UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo

Ana Flavia Tonelli Fernandes

Ribeirão Preto

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientada: Ana Flavia Tonelli Fernandes

Orientadora: Prof^{a}. Dr^{a}. Eliana Guedes Stehling

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 06/09/2018. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Fernandes, Ana Flavia Tonelli
Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo. Ribeirão Preto, 2018.
73 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientadora: Stehling, Eliana Guedes

1. Biodegradação da atrazina 2. Contaminação ambiental 3. Estrutura da comunidade bacteriana do solo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ana Flavia Tonelli Fernandes
Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Prof^a^. Dr^a^. Eliana Guedes Stehling

Aprovada em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ *Assinatura:*_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ *Assinatura:*_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ *Assinatura:*_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ *Assinatura:*_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ *Assinatura:*_____

Este trabalho foi realizado nos seguintes laboratórios de pesquisa:

Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação - LAMAB do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas (DACTB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), sob orientação da Prof^{a}. Dr^{a}. Eliana Guedes Stehling.

Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos - NPPNS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, sob supervisão da Dr^{a}. Anelize Bauermeister e coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

Laboratório de Química Analítica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão e coordenação do Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal.

Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (FMRP-USP), sob supervisão da Dr^{a}. Vânia Santos Braz e coordenação do Prof. Dr. José Freire da Silva Neto.

Laboratório de Ciências do Solo do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Minnesota, sob supervisão do Prof. Dr. Michael Sadowsky.

Dedico este trabalho à minha família e aos meus amigos, por todo incentivo e pelo apoio incondicional em todos os momentos.

Sem vocês nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me guiar e me amparar nas horas difíceis e momentos de incerteza.

À Profª. Drª. Eliana Guedes Stehling, pelos valiosos ensinamentos e pela confiança, orientação e incentivo.

Ao Prof. Dr. Michael Sadowsky, pela grande oportunidade de aprendizado e pela paciência nos momentos de dificuldade.

À minha família, pelo amor, dedicação e incentivo e por acreditar em mim e me apoiar na busca de meus objetivos.

Ao meu esposo Alexander Scaranello, por acreditar nos meus sonhos e trilhar o caminho ao meu lado.

Aos amigos, pelo companheirismo, carinho e amizade durante os dias longe da família.

Aos amigos Vinícius Martins e Vânia Braz, pela paciência, amizade, carinho e pela grande ajuda nos experimentos.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação pelo aprendizado, carinho e momentos de descontração.

Às amigas Jéssica, Danae, Paola e Michelle pelo apoio, companheirismo e amizade.

À equipe e funcionários do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Minnesota, pelo apoio durante o estágio no exterior.

À Drª. Anelize Bauermeister e toda equipe do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos pela grande ajuda nos experimentos de biodegradação.

Ao Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal pelos ensinamentos em espectrometria de massas.

À equipe do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio em experimentos de expressão gênica.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, juntamente com os funcionários da Seção de pós-graduação da FCFRP-USP, no programa de Biociências Aplicadas à Farmácia.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas de doutorado (Processo: 2014/02806-5) e estágio no exterior (Processo: 2017/03982-0) concedidas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pelo apoio financeiro - Código de Financiamento 001.

Ao Centro de Cana do Instituto Agronômico e à Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, pelas amostras de solo cedidas.

Ao Sr. Sérgio Elias Borges, que gentilmente nos concedeu o herbicida usado em alguns experimentos.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

"Quando o homem aprender a respeitar até o menor ser da criação, seja animal ou vegetal, ninguém precisará ensiná-lo a amar seu semelhante."

Albert Schwertzer (Nobel da Paz de 1952).

RESUMO

FERNANDES, A. F. T. **Atrazina: biodegradação e efeitos na comunidade bacteriana do solo.** *2018. 73f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.*

A atrazina, um herbicida triazínico amplamente utilizado no controle de ervas daninhas, é um potencial contaminante ambiental, e possui como principal via de degradação uma via biológica. A linhagem Pseudomonas sp. ADP é o micro-organismo de referência no processo de degradação da atrazina em ambientes contaminados, pois contém em seu genoma os genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE e atzF, os quais codificam as enzimas responsáveis pelo processo de degradação. Bactérias gram-positivas também possuem capacidade para degradar a atrazina, mas iniciam a via de degradação através do gene trzN, análogo ao atzA. O objetivo do presente trabalho foi obter e analisar isolados bacterianos e consórcios formados por duas ou mais bactérias com capacidade para degradação completa do herbicida atrazina, como também analisar os efeitos da atrazina na comunidade bacteriana do solo. Duas bactérias gram-negativas, A01 e A02, foram isoladas de amostras de solo e foram identificadas como pertencentes aos gêneros Achromobacter e Pseudomonas, respectivamente, através do sequenciamento do gene 16S rRNA. Ambos os micro-organismos apresentaram potencial para biodegradação da atrazina em meio sólido, mas somente o isolado Pseudomonas sp. apresentou todos os genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE e atzF, que codificam as enzimas da via completa de degradação da atrazina. O isolado Achromobacter sp. apresentou somente os genes atzA, atzB e atzC, que representam a via inicial de degradação da atrazina até a formação de ácido cianúrico como metabólito. Um ensaio utilizando o método Southern Blot foi realizado para verificar se os genes atz detectados nos isolados do estudo são plasmidiais, sendo que apenas o isolado Pseudomonas sp. apresentou plasmídeo. A expressão dos genes atzA, atzB, atzC e atzD foi avaliada pelo método Northern Blot, contudo apenas o isolado Pseudomonas sp. apresentou expressão diferencial após tratamento com atrazina. Análises em HPLC/DAD e LC-MS/MS demonstraram que o isolado Pseudomonas sp. apresenta um perfil de degradação da atrazina semelhante ao perfil do micro-organismo padrão Pseudomonas sp. ADP, sendo apto a degradar 99% de atrazina in vitro em 24 horas. Já o isolado Achromobacter sp. apresentou um perfil de degradação lento, com início do processo após 24 horas. Os três metabólitos iniciais formados pela degradação da molécula de atrazina foram detectados em amostras contendo tanto o isolado Pseudomonas sp. quanto o isolado Achromobacter sp. O consórcio bacteriano composto pelos dois isolados deste estudo não apresentou eficiência de degradação superior às culturas puras. Por fim, um experimento de campo foi realizado com o objetivo de analisar os efeitos da atrazina na comunidade bacteriana do solo. O herbicida atrazina foi aplicado ao solo e amostras foram coletadas para análise através das técnicas de qPCR e Sequenciamento de Nova Geração. Foi possível observar que a abundância dos genes responsáveis pelo início da via de degradação da atrazina se altera ao longo do tempo, sendo que o aumento mais expressivo foi observado no gene trzN, comumente encontrado em bactérias gram-positivas com capacidade para degradar a atrazina. O sequenciamento do gene 16S rRNA indicou que a aplicação de atrazina ao solo não provocou mudanças significativas na comunidade bacteriana. As amostras apresentaram alta diversidade antes e após o tratamento com atrazina e a análise

da abundância relativa mostrou pequenas diferenças na abundância de famílias após quatro e oito semanas de aplicação da atrazina ao solo. Assim, é possível sugerir que a aplicação do herbicida atrazina ao solo nas doses recomendadas não provoca danos significativos na estrutura da comunidade bacteriana do solo.

Palavras-chave*: atrazina, biodegradação, expressão dos genes atz, qPCR, metataxonômica.*

ABSTRACT

FERNANDES, A. F. T. **Atrazine: biodegradation and effects on soil bacterial community.** *2018. 73f. Thesis (Doctorade). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.*

Atrazine, a triazine herbicide widely used to control broadleaf weeds, is a potential contaminant of soils, groundwater, rivers, lakes and oceans. Its main route of degradation is a biological pathway. Pseudomonas sp. ADP is a standard bacterium in the process of atrazine mineralization in contaminated environments, because it possesses a plasmid that contains the genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE and atzF, which encode the enzymes responsible for the atrazine degradation process. Gram-positive bacteria also have the ability to degrade atrazine, but the degradation starts through the trzN gene, wich is analogue to atzA. The aim of the present work was to obtain and analyze a bacterial isolate or a consortium formed by two or more bacteria capable of completely degrade the herbicide atrazine and to analyze the effects of atrazine on the soil bacterial community. Two gram-negative microorganisms, A01 and A02, were isolated from soil samples and were identified as Achromobacter sp. and Pseudomonas sp., respectively, through the sequencing of the 16S rRNA gene. Both microorganisms showed potential to degrade atrazine on solid medium, but only the isolate Pseudomonas sp. presented the genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE and atzF that are essential for the biodegradation process. Achromobacter sp. presented only the atzA, atzB and atzC genes, which represent the initial pathway of atrazine degradation that leads to the formation of cyanuric acid. An assay using Southern Blot was performed to verify if the atz genes detected in the isolates were located on plasmid, however only Pseudomonas sp. showed a plasmid. The atz gene expression was evaluated through Northern Blot methodology, but only Pseudomonas sp. showed differential expression after atrazine induction. Analyzes in HPLC/DAD and LC-MS/MS demonstrated that the isolate Pseudomonas sp. presents an atrazine degradation profile similar to the profile of Pseudomonas sp. ADP and is capable of degrading 99% of atrazine in vitro. The strain Achromobacter sp. presented a slow degradation profile and started the degradation process after 24 hours of incubation. The three initial metabolites formed after atrazine degradation were detected in samples containing both Pseudomonas sp. and Achromobacter sp. The bacterial consortium composed of the two isolates of this study did not show higher degradation efficiency than pure cultures. Lastly, a field experiment was performed in order to study the effects of atrazine on the soil bacterial community. The herbicide atrazine was applied to the soil and samples were collected to be analysed using qPCR and Next Generation Sequencing. It was possible to observe that the abundance of the atz genes that initiate the degradation process is changed over time. A significant increase was observed on trzN, which is commonly found in gram-positive bacteria that is capable of degrading atrazine. 16S rRNA gene sequencing indicated that atrazine application to soil do not cause significant changes in the bacterial community. Soil samples presented high diversity before and after atrazine treatment and the relative abundance analysis showed slight differences in families abundance after four and eight weeks of atrazine application to soil. Therefore, the results suggest that the use of atrazine in recommended doses does not cause significant damage to the structure of the soil bacterial community.

Keywords: *atrazine, biodegradation, atz gene expression, qPCR, metataxonomic.*

RESUMEN

FERNANDES, A. F. T. **Atrazina: biodegradación y efectos en la comunidad bacteriana del suelo.** *2018. 73f. Tesis (Doctorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.*

La atrazina, un herbicida triazínico ampliamente utilizado en el control de las malas hierbas, es un potencial contaminante ambiental, y tiene como principal vía de degradación una vía biológica. El linaje Pseudomonas sp. ADP es el microorganismo de referencia en el proceso de degradación de la atrazina en ambientes contaminados, pues contiene en su genoma los genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE y atzF, los cuales codifican las enzimas responsables del proceso de degradación. Las bacterias gram-positivas también poseen capacidad para degradar la atrazina, pero inician la vía de degradación através del gen trzN, análogo al atzA. El objetivo del presente trabajo fue obtener y analizar aislados bacterianos y consorcios formados por dos o más bacterias con capacidad para degradación completa del herbicida atrazina, así como analizar los efectos de la atrazina en la comunidad bacteriana del suelo. Dos bacterias gram-negativas, A01 y A02, fueron aisladas de muestras de suelo y fueron identificadas como pertenecientes a los géneros Achromobacter y Pseudomonas, respectivamente, através de la secuenciación del gen 16S rRNA. Ambos microorganismos presentaron potencial para biodegradación de la atrazina en medio sólido, pero sólo el aislado Pseudomonas sp. presentó todos los genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE y atzF, que codifican las enzimas de la vía completa de degradación de la atrazina. El aislado Achromobacter sp. presentó sólo los genes atzA, atzB y atzC, que representan la vía inicial de degradación de la atrazina hasta la formación de ácido cianúrico como metabólico. Un ensayo utilizando el método Southern Blot fue realizado para verificar si los genes atz detectados en los aislados del estudio son plasmídicos, siendo que el aislado Pseudomonas sp. presentó plásmido. La expresión de los genes atzA, atzB, atzC y atzD fue evaluada por el método Northern Blot, pero sólo el aislado Pseudomonas sp. presentó una expresión diferencial después del tratamiento con atrazina. Los análisis en HPLC/DAD y LC-MS/MS demostraron que el aislado Pseudomonas sp. presenta un perfil de degradación de la atrazina similar al perfil del microorganismo Pseudomonas sp. ADP, siendo capaz de degradar 99% de atrazina en medio líquido en 24 horas. El aislado Achromobacter sp. presentó un perfil de degradación lenta, con inicio del proceso de degradación después de 24 horas. Los tres metabolitos iniciales formados por la degradación de la molécula de atrazina se detectaron en muestras que contenían tanto el aislado Pseudomonas sp. como el aislado Achromobacter sp. El consorcio bacteriano compuesto por los dos aislados de este estudio no presentó eficiencia de degradación superior a los cultivos puros. Por último, un experimento de campo fue realizado con el objetivo de analizar los efectos de la atrazina en la comunidad bacteriana del suelo. El herbicida atrazina fue aplicado al suelo y muestras fueron recolectadas para análisis através de las técnicas de qPCR y Secuenciación de Nueva Generación. Se pudo observar que la abundancia de los genes responsables del inicio de la vía de degradación de la atrazina se altera a lo largo del tiempo, siendo que el aumento más expresivo fue observado en el gen trzN, comúnmente encontrado en bacterias gram-positivas con capacidad para degradar la atrazina. La secuenciación del gen 16S rRNA indicó que la aplicación de atrazina al suelo no provocó cambios significativos en la comunidad bacteriana. Las muestras presentaron alta diversidad antes y después del tratamiento con atrazina y

el análisis de la abundancia relativa mostró pequeñas diferencias significativas en la abundancia de familias después de cuatro y ocho semanas de aplicación de la atrazina al suelo. Así, es posible sugerir que la aplicación del herbicida atrazina al suelo a las dosis recomendadas no provoca daños significativos en la estructura de la comunidad bacteriana del suelo.

Palabras clave: *atrazina, biodegradación, expresión de los genes atz, qPCR, metataxonomica.*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Consumo de agrotóxicos no Brasil (2000 – 2014) 2
Figura 2 - Agrotóxicos comercializados no Brasil no ano de 2012 4
Figura 3 - Estrutura química da molécula de atrazina 5
Figura 4 - Transformações da molécula de atrazina e formação de metabólitos intermediários 9
Figura 5 - Estrutura química dos subprodutos clorados da molécula de atrazina resultantes de degradação por desalquilação 9
Figura 6 - Representação do experimento de campo 27
Figura 7 - Classificação dos isolados bacterianos quanto à composição da parede celular 32
Figura 8 - Placas de meio ATZ-R 33
Figura 9 - Placa de meio de cultura contendo os isolados com potencial para biodegradação da atrazina 34
Figura 10 - Detecção dos genes de degradação da atrazina 35
Figura 11 - Perfil plasmidial em gel de agarose 0,8% da Pseudomonas sp. ADP e da Pseudomonas sp. A02 35
Figura 12 - Northern Blot dos genes da via de degradação da atrazina 36
Figura 13 - Localização dos genes de degradação da atrazina no plasmídeo do isolado Pseudomonas sp. A02 37
Figura 14 - Análise da degradação da atrazina em espectrofotômetro de luz ultravioleta 38
Figura 15 - Análise da degradação de atrazina em HPLC/DAD 40
Figura 16 - Abundância dos genes 16S rRNA, atzA, atzD e trzN antes da aplicação de atrazina no solo 42
Figura 17 - Abundância do gene 16S rRNA em amostras de solo após aplicação de atrazina 42
*Figura 18 - Abundância dos genes atzA (**A**) e trzN (**B**) no solo após aplicação de atrazina* 43
Figura 19 - Abundância do gene atzD no solo 44
Figura 20 - Diferença na abundância dos genes atzA, atzD e trzN no solo após a aplicação de atrazina 44
Figura 21 - Diversidade alfa das amostras de solo coletadas antes e após

aplicação de atrazina 45
Figura 22 - Distribuição da comunidade das amostras coletadas antes e após aplicação de atrazina ao solo 46
Figura 23 - Análise de coordenadas principais das matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis das amostras de solo coletadas após aplicação de atrazina 47
Figura 24 - Tamanho do efeito da análise discriminante linear (LEfSe) das amostras de solo coletadas antes e após aplicação de atrazina 48
Figura 25 - Curva de calibração da atrazina 73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Amostras coletadas na Fazenda Experimental de Ribeirão Preto-SP 18
Tabela 2 - Condições das reações para detecção dos genes atz 21
Tabela 3 - Iniciadores utilizados neste trabalho 22
Tabela 4 - Metabólitos pesquisados na análise em Espectrômetro de massas . 26
Tabela 5 - Iniciadores utilizados nas reações de qPCR 28
Tabela 6 - Condições das reações de qPCR para o gene 16S rRNA 73
Tabela 7 - Condições das reações de qPCR para os genes atzA e atzD 73
Tabela 8 - Condições das reações de qPCR para o gene trzN 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	*do inglês Atrazine Degrading Pseudomonas*
AMOVA	*Análise de variância molecular*
ANOSIM	*Análise de similaridades*
ANOVA	*Análise de variância*
ANVISA	*Agência Nacional de Vigilância Sanitária*
atz	*Atrazina*
BHI	*do inglês Brain Heart Infusion*
BSA	*do ingles Bovine Serum Albumin*
CCA	*do inglês Canonical Correspondence Analysis*
DEA	*Desetilatrazina*
DIA	*Desisopropilatrazina*
DNA	*do inglês Deoxyribonucleic Acid*
DO	*Densidade óptica*
EDTA	*do inglês Ethylenediamine tetraacetic acid*
ESI	*do inglês Electrospray Ionization*
EUA	*Estados Unidos da América*
FCFRP	*Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto*
FSI	*Fotossistema I*
FSII	*Fotossistema II*
HPLC/DAD	*do inglês High Performance Liquid Chromatography/Diode Array Detector*
IBAMA	*Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis*
IBGE	*Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística*
LAMAB	*Laboratório de Microbiologia Ambiental*
LC	*do inglês Liquid Chromatography*
LC-MS/MS	*do inglês Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry*
LB	*Luria-Bertani*
MOPS	*3 - [N-morfolino] propano - ácido sulfônico*
MRM	*Monitoramento de Reações Múltiplas*
mRNA	*do inglês messenger Ribonucleic Acid*
NCBI	*do inglês National Center of Biotechnology Information*

NGS	*do inglês Next-Generation Sequencing*
NPPNS	*Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos*
O	*Oeste*
OTU	*do inglês Operation Taxonomic Unit*
PCoA	*Análise de coordenadas principais*
PCR	*do inglês Polymerase Chain Reaction*
pH	*Potencial hidrogeniônico*
qPCR	*do inglês Quantitative Polymerase Chain Reaction*
RDA	*Análise de redundância*
RNA	*do inglês Ribonucleic Acid*
S	*Sul*
SDS	*do inglês Sodium Dodecil Sulfate*
sp.	*Espécie*
SRA	*do inglês Sequence Read Archive*
SRM	*do inglês Selected Reaction Monitoring*
TAE	*Tris-Acetato-EDTA*
TM	*do inglês Trademark*
trz	*Triazina*
U	*Unidade (s)*
UK	*do inglês United Kingdom*
UMGC	*do inglês University of Minnesota Genomics Center*
USEPA	*do inglês United States Environmental Protection Agency*
USP	*Universidade de São Paulo*
UV	*Ultravioleta*

LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS

˚C	*Grau Celsius*
cm	*Centímetro (s)*
CO_2	*Dióxido de carbono*
eV	*Elétron-volt*
$FeSO_4$	*Sulfato ferroso*
g	*Grama (s)*
g	*Medida da gravidade da Terra*
h	*Horas*
H	*Hidrogênio*
ha	*Hectare (s)*
HCl	*Ácido clorídrico*
H_2O	*Água*
KH_2PO_4	*Fosfato monopotássico*
L	*Litro (s)*
M	*Molar*
µCi	*microCurie*
MDa	*Megadalton (s)*
-	*Menos*
Mg	*Magnésio*
mg	*Miligrama (s)*
µg	*Microgama (s)*
$MgCl_2$	*Cloreto de magnésio*
$MgSO_4$	*Sulfato de magnésio*
min	*Minuto (s)*
µL	*Microlitro (s)*
mL	*Mililitro (s)*
mm	*Milimetro (s)*
mM	*Milimolar*
µm	*Micrômetro (s)*
mol	*Mole (s)*
m/z	*Massa/carga*
n˚	*Número*

NaCl	*Cloreto de sódio*
ng	*Nanograma (s)*
NH_3	*Amônia*
nm	*Nanômetro (s)*
nt	*Nucleotídeo (s)*
P	*Fósforo*
pb	*Pares de base*
pmol	*Picomol (s)*
ppm	*Partes por milhão*
®	*Marca Registrada*
rpm	*Rotações por minuto*
seg	*Segundo (s)*
V	*Volt (s)*
v	*Volume*
%	*Percento*

SUMÁRIO

RESUMO ..... **i**
ABSTRACT ..... **iii**
RESUMEN ..... **iv**
LISTA DE FIGURAS ..... **vi**
LISTA DE TABELAS ..... **viii**
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS ..... **ix**
LISTA DE SÍMBOLOS E FÓRMULAS ..... **xi**
1 INTRODUÇÃO **2**
1.1 Herbicidas *3*
1.2 Atrazina *5*
1.2.1 Efeitos da atrazina na microbiota do solo *7*
1.2.2 Biodegradação da atrazina *8*
1.2.3 Micro-organismos degradadores de atrazina *10*
1.2.4 Tratamento de áreas contaminadas por atrazina *11*
2 RELEVÂNCIA DO ESTUDO **14**
3 OBJETIVOS **16**
3.1 Objetivo geral *16*
3.2 Objetivos específicos *16*
4 MATERIAL E MÉTODOS **18**
4.1 Materiais utilizados no estudo *18*
4.2 Coleta de amostras de solo *18*
4.3 Isolamento e identificação de bactérias *19*
4.4 Extração de DNA genômico e plasmidial *20*
4.5 Extração de RNA *20*
4.6 Amplificação dos genes de degradação da atrazina *21*
4.7 Northern Blot *22*
4.8 Southern Blot *22*
4.9 Ensaio de biodegradação da atrazina *23*
4.9.1 Teste de degradação da atrazina em meio líquido - Análise em espectrofotômetro..... *23*
4.9.2 Análise em HPLC/DAD e LC-MS/MS..... *24*
4.9.2.1 Preparo das amostras *24*

4.9.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência 25
4.9.2.3 Detecção de metabólitos resultantes da biodegradação da atrazina - Análise em LC-MS/MS 25
4.10 Análise da comunidade bacteriana de solo contaminado por atrazina 26
4.10.1 Experimento de campo e coleta das amostras de solo 26
4.10.2 Extração de DNA total do solo 27
4.10.3 Determinação da abundância dos genes de degradação da atrazina no solo 27
4.10.4 Comunidade bacteriana do solo - Sequenciamento do 16S rRNA 28
4.10.5 Análise estatística 29
5 RESULTADOS 32
5.1 Isolamento e identificação de bactérias 32
5.2 Detecção dos genes de degradação da atrazina 34
5.3 Northern Blot 36
5.4 Southern Blot 36
5.5 Ensaio de biodegradação da atrazina 37
5.5.1 Teste de biodegradação da atrazina em meio líquido - Análise em espectrofotômetro 37
5.5.2 Análise em HPLC/DAD 39
5.5.3 Detecção de metabólitos resultantes da biodegradação da atrazina - Análise em LC-MS/MS 41
5.6 Análise da comunidade bacteriana de solo contaminado por atrazina 41
5.6.1 Determinação da abundância dos genes de degradação da atrazina no solo 41
5.6.2 Diversidade alfa e composição da comunidade 45
5.6.3 Beta diversidade 46
6 DISCUSSÃO 50
7 CONCLUSÃO 59
8 REFERÊNCIAS 61
APÊNDICE 73
Apêndice A 73
Apêndice B 73

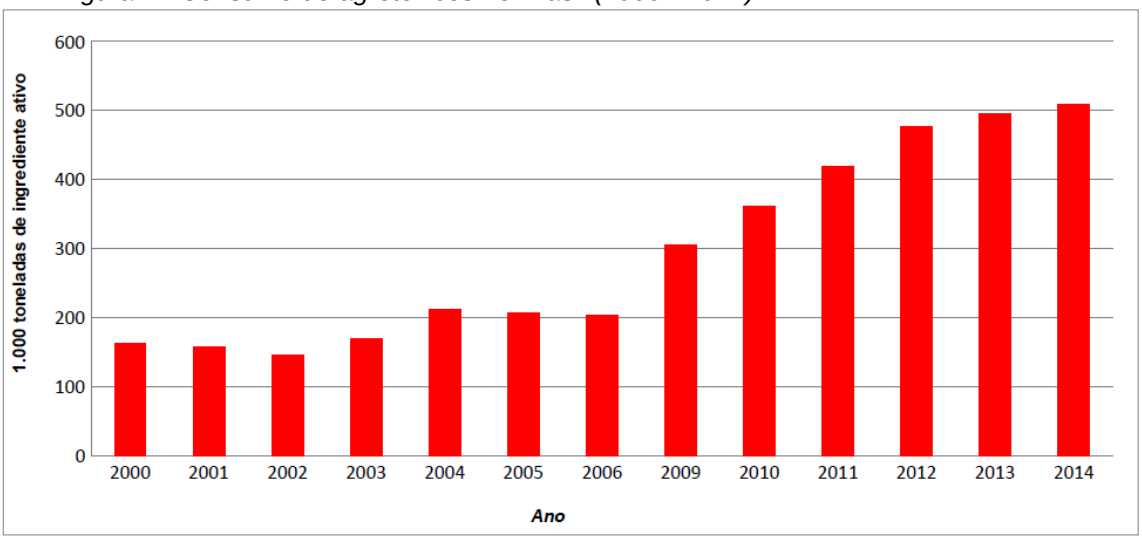
INTRODUÇÃO

1 Introdução

Os agrotóxicos fazem parte da vida moderna desde os anos 1940, quando inseticidas organoclorados foram utilizados pela primeira vez para controlar pragas nas lavouras. Atualmente, esses compostos são usados para proteger culturas agrícolas, grãos armazenados e na erradicação de pragas que transmitem doenças infecciosas (GILL; GARG, 2014).

