.; WANG, Q.; GONGO, M.; HUA, X.M.; PANG, Y.J.; HU, S.; YANG, Y.H. **Impacts of methamidophos on the biochemical, catabolic and genetic characteristics of soil microbial communities**. Soil Biology and Biochemistry. V. 40, 2008. p 778-788.

WECHTER, P., WILLIAMSON, J., ROBERTON, A., e KLUEPFEL, D. **A rapid, cost-effective procedure for the extraction of microbial DNA from soil**. Journal of Microbiology & Biotechnology. 19, 2003. p. 85-91.

WU, X.Y.; WALKER, M.J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. **Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environment significance**. Journal of Microbiological Methods, Amsterdam, v. 64, n.1, 2006. p. 107-119.

WALLS, D.; SMITH, P. G.; MANSELL, M. G. **Pesticides in groundwater in Britain**. Intern. J. Environ. Health Research, v.6, 1996. p.55-62.

WARDLE, D.A.; PARKINSON, D. **Interactions between microclimatic variables and the soil microbial biomass.** *Biology and Fertility of Soils*, Berlin, v.9, n.3, 1990. p.273-280.

WARE, G. W., AND C. C. ROAN. **Interaction of pesticides with aquatic microorganisms and plankton.** *Residue Rev.* 1970. 33:15-45.

WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Diuron** In: *Herbicide Handbook 8th*. Lawrence: Weed Science Society of America. 2002. p. 159-161.

WIDEHEM, P.; AIT-AISSA, S.; TIXIER, C.; SANCELME, M.; VESCHAMBRE, H.; TRUFFAUT, N. **Isolation, characterization and diuron transformation capacities of bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2.** *Chemosphere*, v.46, 2002. p. 527-534.

WOLFE, N. L.; MINGELGRIN, U.; MILLER, G. C. **Abiotic transformation in water, sediments, and soil.** In: CHENG, H. H. ed. *Pesticides in the soil environment: Processes, impacts and modeling.* 2 ed. Madison, Soil Science Society of America, 1990. p. 103-168.

WORRALL, F.; KOLPIN, D. W. **Aquifer vulnerability to pesticide pollution – combining soil, land-use and aquifer properties with molecular descriptors.** *J. Hydrology.* 2004, 293, 191.

XU, J.; QIU, X. H.; DAÍ, J. Y.; CAO, H.; YANG, M.; ZHANG, J.; XU, M.Q. **Isolation and characterization of a *Pseudomonas oleovorans* degrading the chloroacetamide herbicide acetochlor.** *Biodegradation.* V.17, 2006. p. 219-225.

XU, J.; YANG, M.; DAÍ, J.; CAO, H.; PAN, C.; QIU, X.; XU, M. **Degradation of acetochlor by four microbial communities.** *Bioresource Technology.* V.99, 2008. p 7797-7802.

XUA, B.; WEI Z.; YINGYING L.; SHENGHUI W.; JINGSHUN Z.; YANCHUN Y. **Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP Gangming.** 2007.

ZHANG, J.; ZHONGTAO, S.; LI, Y.; PENG, X.; LI, W.; YAN, Y. **Biodegradation of *p*-nitrophenol by *Rhodococcus* sp. CN6 with high cell surface hydrophobicity.** *Journal of Hazardous Materials.* Vo. 163. 2009. p. 723-728.

ZILLI, J. E. Et al. **Diversidade de Microorganismos como indicador da qualidade do Solo.** *Cadernos de ciência e Tecnologia*, Brasília, vol 20. n.3 2003. p.391-411 .

ANEXOS

ANEXO

- Composição do meio de cultura CPS (GOMES, 1991).

Componentes	Quantidade/Litro
Meio Basal	
K ₂ HPO ₄	0,2g
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,05g
FeCl ₃ (0,01%)	4 gotas
CPS (em meio basal)	
Peptona	0,5g
Caseína	0,5g
Amido solúvel	0,5g
Glicerol	0,7mL
Ágar	15g

- Composição do meio de cultura MM (ROQUE e MELO, 2000).

