

**KARINA PASCHOAL GÓES**

**TÍTULO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
DEGRADADORAS DE ACEFATO**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação do Departamento de  
Microbiologia, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**São Paulo**

**2009**

**KARINA PASCHOAL GÓES**

**TÍTULO: ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS  
DEGRADADORAS DE ACEFATO**

**Tese apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação do Departamento de  
Microbiologia, para obtenção do  
Título de Doutor em Ciências.**

**Área de concentração: Microbiologia**

**Orientador: Prof. Dr. René Peter  
Schneider**

**São Paulo**

**2009**

## RESUMO

GÓES, K. P. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de acefato**. 180 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Quatro linhagens capazes de crescer com acefato foram isoladas a partir de solos agrícolas com históricos de aplicação de deste composto. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Pandoreae* sp foram identificadas através da análise do rDNA 16S e perfil de ácidos graxos de membrana. O protocolo analítico para determinação de acefato e metamidofós em meio de cultura baseado na extração com acetato de etila e sulfato de sódio seguido da análise por GC/MS foi desenvolvido e validado. *Rhodococcus* sp foi o isolado mais eficiente na degradação de acefato, removendo 99.24% deste composto em meio de cultura com acefato como única fonte de carbono, seguido da acumulação e degradação de metamidofós. Quando avaliados com acefato como fonte combinada de carbono e nitrogênio, estes organismos degradaram 19% de acefato com formação de 17% de metamidofós. *Staphylococcus* sp apresentou 21% de degradação de acefato utilizando-o como fonte de carbono e nitrogênio, mas não manteve o crescimento quando em presença deste composto como fonte de carbono. *Stenotrophomonas maltophilia* e *Pandoreae* sp não mantiveram a capacidade de crescer com acefato como única fonte de carbono isoladamente. Estas linhagens apresentaram crescimento em acefato como fonte de nitrogênio e enxofre, porém, as análises de GC/MS demonstraram que não houve degradação nestas condições.

**Palavras-chave:** Acefato. Biodegradação. GC/MS. Organofosforado.

## ABSTRACT

GÓES, K. P. **Isolation and Characterization of Acephate degrading bacteria**. 180 p. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Programa de Pós-Graduação, Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Four strains of microorganisms capable of growth on acephate were isolated from agricultural soil samples with a history of acephate application. *Stenotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus* sp, *Staphylococcus* sp and *Pandoreae* sp were identified based on 16S rRNA gene sequencing and fatty acid profiling. An analytical protocol for acephate and metamidophos determination in growth media based on liquid-liquid extraction with ethylacetate and sodium sulphate and subsequent analysis by GC/MS was developed and validated. *Rhodococcus* sp was the most efficient acephate degrader of the isolates, it removed 99.24% of acephate from defined growth media when the compound was provided as sole carbon source, with transient accumulation of metamidophos. When provided as a combined carbon and nitrogen source, the organisms degraded 19% of acephate with formation of metamidophos (17%). *Staphylococcus* sp degraded 21% of acephate when provided as sole nitrogen and carbon source but did not grow on the compound as a sole source of carbon. *Pandoreae* sp and *Stenotrophomonas maltophilia* failed to grow on acephate as sole source of carbon after three successive subcultivations in defined medium. These strains grew in media where the pesticide was provided as a combined nitrogen and carbon source, but no acephate biodegradation could be demonstrated in these instances.

**Key words:** Acephate. Biodegradation. GC/MS. Organophosphorus.

# 1 INTRODUÇÃO

A produção agropecuária moderna é altamente dependente do uso intensivo de agrotóxicos (TREVIZAN et al., 2005). O Brasil se transformou nas últimas décadas em um dos maiores consumidores de agrotóxicos em virtude da expansão da fronteira agrícola e da modernização da tecnologia de produção vegetal e animal. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Química Fina, Biotecnologia e suas Especialidades (ABIFINA), o faturamento do segmento agroquímico saltou de 1,2 bilhões em 2002 para 4,4 bilhões de reais em 2004, sendo que, em 2004, 40% dos produtos vendidos eram herbicidas, 31% fungicidas, 24% inseticidas e 5% outros (FARIA et al., 2007). Em 2003, o Brasil foi classificado como oitavo país entre os maiores consumidores de pesticidas e o quarto maior mercado produtor de pesticidas no mundo. Segundo a Associação Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2006, o Brasil está colocado como o segundo maior consumidor de agrotóxico do mundo.

## 1.1 Organofosforados

Atualmente diferentes classes químicas de pesticidas (organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros) são utilizadas como herbicidas, acaricidas, inseticidas, fungicidas, etc. Dentre estes, destaca-se a classe dos organofosforados, que vem sendo cada vez mais aplicada, devido a sua menor persistência no ambiente e melhor eficácia em relação aos organoclorados.

Estes compostos são derivados do ácido fosfórico, do ácido tiofosfórico ou do ácido ditiofosfórico, com amplo grau de toxicidade para humanos, devido a sua capacidade de inibição da acetilcolinesterase (AChE), enzima que promove a hidrólise da acetilcolina em colina e ácido acético (GALLO e LAWRY, 1990). Sendo assim, apesar da importância na economia, o uso destes compostos oferece riscos à saúde humana e à sobrevivência de outras espécies do ecossistema, alterando os equilíbrios existentes nas cadeias tróficas, causando diminuição e até o desaparecimento de espécies naturais do ambiente.

Dentre estes compostos, o acefato ( $C_4H_{10}NO_3PS$ ), quimicamente conhecido como O,S-dimetil-N-acetil fosforamidotioato, e o metamidofós ( $C_2H_8NO_2PS$ ), conhecido como O,S-dimetil fosforamidotioato, encontram-se como ingredientes ativos comercializados com mais de 100 diferentes tipos de formulações, com boas propriedades inseticidas e acaricidas (RAININA et al., 1996).

## 1.2 Propriedades físicas, químicas e toxicológicas do Acefato e do Metamidofós

Acefato ( $C_4H_{10}NO_3PS$ ) e Metamidofós ( $C_2H_8NO_2PS$ ) na forma pura apresentam semelhanças em suas fórmulas moleculares e estruturais sendo que ambos têm um centro fosfórico ao qual estão ligados um grupo metoxi ( $CH_3O-$ ) e um grupo tiometil ( $CH_3S-$ ) eletrofilico (Figura 1).

O acefato é um inseticida organofosforado, quimicamente conhecido como O,S-dimetil-N-acetil fosforamidotioato, (ANDREI, 1999) sendo obtido através da N-acetilação do metamidofós (SINGH, 1984; HUSSAIN, 1987). Possui dose letal (DL) 50 de 945 mg/kg para machos de ratos albinos e 866 mg/kg para fêmeas; DL 50 aguda dérmica > 2.000 mg/kg para coelhos (TOMLIN, 1995). Tem propriedades físico químicas tais como, pressão de vapor 0,226 mPa (24 °C); Kow = 0,13; solubilidade em água 790 g/l, em acetona 151, etanol > 100, acetato de etila 35, benzeno 16, hexano 0,1 (todos em g/l, 20 °C), ponto de fusão 82 – 89 °C e peso molecular 183,1 g/mol (TOMLIN, 1995; WARE, 1990).

No Brasil é comercializado com os nomes de Orthene 750BR, Acefato Fersol 750PS, entre outros (ANDREI, 1999), estando registrado para uso em 18 culturas, especialmente para hortaliças (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários).

O metamidofós é um inseticida acaricida organofosforado, quimicamente conhecido como O,S-dimetil fosforamidotioato (ANDREI, 1999). Possui DL50 aguda oral de 20 mg/kg para ratos albinos, de 10 – 30 mg/kg para coelhos, e DL50 aguda dérmica de 130 mg/kg para ratos albinos (TOMLIN, 1995), portanto um inseticida muito mais tóxico do que o composto (acefato) que o origina. Tem propriedades físico químicas tais como, pressão de vapor 2,3 mPa (20 °C); pKow = 0,8; solubilidade em água > 200 g/l (20 °C), isopropanol > 200, diclorometano < 200, tolueno 2 - , hexano 0,1 – 1 (todos em g/l, 20 °C), ponto de fusão 44,5 °C e peso molecular 141,1 g/mol (TOMLIN, 1995; WARE, 1990).

No Brasil é comercializado com os nomes Tamaron, Hamidop 600, Metamidofós Fersol 600, entre outros (ANDREI, 1999), estando registrado para uso em 12 culturas, especialmente hortaliças (Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários).



pimentão. Já para o metamidofós as dosagens estão entre 0,01 mg/kg para feijão e soja a 0,3 mg/kg para tomate.

#### **1.4 Metodologias de análise**

Devido à grande utilização de pesticidas no controle de pragas em diferentes culturas de frutas e vegetais, muitos estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de detectar multiresíduos destes compostos em diversas matrizes, no entanto a análise de amostras de água e solo ainda encontra muitas dificuldades.