No processo de aumento da produção mundial de alimentos, os agrotóxicos têm sido usados em maiores quantidades do que no passado. De fato, o gasto mundial com uso de defensivos agrícolas foi estimado em 38 bilhões de dólares por ano (PAN-GERMANY, 2012). Neste contexto, o Brasil figura entre os maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, pois possui uma grande área plantada e clima tropical, que não permite o controle natural de pragas agrícolas durante os meses de inverno, como acontece em países de clima temperado (LUIZ, 2015). No Brasil, o mercado de agrotóxicos cresceu 190% entre 2000 e 2010, superando o crescimento mundial de 93% (Figura 1). Em 2014, houve ainda um aumento de 13% nas vendas de agrotóxicos no país (IBGE, 2015; IBAMA, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, Brasil, 2016).

Figura 1 - Consumo de agrotóxicos no Brasil (2000 - 2014).



Fonte: *IBAMA / Consolidação de dados fornecidos pelas empresas registrantes de produtos técnicos, agrotóxicos e afins, conforme Artigo 41 do Decreto 4074/2002. Dados atualizados em 06/04/2016.*

Se utilizados corretamente, os agrotóxicos exercem efeitos positivos nas culturas agrícolas, mas a não observância das recomendações de dose a ser utilizada, intervalo entre as aplicações, prazo de carência (período entre a aplicação do produto e a data da colheita), regulagem de equipamentos de aplicação e mistura

não recomendada de produtos pode levar à contaminação de solos e mananciais, assim como a contaminação de produtos comestíveis (LUIZ, 2015).

Compostos químicos como os agrotóxicos podem sofrer diversas transformações e serem transferidos através de compartimentos ambientais, alcançando assim ecossistemas fora da área de aplicação e exercendo efeitos tóxicos em organismos não alvos (CARVALHO, 2017). Estes compostos podem ser encontrados no ar, no solo, na poeira, nos alimentos, na água e em produtos para consumo humano (FOSTER et al., 2017). Os agrotóxicos atingem os reservatórios de água por escoamento ou drenagem induzida pela chuva ou irrigação. Já a presença de agrotóxicos no ar pode ser causada por vários fatores, incluindo a dispersão dos compostos durante a pulverização, a volatilização das superfícies tratadas e a aplicação aérea, possivelmente afetando a saúde de peixes, anfíbios e aves (GILL; GARG, 2014).

Os agrotóxicos tendem a se acumular no solo depois de repetidas aplicações, podendo causar impacto ao ambiente mesmo se usados nas doses recomendadas. Além disso, esses compostos entram na cadeia alimentar e provocam efeitos agudos e crônicos em humanos. A exposição a produtos químicos sintéticos como os agrotóxicos está relacionada ao desenvolvimento de câncer, problemas endócrinos e outras doenças. A rota de exposição humana mais frequente é através da alimentação, mas exposições por via inalatória e dérmica também devem ser consideradas (CARVALHO, 2017; FOSTER et al., 2017).

Deste modo, é essencial entender o papel dos agrotóxicos no ambiente do solo para que os riscos de contaminação e os impactos decorrentes do uso sejam avaliados, visto que a produção intensiva de alimentos não poderá dispensar o uso de agroquímicos nos próximos anos (CARVALHO, 2017). Portanto, considerando que a saúde humana deve ser preservada e que o solo e a água são recursos finitos, pesquisas intensivas para conservação e restauração do solo e dos ecossistemas são indispensáveis.

1.1 Herbicidas

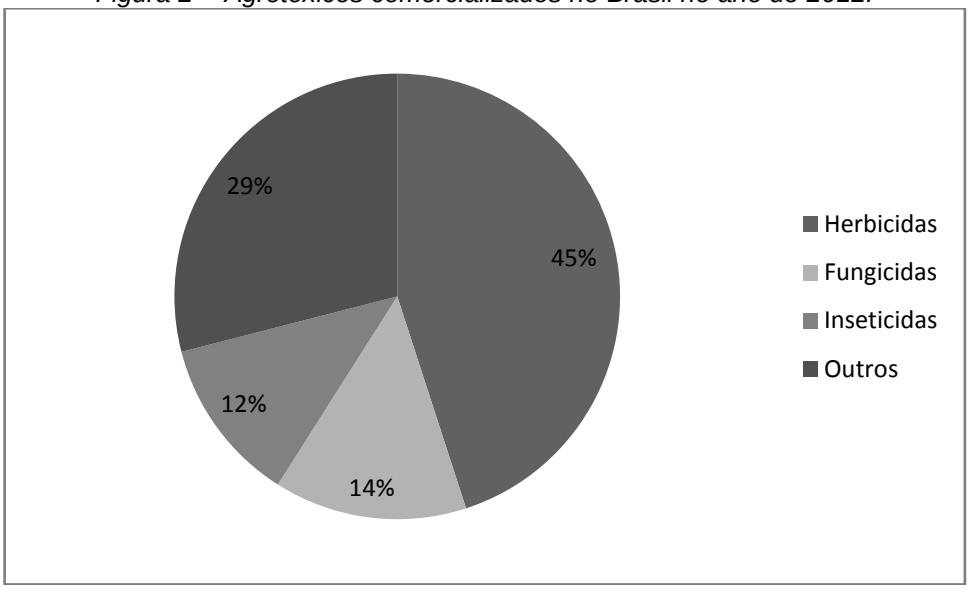
Os herbicidas são compostos químicos capazes de matar ou suprimir o crescimento de espécies específicas. São amplamente utilizados na agricultura para controlar o desenvolvimento de ervas daninhas, plantas que crescem e disputam

espaço, água, nutrientes e sais minerais com as plantas cultiváveis de interesse (RODRIGUES; ALMEIDA, 2005; ROMAN et al., 2005).

Os herbicidas se dividem em duas classes de acordo com a forma de aplicação, podendo ser aplicados diretamente no solo ou nas folhas. Quando aplicados diretamente nas folhas, os herbicidas são classificados como herbicidas de contato, os quais exercem efeito somente no local de contato com a planta, e herbicidas sistêmicos, que são absorvidos pela planta e transportados até os sítios de ação (MARCHI et al., 2008). Além disso, são também caracterizados quanto ao mecanismo de ação (inibidores de proteínas e enzimas, inibidores da divisão celular, inibidores da biossíntese de lipídios e aminoácidos e inibidores do transporte de elétrons na fotossíntese), grupo químico, uso (aplicados diretamente no solo, pré-emergentes e pós-emergentes) e tipos de plantas controladas (ROMAN et al., 2005).

Em todo o mundo, os herbicidas representam 40% de todos os agrotóxicos utilizados no campo com o objetivo de controlar pragas agrícolas (PROSSER et al., 2016). No Brasil, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2013), os herbicidas representam, em média, 45% dos agrotóxicos comercializados (Figura 2), sendo que a atrazina configura como o segundo herbicida mais usado no país.

Figura 2 - Agrotóxicos comercializados no Brasil no ano de 2012.



Fonte: *ANVISA, Brasil - Relatório de Atividades 2012.*

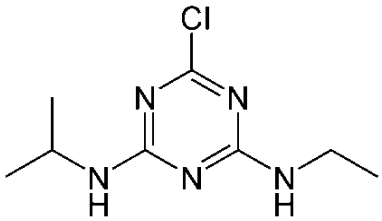
Apesar da importância do uso de herbicidas no aumento da produção agrícola, os efeitos negativos em organismos não alvos, incluindo micro-organismos, devem ser considerados. Esses efeitos podem ser diretos, como a diminuição na abundância de plantas, ou indiretos, como diminuição na abundância de organismos em resposta à degradação do habitat (PROSSER et al., 2016). Além disso, a

exposição a herbicidas em longo prazo provoca efeitos negativos na fertilidade do solo, já que pode causar mudanças na comunidade microbiana responsável pelos processos de decomposição, mineralização e ciclagem de nutrientes (PERUCCI et al., 2000). De fato, altas concentrações de herbicidas levam à significativa redução na contagem de micro-organismos em amostras de solo (SEBIOMO et al., 2010). O uso de herbicidas também foi relacionado à redução de bactérias promotoras de crescimento na rizosfera e aumento de espécies bacterianas gram-positivas (JACOBSEN; HJELMSØ, 2014).

1.2 Atrazina

A atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) é um herbicida pertencente à família das s-triazinas, que inclui também a simazina e a cianazina (Figura 3). É um composto polar, fracamente básico, possui baixa pressão de vapor e peso molecular igual a 215,69 g.mol^{-1}. É solúvel em diferentes solventes orgânicos, tais como acetato de etila, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e éter, entretanto, a solubilidade em água é moderada (33,0 mg.L^{-1}). A atrazina foi introduzida no mercado agrícola a partir dos anos 1960 e pode também ser usada juntamente com outros agrotóxicos. Suas propriedades químicas favorecem a contaminação de águas superficiais e subterrâneas devido à alta susceptibilidade da atrazina à lixiviação e ao escoamento (RIBAUDO; BOUZAHER, 1994; FAN; SONG, 2014).

Figura 3. Estrutura química da molécula de atrazina.



Fonte: *o autor.*

A atrazina é um importante herbicida na produção de milho e é também amplamente utilizada em culturas de sorgo e cana-de-açúcar. A aplicação pode ser feita antes do preparo do solo e em pré ou pós-emergência das plantas daninhas. É um herbicida bem tolerado pelo milho e sorgo, que absorvem e metabolizam esse composto, inativando-o em seguida (RIBAUDO; BOUZAHER, 1994). É classificado como um herbicida sistêmico e seletivo, pois atua apenas no controle das ervas de

folhas largas com pouco ou nenhum dano à cultura (JAVARONI et al., 1999; DUTTA; SINGH, 2013).

A atrazina é absorvida pelas plantas através das raízes após a germinação. O transporte dessa molécula até as folhas é feito via xilema. Nas folhas, atua através da inibição do fotossistema II (FSII), operando como inibidora do transporte de elétrons na fase luminosa (MARIN-MORALES et al., 2013). A molécula de atrazina liga-se a proteína D_1 no sítio de acoplamento à plastoquinona Q_B, um aceptor de elétrons, impedindo a transferência dos elétrons do FSII para o FSI e paralisando o processo fotossintético. A inibição da síntese de energia leva ao esgotamento das reservas e à formação de radicais tóxicos que rompem a membrana dos cloroplastos. Os sintomas nas plantas daninhas se manifestam através da clorose, necrose e morte. Se aplicada em pós−emergência, a atrazina é absorvida através das folhas, onde penetra rapidamente e atua por contato (ROMAN et al., 2005; MARCHI et al., 2008).

Apesar de ser considerada moderadamente tóxica, a atrazina pode causar danos no DNA de organismos aquáticos e interferir no equilíbrio do ecossistema (PRATT et al., 1988; CAVAS, 2011). A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos classificou a atrazina como um produto químico da classe C - potencialmente carcinogênico - após estudos demonstrarem que a atrazina causa câncer em ratos que receberam altas doses do produto (USEPA, 2006). Também em estudos de toxicidade crônica em animais, diversos efeitos adversos no coração, pulmão, rins, fígado, baço, glândulas adrenais e cérebro foram observados (RIBAUDO; BOUZAHER, 1994). A exposição à atrazina em longo prazo foi também associada ao aumento do risco de câncer de ovário e do câncer de mama em humanos (SANDERSON et al., 2000). Além disso, a atrazina é considerada um desregulador endócrino, pois pode interferir na homeostase dos hormônios estrogênicos ao induzir a atividade da enzima aromatase, responsável por catalisar a conversão de testosterona a estrógeno (SANDERSON et al., 2000; MORAES et al., 2008; CARMO et al., 2013). Nas últimas décadas, diversos estudos demonstraram a feminilização de peixes, répteis, anfíbios e mamíferos após exposição prolongada a atrazina (CARMO et al., 2013).

1.2.1 Efeitos da atrazina na microbiota do solo

O solo é um sistema complexo que abriga a maior diversidade microbiana no ambiente terrestre, portanto é essencial para o equilíbrio e o funcionamento do ecossistema (LEITE, 2007; ROESCH et al., 2007). A fração biológica do solo é formada principalmente por micro-organismos, os quais realizam funções vitais para a estruturação do solo, tais como decomposição da matéria orgânica, ciclagem de nutrientes, degradação de substâncias tóxicas, controle biológico de patógenos e solubilização de minerais (LEITE, 2007). A composição do solo influencia a diversidade microbiana, que varia de acordo com fatores abióticos como temperatura, umidade e pH, e também devido a fatores bióticos como competição e parasitismo (KAKIRDE et al., 2010).

Estima-se que um grama de solo contém milhões de bactérias, arqueas, vírus e fungos. Esta complexa biodiversidade de organismos é chamada de biomassa microbiana do solo, sendo que grande parte permaneceu inexplorada por várias décadas. O desenvolvimento de métodos moleculares baseados em ácidos nucléicos permitiu um grande avanço no estudo da ecologia microbiana do solo, já que apenas cerca de 1% destes micro-organismos pode ser cultivado em meios de cultura tradicionalmente usados em laboratório (HIRSCH et al., 2010; KAKIRDE et al., 2010).

A atrazina inibe o crescimento de organismos fotossintetizantes como algumas espécies de algas encontradas no solo e em ambientes aquáticos (HUSSAIN et al., 2009). Estes organismos são comumente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental, pois são sensíveis a diversas substâncias tóxicas. Além disso, alguns estudos demonstraram que uma única aplicação de atrazina no solo pode resultar em mudanças na estrutura da comunidade microbiana, causando diminuição de bactérias gram-negativas, aumento da população de bactérias gram-positivas e diversidade microbiana reduzida com o tempo (BANKS et al., 2014; CHEN et al., 2015). Sáez et al. (2006) mostraram que a atrazina também inibe o crescimento e a atividade desnitrificante da bactéria Xanthobacter autotrophicus in vitro. Após uma aplicação de herbicidas, a comunidade microbiana do solo pode levar até oito semanas para se estabilizar (MORETTO et al., 2017), mas em longo prazo, repetidas aplicações de atrazina pode causar mudanças significativas na estrutura da comunidade bacteriana do solo (SEGHERS et al., 2003).

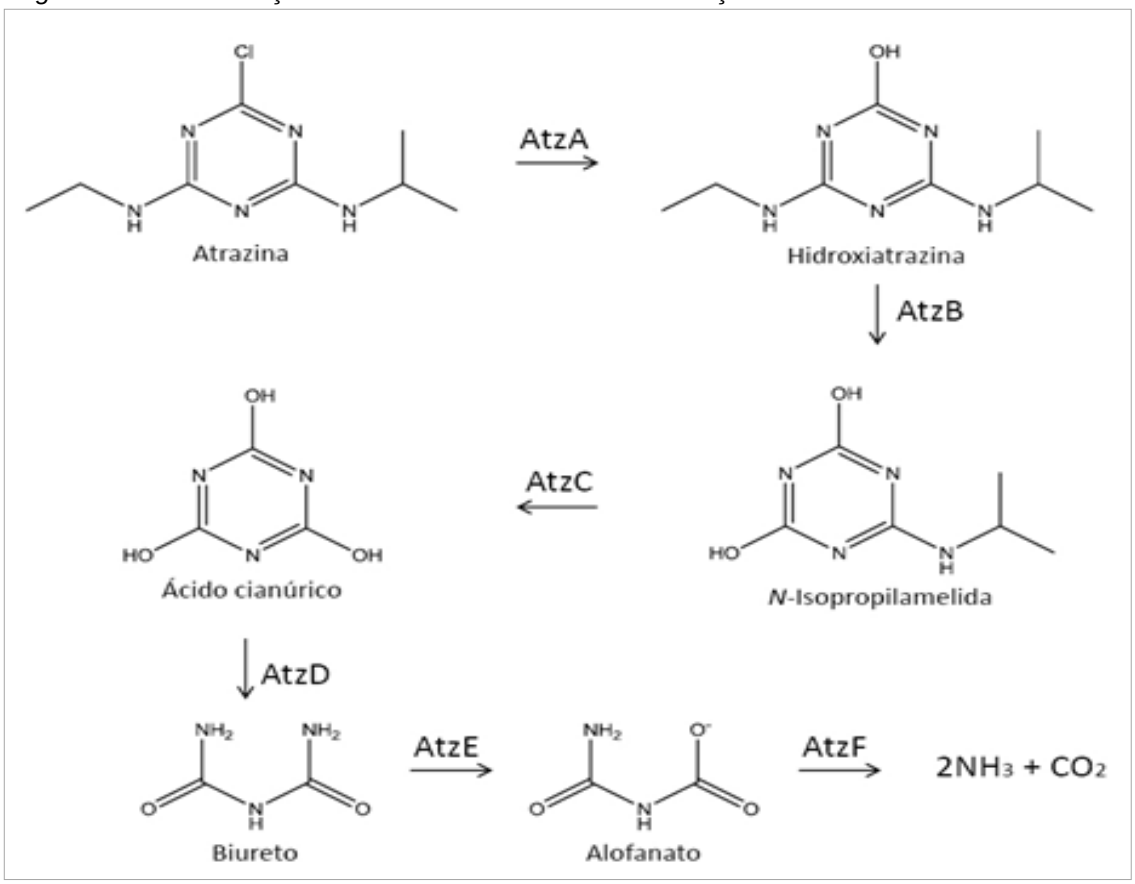
1.2.2 Biodegradação da atrazina

A persistência de um determinado herbicida no solo depende de processos de dissipação incluindo a degradação, que pode ser química, física ou biológica. A degradação pode resultar na mineralização completa do herbicida ou na sua conversão em metabólitos (PELIZZETTI et al., 1990; BALMER; SULZBERGER, 1999; CARVALHO, 2013).

O herbicida atrazina é degradado lentamente no meio ambiente, com uma meia-vida entre 13 e 260 dias, de acordo com variações ambientais e condições do solo (USEPA, 2006). Quando o ambiente do solo muda de aeróbio para anaeróbio, a taxa de degradação cai consideravelmente e pode levar até 660 dias. Ao atingir reservatórios de água, a persistência do composto aumenta, podendo chegar a dois anos (RIBAUDO; BOUZAHER, 1994).

A principal via de transformação da atrazina no solo é a via biológica. A biodegradação da atrazina é realizada por bactérias e fungos que fazem parte da microbiota do solo. As transformações da molécula ocorrem através do deslocamento enzimático e hidrolítico de substituintes dos átomos de carbono que formam o anel s-triazínico (SHAPIR et al., 2007). As modificações da molécula de atrazina incluem a descloração, n-desalquilação e formação de ácido cianúrico como principal metabólito intermediário, seguido de transformações hidrolíticas que resultam na clivagem do anel s-triazínico e mineralização completa com liberação de amônia (Figura 4). O nitrogênio resultante do metabolismo da atrazina é utilizado pelos micro-organismos do solo (DUTTA; SINGH, 2013).

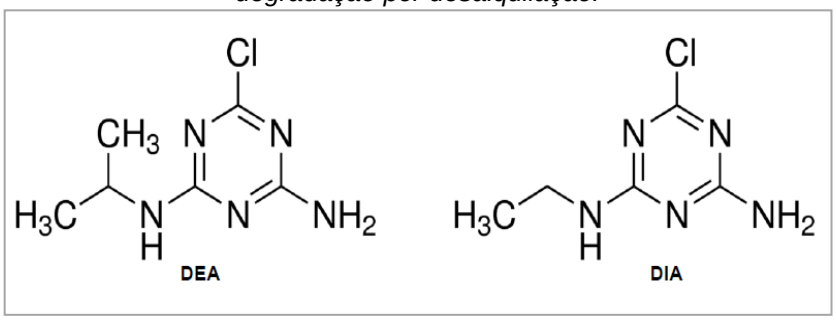
Figura 4 - Transformações da molécula de atrazina e formação de metabólitos intermediários.



Fonte: *Adaptado de Udikovic-Kolic et al., 2013.*

Shapir et al. (2007) sugerem que o processo realizado pelos micro-organismos do solo e descrito acima evoluiu e se espalhou recentemente, pois os primeiros estudos de degradação da atrazina reportam um metabolismo através da desalquilação. O processo através da desalquilação não leva à mineralização completa da molécula e forma os subprodutos desetilatrazina (DEA) e desisopropilatrazina (DIA) (Figura 5), que são frequentemente detectados em amostras de água e apresentam o mesmo perfil toxicológico da molécula de atrazina (NAGY et al., 1995; COELHO; BERNARDO, 2017).

Figura 5 - Estrutura química dos subprodutos clorados da molécula de atrazina resultantes de degradação por desalquilação.



Fonte: Adaptado de Sene et al. 2010.
DEA: desetilatrazina e DIA: desisopropilatrazina.

1.2.3 Micro-organismos degradadores de atrazina

O metabolismo de compostos triazínicos tem sido amplamente estudado e os genes que codificam as enzimas envolvidas no processo de degradação da atrazina já foram identificados e caracterizados (VIBBER et al., 2007).

A linhagem Pseudomonas sp. ADP (de Atrazine Degrading Pseudomonas) é um micro-organismo de referência para a mineralização da atrazina (DE SOUZA et al., 1996). Este isolado possui um plasmídeo autotransmissível denominado pADP-1, onde localizam-se os genes que codificam as enzimas responsáveis pela mineralização desse herbicida (DE SOUZA et al., 1998b; WACKETT et al., 2002). A mineralização da atrazina pela Pseudomonas sp. ADP envolve seis etapas enzimáticas codificadas pelos genes atzA, atzB e atzC e pelo operon atzDEF. Os produtos dos genes atzA, atzB e atzC são responsáveis pela remoção do cloro e dos resíduos de isopropilamina e etilamina para produzir ácido cianúrico (SADOWSKY et al., 1998; GARCÍA-GONZÁLEZ et al., 2005). Para completar o processo de degradação da molécula de atrazina, o regulador atzR atua na ativação do operon atzDEF que codifica as enzimas responsáveis pela transformação do ácido cianúrico em NH_3 e CO_2 (SHAPIR et al., 2005; PORRÚA et al., 2010).

A biodegradação da atrazina não é realizada somente por bactérias do gênero Pseudomonas. Nas últimas décadas, diversas espécies bacterianas pertencentes ao gênero Arthrobacter foram isoladas de solos contaminados com atrazina em diferentes países. Estes micro-organismos apresentam altas taxas de degradação da atrazina in vitro e um conjunto de genes diferente daquele observado na Pseudomonas sp. ADP (FAN; SONG, 2014). Os genes atzB, atzC e trzN, foram detectados em isolados do gênero Arthrobacter e em outras espécies bacterianas gram-positivas (VAISHAMPAYAN et al., 2007; El SEBAÏ et al., 2011; ZANG et al., 2011; WANG; XI, 2012). O gene trzN, assim como o gene atzA, codifica uma enzima pertencente a superfamília amidohidrolase, que participa da transformação da molécula de atrazina em hidroxiatrazina. Apesar de apresentarem funções semelhantes, as duas enzimas diferem em mais de 70% na composição de aminoácidos (MULBRY et al., 2002).

Os genes de degradação da atrazina são dispersos e altamente conservados (DE SOUZA et al., 1998a) e foram detectados em isolados provenientes do Canadá, Estados Unidos, Chile, França, Croácia, China, Brasil, Índia e Egito, com similaridade acima de 97% (VAISHAMPAYAN et al., 2007; HERNÁNDEZ et al.,

2008; SENE et al., 2010; El SEBAÏ et al., 2011; FERNANDES et al., 2014). A organização dos genes atz parece ser variável, já que podem se localizar em diferentes plasmídeos ou no DNA cromossômico (ROUSSEAUX et al., 2002; VAISHAMPAYAN et al., 2007).