Componentes	Quantidade/Litro
K ₂ HPO ₄	0,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g
FeCl ₂ .1H ₂ O	10 mg
CaCl ₂	10 mg
MnCl ₂	0,1mg
ZnSO ₄	0,01mg
Ágar	15g

- Determinação dos atributos dos solos conforme EMBRAPA (1997).

a) pH em H₂O e em CaCl₂ 0,02 mol L⁻¹ relação solo-solução 1:2,5

b) C-carbono orgânico total (COT) - oxidação da matéria orgânica do solo com solução de dicromato de potássio em presença de ácido sulfúrico e determinação por titulação com sulfato ferroso amoniacal;

c) Análise granulométrica - método do densímetro: dispersão com solução de NaOH 1 M e agitação por 1 hora, relação solo-solução dispersante 25:12,5;

1. Metodologia dos testes bioquímicos empregados.

- Teste de Urease

Para preparação de 1 L de ágar urease foram utilizados 900 ml de ágar-ágar, que após autoclavada, recebeu uma solução contendo 29g de Uréia ágar (VETEC) que fora anteriormente dissolvidos em 100ml de água estéril., distribuindo-se em tubos inclinados. Segundo Mac FADDIN (1976) a ocorrência de acidificação do indicador, alterando a cor do meio de pêssego para avermelhado (teste positivo) dá-se após 24-48h de incubado.

- Prova de verificação de *Slime*

Foi preparado Ágar BHI (Brain Hearth Infusion) (Biobrás) e suplementado com 5% sacarose (Sigma) e 0,8 mg de vermelho Congo(Sigma) por ml. Semeou-se em estria e incubados a 37° C/24h. Segundo CHRISTENSEN (1985 apud COLON et al., 2002), são consideradas positivas as colônias pretas e negativas as colônias vermelhas.

- Produção de amilase

O material a ser analisado foi inoculado em Agar simples contendo 0,2% de amido de milho. A placa foi incubada a 36°C por 48horas. Passado o período de incubação, a superfície da placa foi coberta com uma solução de lugol. Como o lugol reage com o amido e produz uma coloração azul-violácea intensa, qualquer traço de hidrólise de amido promovido pela bactéria foi revelado como uma zona clara ao redor do crescimento, representando um resultado positivo para o teste (VERMELHO, 2006).

- Prova de Catalase

Realizada segundo Mac FADIN (1976), adicionou-se sobre as colônias dispostas em lâmina de microscopia, 1 (uma) gota de água oxigenada 10 vol. A reação foi considerada positiva para as colônias que apresentaram emissão de bolhas de ar.

- Prova de TSI (Triple Sugar Iron)

Foram fundidos 10,7g de Agar TSI (BIOBRÁS) em 180ml de água destilada. As cepas foram inoculadas em picada, com estrias na inclinação do meio. Em seguida foram incubadas a 37°C/24h. A interpretação da reação foi realizada segundo (KONEMAM et al.,1999).

- Prova do Citrato

Foram fundido 1,95g de Agar Citrato de Simmons (MERCK) em 80ml de água destilada. A cultura bacteriana foi inoculada e incubada por 48 horas a 37°C em estufa. A reação foi positiva quando houve crescimento e o meio adquiri cor azul. Este teste serve para identificar os microrganismos que utilizam o citrato como única fonte de carbono (KONEMAM et al., 1999).

- Prova de Indol

Transferiu-se uma alçada com o inóculo para os tubos com caldo de triptona 0,4g(DIFCO), cloreto de sódio 0,4g (MICROMED), triptofano 1%(ERICH) e 80ml de água destilada. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C/24 h. Após 24h, foram adicionados três gotas do reagente de KOVACS. Foram consideradas positivas as cepas que formaram um anel vermelho, devido à degradação do triptofano (KONEMAM et al.,1999).