A análise de pesticidas normalmente requer o isolamento e concentração dos compostos de interesse da matriz, antes da análise. Para isso, a extração líquido-líquido (LLE) tem sido mais comum na preparação das amostras, no entanto, este procedimento requer grande volume de solventes de alta pureza, que são caros e potencialmente tóxicos, além de ser um processo demorado, tornando-o muito custoso. Nesse sentido, nos últimos anos vem sendo desenvolvidos métodos de extração por injeção de fluxo como a extração por fase sólida (SPE), micro-extração por fase sólida (SPME), *stir bar sorptive extraction* (SBSE) e extração acelerada com solvente (ASE) (BASHEER et al., 2007; HOLLAND e MALCOM, 1992; SCHENCK e LEHOTAY, 2000; ERNEY e POOLE, 1993; AHAMED, 2001; GOBO, 2004). Na tabela 1 observa-se as diferentes técnicas de extração de acefato e metamidofós e suas respectivas porcentagens de recuperação.



**Tabela 1.** Técnicas de extração para acefato e metamidofós e suas respectivas porcentagens de recuperação.

Composto	Método de Extração		Solvente	Purificação	Matriz	Método de análise	Faixa de análise	Autor
	Método de Extração	% Recuperação						
Acefato	SBSE	-	Metanol	-	Vegetais	GC/MS	5 ng/ml	OCHIAI et al., 2005
Metamidofós	SBSE	-	Metanol	-	Vegetais	GC/MS	5 ng/ml	OCHIAI et al., 2005
Acefato	ASE	72,9	Acetona/ Diclorometano (1:1)	GPC / SPE	Vegetais	GC/FPD	0,01 - 0,50 µg/ml	BEIZHEN et al., 2008
Metamidofós	ASE	72,1	Acetona/ Diclorometano (1:1)	GPC / SPE	Vegetais	GC/FPD	0,01 - 0,50 µg/ml	BEIZHEN et al., 2008
Acefato	SPME	55,0 - 77,0	Acetona	-	Vegetais	GC/NPD	0,1 a 1,0 mg/kg	VOLANTE et al., 2008
Metamidofós	SPME	30,0 - 48,0	Acetona	-	Vegetais	GC/NPD	0,1 a 1,0 mg/kg	VOLANTE et al., 2008
Acefato	LLE	99,0 - 118,0	Acetato de Etila	-	Frutas e Vegetais	GC/NPD	0,08 - 0,2 mg/kg	GOBO et al., 2004
Metamidofós	LLE	88,0 - 117,0	Acetato de Etila	-	Frutas e Vegetais	GC/NPD	0,08 - 0,2 mg/kg	GOBO et al., 2005
Metamidofós	LLE	95,5 - 116,0	Acetonitrila	-	Água	GC/AFID	0,1 a 1,0 mg/l	SZETO et al., 1982
Acefato	LLE	97,7 - 102,0	Acetonitrila	-	Água	GC/AFID	0,1 a 1,0 mg/l	SZETO et al., 1982
Metamidofós	SPE	97,2	Acetonitrila	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Acefato	SPE	72,3	Acetonitrila	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Metamidofós	SPE	81,4	Acetato de Etila	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Acefato	SPE	71,6	Acetato de Etila	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Acefato	SPE	78,7	Cloreto de Metileno	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Metamidofós	SPE	84,4	Cloreto de Metileno	-	Água	GC/MS	100,0 - 150,0 µg/ml	ST-AMAND e GIRARD 2004
Acefato	LLE	75,1 - 82,1	Acetato de Etila	DSPE	Uva	LC/MS/MS	5,0 - 50,0 ng/g	BANERJEE et al., 2007
Metamidofós	LLE	75,2 - 83,8	Acetato de Etila	DSPE	Uva	LC/MS/MS	5,0 - 50,0 ng/g	BANERJEE et al., 2008
Acefato	SPE	86,3 - 95,3	-	-	Água	HILIC/MS/MS	0,05 - 0,5 µg/l	HAYMATA et al., 2008
Metamidofós	SPE	72,0 - 83,5	-	-	Água	HILIC/MS/MS	0,05 - 0,5 µg/l	HAYMATA et al., 2008
Acefato	LLE	76,0 - 102,0	Acetato de Etila	-	Solo	GC/FPD	0,01 - 1,0 mg/kg	CHAI et al., 2008

Como verificado na tabela acima, a extração por fase sólida de pesticidas altamente polares não tem obtido resultados tão satisfatórios quanto à extração líquido-líquido.

Hayama et al. (2006) trataram as amostras de água em cartuchos de carbono ativado no intuito de minimizar possíveis efeitos de matriz, obtendo recuperações de 83 a 94% e 72 a 84% para acefato e metamidofós, respectivamente. Em geral, carbono ativado tem sido efetivo nos métodos de extração de compostos muito hidrofílicos. Kiguchi e Saitoh (2000), obtiveram recuperações entre 73 a 109% na faixa de 0,2 a 2 µg/l de pesticidas polares como acefato e metamidofós a partir de amostras de água utilizando discos de carbono ativado.

Gebert e GeiB (2006) testaram diferentes colunas de extração por fase sólida para metamidofós, encontrando como melhor resultado a extração em carboxem 1000, com 60% de recuperação.

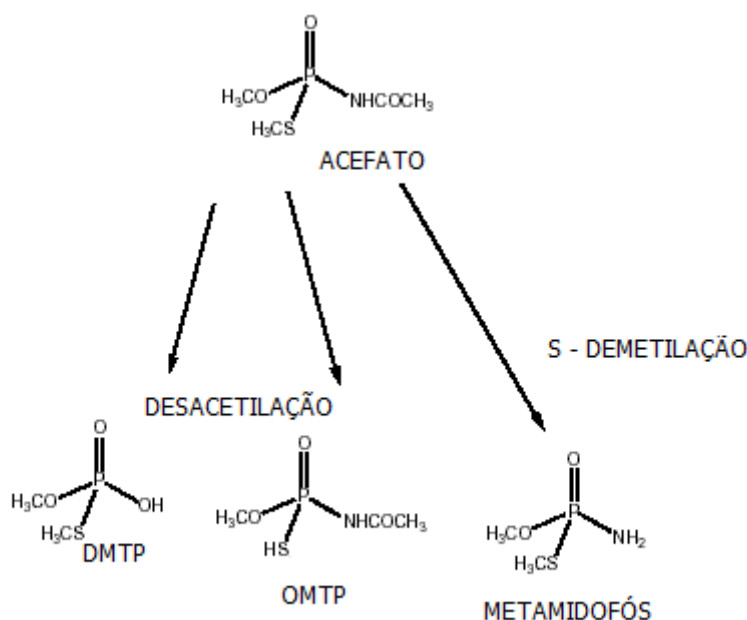
Estas metodologias também vêm sendo aplicadas para análises de amostras de plasma e urina, mas apresentam os mesmos problemas de recuperação devido à polaridade destes compostos, em especial o acefato (INOUE et al., 2007).

Com relação aos solventes utilizados, o acetato de etila é praticamente imiscível em água, o que facilita a remoção desta do extrato de acetato de etila por um agente secante, como sulfato de sódio. Em contraste, a acetona precisa da adição de um solvente não polar, como diclorometano, levando a diluição diminuição na recuperação de analitos muito polares. No caso da acetonitrila, o uso de uma combinação de sais apropriada pode promover uma separação das fases bem definida, sem diluição e com alta recuperação de pesticidas polares (MASTOVSKÁ e LEHOTAY, 2004).

Embora estas análises convencionais sejam exatas, elas requerem uma grande quantidade de solventes orgânicos, tempo de preparo, e um analista experiente na preparação da amostra, na operação e interpretação dos dados. Em contraste, imunoenaios e ensaios de inibição enzimática são rápidos, mais baratos e permitem amostragem direta. Os ensaios enzimáticos, em particular, são utilizados para uma rápida seleção de inseticidas organofosforados e carbamatos em amostras agrícolas, entretanto, como a seletividade desta técnica é baseada na reação antígeno-anticorpo, isto dificulta a diferenciação entre os pesticidas organofosforados (LEE et al., 2003). No estudo realizado por este autor, o acefato foi quantificado por ELISA e GC/FPD a partir de amostras de água, frutas e verduras, demonstrando que a metodologia de ELISA pode ser utilizada para análise de resíduos de acefato, visto que esta apresentou recuperação 72 a 118%, para amostras de água, enquanto a análise por GC/FPD apresentou recuperação entre 60 e 120% para as mesmas amostras.

## 1.5 Comportamento ambiental

A aplicação aérea do acefato pode resultar em contaminação de lagos e riachos, levando a um impacto negativo em insetos aquáticos e peixes. Na água este composto pode ser hidrolisado principalmente por S-demetilação a produtos inócuos como DMTP (O,S-dimethyl phosphorothiolate) e de OMPT (O-methylacetyl phosphoramidothiolate) e, por desacetilação, a produtos mais tóxicos do que os iniciais, como metamidofós, pela combinação de fatores como microrganismos, luz solar, pH, entre outros (CHUKWUDEBE et al., 1984; FOCHT e JOSEPH, 1974) (Figura 2).



**Figura 2.** Possíveis metabólitos formados durante a hidrólise de acefato (CHUKWUDEBE et al., 1984).

Com relação ao transporte de pesticidas em solos, o mesmo também é altamente dependente de interações envolvendo processos químicos, físicos e biológicos. A sorção em superfícies minerais imóveis é um fator determinante ao processo de mobilidade no ambiente, sendo que, um grande número de fatores contribui para o particionamento de pesticidas em soluções aquosas e fases sólidas, incluindo, em geral, as condições das soluções (como pH e concentração de pesticidas), tipo de solo, porcentagem de matéria orgânica natural e as características minerais. Em solos superficiais, geralmente a porcentagem de matéria orgânica natural é alta, influenciando na sorção e na atividade microbiana (YU e ZHOU, 2005).