Culturas puras e consórcios bacterianos são capazes de utilizar a atrazina como fonte de nitrogênio. Além da mineralização da atrazina por culturas puras individuais, estudos demonstraram a mineralização por consórcios simples ou complexos contendo até oito espécies bacterianas diferentes. Além disso, os genes atz foram detectados nos diversos micro-organismos que realizam as diferentes etapas da degradação da molécula. Espécies de Caulobacter, Variovorax, Rhizobium, Pseudomonas, Agrobacterium, Burkholderia, Sphingomonas, Nocardia, Flavobacterium e Achromobacter foram descritas em consórcios bacterianos contendo genes atz (BOUQUARD et al., 1997; SMITH et al., 2005; MARTIN-LAURENT et al., 2006; VAISHAMPAYAN et al., 2007; UDIKOVIĆ-KOLIĆ et al., 2010; El SEBAÏ et al., 2011).

1.2.4 Tratamento de áreas contaminadas por atrazina

A biorremediação é uma técnica que utiliza micro-organismos e seus produtos para remover, reduzir ou transformar contaminantes do solo, sedimentos, água e ar. A viabilidade da técnica de biorremediação depende do local a ser tratado. O tratamento pode ser realizado diretamente no local contaminado - in situ - ou ex situ, que requer a remoção de parte da região contaminada (SAGARKAR et al., 2014; ADAMS et al., 2015).

A biodegradação no solo é afetada por diversos fatores, tais como nutrientes, pH, temperatura, umidade e oxigênio. A adição de nutrientes e aceptores de elétrons específicos ao solo que modificam o ambiente para estimular a atividade da população de micro-organismos existentes no local é conhecida como bioestímulo. Já a adição de micro-organismos previamente isolados em laboratório ao ambiente contaminado é a chamada técnica de bioaumentação ou bioadição. A bioaumentação é necessária em locais onde a população indígena não apresenta potencial para degradar o contaminante e tem sido usada desde os anos 1970 em áreas contaminadas por petróleo e seus derivados (NEWCOMBE; CROWLEY, 1999; ADAMS et al., 2015; CYCOŃ et al., 2017).

A biodegradação é um método eficaz na remoção da atrazina de ambientes contaminados (KLEIN et al., 2012). Lima et al. (2009) demonstraram que a inoculação de Pseudomonas sp. ADP combinada com a adição de citrato de sódio em solos contaminados é o método mais adequado para eliminar altas concentrações de atrazina. Estudos sugerem que uma única inoculação do isolado in situ é pouco eficiente na descontaminação de ambientes, mas após repetidas aplicações a eficiência da degradação aumenta significativamente (NEWCOMBE; CROWLEY, 1999). Cápsulas contendo células de Pseudomonas sp. ADP em condições de repouso e proliferação foram testadas e apresentaram resultados significativos na degradação de atrazina em meio líquido, fornecendo uma base para o desenvolvimento de biorreatores especializados na mineralização do herbicida atrazina (KLEIN et al., 2012). Uma análise prévia e detalhada dos isolados inoculados ao solo permite o acompanhamento do processo de biorremediação in situ e também a verificação da sobrevivência dos micro-organismos no ambiente (SAGARKAR et al., 2016). Um monitoramento do processo de biorremediação realizado por Sagarkar et al. (2014) mostrou que a adição de um consórcio bacteriano não altera o perfil da comunidade microbiana do solo e, portanto, é uma técnica segura e eficaz. Em contrapartida, estudos realizados por Cheyns et al. (2011) sugerem que a presença de uma população nativa com habilidade para degradar a atrazina no solo é o fator mais importante na remoção do contaminante.

RELEVÂNCIA DO ESTUDO

2 Relevância do estudo

A produção agrícola é ainda altamente dependente da aplicação de agrotóxicos. Sistemas de produção alternativa começam a surgir e estão em crescimento constante, entretanto, em curto prazo, a produção de alimentos não poderá dispensar o uso de insumos no campo. Os efeitos positivos dos agrotóxicos no aumento da produção agrícola são evidentes, mas, neste contexto, é importante destacar que, mesmo se aplicados nas quantidades recomendadas, o uso constante de pesticidas leva ao acúmulo de contaminantes no ambiente. Os produtos químicos entram na cadeia alimentar, interferem no equilíbrio do ecossistema e podem persistir por anos.

Apesar de ter sido banido na Europa, o herbicida atrazina continua sendo muito usado em diversos países da Ásia e do continente americano, incluindo o Brasil. A detecção de resíduos de atrazina em amostras de água vários anos após a proibição na Europa confirma a persistência e a capacidade de acumulação da molécula no ambiente. Assim, a preocupação quanto aos efeitos ecotoxicológicos de contaminantes ambientais como a atrazina levou ao aumento de pesquisas relacionadas a esse tema nas últimas décadas. Neste contexto, a microbiologia associada à degradação de poluentes é um campo de pesquisa em constante desenvolvimento e o uso de micro-organismos na descontaminação de ambientes tem sido estudado há anos. Resultados promissores de estudos iniciais impulsionaram a busca por novos micro-organismos com capacidade de degradação para o desenvolvimento de técnicas de biorremediação mais modernas e eficientes. Ainda, o esclarecimento sobre os mecanismos relacionados ao processo de degradação desses compostos, a avaliação da microbiota responsável por tais mecanismos e também daquela afetada no processo, são essenciais para o desenvolvimento de tecnologias para a descontaminação de ambientes.

Deste modo, as técnicas de biorremediação oferecem uma solução econômica e ecologicamente viável para a restauração de ambientes contaminados. Contudo, antes de aplicar as técnicas de biorrmediação, é extremamente importante caracterizar e determinar a capacidade de biodegradação do micro-organismo in vitro para garantir a segurança e eficiência de novas tecnologias.

OBJETIVOS

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Os objetivos deste trabalho foram a caracterização do processo de degradação da molécula de atrazina por micro-organismos isolados de amostras de solo utilizando técnicas cromatográficas e moleculares, bem como a análise dos efeitos da aplicação do herbicida atrazina na estrutura da comunidade microbiana do solo.

3.1 Objetivos específicos

- *Selecionar bactérias de amostras de solo com histórico de aplicação do herbicida atrazina que apresentem potencial para mineralização da molécula de atrazina.*
- *Detectar os genes que fazem parte da via de degradação da atrazina nos isolados bacterianos selecionados.*
- *Pesquisar a presença de plasmídeos nos isolados bacterianos e determinar se os genes de degradação da atrazina são de origem plasmidial.*
- *Estudar a expressão dos genes de degradação da atrazina antes e após tratamento com o herbicida.*
- *Determinar a eficiência de biodegradação da atrazina pelas bactérias isoladas.*
- *Confirmar a biodegradação da atrazina pelos isolados bacterianos do estudo através da detecção de metabólitos formados a partir da transformação da molécula de atrazina.*
- *Formar consórcios bacterianos compostos por duas ou mais espécies bacterianas diferentes e verificar a capacidade de degradação da atrazina pelos micro-organismos em consórcio.*
- *Avaliar o potencial de degradação da atrazina pela comunidade microbiana do solo através da análise de abundância dos genes atzA, atzD e trzN.*
- *Verificar possíveis mudanças na estrutura da comunidade microbiana causadas pela aplicação do herbicida atrazina no solo.*

MATERIAL E MÉTODOS

4 Material e Métodos

4.1 Materiais utilizados no estudo

A atrazina comercial (Nortox, Brasil) usada no enriquecimento das amostras de solo e no preparo dos meios de cultura foi uma cortesia de um produtor de milho local. A atrazina (99% de pureza) usada nos testes de degradação foi adquirida através da empresa Sigma-Aldrich (Alemanha). O meio de cultura ATZ-R usado no isolamento bacteriano e nos testes de degradação contém (L^{-1}): 67 mL de KH_2PO_4 1M (pH 6,8), 2 g de citrato de sódio, 5 mL de Sal-R (16 g de $MgSO_4.7H_2O$, 0,4 g de $FeSO_4.7H_2O$, 0,8 mL de HCl), 0,2 mL de $CaCl_2$ 1M e 10 mL de glicose a 20% (MANDELBAUM et al. 1993). Para a preparação de placas de meio sólido foram adicionados 1,5% de ágar bacteriológico.

4.2 Coleta de amostras de solo

Em fevereiro de 2014, sete amostras de solo foram coletadas na Fazenda Experimental de Ribeirão Preto, de acordo com as recomendações técnicas do local. Os locais de coleta foram escolhidos devido à recente aplicação de herbicidas no solo, de onde foram obtidos 500 gramas de cada ponto de coleta. As amostras foram acondicionadas em sacos plásticos esterelizados. A tabela 1 apresenta informações sobre os locais de cada amostra coletada.

Tabela 1 - Amostras coletadas na Fazenda Experimental de Ribeirão Preto - SP.

Amostra	Cultura	Profundidade da coleta	Aplicação de herbicidas
1	Sorgo (plantio convencional)	0-5 cm	Atrazina 500 16/01/2014 4L.ha^{-1}
2	Sorgo (plantio convencional)	5-10 cm	Atrazina 500 16/01/2014 4L.ha^{-1}
3	Milho (plantio convencional)	0-5 cm	Atrazina 500 27/12/13 4L.ha^{-1}
4	Milho (plantio convencional)	5-10 cm	Atrazina 500 27/12/13 4L.ha^{-1}
5	Milho (plantio direto)	0-5 cm	Atrazina 500 27/12/13 4L.ha^{-1}
6	Milho (plantio direto)	5-10 cm	Atrazina 500 27/12/13 4L.ha^{-1}
7	Área de dessecação	0-5 cm	Aplicação de atrazina na safra anterior.

As amostras foram enviadas ao Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biorremediação (LAMAB) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP) logo após a coleta para processamento imediato. Alíquotas de cada amostra foram armazenadas a 4˚C para análises posteriores.

4.3 Isolamento e identificação das bactérias

Foram realizados dois métodos diferentes para a seleção de micro-organismos das amostras de solo coletadas. No primeiro método, 1 g de cada amostra de solo foi adicionado a um tubo de vidro contendo 5 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani) com adição de 20 ppm de atrazina e este incubado à temperatura de 30˚C por 24 horas sob agitação (150 rpm). Após esse período, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-4} com solução fisiológica esterilizada (NaCl 0,85%) e um volume de 200 µL do material diluído foi semeado em placas de meio ATZ-R com 1000 ppm de atrazina para facilitar a seleção de isolados bacterianos potencialmente degradadores (MUKHERJEE et al. 2011).

A segunda metodologia de isolamento bacteriano do solo foi utilizada com o objetivo de potencializar a seleção de micro-organismos degradadores da atrazina. Neste método, 50 g de cada amostra de solo foram adicionados a 200 mL de meio líquido ATZ-R contendo 1000 ppm de atrazina e os frascos incubados por 4 semanas a 30˚C, sob agitação (150 rpm). Após sete dias de incubação, 200 µL da amostra diluída foram plaqueados em placa de meio ATZ-R contendo 1000 ppm de atrazina. Acrescentou-se à amostra inicial mais 100 mL de meio líquido ATZ-R e 1000 ppm de atrazina e repetiu-se o processo de incubação. Este procedimento foi realizado semanalmente, durante o período de incubação de quatro semanas e o isolamento de micro-organismos foi acompanhado durante todo o período através do crescimento de colônias em placas de meio ATZ-R. As placas foram incubadas a 30˚C por até cinco dias e observou-se o crescimento bacteriano e a formação de halos em torno das colônias para a seleção dos micro-organismos com potencial de degradação da atrazina (adaptado de GARGOURI et al. 2014). A atrazina possui baixa solubilidade em água e, por esse motivo, após o preparo do meio sólido, as moléculas de atrazina precipitam na placa e deixam o meio esbranquiçado. Ao ser degradada pelos micro-organismos, a atrazina desaparece do meio, formando halos em torno das colônias.

Os isolados bacterianos selecionados foram caracterizados molecularmente, por sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S, utilizando os iniciadores 63F (5'-CAGGCCTAACACATGCAAGTC-3') e 1387R (5'-GGGCGGWGTGTACAAGGC-3') (MARCHESI et al., 1998).

4.4 Extração de DNA genômico e plasmidial

O DNA genômico dos isolados foi extraído para ser utilizado como molde nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A extração do DNA foi realizada utilizando-se o QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Alemanha) segundo as recomendações do fabricante. Após a extração, a concentração e a pureza do DNA foram determinadas por análise espectrofotométrica em luz UV, pelo equipamento NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA), empregando-se os comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. As extrações de DNA com razão no intervalo entre 1,6 e 1,9 foram consideradas de boa qualidade devido ao baixo nível de impurezas.

O DNA plasmidial das bactérias em estudo foi extraído utilizando-se o kit de extração de DNA plasmidial Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Alemanha), segundo as recomendações do fabricante. Em seguida, as extrações foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose a 0,8%.

4.5 Extração de RNA

O RNA total dos isolados bacterianos foi extraído para ser utilizado nos ensaios de Northern Blot para análise da expressão dos genes atzA, atzB, atzC e atzD antes e após tratamento dos isolados utilizando atrazina na concentração de 100 ppm.

Os isolados sem estímulo com atrazina foram incubados em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) a 30˚C até o crescimento bacteriano atingir a fase exponencial (DO $_{600nm}$ 1,0) para posterior extração do RNA. Para o ensaio de estímulo com atrazina, os isolados do estudo foram incubados em meio líquido ATZ-R com adição de 100 ppm de atrazina a 30˚C e 150 rpm por 48 horas. Em seguida, 30 μL do crescimento bacteriano foram transferidos para meio líquido BHI. As amostras foram incubadas a 30˚C até o crescimento bacteriano atingir a fase exponencial (DO $_{600nm}$ 1,0). Após este período, as amostras foram centrifugadas a 16.000 x g e à temperatura ambiente e o sobrenadante desprezado. As células foram

ressuspendidas em 2 mL de meio ATZ-R com adição de 100 ppm de atrazina e, então, incubadas por 2 horas a 30˚C e 150 rpm. Por fim, o total de cada amostra (2 mL) foi centrifugado e prosseguiu-se com a extração do RNA (DEVERS et al. 2004).

A extração do RNA foi realizada utilizando-se uma combinação entre o reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific, EUA) e o kit de Extração de RNA RNeasy (QIAGEN, Alemanha) segundo as recomendações do fabricante. A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose-formaldeído. Uma alíquota de cada preparação de RNA extraído foi quantificada em NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, EUA), empregando-se os comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm.

4.6 Amplificação dos genes de degradação da atrazina

As reações de PCR para detecção dos genes atzA, atzB, atzC, atzD, atzE e atzF nos isolados bacterianos foram realizadas de acordo com a metodologia descrita por De Souza et al. (1998) e estão detalhadas na tabela 2.

Tabela 2 - Condições das reações para detecção dos genes atz.

Genes	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Extensão Final
atz (A, B,C,D,E,F)	95˚C 1 min	Ver tabela 3. 30 seg	72˚C 1 min	72˚C 10 min
		30 ciclos		

Cada reação de PCR foi realizada com um volume final de 50µL, sendo 28 µL de água deionizada esterilizada, 5 µL do tampão 10x para PCR (PCR buffer minus Mg-10X); 3,5 µL de $MgCl_2$ (25 mM); 1 µL de solução contendo 10 mM de cada desoxinucleotídeo (dATP, dCTP, dGTP e dTTP); 4 µl de cada primer (12,5 pmol); 2 µL de DNA e 2,5 µL (1,25 U) da enzima Taq DNA Polimerase (TrueStart™ Hot Start Taq DNA Polimerase). Os iniciadores utilizados nas reações estão descritos na tabela 3. Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems), com o kit DYEnamic ET Dye (GE Health Care) Terminator, segundo recomendações do fabricante. As sequências obtidas foram analisadas online no programa BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/) para pesquisa da identidade com outras sequências disponíveis no Genebank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados neste trabalho.

Iniciador	Sequência (5' → 3')	T(˚C)*	Finalidade
atzAf	*ACGGGCGTCAATTCTATGAC*	*58*	*Detecção do gene atzA; sonda utilizada em ensaios de Nothern Blot e Southern Blot.*
atzAr	*CACCCACCTCACCATAGACC*		
atzBf	*TCACCGGGGATGTCGCGGGC*	*58*	*Detecção do gene atzB; sonda utilizada em ensaios de Nothern Blot e Southern Blot.*
atzBr	*CTCTCCCGCATGGCATCGGG*		
atzCf	*GCTCACATGCAGGTACTCCA*	*50*	*Detecção do gene atzC; sonda utilizada em ensaios de Nothern Blot e Southern Blot.*
atzCr	*GTACCATATCACCGTTTGCCA*		
atzDf	*GGAGACATCATATGTATCACATCGACGTTTTC*	*60*	*Detecção do gene atzD; sonda utilizada em ensaios de Nothern Blot e Southern Blot.*
atzDr	*CCAATAAGCTTACGCGGGCAATGACTGCA*		
atzEf	*TACGCGGTAAAGAATCTGTT*	*52*	*Detecção do gene atzE*
atzEr	*GGAGACCGGCTGAGTGAGA*		
atzFf	*CGATCGGAAAAACGAACCTC*	*52*	*Detecção do gene atzF*
atzFr	*CGATCGCCCCATCTTCGAAC*		

** Temperatura de anelamento.*

4.7 Northern Blot

O ensaio de Northern Blot foi realizado com o objetivo de verificar o padrão de expressão dos genes de degradação de atrazina após o estímulo com a atrazina e na ausência deste estímulo. Para obter as sondas utilizadas na detecção do mRNA dos genes atz foi necessário isolar os fragmentos através de reações de PCR contendo as regiões internas dos genes atzA (fragmento de 200 pb); atzB (fragmento de 500 pb); atzC (fragmento de 600 pb) e atzD (fragmento de 1100 pb). As condições das reações de PCR foram descritas no item 4.6 e os iniciadores utilizados estão descritos na Tabela 3. Após visualizar os produtos de PCR em gel de agarose, o restante da reação de PCR foi purificado através do kit GFX™ PCR DNA (GE Healthcare, EUA) e os fragmentos foram marcados radioativamente e utilizados como sonda.

A marcação da sonda foi feita pelo método de iniciação aleatória (FEINBERG; VOGELSTEIN, 1993). Para isso, 25 ng do fragmento de DNA foi marcado com 20 µCi de [α-^{32}P]-dCTP (PerkinElmer, EUA) usando Exo-Klenow enzyme DECAprime™ II Kit (Ambion® Thermo Fisher Scientific, EUA). A reação ocorreu durante 20 min a 37˚C e foi interrompida com a adição de 1 µL de EDTA 0,5 M. Em seguida, o [α-^{32}P]-dCTP livre foi removido com o Kit Wizard® SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA) e 7,5 µg de cada RNA foi submetido à eletroforese em gel desnaturante de agarose-formaldeído 1,5% em tampão MOPS 1X. O gel foi

visualizado sob luz UV, fotografado e transferido para uma membrana de nylon Hybond-XL (GE Healthcare, UK) (AUSUBEL et al. 1992). As membranas foram pré-hibridizadas em 10 mL de solução ULTRAhyb™ (Ambion® Thermo Fisher Scientific, EUA) à 42˚C por 30 minutos e incubadas com a sonda previamente desnaturada (100˚C por 4 minutos) durante 16 horas à 42˚C. Após a hibridização, as membranas foram lavadas duas vezes em solução 2x SSC 0,1% SDS por 5 minutos a 42˚C e duas vezes em solução 0,1x SSC 0,1% SDS por 15 minutos a 42˚C. Após a secagem, as membranas foram expostas a filmes de raios-X a -70˚C por tempos variados de 2 a 48 horas.

4.8 Southern Blot

O ensaio de Southern Blot foi realizado Para verificar a localização dos genes de degradação da atrazina no DNA plasmidial dos isolados (SOUTHERN, 1975). O DNA plasmidial foi extraído através do kit Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Alemanha) e digerido com a enzima HindIII (Promega, EUA). Após a eletroforese do DNA em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X, utilizando como marcador de peso molecular DNA Ladder 1 Kb plus (Invitrogen, EUA), o gel foi corado com brometo de etídio, visualizado sob luz UV e fotografado. O DNA do gel de agarose foi transferido para uma membrana nylon Hybond-XL (GE Healthcare, UK) (AUSUBEL et al., 1992) e a seguir foi realizado o procedimento de Southern Blot nas mesmas condições de hibridização e lavagens descritas para o Northern Blot (item 4.7), utilizando também as mesmas sondas marcadas radioativamente. Após secagem, a membrana foi exposta a filme de raios-X durante a noite a -70˚C. Os ensaios de Northern e Southern Blot foram realizados no Laboratório de Regulação da Expressão Gênica e Patogenicidade Bacteriana do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP, sob a coordenação do Prof. Dr. José Freire da Silva Neto.

4.9 Ensaio de biodegradação da atrazina

4.9.1 Teste de biodegradação da atrazina em meio líquido - Análise em espectrofotômetro

Os testes de degradação da atrazina em meio líquido foram realizados para determinar o potencial de degradação da atrazina pelos isolados do estudo em

culturas puras e em consórcio. O experimento foi realizado em meio líquido ATZ-R contendo 100 ppm de atrazina como única fonte de nitrogênio.

Cada isolado e consórcio bacteriano foi incubado à temperatura de 30˚C a 150 rpm. A absorbância em 225 nm foi medida nos intervalos de 0, 48 e 120 horas para monitorar a presença de atrazina no sobrenadante de cada amostra após centrifugação a 16.000 x g e a 4˚C (GARCIA-GONZALEZ et al. 2003). A análise foi realizada em espectrofotômetro de luz ultravioleta Genesys 10S UV VIS (Thermo Scientific, EUA), em triplicata, e utilizou-se a bactéria padrão Pseudomonas sp. ADP como controle positivo. Um controle contendo meio líquido ATZ-R e 100 ppm de atrazina sem inóculo bacteriano foi usado para verificar a ocorrência de degradação espontânea do herbicida.

A análise estatística foi realizada utilizando o teste ANOVA pelo programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software). O teste foi realizado com o objetivo de avaliar se houve degradação da atrazina e também para comparar a eficácia entre as amostras. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que apresentaram valores de $p<0,05$.

4.9.2 Análise em HPLC/DAD e LC-MS/MS

4.9.2.1 Preparo das amostras

As bactérias isoladas neste estudo foram cultivadas em meio de cultura ATZ-R líquido contendo 100 ppm de atrazina por até 168 horas. O ensaio foi realizado com as culturas puras separadamente e também com os isolados formando um consórcio bacteriano. Para cada isolado bacteriano foi feita uma suspensão em solução fisiológica esterilizada 0,9% na escala 0,5 McFarland e, dessa suspensão, $1,5 \times 10^8$ bactérias foram adicionadas ao meio de cultura e incubadas a 30˚C, sob agitação (150 rpm). Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 16.000 x g a 4˚C. O precipitado foi descartado e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,22 µm e analisado por HPLC/DAD. As análises foram realizadas no tempo inicial do experimento, a cada 6 horas durante as primeiras 24 horas de incubação e, após esse período, a cada 24 horas. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.9.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As amostras foram analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês HPLC/DAD) em cromatógrafo em um sistema Shimadzu equipado com duas bombas LC-30AD, degaseificador DGU-20A e detector SPD-M30A DAD. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Kinetex XB-C18 (100 x 2,1 mm, 2,6 µm), fluxo de 0,250 mL.min^{-1}, e a fase móvel utilizada foi (A) água e (B) metanol, ambos contendo 0,1% de ácido fórmico, com gradiente de 2% da fase B até 98% em 15 minutos, mantendo-se constante por 2 minutos. O volume de amostra injetado foi de 5 µL e a coluna foi mantida a 40˚C.

Para a curva de calibração da atrazina foram preparadas triplicatas de solução estoque 50 µg.mL^{-1} e a partir delas foram preparadas soluções independentes nas concentrações de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1 e 0,1 µg.mL^{-1}. Análises estatísticas foram realizadas de acordo com o item 4.9.1.

O ensaio em HPLC/DAD foi realizado no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob a supervisão da Dr^{a}. Anelize Bauermeister e a coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes.

4.9.2.3 Detecção de metabólitos resultantes da biodegradação da atrazina - Análise em LC-MS/MS

As amostras preparadas para análise em HPLC/DAD também foram analisadas em LC-MS/MS. Alíquotas de 1 mL foram retiradas para análise e detecção de metabólitos da atrazina resultantes da biodegradação da molécula. As alíquotas foram centrifugadas a 16000 x g durante 5 minutos a 4˚C e o sobrenadante foi analisado.

Para a análise cromatográfica foi utilizado um sistema LC (Shimadzu, Japão) composto por uma bomba binária, sistema e injeção automáticos, acoplado a um espectrômetro de massas triplo-quadrupolo (Quatro-LC, Micromass, UK), interfaceado por uma fonte de ionização eletrospray (ESI). O controle instrumental e o processamento de dados foram realizados pelo software Masslynx 4.0. A separação cromatográfica foi feita utilizando-se a coluna analítica X-Terra C18 (3.9 mm x 100 mm x 3.5 µm, Waters, EUA) como fase estacionária. A fase móvel foi composta por uma mistura de solução aquosa contendo ácido fórmico a 0,1% e acetonitrila, no método isocrático 1:1 (v/v). A vazão da fase móvel foi de 0,30

mL.min^{-1}. O forno de coluna cromatográfica foi ajustado a 30˚C. O volume de injeção das amostras foi de 5 µL. A interface ESI foi configurada para operar no modo positivo. As temperaturas do bloco e do gás de dessolvatação foram ajustadas a 100˚C e 350˚C, respectivamente. Nitrogênio foi usado como gás de secagem e nebulização, enquanto que argônio foi usado como gás de colisão. A voltagem e a energia de colisão empregadas durante as análises foram 15 V e 20 eV, respectivamente. As análises foram realizadas em monitoramento do modo de reação selecionado (SRM) de moléculas protonadas $[M + H]^+$ e seus respectivos fragmentos. As transições monitoradas (m/z) estão descritas na tabela abaixo.