- Prova de Voges-Proskauer (VP)

Transferiu-se uma alçada com o inóculo para os tubos com caldo VP (MERCK). Em seguida os tubos foram incubados a 37°C/24 h. Após 24 h, adicionou-se 0,6ml de solução de α -naftol 5% e 0,2ml de solução de hidróxido de potássio 40%. A positividade é observada quando o meio apresenta um anel na cor vermelho “tijolo”. Este teste determina a capacidade de alguns microrganismos produzirem acetoina (produto final neutro) a partir da fermentação da glicose (HERITAGE et al., 1996; KONEMAM et al.,1999).

- Crescimento em 7% de NaCl

Transferiu-se uma alçada com o inóculo para os tubos com caldo nutriente com 7% de NaCl. Em seguida os tubos foram incubados a 37°C/24/48 h. A reação foi positiva quando observou crescimento bacteriano com a turvação do meio e aumento de biomassa (KONEMAM et al., 1999).

- Prova de Fermentação de Carboidratos (manitol, maltose, lactose, glicose, dextrose e xilose).

O processo fermentativo para a obtenção de energia pode ser realizado por diferentes espécies bacterianas e por leveduras, em que, ao hidrolisar o carboidrato, há produção de ácido com ou sem produção de gás.

Transferiu-se uma alçada do inóculo da cultura em ágar nutriente, para um tubo com ágar vermelho de fenol (MICROMED) suplementado com 1% do carboidrato a ser investigado (maltose, sacarose, lactose, glicose, dextrose ou xilose), no processo de produção de enzima hidrolítica. Incubado a 37°C com leitura de 24/48h. As cepas positivas viraram o meio de vermelho para amarelo devido à acidificação.

Resultado do sequenciamento das bactérias do presente estudo.

>19_forward

```
CATGCGATAATACATCCAGTCGATTTAGACAGAAGGGAGCTTGCTCCCGGATGTTTAAGGCGGACG
GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGAGCTAATACC
GGATAGTTCCTTGAACCGCATGGTTCAAGGATGAAAGACGGTTTTCGGCTGTCACTTACAGATGGACC
CGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGA
GGGTGATCGGCCACACTGGGACTGAGATCACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAT
CTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTCTCGGATCGTA
AAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTGCAAGAGTAAGTGCCTTGACGGTACCTAACCAG
AAAGCCACGGGTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTAGTCCGGAAT
TATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGNTCACCGGG
GGAGGGTCATTGGCAAACCTGGGAAAACCTTTTGAAGTTGCAGC
```

>19_reverse

```
AACATAAGGACTGCCGAGATTTNACACACCTGTCCTCTGTCCCCGGAAGGTAAAGCCCTATCTCTA
AGGTTGTCAGAGGATGTCAAGACTGGTAANGTCTTTCGACTTTGCTTCGAATTAACACATGCTCC
ACCGCTTGTGCGGGCCCCGATCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGATACTCCCCAGGCGG
AGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGTCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTT
ACGCGCGTGGAAGTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGNTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTTCAG
TTACAGACCAGAGAAGTCGCCTTCAGCACACATAGGTGTACCGTCCACATCATCTACGCATTTTCAC
```

CGCATAACCGTGGAATTCCACTCTCCTTCTNTCTGCACTCAAAGTTTCCCAGTTTTCCAATTGACCC
TACCCCGGTTGANGCCGGGGGCTTNTCCAGTCCAGACTTAATGACAACCGCCTGACGAGCCCTTA
ACGCCCAATNAA