O estudo de Koleli et al. (2007) avaliou o comportamento do metamidofós em diferentes composições do solo e os resultados obtidos por ele indicaram que o pH da solução de metamidofós aumenta a porcentagem de sorção do mesmo. Isto indica que os grupamentos aminas podem ser responsáveis pela sorção do metamidofós. Outros resultados sugerem que as superfícies minerais, como argila e óxidos de alumínio e ferro são bons sorventes.

Marchetti (2004) verificou que o acefato é rapidamente mineralizado a CO<sub>2</sub> apresentando meia-vida de apenas 7,8 dias no solo. Além disso, o inseticida foi pouco adsorvido aos colóides do solo, com valor de *K<sub>oc</sub>* de 56, o que indica que é um composto altamente móvel, não sendo retido no solo. Além disso, mesmo após 120 dias do tratamento, foram encontrados resíduos apenas até 10 cm de profundidade do perfil do solo e em quantidade que não excedeu os 20% do total aplicado. No entanto, mesmo sendo altamente solúvel e pouco adsorvido, o composto não foi encontrado na água lixiviada das colunas de solo.

Chae et al. (2008), avaliaram a taxa de dissipação de acefato e cloropirifós em solos tropicais superficiais. A taxa de dissipação do acefato foi muito maior do que de cloropirifós, visto que em 7 dias 80% do acefato inicial havia dissipado. Durante este período, apenas 30% do cloropirifós havia dissipado. Após 21 e 84 dias o acefato e o cloropirifós, respectivamente, já não podiam mais ser detectados. Metabólitos de ambos os compostos, metamidofós e 3,5,6-tricloropiridinol foram detectados durante as análises.

Estudos realizados em solos subtropicais de Taiwan demonstraram que as taxas de adsorção, meia vida e dissipação do acefato e do metamidofós são influenciadas pela temperatura, pH e composição do solo.

Temperaturas mais elevadas aumentam a adsorção de ambos os pesticidas em solos com pH e composições diferentes, porém, tanto o metamidofós como o acefato, apresentaram maior adsorção em solos neutros. O metamidofós foi rapidamente degradado nestes solos, a temperaturas entre 20 °C a 30 °C, possuindo meia vida com intervalos de 1,11 a 1,61 dias. A meia vida do acefato foi maior, variando de 4,52 a 16,43 dias, nas mesmas condições de temperatura, o que demonstra que o acefato foi mais persistente do que o metamidofós. A mobilidade de acefato no solo foi maior do que a do metamidofós, indicando que o acefato contamina lençóis freáticos mais facilmente do que metamidofós nas condições ambientais do estudo (YEN et al., 2000).

Kleier (1994) e Malato et al. (1999) demonstraram a importância da radiação solar na fotodecomposição de pesticidas e seus resíduos sob condições de campo e estufa. Segundo o

autor, quando aplicado no campo os pesticidas agem sob condições mais adversas, e imprevisíveis, sendo um dos fatores mais importantes a luz solar, especialmente a radiação ultravioleta, absorvida por muitos pesticidas, sendo suficientemente energética para iniciar a fotodegradação. Sendo assim, os pesticidas aplicados na estufa estão mais protegidos. Han et al. (2008) utilizaram nano  $\text{TiO}_2$  como catalisador na degradação de acefato por fotocatalise, avaliando a influência do substrato e a concentração do catalisador para a degradação deste pesticida, observando que melhor taxa de degradação com adição de 4 g/l de  $\text{TiO}_2$ . Este trabalho demonstra a decomposição do acefato através a quebra inicialmente na ligação C-N e P-N, seguido da quebra das ligações P-S, P-O e P-C, formando ao final  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_3\text{PO}_4$ . Aproximadamente 100% dos átomos de enxofre foram transformados em  $\text{SO}_4$ , contudo, apenas 3% dos átomos de nitrogênio e 2% dos átomos de fósforo foram transformados em  $\text{NO}_3$  e  $\text{PO}_4$ .

Um estudo com objetivo de analisar o comportamento do acefato em águas com e sem sedimento, demonstrou que as taxas de degradação de acefato tiveram um aumento considerável quando as amostras de água foram tratadas e incubadas na presença de sedimentos e se mostrou persistente na ausência destes. A hidrólise do acefato ocorre melhor em meio alcalino (pH 8.2) em temperaturas entre 20 a 30 °C, sendo que, 4,5% do acefato aplicado é convertido em metamidofós. A taxa de degradação do acefato, em águas de riacho, foi de 55% após 50 dias, enquanto que, em águas de lagoa, esta taxa foi de 20% após 42 dias (SZETO et al., 1979).

## **1.6 Biodegradação de acefato e metamidofós**

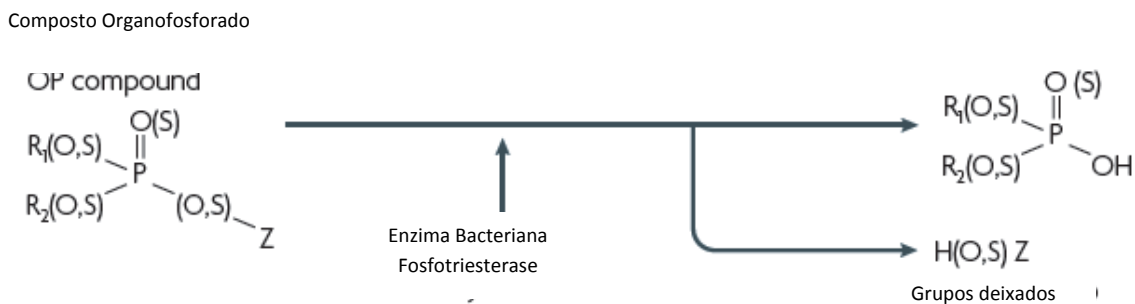
As bactérias possuem importante papel na transformação de pesticidas. Mesmo os mais persistentes podem ser metabolizados por várias espécies de bactérias, através da utilização destes compostos como fonte de energia ou nutrientes (carbono, nitrogênio, fósforo ou enxofre), por mineralização (degradação completa, formando dióxido de carbono ou metano), detoxificação (conversão em metabólitos não tóxicos), cometabolismo (vários microrganismos participam da degradação enquanto crescem e consomem outros compostos) e ainda ativação (moléculas não tóxicas podem ser convertidas a moléculas tóxicas (KUMAR et al., 2007). A mineralização completa é mais provável em consórcios microbianos do que em culturas puras (SCHRIJVER e MOT, 1999).

Em geral, estes compostos não são tóxicos para as bactérias, visto que existem muitos trabalhos demonstrando a biodegradação dos mesmos (SINGH, 2008b). Em 1973 foi isolada de solo a primeira bactéria capaz de degradar compostos organofosforados, identificada como *Flavobacterium sp* ATCC 27551 (SETHUNATHAN e YOSHIDA, 1973; CALDWEL e RAUSHEL, 1999). A partir daí, alguns fungos e cianobactérias foram isolados utilizando compostos organofosforados como fonte de carbono, nitrogênio ou fósforo (SINGH, 2008b).

Durante os últimos 30 anos aumentaram as pesquisas envolvendo os mecanismos moleculares na degradação microbiana de pesticidas. Os genes envolvidos foram mapeados, em sua maioria, em plasmídeos, no entanto, alguns foram encontrados no cromossomo. Na maioria dos casos esses genes são carregados por transposons (SCHRIJVER e MOT, 1999).

A hidrólise microbiana das ligações P-O alquil ou P-O aril catalisada pela fosfo(tri, di ou mono)esterase (KERTESZ et al., 1994) (Figura 2) tem sido descrita como a principal via de detoxificação de compostos organofosforados. No entanto, o modo de regulação desta enzima depende do composto a ser utilizado para o crescimento celular, como fósforo, carbono ou enxofre. A fosfo(tri, di ou mono)esterase tem se mostrado eficiente catalisador da hidrólise de diferentes pesticidas organofosforados clivando as ligações P-O, P-F, P-S e P-(CN) (MULCHANDANI et al., 2001a,b; LAI et al., 1995; LAI et al., 1994), e foi isolada de bactérias como *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium sp*, *Arthrobacter sp* (OHSHIRO et al., 1999; MULCHANDANI et al., 2001; LAI et al., 1995).

Chae et al. (1995) avaliaram a influência de cofatores na afinidade da fosfotriesterase com o acefato, e relataram que a Zn-fosfotriesterase foi a que apresentou maior afinidade. No entanto, esta afinidade, não é suficiente para uma boa ação enzimática, considerando que a eficiência catalítica da enzima para a clivagem da ligação P-S do acefato foi reduzida ( $K_{cat}=2,85 \text{ s}^{-1}$ ) devido à baixa afinidade pelo acefato como substrato ( $K_m=160 \text{ mM}$ ), como demonstra Lai et al. (1995). Este valor indica que são necessárias altas concentrações de acefato no ambiente para que a fosfotriesterase tenha uma atividade sobre este substrato.



**Figura 3.** Via metabólica proposta para degradação de compostos organofosforados através da enzima bacteriana fosfotriesterase (SINGH, 2008a,b).