Tabela 4 - Metabólitos pesquisados na análise em Espectrômetro de Massas.

Analito	Transições MRM
Ácido cianúrico	*129 > 86*
N-isopropilamelida	*170 > 85 e 170 > 128*
Hidroxiatrazina	*198 > 128 e 198 > 156*
Atrazina	*216 > 146 e 216 > 174*

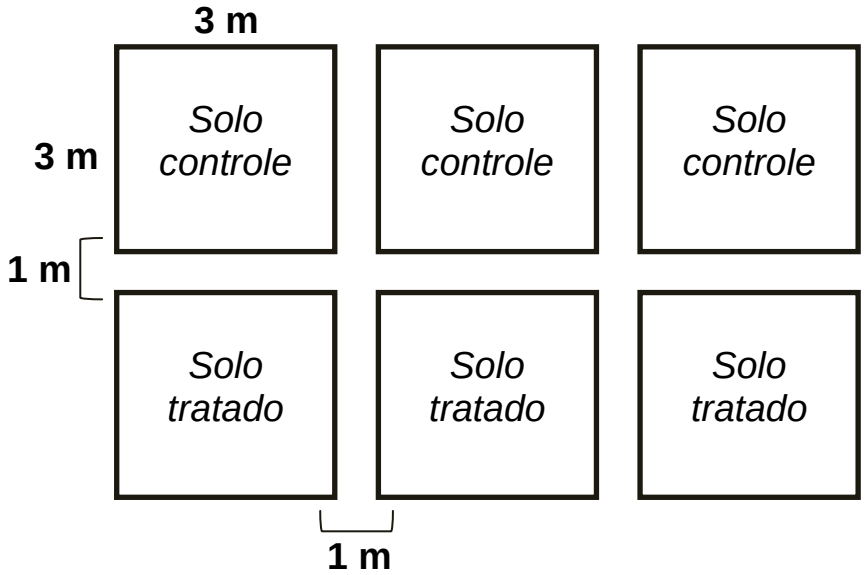
O ensaio em LC-MS/MS foi realizado no Laboratório de Química Analítica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, sob supervisão e coordenação do Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal.

4.10 Análise da comunidade bacteriana de solo contaminado por atrazina

4.10.1 Experimento de campo e coleta das amostras de solo

Um experimento de campo foi conduzido na cidade de Tambaú, São Paulo (21˚ 31' S, 47˚ 16' O a 540 metros) entre Novembro de 2016 a Fevereiro de 2017. De acordo com a Classificação Climática de Köppen-Geiger (2007), o clima local é o subtropical úmido (Cwa), caracterizado por invernos secos e verões chuvosos e temperaturas entre 18 e 28˚C (PEEL et al., 2007). Seis mesocosmos de 9 m^2 cada foram construídos em uma área agrícola e tratados com atrazina na concentração de 6,5 L.ha^{-1}(450 ppm). O solo da região é de textura argilosa (EMBRAPA, 2013), pH de 5,7 e teor de matéria orgânica de 2,3%. O experimento foi conduzido em triplicata. Uma amostra do solo foi coletada antes da aplicação do herbicida e a coleta de amostras seguintes seguiu uma escala temporal baseada em semanas: 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 8ª e 12ª semanas (Figura 6). As amostras de solo foram coletadas em uma profundidade de 5 a 10 cm em cada mesocosmo.

Figura 6 - Representação do experimento de campo.



Fonte: *o autor.*

4.10.2 Extração de DNA total do solo

O DNA total do solo foi extraído utilizando o PowerSoil® DNA Isolation Extraction Kit (MoBio Laboratories, EUA). A integridade do DNA extraído foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose 0,8% com tampão TAE 1X (Tris 400 mM, ácido acético 20 mM e EDTA 1 mM). Posteriormente, as amostras foram coradas com brometo de etídio, visualizadas e fotografadas sob luz ultravioleta. Uma alíquota de cada amostra de DNA foi quantificada pelo método fluorométrico utilizando o Qubit® (Thermo Fisher Scientific, EUA).

4.10.3 Determinação da abundância dos genes de degradação da atrazina no solo

Os ensaios de PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foram realizados em um aparelho Roche LightCycler 480 II (Roche, Suíça) usando SYBR Green como corante fluorescente. A região v4 do gene ribossomal 16S e três genes associados à degradação da atrazina (atzA, atzD e trzN) foram quantificados. Os iniciadores usados nas reações estão listados na tabela 5. Para cada gene, uma curva padrão foi gerada usando uma diluição seriada (30 cópias/5 µL a 3.000.000 cópias/5 µL) de fragmentos de gene gBlocks® contendo os genes alvos (IDTdna, EUA). Cada experimento foi conduzido em uma placa Roche LightCycler 480 II Multiwell Plate 96 com três triplicatas para cada padrão, controle negativo e DNA molde. A amplificação foi feita em um volume total de 20 µL contendo 10 µL de iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad, EUA), 5 µL de cada DNA ou padrão e o

volume adequado de cada iniciador de cada gene alvo. Para otimizar as reações, foram usados $MgCl_2$ e BSA. Água livre de nuclease foi adicionada para completar o volume de 20 µL de cada reação. As condições das reações de cada gene alvo estão listadas nas tabelas 6 a 8 do Apêndice. Todas as reações foram finalizadas com uma curva de dissociação a 90˚C por 5 segundos, 60˚C por 3 segundos e temperatura de refrigeração de 40˚C por 30 segundos.

Tabela 5 - Iniciadores usados nas reações de qPCR.

Gene	Iniciador	Sequência (5'- 3')
16S rRNA v4	U515F	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA
	U806R	GGACTACHVGGGTWTCTAAT
atzA	atzA F	ACGGGCGTCAATTCTATGAC
	atzA R	CACCCACCTCACCATAGACC
atzD	atzD F	TCCCACCTGACATCACAAAC
	atzD R	GGGTCTCGAGGTTTGATTG
trzN	trzN F	CACCAGCACCTGTACGAAGG
	trzN R	GATTCGAACCATTCCAAACG

A eficiência das reações foi calculada de acordo com a equação $E= [10^{(-1/slope)}]-1$. As reações ocorreram em uma eficiência média de 98%, 94%, 96% e 85% para os genes 16S rRNA, atzA, atzD e trzN, respectivamente. O coeficiente de correlação r^2 de cada curva padrão foi acima de 0,99. Controles negativos resultaram em valores abaixo do limite de detecção ou em valores insignificantes em todas as amostras. A abundância de cada gene foi calculada de acordo com o número de cópias do gene por reação multiplicado pela quantidade de DNA contida em cada grama de solo.

4.10.4 Comunidade bacteriana do solo - Sequenciamento do 16S rRNA

Para verificar possíveis mudanças na estrutura da comunidade bacteriana do solo após tratamento com atrazina, foi realizado o sequenciamento do gene ribossomal 16S das amostras de DNA total extraídas do solo como descrito no item 4.10.2.

A região v4 do gene ribossomal 16S foi amplificada usando-se os iniciadores 515F (5'-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3') e 806R (5'-GACTACHVGGGTWTCTAAT-3') e sequenciada pelo método dual-indexing no

Centro de Genômica da Universidade de Minnesota (UMGC, Minneapolis, MN, EUA) (CAPORASO et al. 2012, GOHL et al. 2016). As amostras foram sequenciadas no Illumina MiSeq (Illumina, Inc., EUA) em um comprimento de leitura de 300 nt, de acordo com as recomendações do fabricante. Os dados brutos foram depositados no Arquivo de fragmentos de sequências (Sequence Read Archive - SRA) do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI): BioProject n° SRP123515.

Os dados de sequenciamento foram analisados usando Mothur versão 1.35.1 (SCHLOSS et al. 2009). As amostras foram ajustadas para 150 nt e pareadas usando o software fastq-join em uma média de junção de aproximadamente 10 nt. As amostras foram também ajustadas de acordo com a qualidade (>35 em 50 nt), bases ambíguas (0), homopolímeros (≤8) e discrepância de iniciadores (≤2). Sequências de alta qualidade foram alinhadas contra o banco de dados SILVA versão 123, pré-agrupadas em 2%. UCHIME foi usado para remover quimeras. Após o corte de qualidade, o tamanho das sequências foi em torno de 174 nt. Para comparações estatísticas, todas as amostras foram rarefeitas por subamostragem aleatória para 48000 fragmentos de sequência por amostra para reduzir o viés estatístico devido ao número variável de fragmentos (TOMASEK et al. 2017). Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) foram fixadas em 97% de similaridade usando agrupamento de ligação completa e a classificação taxonômica foi atribuída contra o Ribosomal Database Project, versão 14. Diferentes bancos de dados foram usados para o alinhamento e a classificação das OTUs (SCHLOSS, 2009).

4.10.5 Análise estatística

Para a análise dos resultados da comunidade bacteriana do solo, os testes ANOVA e post hoc de Tukey, correlação de Spearman e Análise de Correspondência Canônica (CCA) foram realizados utilizando XLSTAT versão 2015.6. O Índice de Shannon, os cálculos de beta diversidade e a ordenação foram calculados usando Mothur. Análises de beta diversidade e ordenação foram realizadas usando matrizes de dissimilaridade Bray-Curtis (BRAY; CURTIS, 1957). Diferenças na composição da comunidade foram avaliadas por análise de similaridades (ANOSIM) e o agrupamento de amostras foi avaliado por análise de variância molecular (AMOVA). A ordenação foi realizada por Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e a correlação de Spearman da abundância das famílias associada à ordenação foi calculada usando o comando corr.axes no

Mothur. A Análise de Redundância (RDA) parcial foi realizada usando o pacote vegan em R (R CORE TEAM, 2012). Todas as análises foram calculadas em α= 0,05 com teste de Bonferroni para comparações múltiplas (TOMASEK et al. 2017). Os ensaios de qPCR e de análise da comunidade bacteriana do solo foram realizados no Laboratório de Ciência do Solo do Instituto de Biotecnologia da Universidade de Minnesota, sob supervisão do Prof. Dr. Michael Sadowsky.

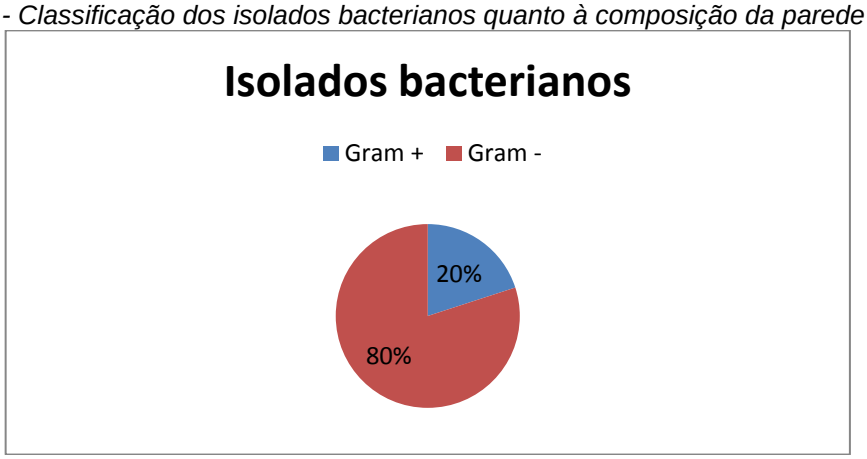
RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento e Identificação de bactérias

Inicialmente, foram isoladas 30 bactérias das 7 amostras de solo coletadas na Fazenda Experimental de Ribeirão Preto (SP). Esses micro-organismos foram isolados a partir da primeira metodologia descrita no item 4.3, utilizando-se 1 g de solo incubado em 5 mL de meio LB por 24 horas. Essas bactérias foram selecionadas de acordo com a morfologia e o crescimento em meio ATZ-R, entretanto, não foram observados halos sugestivos de degradação da atrazina no meio sólido após o crescimento desses isolados. A figura 7 apresenta a classificação dos micro-organismos isolados das amostras de solo coletadas, os quais foram classificados quanto à composição da parede celular pela técnica de coloração de gram.

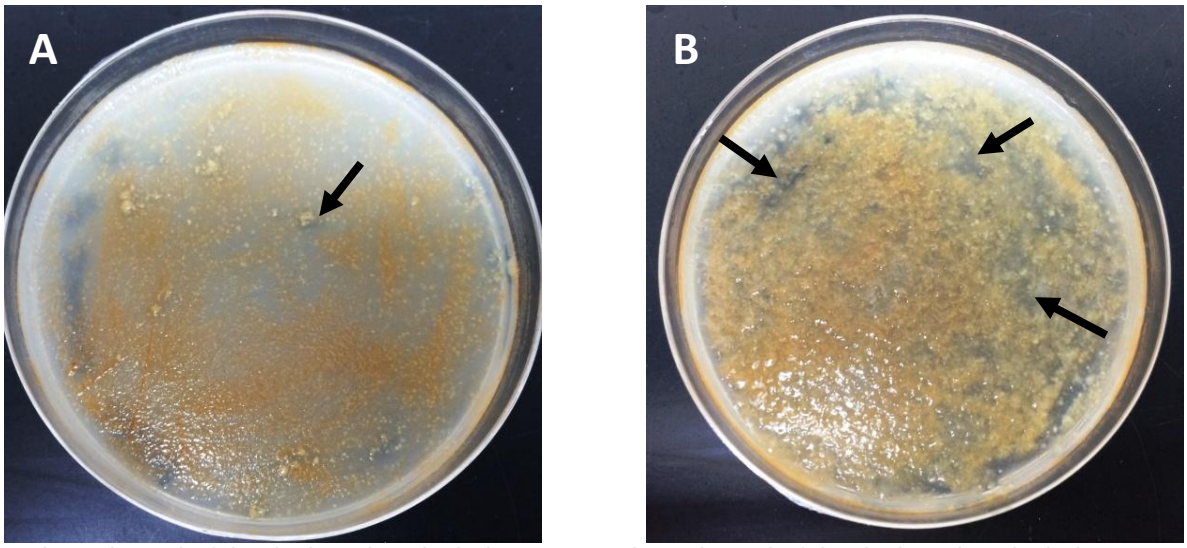
Figura 7 - Classificação dos isolados bacterianos quanto à composição da parede celular.



Por não apresentarem formação de halos em placas de meio ATZ-R, estes isolados não foram selecionados como micro-organismos com potencial para biodegradação da atrazina a serem estudados.

Após o processamento das amostras de solo utilizando-se o segundo método descrito no item 4.3, foram selecionados dois micro-organismos a partir da formação de halos em torno das colônias em meio ATZ-R. As placas de isolamento podem ser vistas na figura 8.

Figura 8 - Placas de meio ATZ-R.

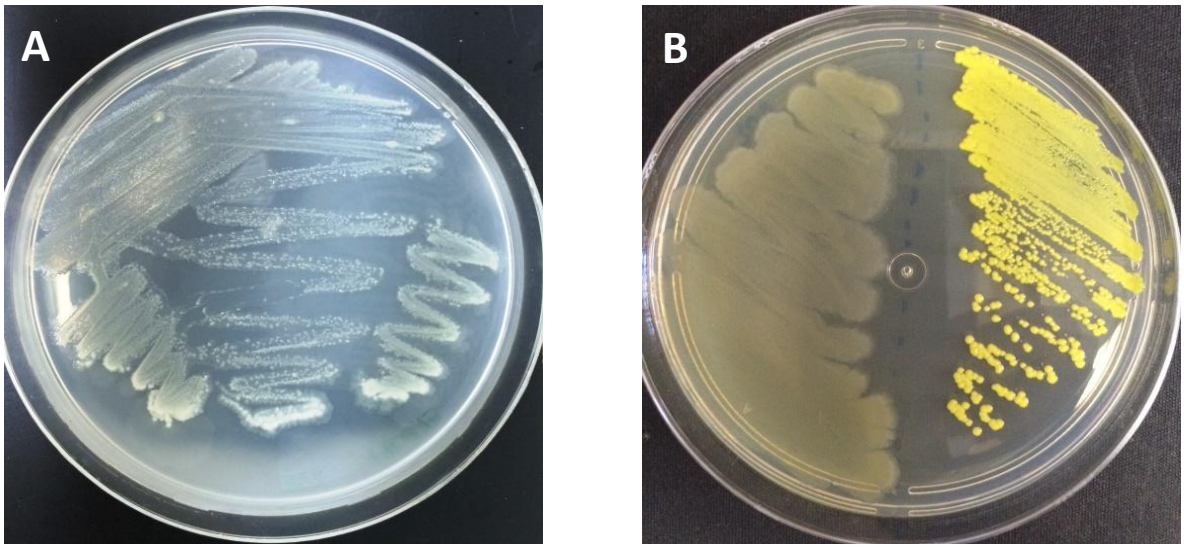


A*: placa de onde foi selecionado o isolado A01.* **B***: placa de onde foi selecionado o isolado A02. As setas indicam os halos sugestivos de degradação formados em torno das colônias.*

O isolado A01 foi selecionado da amostra de solo n° 3, proveniente da Fazenda Experimental, de cultura de milho. O crescimento das colônias e a formação dos halos de degradação da atrazina foram observados na primeira semana de incubação da amostra. Já o isolado A02 foi selecionado da amostra n° 2, também coletada na Fazenda Experimental, mas em um campo de cultivo de sorgo. O crescimento das colônias e a formação dos halos de degradação da atrazina ocorreram na terceira semana de incubação da amostra.

O isolado A01 foi identificado molecularmente como pertencente ao gênero Achromobacter sp. e o isolado A02 foi identificado como Pseudomonas sp. Os testes de identificação foram realizados a partir do sequenciamento do gene RNA ribossomal 16S. A figura 9A apresenta a degradação da atrazina em placa contendo o meio ATZ-R pelo isolado A02. Na figura 9B é possível observar as diferenças morfológicas das colônias bacterianas selecionadas após o isolamento.

Figura 9 - Placas de meio de cultura contendo os isolados com potencial para biodegradação da atrazina.



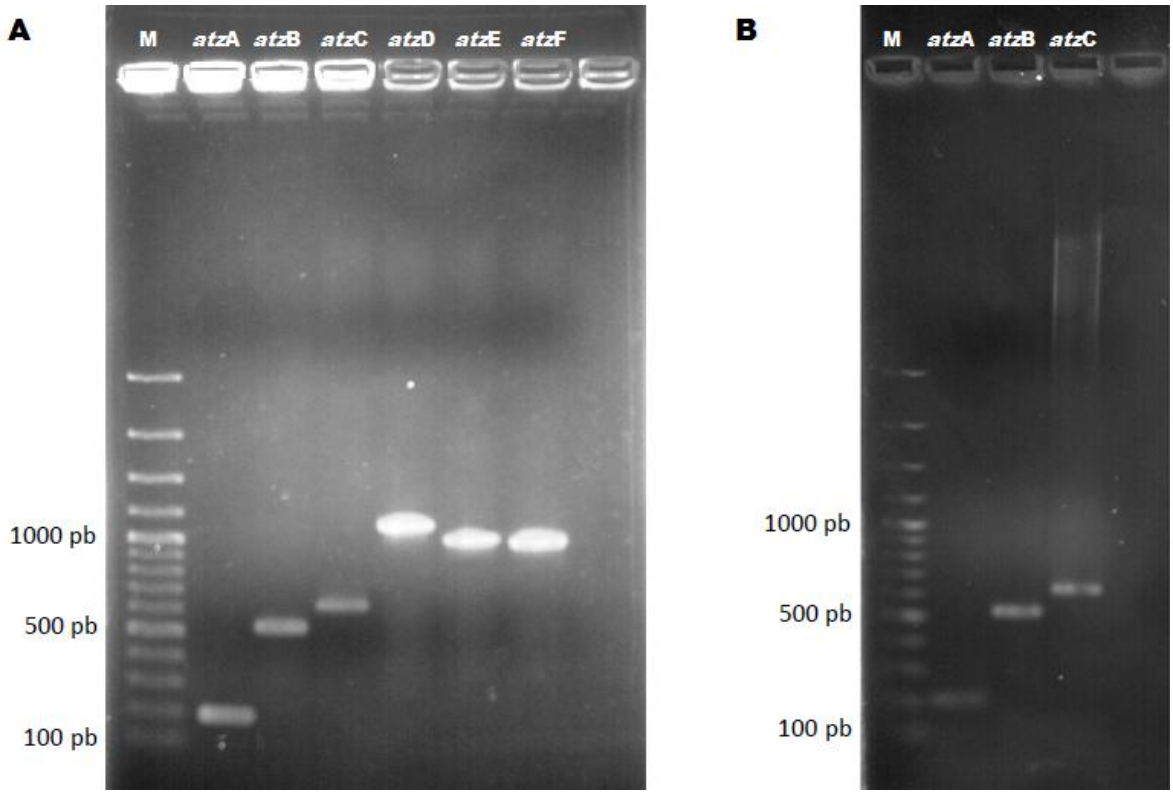
A*: Formação de halos de degradação da atrazina em placa ATZ-R pela Pseudomonas sp.* **B***: Morfologia dos isolados do estudo. Pseudomonas sp. (esquerda) e Achromobacter sp. (direita) em meio sólido Muller Hinton.*

A partir dos resultados de isolamento de micro-organismos do solo aplicando duas metodologias distintas, foi possível observar que o método de enriquecimento das amostras através da aplicação de altas concentrações de herbicida favorece o isolamento de bactérias potencialmente degradadoras.

5.2 Detecção dos genes de degradação da atrazina

Os isolados selecionados no estudo, que apresentaram potencial para biodegradação da atrazina, foram analisados pela técnica de PCR para detecção dos genes atz. A Pseudomonas sp. A02 apresentou os seis genes de degradação (atzA, atzB, atzC, atzD, atzE e atzF) e o isolado Achromobacter sp. A01 apresentou apenas os genes atzA, atzB e atzC, responsáveis pela primeira parte da via de degradação, que quebra a molécula de atrazina gerando ácido cianúrico como metabólito intermediário. A figura 10 apresenta a detecção dos genes de degradação da atrazina nos isolados de Pseudomonas sp. e Achromobacter sp. Os fragmentos das sequências que correspondem aos genes atz detectados nos isolados A01 e A02 apresentaram alta similaridade aos genes atz da bactéria Pseudomonas sp. ADP.

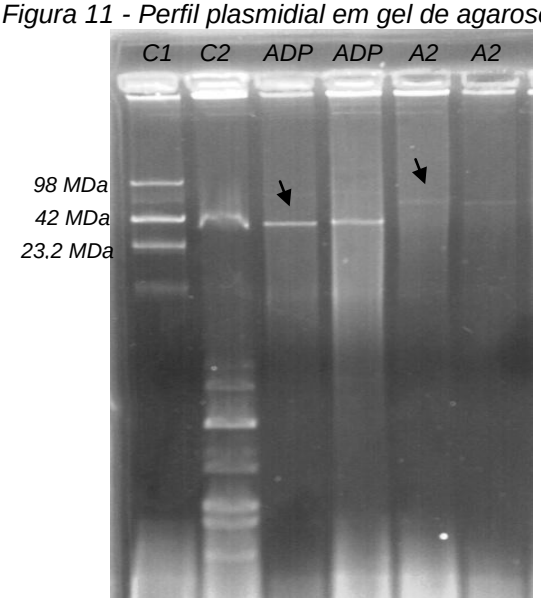
Figura 10 - Detecção dos genes de degradação da atrazina.



A: *Gel de agarose 1% representativo dos produtos de amplificação dos genes atzA (200 pb), atzB (500 pb), atzC (600 pb), atzD (1100 pb), atzE (1000 pb) e atzF (900 pb) em Pseudomonas sp. A02.* **B**: *Gel de agarose 1% representativo dos genes atzA (200 pb), atzB (500 pb) e atzC (600 pb) em Achromobacter sp. A01.*

O DNA plasmidial dos isolados A01 e A02 foi extraído de acordo com a metodologia descrita no item 4.4. Apenas a linhagem de Pseudomonas sp. apresentou plasmídeo, cujo peso molecular é de aproximadamente 42 MDa (Figura 11).

Figura 11 - Perfil plasmidial em gel de agarose da Pseudomonas sp. ADP e Pseudomonas A02.

