

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – UNIOESTE
CAMPUS DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

IMPACTO DA PRESENÇA DE ATRAZINA NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO

ISAMARA GODOI

CASCAVEL – PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO 2012

ISAMARA GODOI

IMPACTO DA PRESENÇA DE ATRAZINA NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração **Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental**.

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. LUCIANE SENE

CASCADEL – PARANÁ - BRASIL
FEVEREIRO 2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

Biblioteca Central do Campus de Cascavel – Unioeste

Ficha catalográfica elaborada por Jeanine da Silva Barros CRB-9/1362

G532i Godoi, Isamara
Impacto da presença de atrazina na comunidade bacteriana do solo.
/ Isamara Godoi — Cascavel, PR: UNIOESTE, 2012.
44 f. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Luciane Sene
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do
Paraná.
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola,
Centro de Ciências Exatas e Tecnológicas.
Bibliografia.

1. Solo – Comunidades bacterianas. 2. Hibridização fluorescente “in
situ”. 3. S-trazinas. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II.
Título.

CDD 21. ed. 631.46

Revisão de Português, Inglês e Normas de dissertação realizada na
data de 16/04/2012 por Ana Maria Alves Vasconcelos.

ISAMARA GODOI

“IMPACTO DA PRESENÇA DE ATRAZINA NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO”

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Engenharia Agrícola, em cumprimento parcial dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola, área de concentração em Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, para aprovação pela seguinte banca examinadora:

Orientadora: Prof^a Dr^a Luciane Sene
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE

Prof^o Dr^o Marcos Pileggi
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UEPG

Prof^a Dr^a Fabiana Gisele da Silva Pinto
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIOESTE

Prof^a Dr^a Marina Kimiko Kadowaki
Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, UNIOESTE

Cascavel, 13 de Fevereiro de 2012

BIOGRAFIA

Isamara Godoi, nascida no ano de 1980, natural de Realeza, PR. Bacharel e Licenciada em Ciências Biológicas com ênfase em Biotecnologia pela UNIPAR (2005), aluna de Iniciação Científica PIBIC (2004-2005), Especialista em Morfofisiologia Humana pela UNIOESTE(2006), Docente da Universidade Paranaense de Francisco Beltrão – PR (2006) das turmas de Biomedicina (disciplina de Patologia) e Nutrição (disciplina de Fisiologia da Nutrição), docente em regime PSS pelo Núcleo Regional de Educação em Cascavel –PR, ministrando aulas de Biologia e Ciências (2006-2009). Mestranda do Programa de Engenharia Agrícola (PGEAGRI) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – campus Cascavel, na área de concentração de Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental, tendo ingressado no programa em 2010, Bolsista Capes.

"As coisas mais simples da vida são as mais extraordinárias, e só os sábios conseguem vê-las."

(Paulo Coelho)

A Deus pelo seu poder e cuidado com minha vida, ao meu esposo pelo carinho, apoio e companheirismo e aos meus pais Gilberto Godoi e Neusa Santana Dias Godoi, pelo amor, vida e educação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo cuidado, proteção e pelas oportunidades concedidas em minha vida.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, *Campus* Cascavel, e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola, pela oportunidade de realização do curso;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo;

À Fundação Araucária de Apoio e Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Paraná e ao CNPQ pelo financiamento do projeto;

À professora Luciane Sene pela orientação, oportunidade, confiança e amizade durante todo o Mestrado;

Ao meu esposo pela compreensão, apoio e carinho durante este período da minha vida;

À minha amiga Danielle Camargo pela amizade e força nos momentos difíceis;