Muitas pesquisas têm sido voltadas para a hidrólise destes compostos devido à alta redução da toxicidade dos mesmos para mamíferos após esta reação. Os passos hipotéticos da hidrólise das ligações fosfoesters podem ser postulados pela produção de monoesteres e finalmente pelo fosfato inorgânico, no entanto esta via não foi especificamente estudada (SINGH e WALKER, 2006). A fosfomonoesterase e a fosfodiesterase, que degradam metil e dimetil fosfato, respectivamente, foram identificadas em *Klebsiella aerogenes* (WOLFENDEN e SPENCE, 1967) e são produzidas somente na ausência de fosfato inorgânico no meio de cultura.

A enzima final desta via de degradação é uma fosfatase alcalina bacteriana, a qual pode hidrolisar fosfatos monoalquílicos simples, e também é regulada pelo nível de fosfato disponível para a célula. Um mecanismo similar de metabolismo foi descrito para os fosfonatos (KERTESZ et al., 1994). A via pela qual o metabolismo é regulado depende fortemente do papel do organofosforado para os organismos estudados. Frequentemente estes compostos são usados para suprir apenas a necessidade da célula de um elemento, carbono, fósforo ou enxofre, e o gene pode não ser expresso em resposta à falta de outros elementos (KERTESZ et al., 1994). Por exemplo, uma linhagem de *Pseudomonas stutzeri*, isolada para utilização de paration como fonte de carbono, liberou dietilfosforotionatos quantitativamente e não pôde metabolizá-los mais tarde, mesmo na ausência de enxofre ou fósforo (DAUGHTON e HSIEH, 1977). Da mesma forma, uma variedade de isolados, capazes de utilizar pesticidas fosforotionatos e fosforoditionatos como única fonte de fósforo, foram incapazes de utilizá-los como única fonte de carbono (ROSEMBERG e ALEXANDER, 1979). Shelton (1988) isolou um consórcio com capacidade de utilizar ácido dietiltiofosfórico como fonte de carbono, mas o consórcio foi incapaz de utilizá-lo como fonte de enxofre ou fósforo. Kertesz et al. (1994) explica uma possível razão para esse fenômeno. Eles sugerem que as condições ambientais do enriquecimento dos isolados são cruciais na seleção das cepas

não só para a função da enzima, mas também para os mecanismos específicos de regulação das vias de degradação.

Wang et al. (2008) avaliaram os efeitos de degradação de uma nova hidrolase (OPHC2), isolada de *Pseudomonas pseudoalcaligenes* em nove organofosforados (cloropirifós, isocarbofós, malation, dimetoato, metamidofós, metidation, fenitrothion, foxim e paration). Os resultados indicaram degradação de 100% para cloropirifós, isocarbofós e foxim, 99,87% para fenitrothion, 94,31% para malation, 78,55% para dimetoato, 87,93% para metidation e 71,55% para metamidofós.

A tabela 2 apresenta os principais compostos e os respectivos microrganismos degradadores.



**Tabela 2.** Microrganismos isolados e seus compostos de degradação.

Composto	Microrganismo	Modo de Degradação	Referencia
Cloropirifós	<i>Enterobacter sp</i>	Catabolismo (C e P)	Singh et al., 2003
	<i>Flavobacterium sp</i> ATCC27551	Cometabolismo	Mallick et al., 1999
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cometabolismo	Serdar et al., 1982
	<i>Micrococcus sp</i>	Cometabolismo	Guha et al., 1997
Paration	<i>Flavobacterium sp</i> ATCC27551	Cometabolismo	Sethunathan e Yoshida , 1973
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cometabolismo	Serdar et al., 1982
	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Cometabolismo	Daughton e Hsieh, 1977
	<i>Arthrobacter spp</i>	Cometabolismo	Nelson et al., 1982
	<i>Agrobacterium radiobacter</i>	Cometabolismo	Horne et al., 2002b
	<i>Bacillus spp</i>	Cometabolismo	Nelson et al., 1982
	<i>Pseudomonas sp</i>	Catabolismo (C e N)	Siddaramappa et al., 1973
	<i>Pseudomonas spp</i>	Catabolismo (P)	Rosenberg & Alexander., 1979
	<i>Arthrobacter sp</i>	Catabolismo (C)	Nelson et al., 1982
	<i>Xanthomonas sp</i>	Catabolismo (C)	Rosenberg e Alexander, 1979
	Metilparation	<i>Pseudomonas sp</i>	Cometabolismo
<i>Bacillus sp</i>		Cometabolismo	Sharmila et al., 1989
<i>Plesimonas sp</i> M6		Cometabolismo	Zhongli et al., 2001
<i>Pseudomonas putida</i>		Catabolismo (C)	Rani e Lalitha-kumari, 1994
<i>Pseudomonas sp</i> A3		Catabolismo (C e N)	Zhongli et al., 2002
<i>Pseudomonas sp</i> WBC		Catabolismo (C e N)	Yali et al., 2002
<i>Flavobacterium balustinum</i>		Catabolismo (C)	Somara e Siddavattam, 1995
<i>Pseudomonas spp</i>		Catabolismo (P)	Kertesz et al., 1994a
Glifosato	<i>Alcaligene sp</i>	Catabolismo (P)	Tolbot et al., 1984
	<i>Bacillus megaterium</i> 2BLW	Catabolismo (P)	Quinn et al., 1989
	<i>Rhizobium sp</i>	Catabolismo (P)	Liu et al., 1991
	<i>Agrobacterium sp</i>	Catabolismo (P)	Wacket et al., 1987
	<i>Arthrobacter sp</i> GLP	Catabolismo (P)	Pipke et al., 1987
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Catabolismo (P)	Pike e Amrhein, 1988
	<i>Geobacillus caldxylosilyticus</i> T20	Catabolismo (P)	Obojska et al., 2002
	<i>Flavobacterium sp</i>	Catabolismo (P)	Balthazor e Hallas, 1986
	<i>Nocardiodes simplex</i> NRRL B24074	Cometabolismo	Mulbry, 2000
	<i>Agrobacterium radiobacter</i> P230	Cometabolismo	Horne et al., 2002b
Coumafós	<i>Pseudomonas monteilli</i>	Cometabolismo	Horne et al., 2002c
	<i>Flavobacterium sp</i>	Cometabolismo	Adhya et al., 1981
	<i>Pseudomonas diminuta</i>	Cometabolismo	Serdar et al., 1982
	<i>Nocardia strain</i> B-1	Catabolismo (C)	Mulbry, 1992
	<i>Pseudomonas spp</i>	Catabolismo (C)	Bhadbhade et al., 2002b
	<i>Bacillus spp</i>	Catabolismo (C)	Rangaswamy e Venkateswaralu, 1992
Monocrotofós	<i>Arthrobacter spp</i>	Catabolismo (C)	Bhadbhade et al., 2002b
	<i>Pseudomonas mendocina</i>	Catabolismo (C)	Bhadbhade et al., 2002a
	<i>Bacillus megaterium</i>	Catabolismo (C)	Bhadbhade et al., 2002b
	<i>Arthrobacter atrocyaneus</i>	Catabolismo (C)	Bhadbhade et al., 2002b
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Catabolismo (P)	Singh e Singh, 2003
	<i>Clavibacter michiganense</i> SBL11	Catabolismo (P)	Singh e Singh, 2003
	<i>Flavobacterium sp</i>	Cometabolismo	Adhya et al., 1981
Fenitrotion	<i>Arthrobacter aurescenes</i> TW17	Catabolismo (C)	Ohshiro et al., 1996
	<i>Burkholderia sp</i> NF100	Catabolismo (C)	Hayatsu et al., 2000
	<i>Flavobacterium sp</i>	Catabolismo (P)	Sethunathan e Yoshida, 1973
Diazinon	<i>Pseudomonas spp</i>	Cometabolismo	Rosenberg e Alexander, 1979
	<i>Arthrobacter spp</i>	Cometabolismo	Barik et al., 1979

Símbolo do nutriente utilizado durante a degradação: C (carbono), P (fósforo) e N (nitrogênio) (SINGH e WALKER, 2006).