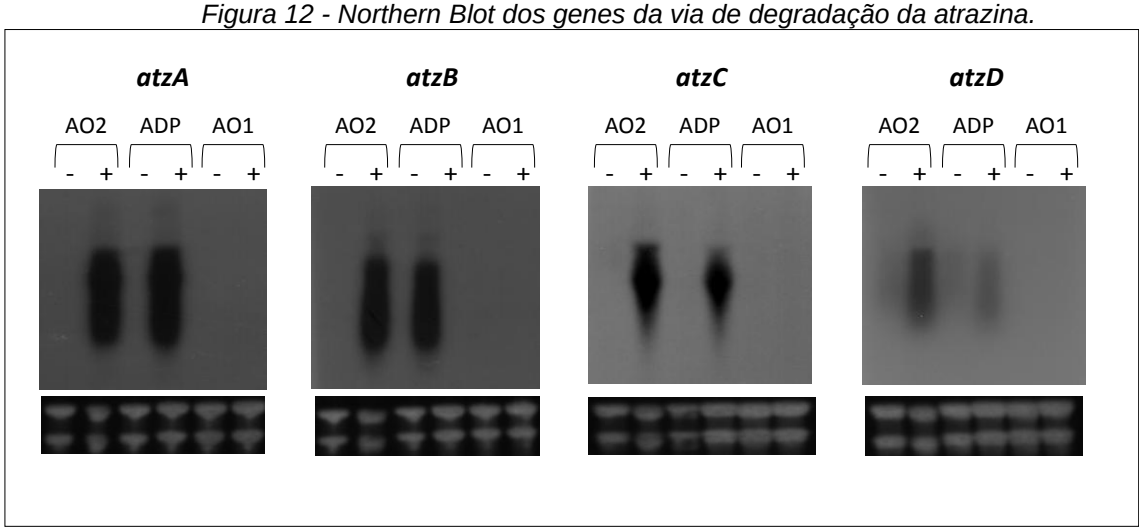


C1: linhagem padrão Escherichia coli 39R861; C2: linhagem padrão Escherichia coli V517. As setas indicam os plasmídeos detectados nos respectivos isolados (em duplicata).

5.3 Nothern Blot

O ensaio de Northern Blot foi realizado para determinar o perfil de expressão dos genes atzA, atzB, atzC e atzD envolvidos na degradação da atrazina. O objetivo do ensaio foi verificar a expressão destes genes após tratamento com o herbicida e na ausência do herbicida, além de comparar com o perfil de expressão da linhagem referência Pseudomonas sp. ADP. O RNA total das linhagens ADP, A01 e A02 foi extraído durante a fase de crescimento exponencial, sendo as células tratadas ou não com atrazina para realizar o ensaio de Northern Blot. Na figura 12 é possível observar que os genes atzA, atzB, atzC e atzD tiveram a expressão aumentada na presença de atrazina quando comparado à expressão na ausência do herbicida para as linhagens ADP e A02. Por outro lado, não foi possível detectar expressão na linhagem A01 antes ou após tratamento com o herbicida. É possível que o tempo de tratamento com o herbicida não tenha sido suficiente para observar a expressão dos genes atz no isolado A01, já que o experimento foi realizado por apenas 2 horas.

Figura 12 - Northern Blot dos genes da via de degradação da atrazina.



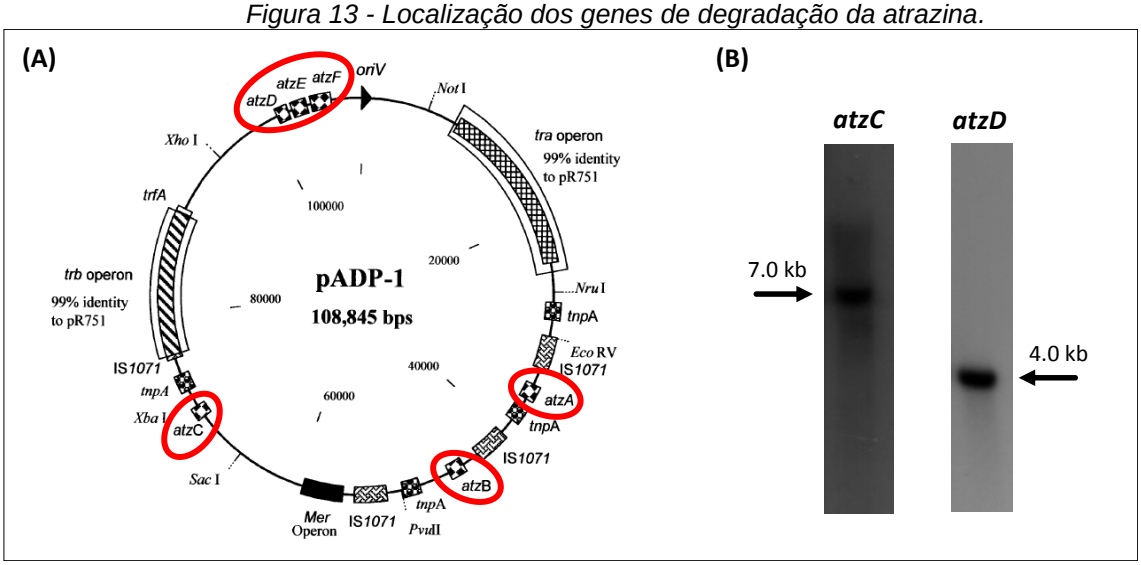
O RNA total foi extraído das linhagens: Pseudomonas sp. (A02), Pseudomnas sp. ADP (ADP) e Achromobacter sp. (A01) das culturas em fase exponencial na presença (+) ou ausência (-) do herbicida atrazina. Os RNAs foram submetidos à eletroforese em gel de agarose-formaldeído, transferidos para membrana de nylon e hibridizados com as sondas radioativas específicas para os genes atzA, atzB, atzC e atzD. Abaixo de cada ensaio vizualiza-se o rRNA corado com brometo de etídio, sendo utilizado como controle de carregamento dos RNAs aplicados no gel e indicando que as concentrações são as mesmas para todas as amostras.

5.4 Southern Blot

O ensaio de Southern Blot foi realizado para determinar a localização dos genes no DNA do isolado A02. A Figura 13A mostra o mapa circular do plasmídeo da linhagem referência Pseudomonas sp. ADP indicando a posição dos genes de degradação da atrazina, assim como outros genes e informações contidos neste

plasmídeo. A sequência deste plasmídeo serviu de guia para a escolha da enzima de restrição utilizada neste experimento. Para determinar o melhor perfil de restrição foi realizada uma análise in silico utilizando a ferramenta NEBcutter V2.0 (site New England Biolabs), e assim foi possível estimar que a enzima de restrição HindIII, apesar de não aparecer no mapa (Figura 13A), resulta em 15 fragmentos que variam de 33,9 kb a 11 pb. Portanto, o DNA plasmidial foi digerido com a enzima HindIII, resultando nas bandas de aproximadamente 7,3 Kb e 4,2 Kb que correspondem às sondas dos genes atzC e atzD, respectivamente em ambas as linhagens, sugerindo a mesma organização dos genes nos dois plasmídeos (Figura 13B). Não foi possível determinar a localização dos genes atzA e atzB no plasmídeo. Contudo, os resultados demonstram que o plasmídeo encontrado neste isolado contém os genes atzC e atzD.

Figura 13 - Localização dos genes de degradação da atrazina.



A: *Mapa circular do plasmídeo pADP-1 de Pseudomonas sp. ADP. Os genes envolvidos na degradação da atrazina estão destacados em círculos vermelhos (adaptado de Martinez et al., 2001).* **B**: *Southern Blot do DNA plasmidial do isolado Pseudomonas sp. digerido com a enzima HindIII e hibridizado com as sondas atzC e atzD, mostra: banda de aproximadamente 7,3 Kb para detecção do gene atzC, e banda de aproximadamente 4,2 Kb confirmando a presença do gene atzD.*

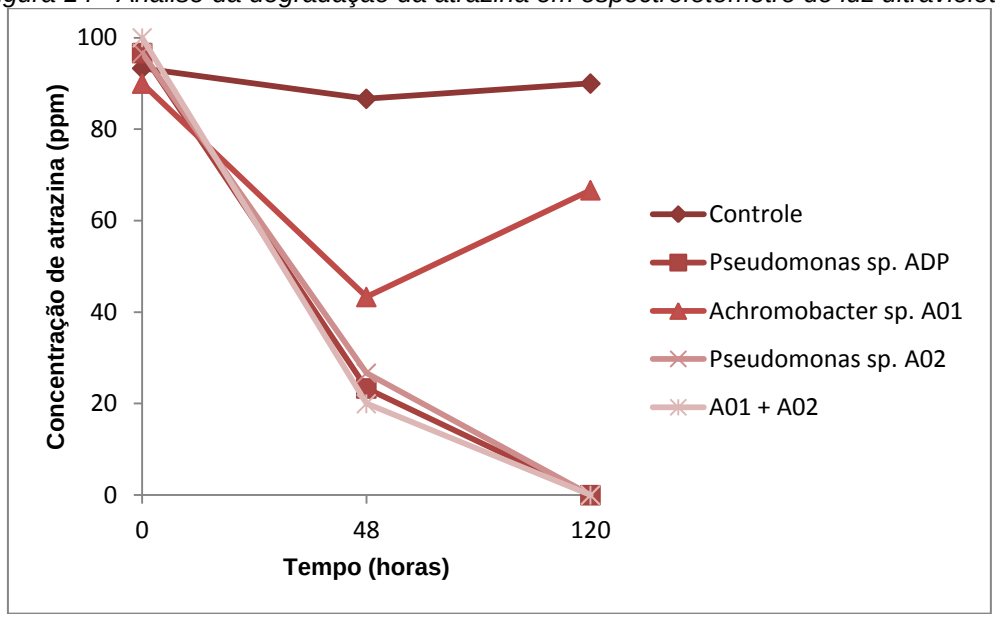
5.5 Ensaio de biodegradação da atrazina

5.5.1 Teste de biodegradação da atrazina em meio líquido - Análise em espectrofotômetro

Após a detecção dos genes atz nas bactérias do estudo, foram realizados testes de degradação da atrazina em meio líquido ATZ-R contendo atrazina (100 ppm) como única fonte de nitrogênio. Além disso, foi formado um consórcio bacteriano com os isolados Pseudomonas sp. A02 e Achromobacter sp. A01 para verificar se a degradação do consórcio é mais eficaz do que a degradação realizada

pelas culturas puras. Para isso, os isolados foram incubados a 30˚C sob agitação (150 rpm) por até 120 horas. O sobrenadante de alíquotas de 2 mL de cada amostra foi analisado em espectrofotômetro a 225 nm para verificar a presença de atrazina no meio após 48 e 120 horas de incubação. Como controle negativo foi utilizado o meio líquido ATZ-R sem inóculo bacteriano e, como controle positivo, o meio líquido ATZ-R com inóculo da bactéria padrão Pseudomonas sp. ADP. O resultado é apresentado na figura 14.

Figura 14 - Análise da degradação da atrazina em espectrofotômetro de luz ultravioleta.



É possível observar que em 120 horas de incubação, o controle sem inóculo bacteriano não se alterou significativamente (p=0,4226), evidenciando que não há degradação do herbicida atrazina. Pode-se observar também que a Pseudomonas sp. A02 e o consórcio bacteriano degradaram totalmente a atrazina em 120 horas de incubação (p<0,0001), mas o consórcio bacteriano não foi mais eficaz em degradar a molécula se comparado à Pseudomonas sp. A02. Observou-se ainda uma diminuição da atrazina em 48 horas de incubação da amostra contendo a bactéria Achromobacter sp. A01. No entanto, em 120 horas, a leitura da absorbância A_{225} nm aumenta. Esse fato pode ser explicado pela formação do metabólito intermediário ácido cianúrico, que apresenta leitura a 220 nm, e é o produto do gene atzC. Já que este isolado não apresentou os genes atzDEF, a degradação do herbicida pode ter ocorrido parcialmente, ou seja, houve acúmulo de metabólitos intermediários na amostra que não foram degradados. Por esse motivo, os isolados foram também

analisados em HPLC/DAD e espectrômetro de massas, que permitem a separação e identificação de metabólitos.

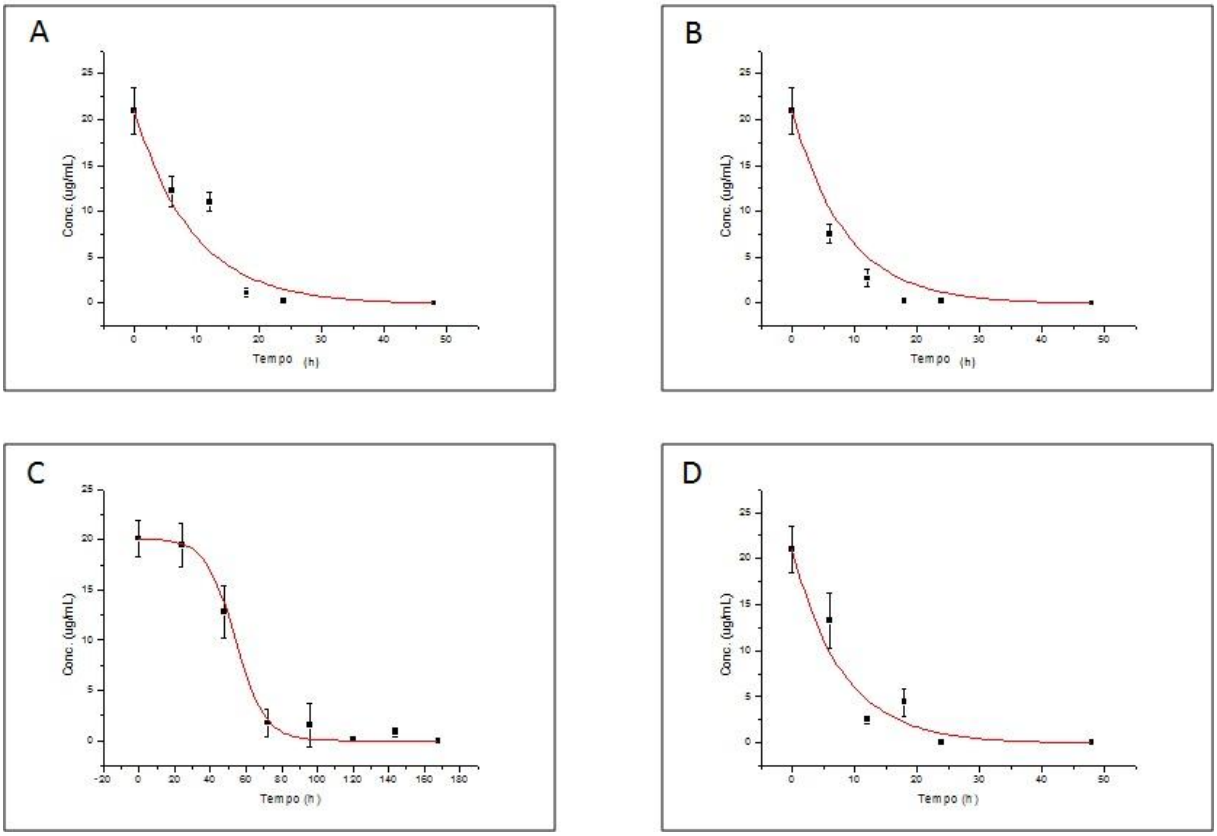
5.5.2 Análise em HPLC/DAD

Para determinar a biodegradação da atrazina pelos isolados do estudo, inicialmente foi realizado um ensaio de triagem com leitura em espectrofotômetro a 225 nm, em períodos de tempo de 48 horas e 120 horas de incubação. Através deste ensaio, foi confirmado o potencial de biodegradação dos micro-organismos, e assim, um novo ensaio foi padronizado, com o objetivo de quantificar a degradação e detectar possíveis metabólitos formados durante este processo. As amostras foram analisadas em HPLC/DAD e LC-MS/MS.

O ensaio foi realizado em meio de cultura ATZ-R líquido com adição de 100 ppm de atrazina como única fonte de nitrogênio. As leituras foram realizadas a cada 6 horas durante as primeiras 24 horas e, a partir daí, a cada 24 horas durante 7 dias. O experimento foi executado em triplicata. A curva de calibração da atrazina do ensaio pode ser vista no Apêndice B.

De acordo com os resultados obtidos pela análise em HPLC/DAD, observa-se diminuição na concentração de atrazina já nas primeiras 6 horas de incubação pelo isolado Pseudomonas sp. ADP em meio ATZ-R. Além disso, após 48 horas de incubação, não foi possível detectar atrazina na amostra. O mesmo ocorreu com o isolado Pseudomonas sp. A02, que rapidamente iniciou a degradação do herbicida atrazina e consumiu 64% do analito nas primeiras 6 horas de incubação ($p<0,0001$). Dessa forma, verificou-se que o isolado A02, selecionado de solo brasileiro e identificado como pertencente ao gênero Pseudomonas, apresenta um perfil de degradação da atrazina semelhante ao perfil da bactéria padrão Pseudomonas sp. ADP. Os resultados estão apresentados nas figuras 15A e 15B.

Figura 15 - Análise da degradação da atrazina em HPLC/DAD.



A*: Pseudomonas sp. ADP.* **B***: Pseudomonas sp. A02.* **C***: Achromobacter sp. A01.* **D***: Consórcio bacteriano.*

O isolado Achromobacter sp. A01 apresentou um perfil de degradação diferente daquele encontrado nos outros micro-organismos analisados. O resultado pode ser observado na figura 15C. Apesar de iniciar a degradação nas primeiras 24 horas de incubação, apenas 7% de atrazina foi consumida pelo isolado A01 neste período. A diminuição significativa de atrazina do meio (39%) ocorreu somente após 48 horas do início do processo (p<0,0001) e ainda foi possível detectar o herbicida na amostra após 4 dias de incubação. Assim, a degradação é mais lenta do que a observada nos isolados ADP e A02.

Em função do exposto acima, foi formado um consórcio bacteriano contendo o isolado A01 e o isolado A02, já que ambos apresentaram os genes atzA, atzB e atzC que fazem parte da via inicial da degradação da atrazina e, portanto, poderiam realizar a primeira parte da via de forma mais eficiente. Assim o objetivo dessa análise em consórcio foi verificar se os isolados juntos conseguem utilizar as moléculas de atrazina mais rapidamente do que as culturas puras. O resultado é apresentado na figura 15D e demonstra que o consórcio bacteriano formado pelos isolados A01 e A02 não foi mais eficiente na degradação da atrazina se comparado

ao isolado A02 em cultura pura (p=0,1814). De fato, o perfil de degradação do consórcio bacteriano é semelhante ao perfil encontrado na bactéria padrão ADP e no isolado A02.

5.5.3 Detecção de metabólitos resultantes da biodegradação da atrazina - Análise em LC-MS/MS

As amostras analisadas em HPLC/DAD foram também analisadas em LC-MS/MS para detecção dos metabólitos formados pela degradação da atrazina. Os analitos pesquisados foram os metabólitos resultantes da via inicial de degradação da atrazina, que leva à formação de ácido cianúrico como produto intermediário. Foi possível detectar hidroxiatrazina, n-isopropilamelida e ácido cianúrico em todos os isolados e em períodos de incubação diferentes. A detecção dos metabólitos nas amostras confirma a degradação da molécula de atrazina pelas enzimas codificadas pelos genes atzA, atzB e atzC.

Os três analitos pesquisados foram detectados nas amostras do isolado Pseudomonas sp. A02 nas primeiras 6 horas do processo degradativo. Apesar de apresentar um perfil de degradação lento, hidroxiatrazina e n-isopropilamelida foram detectados nas amostras do isolado Achromobacter sp. A01 nas primeiras 12 horas de incubação. O metabólito intermediário ácido cianúrico foi formado somente a partir de 96 horas e pôde ser observado mesmo após 7 dias de incubação da amostra, sugerindo acúmulo de ácido cianúrico no meio.

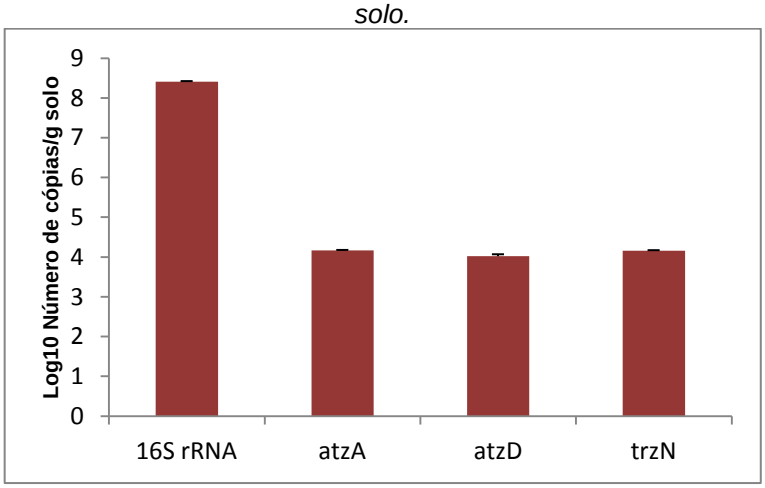
5.6 Análise da comunidade bacteriana de solo contaminado por atrazina

5.6.1 Determinação da abundância dos genes de degradação da atrazina no solo

Com o objetivo de avaliar o potencial de degradação das moléculas de atrazina pela microbiota do solo, um experimento de campo foi realizado durante 12 semanas. O herbicida atrazina foi aplicado ao solo e, posteriormente, amostras foram coletadas para análise. O DNA total do solo coletado foi extraído e usado como molde em ensaios de qPCR para determinar a abundância do gene 16S rRNA e dos genes atzA, atzD e trzN, envolvidos na degradação de atrazina. Amostras de solo também foram coletadas antes da aplicação de atrazina e analisadas da mesma forma que as amostras de solo tratado com o herbicida. Não foi possível observar diferença na abundância dos genes de degradação da atrazina no solo antes da aplicação do herbicida (p= 0,4496), todavia há uma diferença significativa

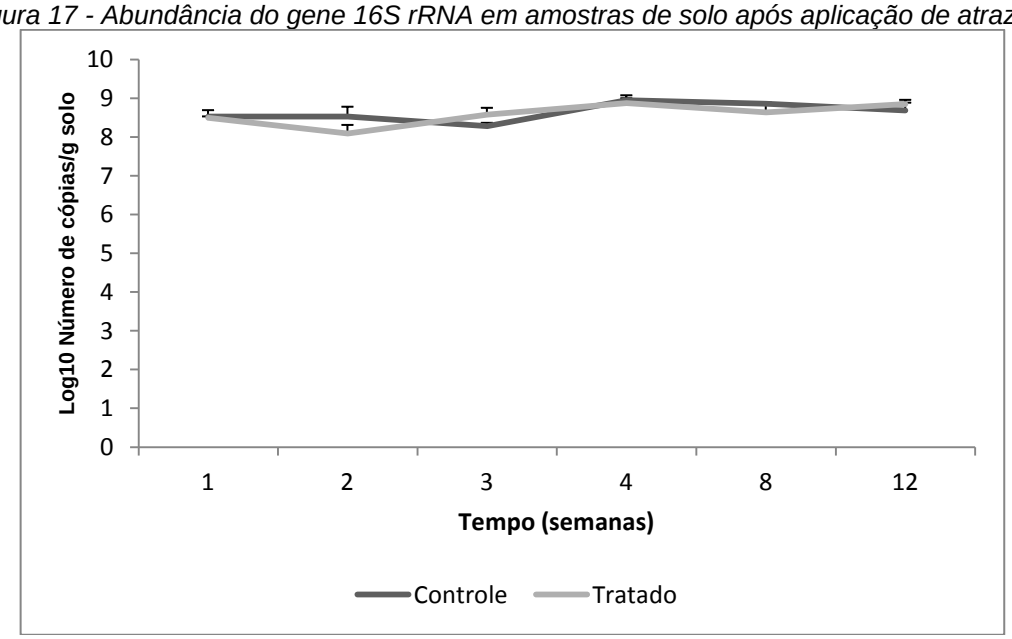
entre o número de cópias do gene 16S rRNA e os genes atz (p< 0,0001). O resultado desta análise é apresentado na figura 16.

Figura 16 - Abundância dos genes 16S rRNA, atzA, atzD e trzN antes da aplicação de atrazina no solo.



Os resultados do ensaio mostram variação na abundância do gene 16S rRNA ao longo das 12 semanas (p< 0,0001), mas essa variação não é constante. Inicialmente, ocorre diminuição do número de cópias do gene 16S, mas a partir da terceira semana é possível perceber aumento significativo na abundância do gene 16S rRNA no solo após aplicação de atrazina (Figura 17).