>26_ forward

CGTTTNGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTTATNCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGT
AACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGNTTGTGTTGAACCG
CATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATAGCTAG
TTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACT
GGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAA
AGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGGCTCTGTTGTTAGGG
AAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGAACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGAAATTATTGGGCGTAAAA
GGGCTCGCAGGCCGGTTCTTAAGTCTGATGTGAAAAGCCCCGGCTCCACCGGGGAGGGTCATTGGA
AACTGGGGAACTTGAGTGCAGAACGAGAGAGTGGAATTCCACGTTGTAGCGGNTGAAATGCGTAGA
GATGTTGAAGGAACACCCAGTGGGCAAAGGCAACTTCTCTGGTCTGTAACCTGACGCTAGAGCGAA
GCGTGGGGGAGCGAACNGGAT

>26_ reverse

ACTCAGACACGAGCCCACGAGATCANNANGCACACCTGTCACTCTGCCCCGGAAGGTTACGTCTAT
CTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGTGTTGCTTCGAATTAACCAT
GCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCAGCCGTAACCCAGGC
GGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTT
TACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTT
ACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTGGTGTTCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACAACG
TGGAATTCACCTCTCCTCTTCTGCACTCAAAGTTCCCCAGTTTCCAATGACCCTCCCCGGTTTTGAGCC
GGGGGGCTTTCACATCAGACTTTAAGAAACCGCTGCGAGCCCTTACGCCAATAATTCCCGGACAA
CCGCTTTGCCAACCCTAACGTATTACCCGCGGGCTGCTGGCACCGTAGTTTAGCCCGTGGTTTTCTTG
GTTTAGGTACCGTCCAAGGTGCCGCCCTATTTTGAACGGACTTGTCTTCCCTAACAAAACAGGAGC
TTTAACGGATCCNGNAAAACCCTTTCATTCA

>51_ forward

TCAGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTTTTTCGGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTG
CCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGCTTGTGTTGAACCGCATGGT
TCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCATAGCTAGTTGGTG
AGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACT
GAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGA
CGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAA
GTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC

GGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGGAAC
 TTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGGA
 ACCACCCAGTGGGCGAAAGCGACTCTCTGGTCTTGTAACGCTGAGAACCGAAAGCGTGGGA
 GCGAACAGGATTTAGATACCCTGGTA

>51_ reverse

CACACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGGACGTCTATCTCTAGGATTGTCAGAGGATGTCAAGACCT
 GGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAAT
 TCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCAGCACT
 AAGGGGCGGAAACCCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT
 CCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAGAGAGTCGCCTTCGCCACTG
 GTGTTCCCTCCACATCTCTACGCATTTACCGCTACACGTGGAATTCCACTCTCTCTTCTGCACTCAA
 GTTCCCCAGTTTCCAATGACCTCCCCGGTTGAGCCGGGGGCTTTCACATCAGACTTAAGAAACCGC
 CTGCGAGCCCTTTACGCCAATAATTCCGGA
 CAACGCTTGCCACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTGGCTTTCTGGTTAGGT
 ACCGTCAAGGTGCCGCCTATTTGAACGGCACTTGTCTTCCCTAACAACAGAGCTTTACGATCCGAA
 AACCTTCATCCACTCACCGCGGCGTTGCTCCCGTCAAGACTTTCGTCCATTGCGGAAGATTCCCTACT
 GGTTGGCTTCCCGTAAGANTCTTGGGGCCGGTCTCAGTCCCCAGG

>55_ forward

AGAGACAGATAGGAGCTTGCTCCCTTAGTGCTTTTACGGCGGACAGGGGTGAGATAATCACGTGGG
 GTAATCCTGCCTGTTATGACATGNGAGTAACATCCGCGGAAACCGCGGGACGTAAATACCGCGAGT
 AGTTTGATTTGAACCGCATGGGTTACGACATAAAAGGGTGGGCGTTCGGGCCTAACCAACTTTAAC
 ATGGAATTGAACCCGGCGCGTCCGGCATATTATGGCCCTAAGGTTAGTGGTGAAGNGTAACGTGCG
 TTCTACACCAAAGGGAGAAACG