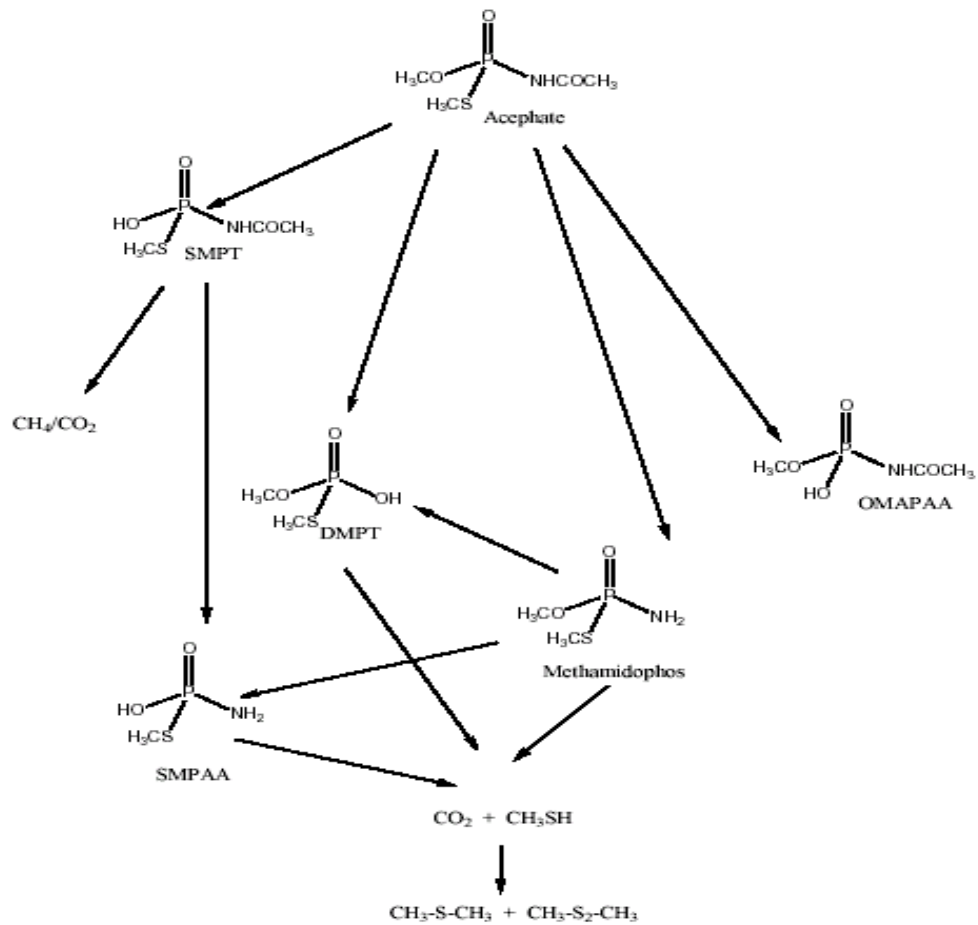
Como se observa na tabela 2 não existem relatos de microrganismos degradadores de acefato e metamidofós até o momento, apenas estudos sobre o efeito que a presença destes compostos exerce sobre o crescimento microbiano.

Focht e Joseph (1974) avaliaram o tratamento de solos com acefato e metamidofós (20 mg/l por 50 dias) e verificaram que este tratamento não afetou substancialmente os níveis de

população de microorganismos, o que demonstra que nenhum dos dois pesticidas teve efeito adverso sobre os microorganismos do solo, não alterando a amonificação, nitrificação, oxidação de enxofre, e respiração dos microorganismos.

Em contrapartida, Wang et al. (2008) verificaram que aplicações de metamidofós ao longo de quatro anos afetaram significativamente a comunidade microbiana do solo, reduzindo a biomassa e a diversidade genética e aumentando o catabolismo. Neste caso observou-se uma redução nas bactérias Gram positivas e fungos presentes no solo, demonstrando a toxicidade deste composto para estes organismos e a adaptação de bactérias Gram negativas a esta situação de stress. O aumento do catabolismo indica uma possível degradação deste composto por estas bactérias.

Outros estudos demonstraram que solos aeróbios possuem forte potencial de degradação destes compostos, com meia vida de 0,5 a 13 dias para o acefato e 0,583 dias para o metamidofós, enquanto que, em solos anaeróbios, a meia vida do acefato foi de 5,2 a 6,4 dias. Neste estudo não foi descrito o potencial de degradação de metamidofós em condições anaeróbias (FAN e WALTERS, 2002). Os produtos de degradação do acefato em solos aeróbios e anaeróbios foram metamidofós, monometilacetilfosforamidato (OMAPAA) e O,S-dimetil O-fosforotioato (DMTP), e seus intermediários até CO<sub>2</sub> (Figura 4).



**Figura 4.** Metabolismo proposto para degradação do acefato em solo (FAO, 2003).

Li et al. (2008), avaliaram a influência do tratamento com diferentes concentrações de metamidofós em microcosmos. Os resultados da contagem por placa após 60 dias de microcosmo na maior concentração (250 mg/kg) indicaram um estímulo significativo na população de fungos. A análise por DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis) indicou que os perfis de fungos cultiváveis aumentaram após uma semana de incubação, entretanto, o índice de diversidade diminuiu nesta semana.

Jilane e Khan (2004) avaliaram a resposta no crescimento de *Pseudomonas* à diferentes concentrações de metamidofós onde verificaram que apenas concentrações na faixa de 80 a 200 mg/l apresentaram-se como estimulantes durante 24 horas de incubação. A partir de 800 mg/l observou-se resistência no crescimento e a 1200 mg/l morte celular, indicando a alta toxicidade deste composto para alguns microrganismos.

Até hoje vários estudos avaliaram a ação destes compostos no meio ambiente, no controle de insetos, biotoxicidade, resíduos em alimentos e meio ambiente, contudo

verificam-se poucos relatos sobre os impactos na microbiota do solo e seu potencial de degradação (WANG et al., 2008).

Nesse sentido, o objetivo específico deste trabalho foi isolar e caracterizar bactérias degradadoras deste composto, utilizando-o como fonte de diferentes nutrientes essenciais, como carbono, nitrogênio, fósforo e/ou enxofre, presentes na molécula.

## 5 CONCLUSÕES

A realização deste trabalho permitiu a validação e aplicação da metodologia de extração líquido-líquido de acefato e metamidofós em amostras de água seguida da análise por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa, apresentando bons resultados de linearidade, reprodutibilidade, precisão e seletividade. Ressalta-se que a metodologia utilizada foi eficaz com a utilização de um volume pequeno de amostra e de solvente comparado com outros trabalhos, além disso, apresentou baixo tempo de extração, possibilitando a otimização do processo.

Com relação à degradação de acefato, foram isoladas quatro cepas a partir de amostras de solo com constantes aplicações de acefato, capazes de crescer em presença do mesmo. As linhagens isoladas foram identificadas como *Rhodococcus* sp (EMACE 6), *Stenotrophomonas maltophilia* (EMACE 5), *Staphylococcus* sp (EMACE 10) e *Pandoreae* sp (EMACE 15) através análise de rDNA 16S e perfil de ácidos graxos de membrana.

Ressalta-se, no entanto, que apenas a cepa EMACE 6 apresentou altas porcentagens de degradação deste pesticida (99,24%), utilizando-o como fonte de carbono. Durante os ensaios, as análises de cromatografia indicaram a formação de metamidofós, contudo, ao final do experimento o mesmo não foi detectado acima do limite de quantificação (13,66 mg/l). Este dado, em conjunto com a formação de CO<sub>2</sub>, avaliada através da análise respirométrica, indica a possível mineralização de acefato.

Relativamente às outras linhagens isoladas, observou-se o crescimento da linhagem EMACE 5 em meio com acefato como única fonte de S (0,4 g/l de acefato) ou N (5,4 g/l de acefato), da EMACE 6 como fonte de S e N, além de C (1,5 g/l de acefato), da EMACE 10 como fonte de P (1,19 g/l de acefato) e N e da EMACE 15 como fonte de S e N. Destaca-se, no entanto, que todas estas cepas apresentaram crescimento em meio MM/S+GC sem adição de acefato, indicando um crescimento a partir de fontes de S não provenientes da quebra do acefato. Considerando estes dados, apenas os cultivos com acefato como fonte de P e N foram avaliados por cromatografia quanto à degradação de acefato, contudo as análises demonstraram que não houve degradação de acefato e formação de metamidofós. Sendo assim, todas as linhagens foram testadas utilizando acefato como fonte combinada de nutrientes (C e N; C e P), porém apenas as linhagens EMACE 6 e EMACE 10 mantiveram o crescimento com acefato como fonte de C e N, no entanto, a análise de cromatografia indicou redução de apenas 19% do acefato inicial e formação de 17% de metamidofós no cultivo com

a linhagem EMACE 6 e 21% de redução do acefato inicial no cultivo com a linhagem EMACE 10.

Contudo, o isolamento de uma linhagem capaz de degradar mais de 99% de acefato em altas concentrações (1,5 g/l), realizado por este trabalho, indica a biodegradabilidade deste composto, permitindo estudos posteriores das vias de degradação, considerando a ausência de informações neste campo. Sendo assim, para a continuidade deste trabalho sugere-se um estudo a nível molecular dos genes envolvidos no processo de degradação, para posterior aplicação em processos de biorremediação.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS\*

ABU, G. O.; DIKE, P. O. A study of natural attenuation processes involved in a microcosm model of a crude oil-impacted wetland sediment in the Niger Delta. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 4761-4767, 2008.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.** Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm)>. Acesso em: 13 jan. 2009.

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 2, p. 361-3, 2006.

AHAMED, F. E. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 20, n. 11, 649-661, 2001.

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

ALTSCHUL S. F.; MADDEN T. L.; SCHAFFER A.A.; ZHANG J.; ZHANG Z.; MILLER W.; LIPMAN D.J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p. 3389–3444, 1997.

AMANN, R. I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. **Kluwer Academic Publishers Printed in the Netherlands**, v. 25, p. 3389–3444, 1995.

ANDREI, E. **Compêndio de defensivos agrícolas.** 6<sup>nd</sup> ed. São Paulo: Andrei, 1999.