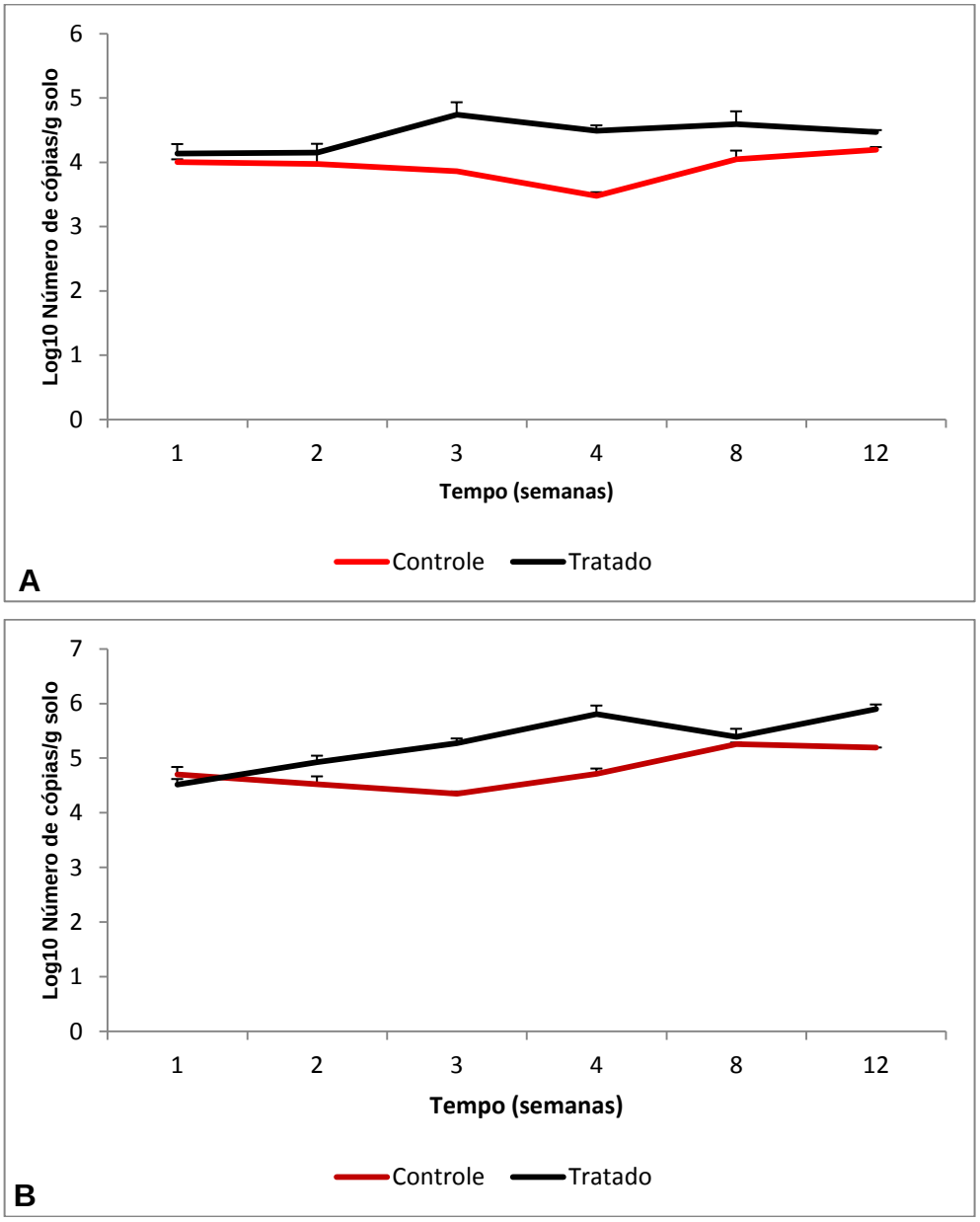
Figura 17 - Abundância do gene 16S rRNA em amostras de solo após aplicação de atrazina.



Em relação aos genes de degradação da atrazina, os resultados do ensaio de qPCR mostram que a abundância dos genes que iniciam a via de degradação segue um padrão de alterações com o tempo. Ou seja, o número de cópias dos genes atzA e trzN no solo aumenta ao longo das primeiras semanas de tratamento. A

abundância do gene atzA é significativamente maior a partir da terceira semana e o aumento se mantém até a oitava semana. Na 12ª semana, os valores retornam ao inicial, ou seja, não há diferença significativa entre os valores do início e término do experimento (Figura 18A). A abundância do gene trzN foi alterada a partir da segunda semana, sendo que o maior aumento foi observado na quarta semana de tratamento. O aumento na abundância do gene trzN foi observado até a última semana de análise das amostras de solo (p<0,0001) (Figura 18B).

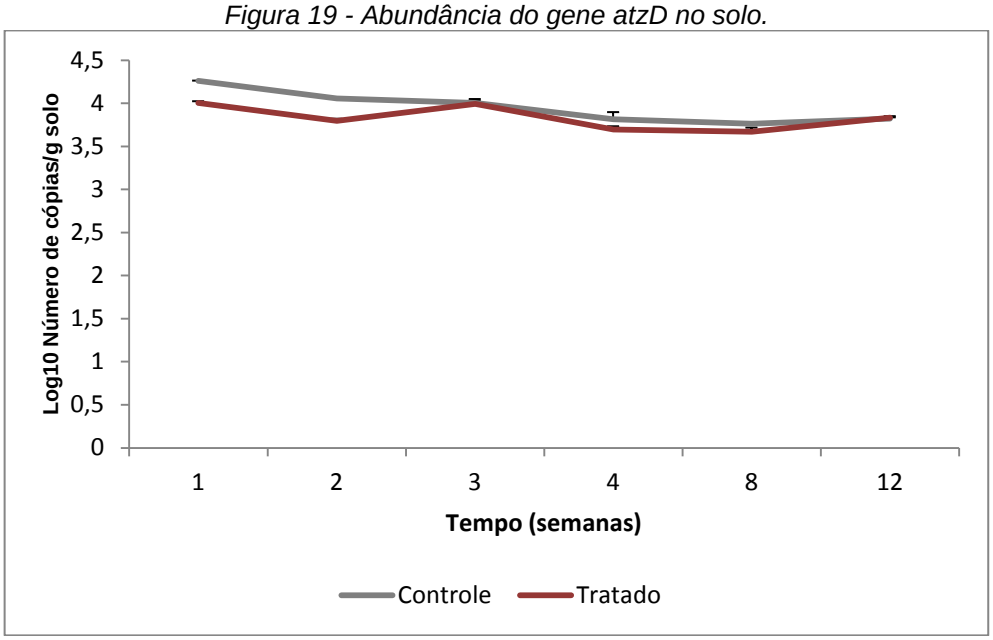
*Figura 18 - Abundância dos genes atzA (**A**) e trzN (**B**) no solo após aplicação de atrazina.*



As alterações no número de cópias do gene atzD (Figura 19) no solo não seguem o mesmo padrão observado nos genes atzA e trzN. É possível observar uma variação na abundância ao longo do tempo, mas o número de cópias do gene

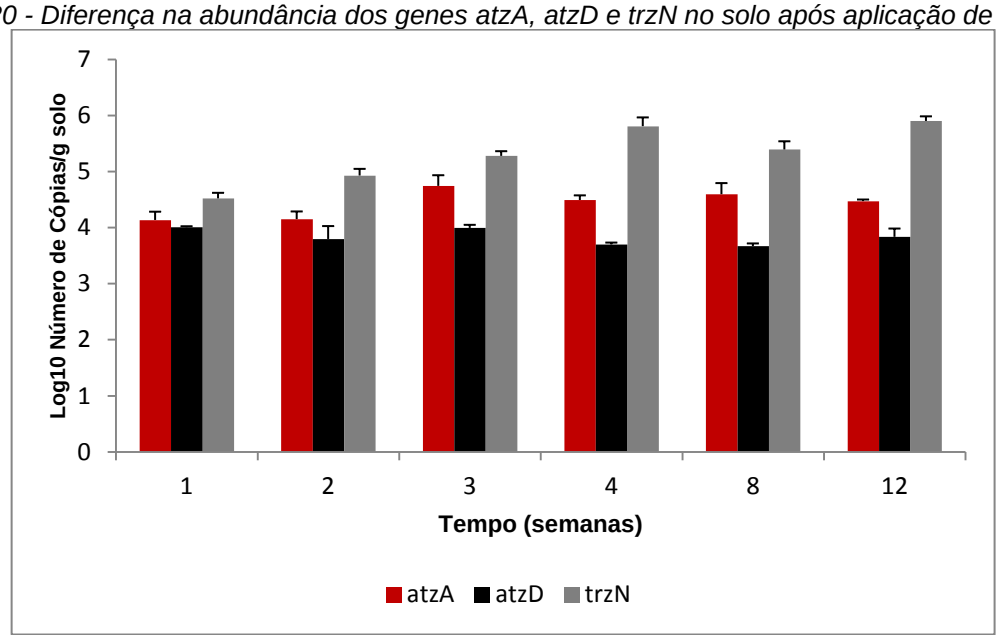
atzD nas amostras de solo tratadas apresenta valores abaixo dos valores detectados na amostra controle. Portanto, essa variação não parece estar relacionada ao uso da atrazina no solo e pode ter ocorrido devido a outros fatores, como pequenas variações de temperatura, umidade e pH do solo durante o período do experimento.

Figura 19 - Abundância do gene atzD no solo.



Ao comparar a abundância dos genes de degradação da atrazina atzA, atzD e trzN nas amostras de solo, pode-se perceber que o gene trzN é o mais abundante em todo o período pesquisado (Figura 20). Há uma diferença significativa entre a abundância dos genes estudados durante as 12 semanas (p< 0,0001).

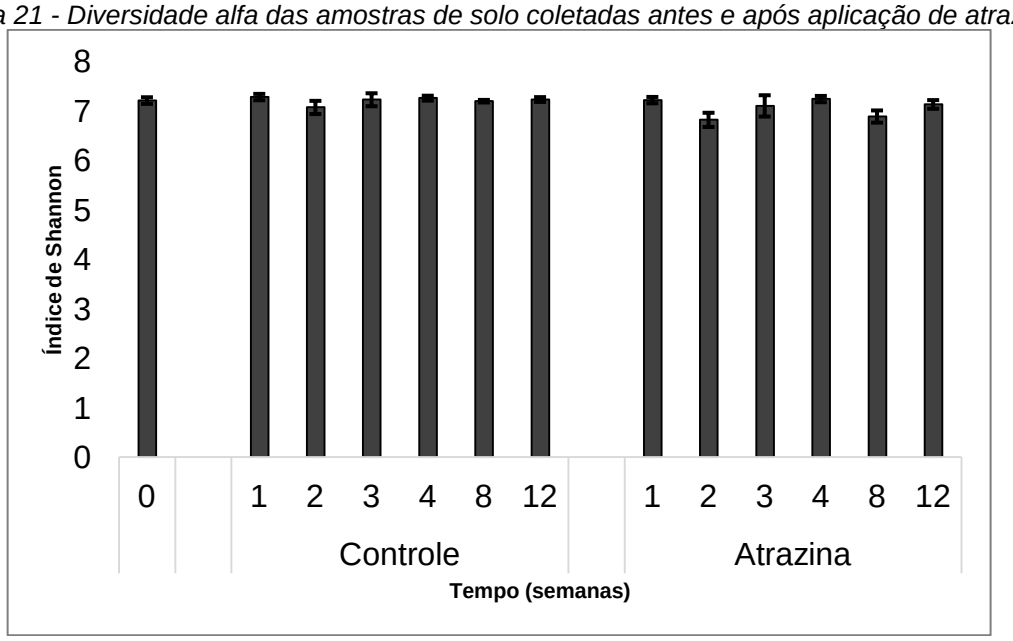
Figura 20 - Diferença na abundância dos genes atzA, atzD e trzN no solo após aplicação de atrazina.



5.6.2 Diversidade alfa e composição da comunidade

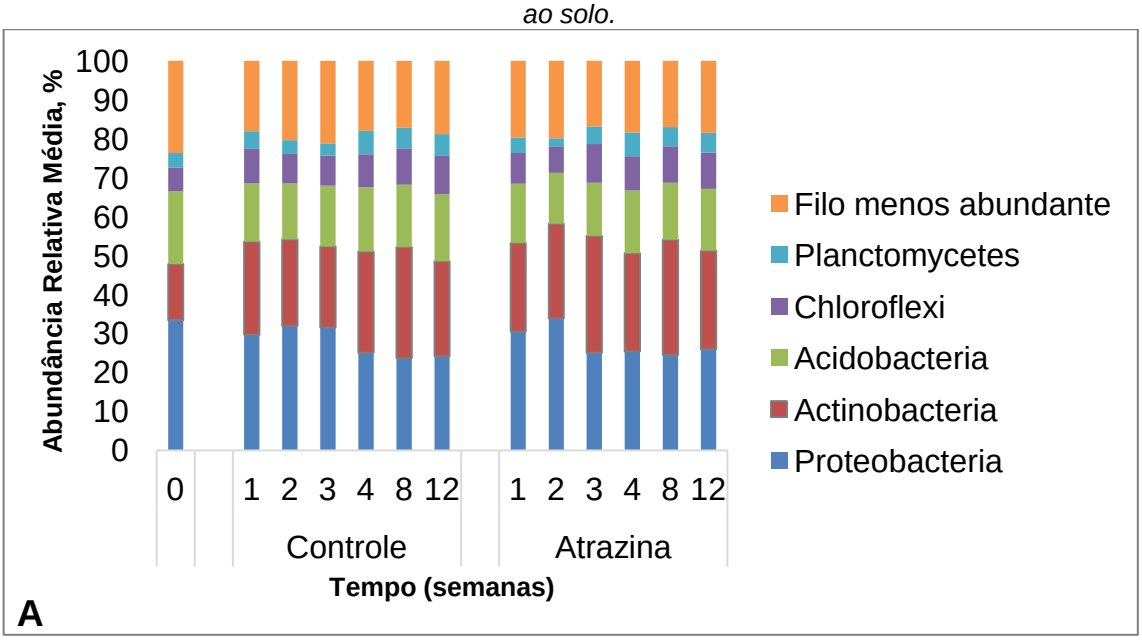
O número de Unidades Taxonômicas Operacionais (OTU's) variou entre 2485 a 5896 OTU's por amostra, com uma média de cobertura de 96,4% ± 1,2% entre todas as amostras. As amostras coletadas na segunda e oitava semanas após aplicação de atrazina ao solo apresentaram menor diversidade alfa (médias 6,82 ± 0,14 e 6,88 ± 0,12; p= 0,0002) medida através do índice de Shannon, se comparadas às amostras coletadas antes do início do tratamento (média 7,21 ± 0,06) (Figura 21). Não houve alteração significativa na diversidade alfa das amostras controle.

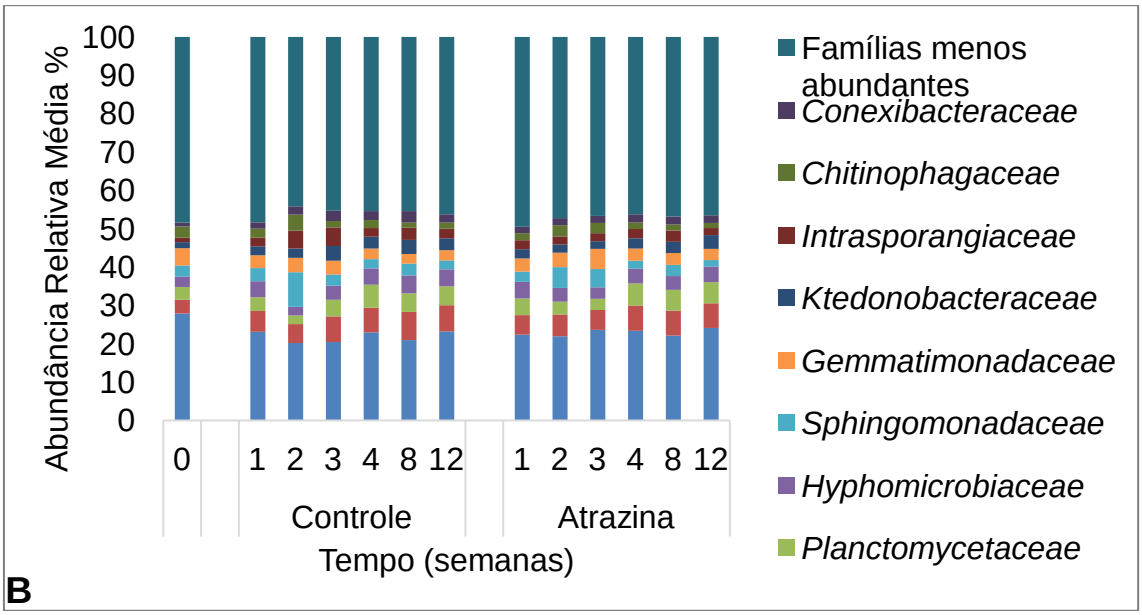
Figura 21 - Diversidade alfa das amostras de solo coletadas antes e após aplicação de atrazina.



Durante o período de 12 semanas de coleta de solo após a aplicação de atrazina, a comunidade das amostras foi composta predominantemente por membros dos filos Proteobacteria e Actinobacteria (Figura 22A). A figura 22B apresenta a distribuição das comunidades das amostras de solo ao nível de família e observa-se que a composição da comunidade é majoritariamente de famílias menos abundantes. Aproximadamente 20-30% das leituras de sequências não puderam ser classificadas neste nível taxonômico.

Figura 22 - Distribuição da comunidade das amostras coletadas antes e após aplicação de atrazina ao solo.





A: *Filos mais abundantes.* **B**: *Classificação ao nível de família.*

5.6.3 Beta diversidade

A composição da comunidade bacteriana diferiu significativamente entre todas as amostras de solo analisadas (ANOSIM R= 0,2362, p< 0,001), mas não houve diferença significativa entre as amostras coletadas antes da aplicação de atrazina e as amostras tratadas com o herbicida.

A ordenação de matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis revelou que não há diferença significativa entre as comunidades das amostras controle e tratadas, já que o agrupamento das amostras não pode ser relacionado à aplicação de atrazina

ao solo (Figura 23). Entretanto, foi possível observar diferenças significativas na abundância de famílias na quarta e oitava semanas após aplicação de atrazina ao solo (Figura 24). A abundância das famílias Enterobacteriaceae e Burkholderiaceae é maior na quarta semana e a abundância das famílias Conexibateraceae, Solirubrobacteraceae e Gaiellaceae estão aumentadas na oitava semana em relação ao período anterior à aplicação de atrazina.

Figura 23 - Análise de coordenadas principais das matrizes de dissimilaridade de Bray-Curtis das amostras de solo coletadas após aplicação de atrazina.

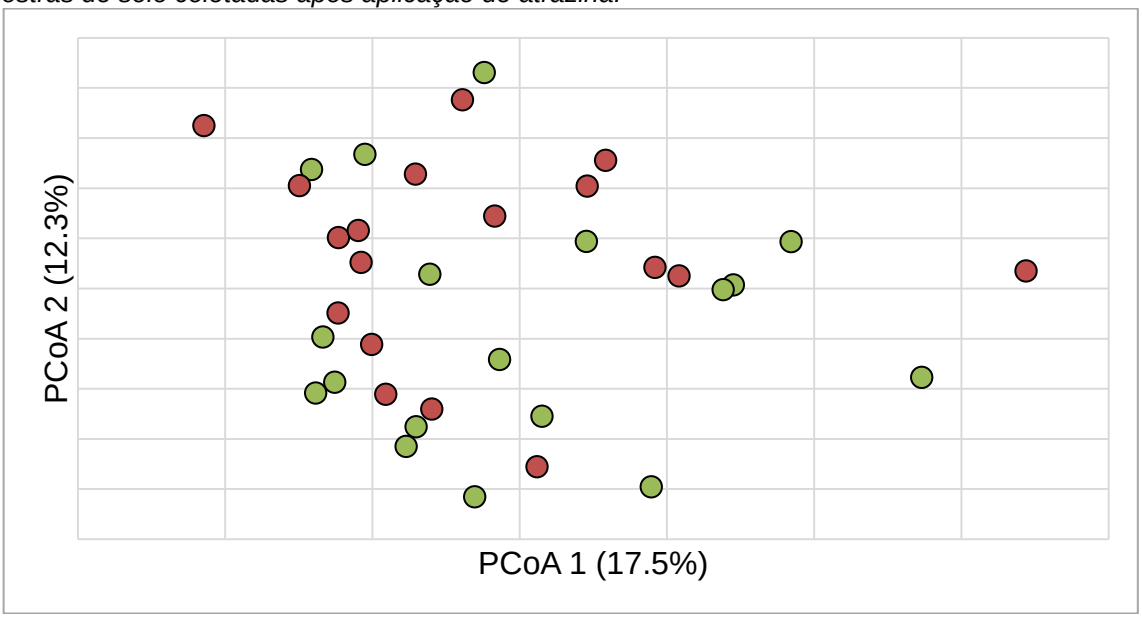
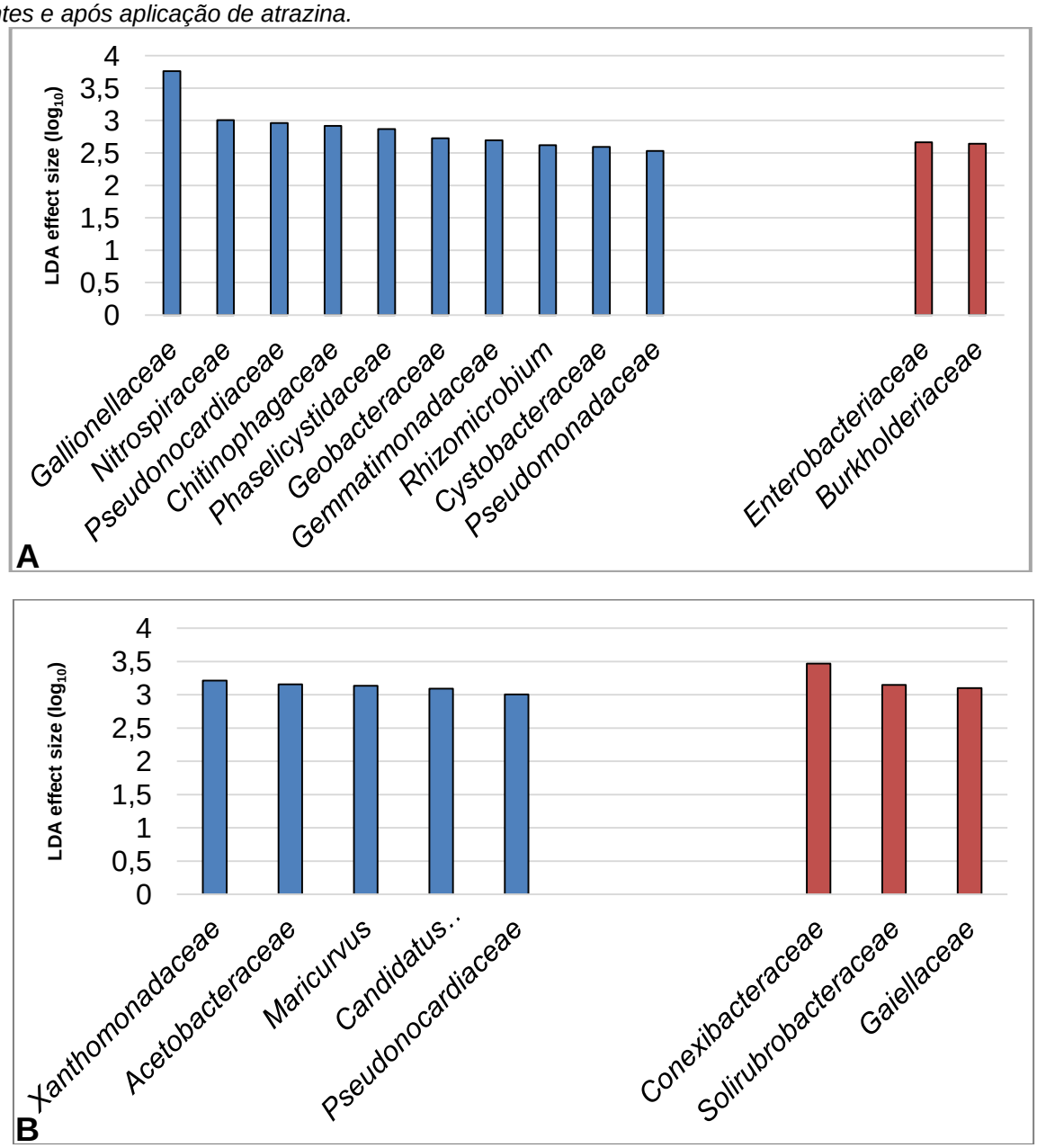


Figura 24 - Tamanho do efeito da análise discriminante linear (LEfSe) das amostras de solo coletadas antes e após aplicação de atrazina.



A: *Quarta semana.* **B**: *Oitava semana.*

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

O solo é um sistema dinâmico e complexo que apresenta uma biodiversidade substancial estimada em cerca de 10^9 células bacterianas em cada grama de solo. A microbiota do solo é capaz de degradar uma grande variedade de compostos, incluindo produtos químicos sintetizados pelo homem. Entretanto, em áreas agrícolas com repetidas aplicações de agrotóxicos ao longo do tempo, a diversidade microbiana pode ser reduzida (ROESCH et al., 2007). A perda da biodiversidade do solo é extremamente prejudicial ao ambiente, pois os micro-organismos constituem um recurso genético que pode ser usado em técnicas de descontaminação ambiental (NUNES; REZENDE, 2015). Assim, pesquisas relacionadas à biorremediação são essenciais, já que esta é uma tecnologia adequada para o tratamento de áreas contaminadas por xenobióticos.

O presente trabalho apresenta duas bactérias gram-negativas com habilidade para degradar atrazina que foram isoladas de amostras de solos após aplicação recente do herbicida. Os isolados A01 e A02 foram identificados como pertencentes aos gêneros Achromobacter e Pseudomonas, respectivamente. Espécies de Pseudomonas e Achromobacter são ubíquas e podem ser facilmente encontradas em diferentes ambientes, tais como água, solo, plantas e superfícies. Estes gêneros bacterianos já foram descritos anteriormente como potenciais degradadores de atrazina (UDIKOVIĆ-KOLIĆ et al., 2010).