Aos que embora não citados, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

IMPACTO DA PRESENÇA DE ATRAZINA NA COMUNIDADE BACTERIANA DO SOLO

RESUMO

A remoção da contaminação química no solo e água é dependente principalmente da presença de uma comunidade microbiana capaz de degradar tais compostos. A existência de microorganismos capazes de metabolizar xenobióticos é de um considerável interesse evolucionário, uma vez que estes compostos são relativamente novos no planeta nas últimas cinco décadas. Pouco se sabe sobre a variação da estrutura da comunidade microbiana do solo em função da ausência e presença dos herbicidas s-triazínicos. Diferentemente dos métodos dependentes de cultivo, que requerem tempo para a detecção de bactérias, técnicas moleculares vem sendo desenvolvidas para o reconhecimento de espécies individuais em populações mistas em ambientes naturais. A técnica de Hibridização Fluorescente "in situ" (FISH) supera algumas dificuldades encontradas com outras técnicas moleculares, pois dispensa as etapas de isolamento e amplificação de DNA e permite a identificação de genes específicos em células intactas. Em virtude disso, o presente trabalho teve como objetivo comparar o efeito da ausência/presença de atrazina na estrutura da comunidade bacteriana do solo no aspecto filogenético. Foram utilizadas sondas alvo para as subdivisões de Proteobactéria alfa, beta e gama, bactérias Gram-positivas com alto teor de G + C e Betaproteobactérias oxidantes de amônia, Bactérias oxidantes de Nitrito e Planctomicetos. Também foi utilizada uma sonda específica *AtzB1* para verificar a presença do gene *atzB* que está envolvido na degradação das s-triazinas. A abundância bacteriana foi determinada através de contagem direta em microscopia de epifluorescência, e os valores correspondentes a cada sonda foram expressos em porcentagem da contagem total com DAPI para cada amostra. No presente estudo células positivas para todas as sondas utilizadas foram encontradas em ambos os solos, porém a abundância de todos os grupos foi menor no solo contaminado com o herbicida atrazina, demonstrando dessa forma a influência negativa do mesmo, sendo o grupo mais afetado o dos Planctomicetos com uma abundância 57% menor em solo contaminado. O segundo grupo mais afetado foi o das bactérias oxidantes de nitrito seguido pelo grupo das β -Proteobactérias. Foi também detectado no presente estudo a presença do gene *atzB* demonstrando que em ambos os solos existem bactérias potencialmente degradadoras de s-triazinas.

PALAVRAS CHAVE: Comunidades bacterianas, Hibridização fluorescente "in situ", s-triazinas

IMPACT OF ATRAZINE ON BACTERIOLOGICAL SOIL COMMUNITY

ABSTRACT

Chemical contamination removal in soil and water depends on microbiological community that is able to degrade these compounds. There is a great evolutionary interest on studying microorganisms that metabolize the xenobiotic ones, since they have relatively been seen as new in the last five decades. Little is known about structure variation of microbiological community of soil due to the absence and presence of s-triazine herbicides. Unlike crop dependent methods that require time to detect bacteria, molecular techniques have been developed to identify individual species in mixed populations under natural environments. Fluorescence "in situ" Hybridization (FISH) technique overcomes some difficulties that are found out in other molecular techniques, as it does not need DNA isolation and amplification steps and allows the identification of specific genes in intact cells. Thus, this study aimed at comparing the absence/presence of atrazine effect on bacteriological community structure in soil according to the phylogenetic aspect. Target probes were used on subdivisions of alpha, beta and gamma Proteobacteria, gram-positive bacteria with high G+C content, ammonia oxidizing bacteria, nitrite oxidizing bacteria and Planctomycetes. It was also used an AtzB1 specific probe to check the *atzB* gene presence, which makes part of s-triazine degradation. Bacteriological amount was determined by direct counting on epifluorescence microscopy, while the corresponding values to each probe were expressed in percentages of the total count with DAPI for each sample. According to this study, positive cells were found out for all probes used in both soils, but the abundance of all groups was lower in soil contaminated with atrazine herbicide, thereby demonstrating its negative influence. Planctomycetes was the most affected group with 57% lower abundance in contaminated soil. The nitrite oxidizing bacteria was the second most affected group followed by β -Proteobacteria. It was also detected the gene *atzB* presence, so, it can be inferred that there are potentially degrading s-triazine bacteria in both soils.