ASSOCIAÇÃO GRUPO DE ANALISTAS DE RESÍDUOS DE PESTICIDAS. **Manual de Resíduos de Pesticidas em Alimentos.** São Paulo: GARP, 1999. Apostila.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BAILEY, J. E.; OLLIS, D. F. **Biochemical Engineering Fundamentals**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: McGraw-Hill, 1986. p. 27–85.

BAKER, G. C.; SMITH, J. J.; COWAN, D. A. Review and re-analysis of domain specific 16S primers. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, p. 541-555, 2003.

BANERJEE, K.; OULKAR, D. P.; DASGUPTA, S.; PATIL, S. B.; PATIL, S. H.; SAVANT, R.; ADSULE, P. G. Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1173, p. 98-109, 2007.

BAPTISTA, I.; ZHOU, N.; EMANUELSSON, E.; PEEVA, L.; LEAK, D.; MANTALARIS, A.; LIVINGSTON, A. Evidence of species succession during chlorobenzene biodegradation. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 68-74, 2008.

BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; COSTA-PÉREZ, C.; PERALTA-CRUZ, J.; BARRERA-CORTÉS, J.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 59, p. 239-244, 2007.

BASHEERA. C.; ALNEDHARYB, A. A.; RAOB, B. S. M.; LEE, H. K. Determination of organophosphorous pesticides in wastewater samples using binary-solvent liquid-phase microextraction and solid-phase microextraction: A comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 605, p. 147–152, 2007.

BEHKI, R.M.; KHAN, S. U. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1237-1241, 1994.

BEHKI, R.M.; KHAN, S. U. Inhibitory effect of parathion on the bacterial degradation of EPTC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 39, p. 805-809, 1991.

BEHKI, R.M.; TOPP, E.; DICK, W.; GERMON, P. Metabolism of the herbicide atrazine by *Rhodococcus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 1955-1959, 1993.

BELL, K. S.; PHILIP, J. C.; AW, D. W. J.; CHRISTOFI, N. The genus *Rhodococcus*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 85, p. 195–210, 1998.



BENIMELI, C. S.; FUENTES, M. S.; ABATE, C. M.; AMOROSO, M. J. Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 61, n. 3, p. 233-239, 2008.

BOONCHAN, S.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. Surfactant enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 59, n. 4, p. 482-494, 1998.

BRITO, N. M.; AMARANTE JR, O. P.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 13, p. 129-146, 2003.

BROWN, B.J.; LEFF, L.G. Comparison of fatty acid methyl ester analysis with the use of API 20E and NFT strips for identification of aquatic bacteria. **Applied and environmental Microbiology**, v. 62, p. 2183-2185, 1996.

BUSSE, H.; DENNER, E.B.M.; LUBITZ, W. Classification and identification of bacteria: Current Approaches to an Old Problem. Overview of methods used in Bacterial Systematics. **Journal of Bacteriology**, v. 47, p. 3-38, 1996.

BUYER, J. S. Identification of bacteria from single colonies by fatty acid analysis. **Journal of Microbiological Methods**, v. 48, p. 259-265, 2002.

CALDAS, E. D.; SOUZA, L. C. K. R. Avaliação de risco crônico na ingestão de resíduos de pesticidas na dieta brasileira. **Revista de Saúde Pública**, v. 34, n. 5, p. 529-37, 2000.

CALDWELL, S. R.; RAUSHEL, F. M. Detoxification of organophosphate pesticides using an immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 103-109, 1991.

CARVALHO, C. C.; FONSECA, M. M. The remarkable *Rhodococcus erythropolis*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 67, p. 715-26, 2005.

CHAE, M. Y.; OMBURO, G. A.; LINDAHL, P. A.; RAUSHEL, F.M. Utilization of copper as a paramagnetic probe for the binuclear metal center of phosphotriesterase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 316, n. 2, p. 765-772, 1995.

CHAI, L. K.; TAHIR, N. M.; HANSEN, H. C. B. Determination of chlorpyrifos and acephate in tropical soils and application in dissipation studies. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 88, n. 8, p. 549-560, 2008.

CHUKWUDEBE, A. C.; HUSSAIN, M. A.; OLOFFS, P. C. Hydrolytic and metabolic products of acephate in water and mouse liver. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 19, n.6, p. 501-522, 1984.

COENYE T.; LIU L.; VANDAMME P.; LIPUMA J. J. Identification of *Pandora* species by 16S ribosomal DNA-based PCR assays. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4452-4455, 2001.

COUTINHO, L. C.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P.; ROSADO, A. S. Evaluating the microbial diversity of soil samples: Methodological Innovations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 71, n. 3-II, p. 491-503, 1999.

DARLENGO, R. P. **Análise multirresíduo de inseticidas em batata (*Solanum tuberosum* L.)**. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2007.

DAUGHTON, C. G.; HSIEH, D. P. Parathion utilization by bacterial symbionts in a chemostat. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 175–184, 1977.

DAWYNDT, P.; VANCANNEYT, M.; SNAUWAERT, C.; DE BAETS, B.; DE MEYER, H.; SWINGS, J. Mining fatty acid databases for detection of novel compounds in aerobic bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 3, p. 410–433, 2006.

DE SCHRIJER, A.; DE MOT, R. Degradation of pesticides by *Actinomycetes*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 85-119, 1999.

ERNEY, D. R.; POOLE, C. F. A study of single compound additives to minimize the matrix induced chromatographic response enhancement observed in the gas chromatography of pesticide residues. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 16, p. 501, 1993.

EVANS, A.G.; WHITE, S. D. Bacterial diseases. In: SMITH, B.P. **Large animal internal medicine**. 3<sup>rd</sup>. ed. St. Louis: Mosby, 2002. v.2, cap.38, p.1207-1208.

FAN, S.; WALTERS, J. Use information and air monitoring recommendations for the pesticide active ingredients acephate, chlorothalonil and methamidophos. California Department of Pesticide Regulation, **Environmental Monitoring and Pest Management Branch**, p. 1-20, 2002.

FARIA, N. M. X.; FASSA, A. C. G.; FACCHINI, L. A. Pesticides poisoning in Brazil: the official notification system and challenges to conducting epidemiological studies. **Ciência Saúde Coletiva**, v. 12, n. 1, p. 25-38, 2007.

FERNANDES-ALBA, A. R.; AGÜERA, A.; CONTRERAS, M.; PEÑUELA, G.; FERRER, I.; BARCELÓ, D. Comparison of various sample handling and analytical procedures for the monitoring of pesticides and metabolites in ground waters. **Journal of Chromatography A**, v. 832, p. 35-47, 1998.

FINNERTY, W. R. The biology and genetics of the genus *Rhodococcus*. **Annual Review of Microbiology**, v. 46, p. 193–218, 1992.

FOCHT, D. D.; JOSEPH, H. Microbial activity in soils treated with acephate and monitor. **Journal of Environmental Quality**, v. 3, n. 4, p. 327-328, 1974.

FOOD ADMINISTRATION DRUGS. **Acephate (095)**. Disponível em: <[www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003\\_eva/acephate%202003.pdf](http://www.fao.org/ag/AGP/AGPP/Pesticid/JMPR/Download/2003_eva/acephate%202003.pdf)>. Acesso em: 02 mar. 2009.

FOUHY, Y.; SCANLON, K.; SCHOUEST, K.; SPILLANE, C.; CROSSMAN, L.; AVISON, M. B.; RYAN, R. P.; DOW, J. M. Diffusible signal factor-dependent cell-cell signaling and virulence in the nosocomial pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 13, p. 4964-4968, 2007.

GALLO, M. A.; LAWRYK, N. J. - Organic phosphorus pesticides. In: HAYES, W. J. & LAWS, E. R. JR. (Ed.). **Handbook of pesticide toxicology**. San Diego, Academic Press, 1990. p. 920-925.

GEIß, S.; GEBERT, S. Extraction of highly polar organophosphorus pesticides from water. **Spectrometry**, v. 22, p. 2203–2210, 2008.

GILAROVA, R.; VOLDRICH, M.; DEMNEROVA, K.; CEROVSKY, K.; DOBIAS, J. Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. **International Journal of food microbiology**, v. 24, p. 315-319, 1994.

GIRARD, L.; ST-AMAND, A. D. Determination of acephate and its degradation product methamidophos in soil and water by solid-phase extraction (SPE) and GC-MS. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 739-748, 2004.

GOBO, A. B.; ZANELLA, R.; KURZ, M. H. S.; PIZZUTTI, I. R.; ADAIME, M. B. Development and validation of methodology for the determination of residues of

organophosphorus pesticides in tomatoes. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 6, p. 945-950, 2004.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAYAMA, T.; YOSHIDA, H.; TODOROKI, K.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass.* **Acta hydrochimica et hydrobiologica**, v. 34, p. 464 – 473, 2006.

HAYATSU, M.; HIRANO, M.; TOKUDA, S. Involvement of two plasmid in fenitrothion degradation by *Burkholderia* sp. Strain NF1000. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1737-1740, 2000.

HEUER, H.; KRSEK, M.; BAKER, P.; SMALLA, K.; WELLINGTON, M. H. Analysis of *Actinomyce* communities by specific amplification of genes encoding 16S rRNA and gel-electrophoretic separation in denaturing gradients. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 8, p. 3233 – 3241, 1997.

HOFF, G. R.; ZONEN, P. Trace analysis of pesticides by gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 843, p. 301-322, 1999.