O local e a data de coleta das amostras de solo foram escolhidos de acordo com as culturas e aplicação recente de atrazina, pois a degradação de xenobióticos pela microbiota local pode estar relacionada ao histórico de contaminação da área. De fato, estudos indicam que a aplicação de atrazina às lavouras leva ao desenvolvimento de uma comunidade microbiana geneticamente capaz de biodegradar este herbicida (El SEBAÏ et al., 2011). Além disso, segundo Cycón et al. (2017), locais contaminados são considerados boas fontes para isolamento de micro-organismos degradadores de poluentes, sendo que o método de enriquecimento das amostras em meio de cultura é o mais adequado para o isolamento de espécies microbianas com habilidade para degradar compostos químicos. Nesse estudo, a metodologia convencional para o isolamento bacteriano não resultou em isolados com potencial de degradação da atrazina, que pode ser observado através da formação de halos em torno das colônias em meio sólido. Por

este motivo, a metodologia foi adaptada para a técnica do enriquecimento das amostras em meio de cultura ATZ-R com altas concentrações de atrazina.

Entender a distribuição de diferentes genes catabólicos em diferentes bactérias auxilia na compreensão do desenvolvimento de funções metabólicas. De Souza et al. (1998a) sugerem que os genes de degradação da atrazina podem ter surgido de uma origem única, pois estão distribuídos globalmente e são altamente conservados em diferentes espécies bacterianas. Neste estudo, o isolado Pseudomonas sp. A02 apresentou todos os seis genes (atzA, atzB, atzC, atzD, atzE e atzF) que fazem parte da via de degradação da atrazina iniciada pela descloração da molécula. Já o isolado Achromobacter sp. apresentou somente os genes atzA, atzB e atzC, que são responsáveis pela primeira etapa de degradação da atrazina e resulta na formação de ácido cianúrico como metabólito. Nos dois casos, os genes atz foram sequenciados e apresentaram alta similaridade com os genes detectados na bactéria padrão Pseudomonas sp. ADP e em outros isolados, corroborando a proposição de De Souza et al. (1998a) e confirmando a presença dos genes atz em amostras de solo brasileiro.

Além de utilizar diversos compostos orgânicos como fonte de carbono e nitrogênio, bactérias pertencentes ao gênero Pseudomonas são capazes de desenvolver novas atividades metabólicas rapidamente em resposta a fatores externos. Em um trabalho inovador, Cook e Hutter (1981) descreveram espécies de Pseudomonas com habilidade para utilizar compostos s-triazínicos como fonte de nitrogênio. Em seguida, Behki e Khan (1986) isolaram três espécies de Pseudomonas a partir de amostras de solo contaminado por atrazina, que foram aptas a usar as moléculas de atrazina como fonte de carbono.

Mandelbaum et al. (1995) isolaram e caracterizaram a bactéria Pseudomonas sp. ADP, que possui o plasmídeo pADP-1 onde se localizam os genes atz. A multifuncionalidade encontrada em bactérias do gênero Pseudomonas pode ocorrer devido à presença de plasmídeos que conferem vantagem seletiva aos micro-organismos (NUNES; REZENDE, 2015). No presente estudo, foi possível identificar um plasmídeo da bactéria Pseudomonas sp. A02 que abriga os genes atzC e atzD. Não foi possível determinar a localização dos genes atzA e atzB no DNA plasmidial do isolado A02, porém, como o ensaio de Southern Blot indicou que os genes atzC e atzD estão localizados no plasmídeo e apresentam organização similar ao plasmídeo pADP-1, pode-se sugerir que os demais genes também se encontram no

plasmídeo. Por outro lado, não foi detectado nenhum plasmídeo do isolado A01, assim é possível que os genes atz estejam localizados no DNA cromossômico. É possível também que os genes se localizem em plasmídeos de alto peso molecular ou que estejam presentes em baixo número de cópias, o que dificulta a extração por metodologias convencionais.

Uma espécie de Arthrobacter isolada de amostras de solo da Índia apresentou genes atz inseridos no DNA cromossômico (VAISHAMPAYAN et al. 2007). A disseminação desses genes no ambiente pode ocorrer por transferência lateral associada a sequências de inserção. De fato, um estudo demonstrou que o plasmídeo ADP1::Tn5 foi transferido para a microbiota do solo e os micro-organismos adquiriram os genes atzA e atzB, que foram inseridos no DNA cromossômico por um transposon (DEVERS et al. 2005). Além disso, Udiković-Kolić et al. (2008) reportaram um perfil plasmidial composto por cinco plasmídeos de diferentes pesos moleculares extraídos de uma comunidade microbiana com atividade de degradação da atrazina. Apenas um dos plasmídeos, de 322 kb, foi relacionado aos genes atz. Ademais, De Souza et al. (1998b) revelaram que o plasmídeo pADP-1 pode estar presente em baixo número de cópias no genoma da bactéria Pseudomonas sp. ADP.

Para se desenvolver técnicas de biorremediação, é fundamental determinar a capacidade de degradação dos micro-organismos em meio líquido e os parâmetros adequados ao processo de acordo com o composto estudado. Por isso, para alcançar as maiores taxas de degradação da atrazina pelos isolados deste estudo, foram definidos os seguintes parâmetros dos ensaios: pH do meio de cultura ajustado em 6,8, temperatura de incubação de 30°C e incubação das amostras sob agitação em 150 rpm. Esses parâmetros são os mesmos utilizados em diversos estudos de degradação (MANDELBAUM et al., 1993; MANDELBAUM et al., 1995; HERNÁNDEZ et al., 2008).

Experimentos realizados por Hussain et al. (2007) mostraram que as maiores taxas de degradação do inseticida endosulfan por espécies de Pseudomonas aeruginosa foram observadas na faixa de temperatura de 25-35°C. O mesmo estudo demonstrou ainda que o pH básico é o ideal para os processos de degradação. A concentração de atrazina também pode influenciar a capacidade de degradação do micro-organismo e Wang & Xie (2012) demonstraram que as concentrações de 50, 100 e 500 mg.L^{-1} são completamente degradadas por micro-organismos em meio

líquido em até 48 horas de incubação, mas a taxa de degradação diminui consideravelmente se a concentração aumenta para 1000 mg.L^{-1}. Estudos aplicados revelaram ainda que, mesmo apresentando altas taxas de degradação da atrazina, um inóculo único da bactéria ADP é insuficiente para descontaminar áreas com altas concentrações do herbicida (STRUTHERS et al., 1998; LIMA et al., 2009).

Análises em HPLC/DAD evidenciaram que a Pseudomonas sp. A02 foi capaz de reduzir significativamente a concentração de atrazina in vitro em 6 horas de incubação. Todos os seis genes atz foram detectados no DNA do isolado, sugerindo potencial para a degradação completa da molécula de atrazina que leva à formação de CO_2 e NH_3. Os resultados do ensaio de Northern Blot mostraram que os genes atzA, atzB, aztC e atzD nesse isolado são diferencialmente expressos após 2 horas de tratamento com atrazina, indicando que o herbicida aumenta a expressão destes genes. Ainda, os três metabólitos iniciais hidroxiatrazina, n-isopropilamelida e ácido cianúrico foram detectados nas primeiras seis horas de incubação do isolado A02, corroborando a transformação da molécula em um curto período de tempo.

Em contrapartida, o isolado A01 apresentou somente os genes atzA, atzB e atzC, que são necessários para transformar a molécula de atrazina até ácido cianúrico (DE SOUZA et al., 1996; SADOWSKY et al., 1998; SHAPIR et al. 2007). A partir desses resultados, é possível sugerir que a degradação pelo isolado A01 é incompleta, já que os genes atzD, atzE e atzF não foram detectados. Esse conjunto de genes é responsável pela finalização da via de degradação da atrazina, levando à transformação completa da molécula (MARTINEZ et al. 2001; SHAPIR et al. 2005). Estes resultados encontrados são consistentes com o trabalho de Wang e Xie (2012), que reportaram uma espécie de Arthrobacter com habilidade para transformar a atrazina em ácido cianúrico, contendo apenas os genes trzN (análogo ao atzA), atzB e atzC. Outra espécie de Arthrobacter, isolada de solo egípcio, possui o mesmo conjunto de genes (trzN, atzA e atzB) e também é incapaz de degradar completamente a molécula de atrazina (El SEBAÏ et al., 2011).

Somando-se a esses resultados, não foi possível detectar expressão dos genes atzA, atzB e atzC após 2 horas de tratamento com atrazina, fato que pode explicar a degradação tardia apresentada pelo isolado Achromobacter sp. A análise das amostras em LC/MS-MS mostrou também que o metabólito ácido cianúrico é formado somente após 96 horas e foi detectado mesmo após 7 dias de incubação,

indicando possível acúmulo de ácido cianúrico pelo isolado A01, observado nas análises em espectrofotômetro de luz ultravioleta.

De acordo com Martinez et al. (2001), os genes atzA, atzB e atzC são expressos constitutivamente e não são regulados pela presença de atrazina. Além de apresentar perfis de degradação bastante distintos, os isolados bacterianos deste estudo mostraram diferentes perfis de expressão dos genes atz. Somente o isolado A02 exibiu expressão diferencial após tratamento com atrazina em meio líquido, enquanto que não foi possível avaliar o padrão de expressão dos genes antes e depois do tratamento no isolado A01.

Devers et al. (2004) analisaram a expressão dos genes atz em dois micro-orgnismos diferentes, Pseudomonas sp. ADP e Chelatobacter heintzii, e mostraram que os níveis de expressão foram aumentados significativamente no isolado ADP na presença de atrazina. A expressão do gene atzC não foi detectada em C. heintzii. Esses dados indicam que diferentes micro-organismos podem apresentar diferentes padrões de expressão gênica, já que a rede de regulação de cada bactéria influencia a expressão dos genes e modula a função de degradação. Adicionalmente, cada micro-organismo responde aos estímulos de maneira diferente.

As etapas do metabolismo da atrazina podem ser realizadas por diferentes micro-organismos que fazem parte de um consórcio bacteriano (DE SOUZA et al.1998b). Um consórcio contendo as bactérias Achromobacter sp. e Pseudomonas sp. foi formado e os resultados da análise de degradação evidenciaram que o isolado A01 não foi capaz de auxiliar o isolado A02 nas etapas iniciais do processo de degradação da atrazina. O perfil de degradação do consórcio bacteriano é muito semelhante ao perfil observado na Pseudomonas sp., indicando que o isolado Achromobacter sp. não participa do processo nessa análise específica. Esse resultado está de acordo com o esperado, visto que os micro-organismos A01 e A02 possuem perfis de degradação muito diferentes e a degradação da molécula de atrazina pelo isolado A01 é iniciada tardiamente.

Comunidades microbianas com habilidade para metabolizar compostos são mais comuns no solo do que espécies individuais e podem apresentar maior capacidade para transformar substratos devido ao aumento da atividade metabólica (UDIKOVIĆ-KOLIĆ et al., 2007). Espécies de Achromobacter sp. já foram descritas como membros de consórcios em ensaios de degradação da atrazina em água, como também em amostras de solo (MIRGAIN et al., 1995; SAGARKAR et al.,

2013). Portanto, o isolado A01 pode ser usado em técnicas de biorremediação como parte de um consórcio bacteriano juntamente com outros micro-organismos que possuem os genes atzD, atzE e atzF e que não iniciam a via de degradação da atrazina isoladamente.

Neste trabalho, a abundância dos genes atzA, trzN e atzD foi quantificada usando a técnica de qPCR. A quantificação da abundância dos genes de degradação da atrazina é importante para determinar o potencial genético da comunidade bacteriana. Além disso, os genes atz podem ser usados como biomarcadores da habilidade de degradação pela microbiota do solo (MONARD et al., 2010, FAJARDO et al., 2012). A quantificação de micro-organismos do solo pode apresentar problemas devido a espécies bacterianas não cultiváveis, inibidores da reação e dificuldade de se obter DNA purificado, mas a técnica de PCR em tempo real é considerada o método mais adequado e sensível para a detecção dos genes atz no ambiente do solo (THOMPSON et al., 2010).

Os resultados do ensaio de qPCR mostraram que os genes atz que codificam as enzimas responsáveis pelo início da via de degradação variou em resposta a aplicação de atrazina ao solo. O número de cópias dos genes atzA e trzN aumentou a partir das primeiras semanas após a aplicação de atrazina ao solo, sugerindo adaptação da microbiota. De fato, a degradação natural de poluentes é sustentada pela adaptação da microbiota do solo no ambiente e é essencial para os processos de detoxificação do solo (MONARD et al., 2010). Monard et al. (2008) demonstraram que o gene atzA detectado em amostras de solo derivou de bactérias indígenas e não de espécies inoculadas ao solo, após comparar a abundância de atzA em solo com e sem inóculo bacteriano. Diferentemente, Kersantè et al. (2006) sugerem que o tratamento com atrazina não afeta significativamente a abundância dos genes atzA, atzB e atzC em amostras de solo sem inóculo bacteriano. Essas análises foram realizadas após 9 dias do tratamento do solo com atrazina, o que pode explicar a divergência de resultados, já que no presente trabalho o número de cópias dos genes trzN e atzA aumentou após 2 e 3 semanas, respectivamente.

O gene trzN codifica para uma atrazina clorohidrolase que é análoga à AtzA. Neste estudo, os resultados indicaram que o trzN é o gene mais abundante nas amostras de solo tratadas com atrazina, se comparado aos genes atzA e atzD. Estes resultados concordam com o trabalho de Arbeli e Fuentes (2010) que mostrou que o gene trzN é dominante em uma comunidade de micro-organismos

degradadores de atrazina. Sagarkar et al. (2013) monitoraram os genes atz durante o processo de degradação da atrazina em amostras de solo e observaram que o número de cópias do gene trzN aumenta na segunda semana em amostras de solo sem inóculo bacteriano.

O sequenciamento do gene 16S rRNA sugere que a estrutura da comunidade bacteriana não mudou significativamente após a aplicação de atrazina ao solo. As amostras tratadas apresentaram alta diversidade alfa mesmo após uma pequena diminuição na segunda e oitava semanas. A biodegradação da atrazina tem sido bastante estudada nas últimas décadas e está diretamente ligada a alta diversidade bacteriana. Diversas espécies bacterianas já foram descritas como degradadoras de atrazina no solo (MONARD et al., 2010). Herbicidas podem inibir o crescimento de alguns organismos devido à toxicidade, mas também são capazes de estimular grupos específicos já que servem como fonte de nutrientes (BONFLEUR et al., 2015). O trabalho de Moreno et al. (2007) indicou um aumento na biomassa microbiana após tratamento do solo com atrazina e sugere que as variações ocorridas na comunidade do solo refletem a habilidade dos organismos em responder ao poluente e adaptar-se. Isto pode explicar o aumento no número de cópias do gene 16S rRNA após a segunda semana de tratamento com atrazina no presente trabalho.

Voets et al. (1974) utilizaram métodos baseados em cultura para analisar amostras de solo após longos períodos de tratamento com atrazina e mostraram que o herbicida pode alterar significativamente a população microbiana. O total de bactérias e fungos não diminuiu, mas grupos específicos foram reduzidos. Godoi et al. (2014) estudaram amostras de solo brasileiro usando a técnica de FISH e descobriram que as amostras tratadas com atrazina apresentam menor diversidade. Estes trabalhos ilustram a dificuldade em comparar estudos de efeitos de agrotóxicos na microbiota do solo devido à diferentes desenhos experimetais, dose aplicada e técnicas utilizadas. Muitos trabalhos utilizam técnicas baseadas em cultura e técnicas independentes de cultivo como DGGE, FISH, T-RFLP, RAPD, que são métodos bem estabelecidos, mas apresentam baixa resolução se comparados ao sequenciamento de nova geração. O Sequenciamento de nova geração permite uma análise mais detalhada das amostras e é a ferramenta mais adequada para a avaliação de comunidades microbianas do solo (JACOBSEN; HJELMSØ, 2014).

A análise da estrutura das comunidades bacterianas mostrou que os filos mais abundantes, tanto nas amostras controle quanto nas amostras tratadas, são Actinobacteria e Proteobacteria. Estes filos já foram positivamente correlacionados à concentração de atrazina no solo e foram também reportados como os filos mais abundantes em ambientes contaminados por agrotóxicos. Do mesmo modo, vários organismos degradadores de atrazina fazem parte destes filos (LIU et al., 2016).

A análise da abundância relativa das famílias indicou que as famílias Enterobacteriaceae e Burkholderiaceae estão significativamente aumentadas nas amostras coletadas quatro semanas após a aplicação de atrazina ao solo. Estas famílias são compostas por bactérias gram-negativas de crescimento rápido que podem conter o gene atzA em seu material genético.

As famílias Conexibacteraceae, Solirubrobacteraceae e Gaiellaceae estão aumentadas na oitava semana e podem ser relacionadas ao aumento na abundância do gene trzN. Estas famílias pertencem ao filo Actinobacteria que representa um dos filos mais abundantes em amostras de solo. A família Conexibacteraceae é baseada apenas em uma espécie e as famílias Conexibacteraceae e Solirubrobacteraceae contêm apenas algumas espécies cultiváveis. Apesar disso, várias sequências do gene 16S rRNA de solos de diferentes partes do mundo e também de isolados de solo não identificados apresentam alta similaridade a organismos destes grupos (WHITMAN et al., 2012). Já a família Gaiellaceae é nova e pouco estudada até o momento. Esta família é formada por bactérias gram-positivas estritamente aeróbias e tem sido associada às plantas e correlacionada à taxa carbono-nitrogênio no solo (HERMANS et al., 2016). Até o presente momento, não existem muitos estudos relacionados a essas famílias e, por isso, as pesquisas relacionadas às bactérias do solo em diferentes níveis taxonômicos são necessárias para o melhor entendimento dos efeitos na comunidade bacteriana do solo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- *Este estudo confirma a presença de bactérias com capacidade de biodegradação da atrazina em solo da região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.*
- *As bactérias isoladas neste estudo apresentaram conjuntos de genes de degradação da atrazina diferentes, assim como perfis de degradação diferentes.*
- *Os genes atzC e atzD do isolado Pseudomonas sp. A02 estão localizados no DNA plasmidial. Não foi possível determinar a localização de todos os genes atz detectados nas duas bactérias do estudo.*
- *Apenas o isolado A02 apresentou expressão diferencial dos genes atz após tratamento com atrazina.*
- *A transformação da molécula de atrazina pelos isolados do estudo foi confirmada através da detecção de metabólitos em amostras contendo as bactérias do estudo.*
- *O perfil de degradação dos isolados está relacionado ao grupo de genes detectado em cada isolado e também com o perfil de expressão dos genes atz.*
- *O isolado Achromobacter sp. A01 é um candidato para formação de consórcio bacteriano.*
- *A aplicação de atrazina ao solo aumenta a abundância dos genes atzA e trzN ao longo do tempo, mas não causa efeitos significativos na estrutura da comunidade bacteriana.*

REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

ADAMS, G. O., FUFEYIN, P. T., OKORO, S. E., EHINOMEN, I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmention: a review. International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation, v. 3(1), p. 28-39, 2015. DOI: 10.12691/ijebb-3-1-5.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. ***Relatório de Atividades 2012****. Brasília DF, 2013.*

ARBELI, Z., FUENTES, C. Prevalence of the gene trzN and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from13Colombian agricultural soils. **FEMS Microbiol Ecology***, v. 73, p. 611-623, 2010. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.00905.x.*

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAM, J. G; SMITH, J. A.; STRUHL, K. ***Short protocols in molecular biology****. 3ª ed. Greene Publishing Associates and John Wiley & Sens, 1992.*

BALMER, M., SULZBERGER, B. Atrazine degradation in irradiated iron/oxalate systems: effects of pH and oxalate. **Environmental Science Technology***, v. 33, p. 2418-2424, 1999. DOI: 10.1021/es9808705.*

BANKS, M. L., KENNEDY, A. C., KREMER, R. J., EIVAZI, F. Soil microbial community response to surfactants and herbicides in two soils. **Applied Soil Ecology***, v. 74, p. 12-20, 2014. DOI: 10.1016/j.apsoil.2013.08.018.*

BONFLEUR, E. J., TOMISIELO, V. L., REGITANO, J. B., LAVORENTI, A. The Effects of Glyphosate and Atrazine Mixture on Soil Microbial Population and Subsequent Impacts on Their Fate in a Tropical Soil. **Water, Air and Soil Pollution***, v. 226, p. 21, 2015. DOI: 10.1007/s11270-014-2190-8.*

BOUQUARD, C., OUAZZANI, J., PROMÉ, J-C., MICHEL-BRIAND, Y., PLÉSIAT, P. Dechlorination of atrazine by a Rhizobium sp. isolate. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 3, p. 862-866, 1997.*

BRAY, J. R., CURTIS, J. T. An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. **Ecological Monographs,** *v. 27, p. 325-349, 1957.*

CAPORASO, J. G., LAUBER, C. L., WALTERS, W. A., BERG-LYONS, D., HUNTLEY, J., FIERER, N., OWENS, S. M., BETLEY, J., FRASER, L., BAUER, M., GORMLEY, N., GILBERT, J. A., SMITH, G., KNIGHT, R. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. **The ISME Journal,** *v. 6, p. 1621-1624, 2012. DOI:10.1038/ismej.2012.8.*

CARMO, D. A., CARMO, A. P. B., PIRES, J. M. B., OLIVEIRA, J. L. M. Comportamento ambiental e toxicidade dos herbicidas atrazina e simazina. **Revista Ambiente & Água - An Interdisciplinary Journal of Applied Science***, v. 8(1), p. 133-143, 2013. DOI: 10.4136/ambi-agua.1073.*

CARVALHO, F. P. Pesticides, environment and food safety. **Food and Energy Security***, v. 6(2), p. 48-60, 2017. DOI: 10.1002/fes3.108.*

CARVALHO, L. B. ***Herbicidas****. 1ª ed. Editado pelo autor, Lages SC, 2013.*

CAVAS, T. In vivo genotoxicity evaluation of atrazine and atrazine–based herbicide on fish Carassius auratus using the micronucleus test and the comet assay. **Food and Chemical Toxicology***, v. 49, p. 1431-1435, 2011. doi:10.1016/j.fct.2011.03.038.*

CHEN, Q., YANG, B., WANG, H., HE, F., GAO, Y., SCHEEL, R. A. Soil microbial community toxic response to atrazine and its residues under atrazine and lead contamination. **Environmental Science and Pollution Research***, v. 22, p. 996-1007, 2015. DOI: 10.1007/s11356-014-3369-7.*

CHEYNS, K., MARTIN-LAURENT, F., BRU, D., AAMAND, J., VANHAECKE, L., DIELS, J., MERCKX, R., SMOLDERS, E., SPRINGAEL, D. Long-term dynamics of the atrazine mineralization potential in surface and subsurface soil in an agricultural field as a response to atrazine applications. **Chemosphere***, v. 86, p. 1028-1034, 2012. DOI:10.1016/j.chemosphere.2011.11.045.*

COELHO, E. R. C., DI BERNARDO, L. The presence and the removal of atrazine, deethylatrazine, deisopropylatrazine and deethylhidroxiatrazine in a pilot plant consisted of ozonation and slow sand filtration. **Engenharia Sanitária e Ambiental***, v. 22(4), p. 789-796, 2007. DOI: 10.1590/S1413-41522017147638.*

CYCÓN, M., MROZIK, A., PIOTROWSKA-SEGET, Z. Bioaugmentation as a strategy for the remediation of pesticide-polluted soil: a review. **Chemosphere,** *v. 172, p. 52-71, 2017.*

DE SOUZA, M. L., SEFFERNICK, J., MARTINEZ, B., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. The atrazine catabolism genes atzABC are widespread and highly conserved. **Journal of Bacteriology***, p. 1951-1954, 1998a.*

DE SOUZA, M. L., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. Atrazine chlorohydrolase from Pseudomonas sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. **Journal of Bacteriology***, v. 178(16), p. 4894-4900, 1996.*

DE SOUZA, M., WACKETT, L. P., SADOWSKY, M. J. The atzABC genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in Pseudomonas sp. strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 64(6), p. 2323-2326, 1998b.*

DEVERS, M., HENRY, S., HARTMAN, A., MARTIN-LAURENT, F. Horizontal gene transfer of atrazine-degrading genes (atz) from Agrobacterium tumefaciens St96-4 pADP1::Tn5 to bacteria of maize cultivated soil. **Pest Management Science***, v. 61(9), p. 870-880, 2005. DOI: 10.1002/ps.1098.*

DEVERS, M., SOULAS, G., MARTIN-LAURENT, F., 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. **Journal of Microbiological Methods***, v. 56, p. 3-15, 2004. DOI: 10.1016/j.mimet.2003.08.015.*

*DUTTA, A., SINGH, N. Degradation of atrazine in mineral salts medium and soil using enrichment culture***. Journal of Environmental Science and Health***, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, v. 48, p. 860-868, 2013.*

EL SEBAÏ, T., DEVERS-LAMRANI, M., CHANGEY, F., ROUARD, N., MARTIN-LAURENT, F. Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: Isolation of Arthrobacter sp. TES6, an atrazine-degrading strain. **International Biodeterioration & Biodegradation***, v. 65, p. 1249-1255, 2011. DOI:10.1016/j.ibiod.2011.05.011.*

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Solos. ***Sistema brasileiro de classificação de solos****. 3ª ed. Brasília DF, 2013.*