>55_ reverse

GCTATCTCTAGTGAATTGTCAGAGGAGTGTCAAGACCTGGGTAAGGGTGTCTCAGCTGTTGCGTTC
 GAAATTAACCACACTGCTGTCCTACCGCGTTGTGCTGCGGCCCCCCGCTCAAATATCCCTCTGTAG
 ATTTTCATGATCCTCTGTGCGGAGCCGTCTACATCCTCCCANGGCGGGAGATGCTGTCTAATATGCGC
 TTATGTACGTGCTAGACACATAATGAGGGGCGGAAAAACCCCCCTAATACACATTTATGTACACATC
 ATCGTCTGTTACGGGCGTGGTACATACTCAGGGGTATCTA

>60_ forward

CGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTNGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGC
 CTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGNTTGTGTTGAACCGCATGGTT
 CAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTTGGTGA
 GGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGACTG
 AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGAC
 GGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGGTTTTCCGGATCGTAAAGCTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAG

TGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCCA
 GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGC
 GGTTCCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAACTGGGGA
 TGAAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCACGTGTAAGCGGTGAAATGCGTA

>60_reverse

AGCTCACGACGATTTAGCACACCTGTCACTCTGCCCCGAAGGGTTACGTCCTATCTCTAGGATTGT
 CAGAGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCTGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGCT
 TGTGCGGGCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAGTCTTGCGACCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTA
 ATGCGTTAGCTGCAGCACTAAGGGGCGGAAACCCCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTG
 GACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAGTTACAGACCAG
 AGAGTCGCCTTCGCCACTGGTTGGTTTTCCCGTTCGCGAACAATTCCTTCCTAACCCGGCCAATTTT
 CCAAACCCTGGGCCGTTAAACCAAACCGGTTTGGGGGAAAAAATTTCCGCCAACTAGTTTTCTT
 TTCACCGTTTCCCCTTTTTATCCCCTTTGTGGGCGAAAAGCCCCTTTCCCAAAAAACACGGGTTT
 TTTATGC

>69_forward

TAGAATGGATTAGAGCTTGCTCNTTATGAAGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACC
 TGCCATAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATAACATTTTGAACCGCATG
 GTTCGAAATTGAAAGGCGGCTTCGGCTGTCACTTATGGATGGACCCGCGTCGCATTAGCTAGTTGGT
 GAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACACTGGGA
 CTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGCAATGGACGAAAGTCT
 GACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGCTTTCGGGTCGTAAACTCTGTTGTTAGGGAAGAAC
 AAGTGCTAGTTGAATAAGCTGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGC
 CAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAAGCGTTATCCGGAATTCATTGGGCGTAAAGGCCGCGC
 GCAGGTGGGTTNCTTTAAGTCCTGATTGGTGAAGGCCACGGCTCACACCGGTGGGAGGGGTC
 ATTGGCGAAAACCTGGGGAGAC

>69_reverse

GGCTTACACACCTGTCACTCTGCTCCGAGGGGTAGCCCTATCTCTAGGGTTTCAGAGGATGTCAAGA
 CTGGTAACGTTCTTCGAGTTGCTTCGAATTAACCACATGCTCCACCGTTGTGCGGGCCCCCGTCAA
 TTCCTTTGAGTTCAGCCTTGCGGCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAACTTCAGCACTA
 AAGGGCGGAAACCCTCTAACACTTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCC
 TGTTTGCTCCCCACGCTTTCGCGCCTCAGTGTGAGTTACAGACCAGAAAGTCGCCTTCGCCACTGGT
 GTTCCTCCATATCTCTACGCATTTCAACCGCTACACATGGAATTCACCTTTCCTTCTGCACTCAAG
 TCTCCCAGTTTCCAATTGACCCTCCACGGTTGAGGCCGTGGGCCTTTCACATCATGACTTAAGAAAA
 CCACCTGCGCGCGCTTTACGCCAATAATCCGGATAACGCTTGCCACCTACGTATTACCTGTGGGC
 TGCTGGCACGTAGTTAGCCGGTGGCTTTCTGG

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)