HOLLAND, P. T.; MALCOLM, C. P. Multiresidue analysis of fruits and vegetables. In: CAIRNS, T.; SHERMA, J. (Ed.). **Emerging Strategies for Pesticide Analysis**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1992. 79 p.

HUSSAIN, M. A. Anticholinesterase properties of methamidophos and acephate in insects and mammals. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 38, p. 131-138, 1987.

INGELSE, B.A; VAN-DAM, R. C. J.; VREEKEN, R. J.; MOL, H. G. J.; STEIJGER, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 918, n. 1, p. 67-78, 2001.

INOUE, S.; SAITO, T.; MASE, H.; SUZUKI, Y.; TAKAZAWA, K.; YAMAMOTO, I.; INOKUCHI, S. Rapid simultaneous determination for organophosphorus pesticides in human serum by LC–MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 258–264, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos**. Rio de Janeiro: INMETRO, 2003. Revisão 01. DOQ-CGCRE-08.

JILANI, S.; KHAN, A. M. Isolation, Characterization and Growth response of pesticides Degrading Bacteria. **Journal of Biological Sciences**, v. 4, n. 1, p. 15-20, 2004.

KERTESZ, M. A.; COOK, A. M.; LEISINGER, T. Microbial metabolism of sulfur- and phosphorus-containing xenobiotics. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 15, n. 2-3, p. 195-215, 1994.

KIGUCHI, O.; SAITOH, K. Simultaneous determination of polar and nonpolar pesticides in water samples by solid-phase multilayered disk extraction using polystyrene gel and activated carbon disk along with GC/MS. **Bunseki Kagaku**, v. 49, p. 575-582, 2000.

KLEIER, D. A. Environmental effects on the photodegradation of pesticides. In: COMPARING GLASSHOUSE & FIELD PESTICIDE PERFORMANCE, BCPC II, 1994, Canterbury. Monograph: **Comparing glasshouse and field pesticide performance II**. Proceedings. Surrey: British Crop Protection Council, 1994. p. 97-109.

KOLELI, N.; DEMIR, A.; ARSLAN, H.; KANTAR, C. Sorption behavior of methamidophos in a heterogeneous alluvial soil profile. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 301, p. 94-99, 2007.

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

KUMAR, M.; PHILIP, L. Bioremediation of endosulfan contaminated soil and water-optimization of operating conditions in laboratory scale reactors. **Journal of Hazardous Materials**, v. 136, n. 2, p. 354-64, 2006a.

KUMAR, M.; PHILIP, L. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 41, n. 1, p. 81-96, 2006b.

KUNITSKY, C.; OSTERHOUT, G.; SASSER, M. Identification of microorganisms using fatty acid methyl ester (FAME) analysis and the MIDI Sherlock Microbial Identification System. In: MILLER, M (ed.). **Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods**. Bethesda: PDA, 2006.

KUOKKANEN, T.; VÄHÄOJA, P.; VÄLIMÄKI, I.; LAUHANEN, R. Suitability of the respirometric BOD Oxitop method for determining the biodegradability of oils in groundwater using forestry hydraulic oils as model compounds. **International Journal of Environment Analytical Chemistry**, v.84, n. 9, p. 677-689, 2004.

LACORDE, S.; MOLINA, C.; BARCELO, D. Temperature and extraction voltage effect on fragmentation of organophosphorus pesticides in liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 13-26, 1998.

LAI, K.; DAVE, K. L.; WILD, J. R. Bimetallic binding motifs in organophosphorus hydrolase are important for catalysis and structural organization. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 24, p. 16579-16584, 1994.

LAI, K.; STOLOWICH, N. J.; WILD, J. R. Characterization of P-S bond hydrolysis in organophosphorothioate pesticides by organophosphorus hydrolase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 318, n. 1, p. 59-64, 1995.

LAMBERT, M. A.; PATTON, C. M.; BARRET, T. J.; MOSS, C. W. Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acids composition. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, p. 706-713, 1987.

LANE, D. J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester: John Wiley & Sons, 1991.

LARKIN, M. J.; KULAKOV, L. A.; ALLEN, C. C. Biodegradation by members of the genus *Rhodococcus*: biochemistry, physiology, and genetic adaptation. **Advances in Applied Microbiology**, v. 59, p. 1-29, 2006.

LEE, W-O.; LAW, M. L-M.; WONG, S-K. Determination of methamidophos residues in food remnants. **Food Additives and Contaminants**, v. 13, n. 6, p. 687-694, 1996.

LI, X.; JIANG, J.; GU, L.; ALI, S. W.; HE, J.; LI, S. Diversity of chlorpyrifos-degrading bacteria isolated from chlorpyrifos-contaminated samples. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 4, p. 331-335, 2008.

LI, X.; ZHANG, H.; WU, M.; ZHANG, Y.; ZHANG, C. Effect of methamidophos on soil fungi community in microcosms by plate count, DGGE and clone library analysis. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 619-625, 2008.

LIZ, J. A. Z. E.; ROBLERO, J. J.; SERNA, J. Z. D.; LEÓN, A. V. P.; RODRÍGUEZ, C. H. Degradation of polychlorinated biphenyl (PCB) by a consortium obtained from a contaminated soil composed of *Brevibacterium*, *Pandoraea* and *Ochrobactru*. **World Journal os Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 165-170, 2009.

MACHÍN-RAMÍREZ, C.; OKOH, A. I.; MORALES, D.; MAYOLO-DELOISA, K.; QUINTERO, R.; TREJO-HERNÁNDEZ, M. R. Slurry-phase biodegradation of weathered oily sludge waste. **Chemosphere**, v. 70, p. 737-744, 2008.

MADIGAN, M. T.; BROCK, T. D.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Biology of Microorganisms**. 7th ed. New Jersey: Prentice Hall, 1994. 909 p.

MALATO, S.; BLANCO, J.; RICHTER, C.; MILOW, B.; MALDONADO, M. I. Solar photocatalytic mineralization of comercial pesticides: Methamidophos. **Chemosphere**, v. 38, n. 5, p. 1145-1156, 1999.

MALLICK, S.; DUTTA, T. K. Kinetics of phenanthrene degradation by *Staphylococcus* sp. strain PN/Y involving 2-hydroxy-1-naphthoic acid in a novel metabolic pathway. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 9, p. 1004-1008, 2008.

MARCHETTI, M.; LUCHINI, L. C. Sorção/dessorção e mineralização do inseticida acefato em solo. **Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 14, p. 61-72, 2004.

MARIANO, A. P.; KATAOKA, A. P. A. G.; ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Laboratory study on the bioremediation of diesel oil contaminated soil from a petrol station. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 346-353, 2007.

MARTÍNKOVÁ, L.; UHNÁKOVÁ, B.; PÁTEK, M.; NEŠVERA, J.; KŘEN, V. Biodegradation potential of the genus *Rhodococcus*. **Environment International**, v. 35, p. 162-177, 2009.

MASSOL-DEYA M.; ODELSON, D. A.; HICKEY, R. F.; TIEDJE, J. M. Bacterial community fingerprinting of amplified 16S and 16-23S ribosomal DNA gene sequences and restriction endonuclease analysis (ARDRA). **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3.3.2, p. 1-8, 1995.

MERKWAYA, G. M.; WELCH, D. F. Subgrouping of *Pseudomonas cepacia* by celullar fatty acid composition. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, p. 2640-2646, 1989.

MUKRED, A. M.; HAMID, A. A.; HAMZAH, A.; YUSOFF, W. M. W. Enhancement of biodegradation of crude petroleum oil in contaminated water by the addition of nitrogen sources. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 17, p. 2122 – 2127, 2008.

MUKRED, A.; HAMID, A. A.; HAMZAH, A.; YUSOFF, W. M. W. Development of Three Bacteria Consortium for the Bioremediation of Crude Petroleum-oil in Contaminated Water. **Journal of Biological Sciences**, v. 8, n. 4, p. 73-79, 2008.

MULCHANDANI, A.; CHEN, W.; MULCHANDANI, P.; WANG, J.; ROGERS, K. R. Biosensors for direct determination of organophosphate pesticides. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 225-230, 2001a.

MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A.; WANG, J.; AND CHEN, L. Amperometric microbial biosensor for direct determination of organophosphate pesticides using recombinant microorganism with surface expressed organophosphate hydrolase. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, p. 433-437, 2001b.

MUNNECKE, D. M. Properties of an Immobilized pesticide-hydrolyzing enzyme. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 503-507, 1977.

MUYZER, G.; HOTTENTRÄGER, S.; TESKE, A.; WAWER, C. Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA – A new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities. **Molecular Microbial Ecology Manual**, v. 3.4.4., p. 1-23, 1996.

OCHIAI, N.; SASAMOTO, K.; KANDA, H.; YAMAGAMI, T.; DAVID, F.; TIENPONT, B.; SANDRA, P. Optimization of a multi-residue screening method for the determination of 85 pesticides in selected food matrices by stir bar sorptive extraction and thermal desorption GC-MS. **Journal of Separation Science**, v. 28, 9-10, p. 1083-1092, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, São Paulo: Ed. Atheneu, 1996. p. 478–485.

OHSHIRO, K.; KAKUTA, T.; NIKAIDOU, N.; WATANABE, T.; UCHIYAMA. Molecular cloning and nucleotide sequencing of organophosphorus insecticide hydrolase gene from *Arthrobacter* sp. Strain B-5. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 4, p. 531-534, 1999.