FAN, X., SONG, F. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. **Journal of Soils and Sediments***, v. 14, p. 1727–1737, 2014.*

FAJARDO, C., SACCÀ, M. L., GIBELLO, A., MARTINEZ-INIGO, M. J., NANDE, M., LOBO, C., MARTIN, M. Assessment of s-Triazine catabolic potential in soil bacterial isolates applying atz genes as functional biomarkers. **Water, Air and Soil Pollution***, v. 223, p. 3385-3392, 2012. DOI: 10.1007/s11270-012-1117-5.*

FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry***, v. 132, p. 6-13, 1993.*

FERNANDES, A. F. T., DA SILVA, M. B. P., MARTINS, V. V., MIRANDA, C. E. S., STEHLING, E. G. Isolation and characterization of a Pseudomonas aeruginosa from a virgin Brazilian Amazon region with potential to degrade atrazine. **Environmental Science and Pollution Research***, v. 21, p. 13974-13978, 2014. DOI: 10.1007/s11356-014-3316-7.*

FOSTER, W. G., EVANS, J. A., LITTLE, J., ARBOUR, L., MOORE, A., SAUVE, R., LEÓN, J. A., LUO, W. Human exposure to environmental contaminants and congenital anomalies: a critical review. **Critical Reviews in Toxicology***, v. 47(1), p. 59-84, 2017. DOI: 10.1080/10408444.2016.1211090.*

GARCÍA-GONZÁLEZ, V., GOVANTES, F., PORRÚA, O., SANTERO, E. Nitrogen control of atrazine utilization in Pseudomonas sp. strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 69, p. 6987-6993, 2005. DOI: 10.1128/AEM.69.12.6987–6993.2003.*

GARGOURI, B., KARRAY, F., MHIRI, N., ALOUI, F., SAYADI, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons-contaminated soil. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology***, v. 89, p. 978–987, 2014. DOI: 10.1002/jctb.4188.*

GILL, H. K., GARG, H. ***Pesticides****: environmental impacts and management strategies, Pesticides - toxic aspects, Dr. Sonia Soloneski (Ed.), InTech, 2014. DOI: 10.5772/57399. Disponível em: < https://www.intechopen.com/books/pesticides-toxic-aspects/pesticides-environmental-impacts-and-management-strategies>. Acesso em: 30 jan. 2018.*

GODOI, I., SENE, L., CARACCIOLO, A. B. Assessment of the bacterial community structure in a Brazilian clay soil treated with atrazine. **Annals of Microbiology***, v. 64, p. 307-311, 2014. DOI: 10.1007/s13213-013-0665-2.*

GOHL, D. M., VANGAY, P., GARBE, J., MACLEAN, A., HAUGE, A., BECKER, A., GOULD, T. J., CLAYTON, J. B., JOHNSON, T. J., HUNTER, R., KNIGHTS, D., BECKMAN, K. B. Systematic improvement of amplicon marker gene methods for increased accuracy in microbiome studies. **Nature Biotechnology***, v. 34(9), p. 942-950, 2016. DOI:10.1038/nbt.3601.*

HERMANS, S. M., BUCKLEY, H. L., CASE, B. S., CURRAN-COUMANE, F., TAYLOR, M., LEA, G. Bacteria as emerging indicators of soil condition. **Applied and Environmental Microbiology,** *accepted manuscript posted online, 28 October 2016. DOI:10.1128/AEM.02826-16.*

HERNÁNDEZ, M., VILLALOBOS, P., MORGANTE, V., GONZALEZ, M., REIFF, C., MOORE, E., SEEGER, M. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, Pseudomonas sp. MHP41. **FEMS Microbiology Letters***, v. 286, p. 184-190, 2008. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01274.x.*

HIRSCH, P. R., MAUCHLINE, T. H., CLARK, I. M. Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. **Soil Biology & Biochemistry***, v. 42, p. 878-887, 2010. DOI: 10.1016/j.soilbio.2010.02.019.*

HUSSAIN, S., ARSHAD, M., SALEEM, M., KHALID, A. Biodegradation of α and ß-endosulfan by soil bacteria. **Biodegradation***, v. 18, p. 731-740, 2007. DOI: 10.1007/s10532-007-9102-1.*

HUSSAIN, S., SIDDIQUE, T., SALEEM, M., ARSHAD, M., KHALID, A. Impact of pesticides on soil microbial diversity, enzymes and biochemical reactions. **Advances in Agronomy***, v. 102, 2009. DOI: 10.1016/S0065-2113(09)01005-0.*

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. ***Relatórios de comercialização****. Brasil, 2016. Disponível em: < http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatoriosdecomercializacaodeagrotoxicos#historicodecomercializacao>. Acesso em: 2 fev. 2018.*

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. ***Indicadores de desenvolvimento sustentável****. Rio de Janeiro, 2015.*

JACOBSEN, C. S., HJELMSØ, M. H. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. **Current Opinion in Biotechnology***, v. 27, p. 15-20, 2014.*

JAVARONI, R. A., LANDGRAF, M. D., REZENDE, M. O. O. Comportamento dos herbicidas atrazina e alaclor aplicados em solo preparado para o cultivo de cana-de-açúcar. **Química Nova***, v. 22(1), p. 58-64, 1999.*

KAKIRDE, K. S., PARSLEY, L. C., LILES, M. R. Size does matter: application-driven approaches for soil metagenomics. **Soil Biology & Biochemistry***, v. 42, p. 1911-1923, 2010. DOI:10.1016/j.soilbio.2010.07.021.*

KERSANTÈ, A., MARTIN-LAURENT, F., SOULAS, G., BINET, F. Interactions of earthworms with Atrazine-degrading bacteria in an agricultural soil. **FEMS Microbiol Ecology***, v. 57, p. 192-205, 2006. DOI:10.1111/j.1574-6941.2006.00108.x.*

KLEIN, S., AVRAHAMI, R., ZUSSMAN, E., BELIAVSKI, M., TARRE, S., GREEN, M. Encapsulation of Pseudomonas sp. ADP cells in electrospun microtubes for atrazine bioremediation. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology***, v. 39, p. 1605-1613, 2012. DOI 10.1007/s10295-012-1164-3.*

LEITE, L. F. C. ***Ecologia microbiana do solo****. 1ª ed. Teresina: Embrapa Meio-Norte, 2007.*

LIMA, D., VIANA, P., ANDRÉ, S., CHELINHO, S., COSTA, C., RIBEIRO, R., SOUSA, J. P., FIALHO, A. M., VIEGAS, C. A. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. **Chemosphere***, v. 74, p. 187-192, 2009. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2008.09.083.*

LIU, X., HUI, C., BI, L., ROMANTSCHUK, M., KONTRO, M., STROMMER, R., HUI, N. Bacterial community structure in atrazine treated reforested farmland in Wuying China. **Applied Soil Ecology***, v. 98, p. 39-46, 2016. DOI: 10.1016/j.apsoil.2015.09.005.*

LUIZ, A. J. B. ***Agrotóxicos são do mal?*** *Embrapa Meio Ambiente, 2015. Disponível em:<https://www.embrapa.br/buscadenoticias//noticia/6248227/artigoagrotoxicossao-do-mal>. Acesso em: 07 dez. 2017.*

MANDELBAUM, R. T., ALLAN, D. L., WACKETT, L. P. Isolation and characterization of a Pseudomonas sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 61(4), p. 1451-1457, 1995.*

MANDELBAUM, R. T., WACKETT, L. P., ALLAN, D. L. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 59, p. 1695–1701, 1993.*

MARCHESI, J. R., TAKUICHI, S., WEIGHTMAN, A. J., MARTIN, T. A., FRY, J. C., HIOM, S. J., WADE, W. G. Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology***, v. 64(2), p. 795-799, 1998.*

MARCHI, G., MARCHI, E. C. S., GUIMARÃES, T. G. ***Herbicidas****: mecanismos de ação e uso. Embrapa Cerrados. Planaltina DF, 2008.*

MARIN-MORALES, M. A., VENTURA-CAMARGO, B. C., HOSHINA, M. M. ***Toxicity of herbicides****: impact on aquatic and soil biota and human health, Herbicides - Current Research and Case Studies in Use, Dr. Andrew Price (Ed.), InTech, 2013. doi: 10.5772/55851. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/herbicides-current-research-and-case-studies-in-use/toxicity-of-herbicides-impact-onaquaticand-soil-biota-and-human-health>. Acesso em: 26 fev. 2018.*

MARTIN-LAURENT, F., BARRÉS, B., WAGSHAL, I., PIUTTI, S., DEVERS, M., SOULAS, G., PHILLIPOT, L. Impact of the maize rhizosphere on the genetic structure, the diversity and the atrazine-degrading gene composition of cultivable atrazine-degrading communities. **Plant and Soil***, v. 282, p. 99-115, 2006. DOI: 10.1007/s11104-005-5316-3.*

MINISTÉRIO DA SAÚDE. ***Agrotóxicos na ótica do Sistema Único de Saúde****. Relatório Nacional de Vigilância em Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos (VSPEA). 1ª ed. Brasília DF, 2016.*

MIRGAIN, I., GREEN, G., MONTEIL, H. Biodegradation of the herbicide atrazine in groundwater under laboratory conditions. **Environmental Technology***, v. 16(10), p. 967-976, 1995.*

MONARD, C., MARTIN-LAURENT, F., DEVERS-LAMRANI, M., LIMA, O., VANDENKOORNHUYSE, P., BINET, F. Atz gene expressions during atrazine degradation in the soil drilosphere. **Molecular Ecology***, v. 19, p. 749-759, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04503.x.*

MONARD, C., MARTIN-LAURENT, F., VECCHIATO, C., FRANCEZ, A. J., VANDENKOORNHUYSE, P., BINET, F. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. **Soil Biology & Biochemistry***, v. 40, p. 2253-2259, 2008. DOI:10.1016/j.soilbio.2008.04.022.*

MORAES, N. V., GRANDO, M. D., VALERIO, D. A. R., OLIVEIRA, D. P. Exposição ambiental a desreguladores endócrinos: alterações na homeostase dos hormônios esteroidais e tireoideanos. **Revista Brasileira de Toxicologia***, v. 21(1), p. 1-8, 2008.*

MORENO, J. L., ALIAGA, A., NAVARRO, S., HERNÀNDEZ, T., GARCÍA, C. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. **Applied Soil Ecology***, v. 35, p. 120-127, 2007. DOI: 10.1016/j.apsoil.2006.05.002.*

MORETTO, J. A. S., ALTARUGIO, L. M., ANDRADE, P. A., FACHIN, A. L., ANDREOTE, F. D., STEHLING, E. G. Changes in bacterial community after application of three different herbicides. **FEMS Microbiology Letters***, v. 364, 2017. DOI: 10.1093/femsle/fnx113.*

MULBRY, W. W., ZHU, H., NOUR, S. M., TOPP, E. The triazine hydrolase gene trzN from Nocardioides sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers.

FEMS Microbiology Letters, *v. 206, p. 75-79, 2002. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2002.tb10989.x*

MUKHERJEE, K., TRIBEDI, P., CHOWDHURE, A., RAY, T., JOARDAR, A., GIRI, S., SIL, A. K. Isolation of a Pseudomonas aeruginosa strain from soil that can degrade polyurethane diol. **Biodegradation**, *v. 22, p. 377-388, 2011. DOI 10.1007/s10532-010-9409-1.*

NAGY, I., COMPERNOLLE, F., GHYS, K., VANDERLEYDEN, J., DE MOT, R. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides EPTC (s-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by Rhodococcus sp. strain NI86/21. **Applied and Environmental Microbiology**, *v. 61(5), p. 2056-2060, 1995.*

NEWCOMBE, D. A., CROWLEY, D. E. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *V. 51, P. 877-882, 1999.*

NUNES, R. R. e REZENDE, M. O. O. Recurso solo: propriedades e usos. In:Mattos, M.L.T. **Microbiologia do Solo**. *1ª ed. São Carlos: Editora Cubo, 2015. p. 250-272.*

PAN-GERMANY. ***Pesticide and health hazards****: facts and figures, 2012. Disponível em: <https://WWW.pangermany.org/download/Vergift_EN-201112-web.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2018.*

PEEL, M. C., FINLAYSON, B. L., McMAHON, T. A. Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. **Hydrology and Earth System Sciences**, *v. 11, p. 1633-1644, 2007. DOI: https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007.*

PELIZZETTI, E., MAURINO, V., MINERO, C., CARLIN, V., PRAMAURO, E., ZERBINATI, O., TOSATO, M. L. Photocatalytic Degradation of Atrazine and Other s-Triazine Herbicides. **Environmental Science Technology**, *v. 24, p. 1559-1565, 1990.*

PERUCCI, P., DUMONTET, S., BUFO, S. A., MAZZATURA, A., CASUCCI, C. Effects of organic amendment and herbicide treatment on soil microbial biomass. **Biology and Fertility of Soils**, *v. 32, p. 17–23, 2000.*

PORRÚA, O., GARCÍA-JARAMILLO, M., SANTERO, E., GOVANTES, F. Complex interplay between the LysR-type regulator AtzR and its binding site mediates atzDEF activation in response to two distinct signals. **Molecular Microbiology**, *v. 76, p. 331-347, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07100.x.*

PRATT, J. R., BOWERS, N. J., NIEDERLEHNER, B. R., CAINS Jr, J. Effects of Atrazine on Freshwater Microbial Communities. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, *v. 17, p. 449-457, 1988.*

PROSSER, R. S., ANDERSON, J. C., HANSON, M. L., SOLOMON, K. R., SIBLEY, P. K. Indirect effects of herbicides on biota in terrestrial edge-of-field habitats: A critical review of the literature. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, *v. 232, p. 59-72, 2016.*

*R CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2012.*

*RIBAUDO, M. O., BOUZAHER, A**. Atrazine**: environmental characteristics and economics of management. Resources and Technology Division, Economic Research Service, U.S. Department of Agriculture. Agricultural Economic Report N° 699. Washington DC, 1994.*

*RODRIGUES, B. N.; ALMEIDA, F. S. **Guia de herbicidas**. 5ª ed. Edição dos autores. Londrina PR, 2005.*

ROESCH, L. F. W., FULTHORPE, R. R., RIVA, A., CASELLA, G., HADWIN, A. K. M., KENT, A. D., DAROUB, S. H., CAMARGO, F. A. O., FARMERIE, W. G., TRIPLETT, E. W. Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. **The ISME Journal***, v. 1, p. 283-290, 2007.*

*ROMAN, E. S., VARGAS, L., RIZZARDI, M. A., HALL, L., BECKIE, H., WOLF, T. M. **Como funcionam os herbicidas**: da biologia à aplicação. Editado por Erivelton Scherer Roman, Leandro Vargas. Passo Fundo: Gráfica Editora Berthier, 2005.*

ROUSSEAUX, S., SOULAS, G., HARTMANN, A. Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described Chelatobacter and Arthrobacter strains. **FEMS Microbiology Ecology***, v. 41, p. 69-75, 2002.*

SADOWSKY, M. J., TONG, Z., DE SOUZA, M., WACKETT, L. P. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. **Journal of Bacteriology***, v. 180, p. 152-158, 1998.*

SÁEZ, F., POZO, C., GÓMEZ, M. A., MARTINEZ-TOLEDO, M. V., RODELAS, B., GÓNZALEZ-LÓPEZ, J. Growth and denitrifying activity of Xanthobacter autotrophicus CECT 7064 in the presence of selected pesticides. **Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 71, p. 563-567, 2006. DOI: 10.1007/s00253-005-0182-8.*

SAGARKAR, S., BHARDWAJ, P., STORCK, V., DEVERS-LAMRANI, M., MARTIN-LAURENT, F., KAPLEY, A. s-triazine degrading bacterial isolate Arthrobacter sp. AK-YN10, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil. **Applied Microbiology and Biotechnology***, v. 100, p. 903-913, 2016. DOI: 10.1007/s00253-015-6975-5.*

SAGARKAR, S., MUKHERJEE, S., NOUSIAINEN, A., BJÖRKLÖF, K., PUROHIT, H. J., JØRGENSEN, K. S., KAPLEY, A. Monitoring bioremediation of atrazine in soil microcosms using molecular tools. **Environmental Pollution***, v. 172, p. 108-115, 2013.*

SAGARKAR, S., NOUSIAINEN, A., SHALIGRAM, S., BJÖRKLÖF, K., LINDSTRÖM, M., JØRGENSEN, K. S., KAPLEY, A. Soil mesocosm studies on atrazine bioremediation. **Journal of Environmental Management***, v. 139, p. 208-216, 2014.*

SANDERSON, J. T., SEINEM, W., GIESY, J. P., VAN DEN BERG, M. 2-chloro-s-triazine herbicides induce aromatase (CYP19) activity in H295R human adrenocortical carcinoma cells: a novel mechanism for estrogenicity? **Toxicological Sciences***, v. 54, p. 121-127, 2000.*

SCHLOSS, P. D. A high-throughput DNA sequence aligner for microbial ecology studies. **PLoS ONE***, v. 4, p. 8230, 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0008230.*

SCHLOSS, P. D., WESTCOTT, S. L., RYABIN, T., HALL, J. R., HARTMANN, M., HOLLISTER, E. B., LESNIEWSKI, R. A., OAKLEY, B. B., PARKS, D. H., ROBINSON, C. J., SAHL, J. W., STRES, B., THALLINGER, G. G., VAN HORN, D. J., WEBER, C. F. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology,** *v. 75(3), p. 7537-7541, 2009. DOI:10.1128/AEM.01541-09.*

SEBIOMO, A., OGUNDERO, V. W., BANKOLE, S. A. Effect of four herbicides on microbial population, soil organic matter and dehydrogenase activity. **African Journal of Biotechnology***, v. 10(5), p. 770-778, 2011. DOI: 10.5897/AJB10.989.*

SEGHERS, D., VERTHE, K., REHEUL, D., BULCKE, R., SICILIANO, S. D., VERSTRAETE, W., TOP, E. M. Efect of long-term herbicide applications on the bacterial community structure and function in an agricultural soil. **FEMS Microbiology Ecology***, v. 46, p. 139-146, 2003. DOI:10.1016/S0168-6496(03)00205-8.*

SENE, L., CONVERTI, A., SECCHI, G. A. R., SIMÃO, R. C. G. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology***, v. 53, p. 487-496, 2010.*

SHAPIR, N., MONGODIN, E. F., SADOWSKY, M. J., DAUGHERTY, S. C., NELSON, K. E., WACKETT, L. P. Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. **Journal of Bacteriology***, v. 189(3), p. 674-682, 2007. DOI: 10.1128/JB.01257-06.*

SHAPIR, N., SADOWSKY, M. J., WACKETT, L. P. Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from Pseudomonas sp. strain ADP. **Journal of Bacteriology***, v. 187, p. 3731-3738, 2005. DOI:10.1128/JB.187.11.3731–3738.2005.*

SMITH, D., ALVEY, S., CROWLEY, D. E. Cooperative catabolic pathways within na atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology***, v. 53, p. 265-273, 2005. DOI:10.1016/j.femsec.2004.12.011.*

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology***, v. 98, p. 503-17, 1975.*

STRUTHERS, J. K., JAYACHANDRAN, K., MOORMAN, T. B. Biodegradation of atrazine by Agrobacterium radiobacter J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, *v. 64(9), p. 3368-3375, 1998.*

THOMPSON, B. M., LIN, C., HSIEH, H., KREMER, R. J., LERCH, R. N., GARRET, H. E. Evaluation of PCR-based Quantifi cation Techniques to Estimate the Abundanceof Atrazine Chlorohydrolase Gene atzA in Rhizosphere Soils. **Journal of Environment Quality**, *v. 39, p. 1999-2005, 2010. DOI: 10.2134/jeq2010.0192.*

TOMASEK, A., STALEY, C., WANG, P., KAISER, T., LURNDAHL, N., KOZAREK, J. L., HONDZO, M., SADOWSKY, M. J. Increased denitrification rates associated with shifts in prokaryotic community composition caused by varying hydrologic connectivity. **Frontiers in Microbiology**, *v. 8, p. 2304, 2017. DOI: 10.3389/fmicb.2017.02304.*

UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N., HRŠAK, D., DEVERS, M., KLEPAC-CERAJ, V., PETRIĆ, I., MARTIN-LAURENT, F. Taxonomic and functional diversity of atrazine-degrading bacterial communities enriched from agrochemical factory soil. **Journal of Applied Microbiology**, *v. 109, p. 1364-5072, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2010.04700.x.*

UDIKOVIC´-KOLIC´, N., HRSˇAK, D., KOLAR, A. B., PETRIC´, I., STIPICˇEVIC, S., SOULAS, G., MARTIN-LAURENT, F. Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, *v. 60(4), p. 299-307, 2007. DOI:10.1016/j.ibiod.2007.05.004.*

UDIKOVIĆ-KOLIĆ, N., MARTIN-LAURENT, F., DEVERS, M., PETRIC, I., BEGONJA KOLAR, A., HRSAK, D. Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from an herbicide factory effluent. **Journal of Applied Microbiology**, *v. 105(5), p. 1334-1343, 2008. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2008.03890.x.*

USEPA - United States Environmental Protection Agency. ***Decision documents for atrazine****. Washington D.C., 2006.*

VAISHAMPAYAN, P. A., KANEKAR, P. P., DHAKEPHALKAR, P. K. Isolation and characterization of Arthrobacter sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. ***International Biodeterioration & Biodegradation****, v. 60, p. 273-278, 2007. DOI:10.1016/j.ibiod.2007.05.001.*

VIBBER, L. L., PRESSLER, M. J., COLORES, G. M. Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil. **Applied Microbiology and Biotechnology**, *v. 75, p. 921–928, 2007. DOI: 10.1007/s00253-007-0871-6.*

VOETS, J. P., MEERCHSMAN, P., VERSTRAETE, W. Soil microbiological effects of long-term atrazine application. **Soil Biology and Biochemistry**, *v. 6, p. 149-152, 1974.*

WACKETT, L. P., SADOWSKY, M. J., MARTINEZ, B., SHAPIR, N. Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. **Microbial Biotechnology***, v. 58, p. 39-45, 2002.*

WANG, Q. e XIE, S. Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading Arthrobacter sp. strain. **International Biodeterioration & Biodegradation***, v. 71, p. 61-66, 2012. DOI:10.1016/j.ibiod.2012.04.005.*

WHITMAN, W. B., GOODFELLOW, M., KAMPFER, P., BUSSE, H. J., TRUJILLO, M. E., LUDWIG, W., SUZUKI, K. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology***: Vol 5: The Actinobacteria. 2ª ed: Springer Science & Business Media, 2012.*

ZHANG, Y., JIANG, Z., CAO, B., HU, M., WANG, Z., DONG, X., 2011. Metabolic ability and gene characteristics of Arthrobacter sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. **International Biodeterioration and Biodegradation***, v. 65, p. 1140-1144. doi:10.1016/j.ibiod.2011.08.010.*

APÊNDICE

Apêndice

Apêndice A. Condições das reações de qPCR para os genes 16S rRNA, atzA, atzD e trzN.

Tabela 6 - Condições da reação de qPCR para o gene 16S rRNA.

Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão
50˚C por 2 min	*95°C*	*50˚*	*72°C*
95˚C por 5 min	*15 seg*	*30 seg*	*30 seg*
		40 ciclos	

Tabela 7 - Condições da reação de qPCR para os genes atzA e atzD.

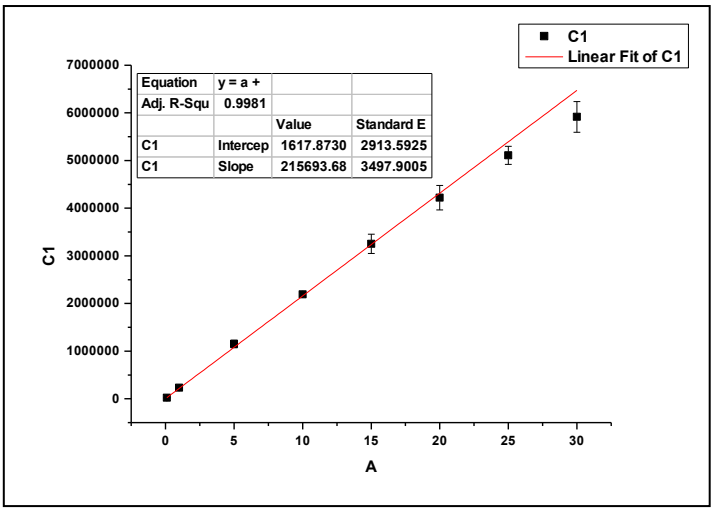
Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Aquisição de sinal
50˚C - 2 min	*95°C*	*60˚*	*72°C*	*81˚C*
95˚C - 5 min	*15 seg*	*30 seg*	*30 seg*	*15 seg*
		40 ciclos		

Tabela 8 - Condições da reação de qPCR para o gene trzN.

Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão
50˚C por 2 min	*95°C*	*55˚*	*72°C*
95˚C por 5 min	*45 seg*	*45 seg*	*45 seg*
		45 ciclos	

Apêndice B. Curva de calibração da atrazina.

Figura 25 - Curva de calibração da atrazina.



Equação: y = a + b.x

a = 1.617,873

b = 215.693,68

x = (y – a)/b