KEYWORDS: Bacterial communities, Fluorescence "in situ" hybridization, s-triazines

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Gerais	3
2.2 Específico	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1 Os herbicidas s-trizínicos e a atrazina.....	4
3.2 Diversidade bacteriana no solo.....	6
3.3 Degradação da atrazina por bactérias	9
3.4 Hibridização fluorescente “in situ”	12
4 MATERIAL E MÉTODOS	16
4.1 Coleta das amostras.....	16
4.2 Caracterização do solo.....	18
4.3 Fixação das amostras e extração das células.....	18
4.4 Preparo das membranas.....	19
4.5 Hibridização fluorescente “in situ” (FISH) e quantificação celular.....	20
4.6 Análise Estatística.....	23
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
5.1 Caracterização do solo.....	23
5.2 Hibridização fluorescente “in situ”	27
5.2.1 Sondas filogenéticas.....	27
5.2.2 Sonda AtzB1.....	33
6 CONCLUSÕES.....	36
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	37
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Coordenadas dos pontos de coleta de amostras de solo.....	17
Tabela 2 Sequências das sondas filogenéticas utilizadas.....	21
Tabela 3 Principais características físico-químicas dos diferentes solos utilizados.....	24
Tabela 4 Composição do Domínio Bactéria.....	28

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura química da atrazina e simazina.....	4
FIGURA 2 Árvore filogenética.....	7
FIGURA 3 Degradação da molécula de atrazina por <i>Pseudomonas</i> ADP.....	10
FIGURA 4 Plasmídio pADP com localização dos genes de degradação da atrazina.....	10
FIGURA 5 Etapas da hibridização fluorescente “in situ”.....	13
FIGURA 6 Pontos de coleta de amostras de solo sem atrazina no município de Cascavel – PR.....	17
FIGURA 7 Pontos de coleta de amostras de solo contaminado com atrazina no município de Assis Chateaubriand – PR.....	18
FIGURA 8 Procedimento de extração de bactérias em amostras de solo.....	19
FIGURA 9 Fotografia de teste com células extraídas de amostras de lodo proveniente de Reator em Bateladas Seqüenciais.....	22
FIGURA 10 Fotografia de células extraídas de amostras de solo exposto ao herbicida atrazina.....	34

1 INTRODUÇÃO

Os microrganismos presentes no solo desempenham papel-chave na ciclagem de nutrientes e na manutenção de sua fertilidade e por serem potencialmente os marcadores biológicos mais sensíveis e disponíveis, podem ser muito úteis na classificação de ecossistemas perturbados. Sabendo-se que os microrganismos são parte integrante da qualidade do solo, um melhor entendimento da dinâmica das comunidades microbianas se faz necessário. Com base em vários estudos, as comunidades microbianas do solo são diversas e parecem responder à ação antropogênica, tais como a introdução de fertilizantes, poluentes, entre outros.

A atrazina é um herbicida aromático clorado, da classe dos triazínicos, amplamente utilizado na produção agrícola para controlar plantas daninhas em culturas como, por exemplo, milho, sorgo, cana de açúcar e abacaxi. Foi classificada como um herbicida moderadamente persistente no ambiente, com hidrossolubilidade de 33 mg.L^{-1} a 27°C e meia-vida no solo variando de 4 a 57 semanas.

As bactérias degradadoras de atrazina geralmente iniciam a degradação através de uma decoloração hidrolítica, catalisada pela enzima atrazina clorohidrolase (AtzA), codificada pelo gene *atzA*, seguido por duas reações de deaminação catalisadas pela hidroxiatrazina etilaminohidrolase (AtzB) e pela N-isopropilamida isopropilaminohidrolase (AtzC), codificadas pelos genes *atzB* (*trzB*) e *atzC* (*trzC*), respectivamente, que convertem a atrazina sequencialmente a ácido cianúrico, que em seguida é completamente mineralizado a CO_2 e NH_3 por outras três hidrolases. Em algumas bactérias a biodegradação da atrazina inicia-se através de uma N-dealquilação das cadeias laterais etil e isopropil levando à formação de dietilatrazina e deisopropilatrazina.