ORTÍN, X.; JAEN-MARTINEZ, J.; RODRIGUEZ-LUACES, M.; ALVARO, T.; FONT, L. Fatal pulmonary hemorrhage in a patient with myelodysplastic syndrome and fulminant pneumonia caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. **Infection**, v. 35, p. 201-202, 2007.



OZAKI, S.; KISHIMOTO, N.; FUJITA, T. Isolation and phylogenetic characterization of microbial consortia able to degrade aromatic hydrocarbons at high rates. **Microbes and Environments**, v. 21, n. 1, p. 44-52, 2006.

PAREKH, N. R.; WALKER, S. J.; ROBERTS, S. J.; WELCH, S. J. Rapid degradation of triazinone herbicide metamiltron by *Rhodococcus* sp isolated from treated soil. **Applied Bacteriology**, v. 77, p. 467-475, 1994.

PAUL D.; PANDEY, G.; MEIER, C.; MEER, J. R. V. D.; JAIN, R. K. Bacterial community structure of a pesticide-contaminated site and assessment of changes induced in community structure during bioremediation. **FEMS Microbiol Ecology**, v. 57, p. 116–127, 2006.

PERRIELLO, F. A. **Bioremediation of petroleum pollutants with alkane-utilizing bacteria**. United States patent US 6110372, 2000.

PICKUP, R. W.; RHODES, G.; SAUNDERS, J. R. Extraction of microbial DNA from aquatic sources: Freshwater. **Molecular Microbial Ecology Manual**. v. 1.1.2, p. 1-11, 1995.

RAININA, E. I.; EFREMENCO, E. N.; VARFOLOMEYEV, S. D.; SIMONIAN, A. L.; WILD, J. R. The development of a new biosensor based on recombinant *E. Coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 11, n. 10, p. 991-1000, 1996.

RAMETTE, A.; LIPUMA, J. J.; TIEDJE, J. M. Species abundance and diversity of *Burkholderia cepacia* complex in the environment. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 1193-1201, 2005.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. F. S.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 771-780, 2004.

ROSENBERG, A.; ALEXANDER, M. Microbial cleavage of various organophosphorus insecticides. **Applied Environmental Microbiology**, v. 37, n. 5, p. 886-891, 1979.

SCHENCK, F. J.; LEHOTAY, S. J. Does further clean-up reduce the matrix enhancement effect in gas chromatographic analysis of pesticide residues in food? **Journal of Chromatography A**, v. 868, p.51-61.

SCHNEIDER, R. P.; MORANO, S. C.; GIGENA, M. A. C.; MISSAWA, S. K.; ROCHA, R. C. S.; SILVA, L. R.; ELLERT, N.; KATSURAGI, C.; ROSA, C. S. R.; OLIVEIRA-FILHO, L. C. Contamination levels and preliminary assessment of the employing natural attenuation in 5 priority areas of Presidente Bernardes refinery in Cubatão, São Paulo, Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 116, p. 21-52, 2006.

SEGONDS, C.; PAUTE, S.; CHABANON, G. Use of amplified ribosomal DNA restriction analysis for identification of *Ralstonia* and *Pandoraea* species: interest in determination of the respiratory bacterial flora in patients with cystic fibrosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 3415-3418, 2003.

SETHUNATHAN, N.; YOSHIDA, T. *Flavobacterium* sp. that degrades diazinon and parathion. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 19, 873–875, 1973.

SHELTON, D.R. Mineralization of diethylthiophosphoric acids by an enriched consortium from cattle dip. **Applied Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2572-2573, 1988.

SIDDIQUE, T.; BENEDICT, C. O.; ARSHAD, M.; FRANKENBERGER JR, W. T. Enrichment and isolation of endosulfan-degrading microorganisms, **Journal of Environmental Quality**, v. 32, p. 47–54, 2003.

SINGH, A. K. Improved analysis of acephate and methamidophos in biological samples by selective ion monitoring gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography**, v. 301, p. 465-469, 1984.

SINGH, A. K. Kinetic analysis of inhibition of brain and red blood cell acetylcholinesterase and plasma cholinesterase by acephate or methamidophos. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.81, p. 302-309, 1985.

SINGH, B. K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. **Nature Reviews Microbiology**, p. 1-9, 2008a.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 428–471, 2006.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W.; WRIGHT, D. J. Effects of soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, p. 5198–5206, 2003.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W.; WRIGHT, D. J. Role of soil pH in the development of enhanced biodegradation of fenamiphos. **Applied Environmental Microbiology**, v. 69, 7035–7043, 2003.

SINGH, D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, p. 35–40, 2008b.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Acephate: Relatório do ingrediente ativo.** Disponível em: <[http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 15 set. 2008.

SLABBINCK, B.; DE BALTS, B.; DAWYNTD, P.; DE VOS, P. Genus wide Bacillus species identification through proper artificial neural network experiments on fatty acid profiles. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 2, p. 187-98, 2008.

SPASSOVA, D.; WHITE, T.; SINGH, A.K. Acute effects of acephate and methamidophos on acetylcholinesterase activity, endocrine system and amino acid concentrations in rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126, p. 79-89, 2000.

ST-AMAND, A. D.; GIRARD, L. Determination of acephate and its degradation product methamidophos in soil and water by solid-phase extraction (SPE) and GC-MS. **Interantional Journal of Environmental Chemistry**, v. 84, n. 10, p. 739-748, 2004.

STRYJEWSKI, M. E.; LIPUMA, J. J.; MESSIER J. R.; RELLER, B.; ALEXANDER, B. D. Sepsis, multiple organ failure, and death due to *Pandoraea pnomenusa* infection after lung transplantation. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n. 5, p. 2255-2257, 2003.

SZETO, S. Y.; BROWN, M. J.; OLOFFS, P. C. Simplified method for determining acephate and methamidophos residues in several substrates. **Journal of Chromatography**, v. 240, p. 526-531, 1982.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS,D.G.; GIBSON,T.J. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acid Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMLIN, C. **The Pesticide Manual**. 10<sup>th</sup> ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1995. 1341 p.

TORRES, C. M.; PICÓ Y.; MAÑES J. Determination of pesticide residues in fruit and vegetables, **Journal of Chromatography A**, v. 754, p. 301-331, 1996.

TREVIZAN, L. R. P.; BAPTISTA, G. C. de; PAPA, G. Acephate and methamidophos residues in greenhouse and in field grown tomatoes. **Horticultura Brasileira**, v. 23, n. 1, p. 38-43, 2005.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF PESTICIDE PROGRAMS. **Interim Reregistration Eligibility Decision for Methamidophos Case No. 0043**. Disponível em: [http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/methamidophos\\_red.pdf](http://www.epa.gov/pesticides/reregistration/REDS/methamidophos_red.pdf). Acesso em: 15 set. 2008.

VÃHÃOJA, P.; KUOKKANEN, T.; VÃLIMÃKI, I.; VUOTI, S.; PERÃMÃKI, P. Biodegradabilities of some chain oils in groundwater as determined by the respirometric BOD Oxitop method. **Analytical & Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 455-450, 2005.

VALLEJO, V.; SALGADO, L.; ROLDAN, F. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 7, n. 2, p. 67-78, 2005.

VANEECHOUTTE, M.; ROSSAU, R.; DE VOS, P.; GILLIS, M.; JANSSENS, D.; PAEPE, N.; DE ROUCK, A.; FIERS, T.; CLAEYS, G.; KERSTERS, K. Rapid identification of bacteria of the Comamonadaceae with amplified ribosomal DNA-restriction analysis (ARDRA). **FEMS Microbiology Letters**, v. 93, p. 227-234, 1992.

WANG, J. F.; GAO, M. H.; WU, N. F.; PAN, K. P. The Degradation Effects of a *Pseudomonas* Hydrolase OPHC2 to Organophosphorus Insecticides. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon**, v. 183, p. 804-810, 2008.

WARE, G. W. Pesticide Water Solubilities. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 116, p. 28, 29, 130, 131, 1990.

WARHURST, A. M.; FEWSON, C. A. Biotransformations catalyzed by the genus *Rhodococcus*. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.14, p. 29-73, 1994.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A.; LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 2, p. 697-703, 1991.

WILLIAN, G. L. **The effect of acephate (Orthene®) on growth and nutrient uptake of two aquatic bacteria.** Master Thesis - Biological Science Department, B.E.S. Universidade de Waterloo, 1975.

WOLFENDEN, R; SPENCE, G. Derepression of phosphomonoesterase and phosphodiesterase activities in *Aerobacter aerogenes*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 146, n. 1, 296–298, 1967.

WU, X.; WALKER, M. J.; HORNITZKY, M.; CHIN, J. Development of a groupspecific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental Significance. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, p. 107–119, 2006.

YANG, C.; LIU, N.; GUO, X.; QIAO, C. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **FEMS Microbiology Letters**, v. 265, n. 1, p. 118–125, 2006.

YEN, J. H.; LIN, K. H.; WANG Y. S. Potential of the insecticides acephate and methamidophos to contaminate groundwater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p. 79-86, 2000.

YU, Y.; ZHOU, Q. X. Adsorption characteristics of pesticides methamidophos and glyphosate by two soils, **Chemosphere**, v. 58, p. 811–816, 2005.