A pesquisa de microrganismos degradadores de atrazina tem sido direcionada ao isolamento e caracterização de linhagens de ocorrência natural em ambientes contaminados com esse pesticida. Algumas linhagens capazes de degradar a atrazina foram identificadas e entre elas estão *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., *Ralstonia* sp., *Clavibacter* sp., *Pseudomonas putida*, *Agrobacterium* sp., *Acinetobacter* genus, *Streptomyces* sp. e *Arthobacter* sp. Entre as espécies degradadoras de atrazina, *Pseudomonas* sp. ADP é a melhor caracterizada, sendo capaz de utilizar a atrazina como única fonte de nitrogênio e de mineralizar completamente o anel triazínico.

O estudo de comunidades microbianas, no entanto, tem sido limitado por métodos culturais, o que pode subestimar grandemente a diversidade. Isso se deve ao fato de que somente uma pequena fração das comunidades microbianas naturais (0,1 – 10%) são cultivadas com sucesso. O advento das tecnologias de análise de ácidos nucléicos permite que as comunidades microbianas possam ser quantificadas e classificadas sem as limitações de cultivo. Grupos completos de microrganismos não cultiváveis e não

caracterizados, conhecidos somente a partir de suas seqüências de ácidos nucléicos, tem emergido como membros significantes em muitos ambientes.

A técnica de hibridização fluorescente “in situ” (FISH) se baseia na ligação específica de uma sonda corada de oligonucleotídeos complementar a uma seqüência de rRNA conhecida de um organismo de interesse, permitindo que as células sejam visualizadas através de microscopia de fluorescência. Outra grande vantagem dessa técnica é que a quantificação é feita diretamente após a separação adequada das células das amostras, sem a necessidade das etapas anteriores de cultivo, isolamento do DNA e amplificação por PCR.

A técnica FISH e outras ferramentas de ecologia molecular estão sendo utilizadas para investigar a estrutura das comunidades e diversidade de solos, aquíferos e outros “habitats” naturais. Essas técnicas permitem não somente a identificação filogenética de microrganismos, como também uma identificação de genes envolvidos na degradação de diversos compostos.

O presente trabalho teve como objetivo utilizar a técnica FISH para comparar a estrutura da comunidade bacteriana presente em solo com e sem prévia exposição à atrazina, utilizando-se sondas filogenéticas, bem como avaliar, na comunidade bacteriana, a presença do gene *atzB* envolvido na produção de uma das enzimas envolvidas na degradação de compostos triazínicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Comparar o efeito da ausência e presença de atrazina na estrutura e função degradadora da comunidade bacteriana do solo através da técnica de hibridização fluorescente "in situ" (FISH).

2.2 Específicos

- Caracterizar a estrutura da comunidade das amostras de solo, através de sondas filogenéticas de diferentes grupos bacterianos.
- Detectar a presença do gene *atzB* através da sonda AtzB1.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Os herbicidas s-triazínicos e a atrazina

Os herbicidas s-triazínicos tais como atrazina, simazina, propazina e cianazina contêm na sua estrutura química um anel aromático hexamérico e simétrico constituído por três átomos de carbono e três nitrogénios em posições alternadas (Figura 1). Atuam sobre as espécies vegetais suscetíveis competindo com a plastoquinona pelo local de ligação QB no fotosistema II, inibindo o transporte de elétrons na fotossíntese.

A atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina) de fórmula química igual a $C_8H_{14}ClN_5$, é um poluente de importância ambiental devido a sua baixa biodegradabilidade e seu alto potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas (CHAN ; CHU, 2005).

Khouri (2007) destaca em seu trabalho que o mecanismo primário de dissipação de atrazina se dá pela degradação biológica. A atrazina, devido ao uso intenso, baixas reatividade e solubilidade, é comumente detectada no monitoramento de solos e águas subterrâneas. Seus resíduos e metabólitos podem ser encontrados nesses locais após um longo tempo de aplicação, pois seu tempo de vida médio varia de 20 a mais de 100 dias e seus resíduos também são encontrados em frutas e vegetais.



Figura 1 Estrutura química da atrazina e simazina.

Embora seja uma substância regulada ou banida em vários países, concentrações de 100 ng L^{-1} a $1 \mu\text{g L}^{-1}$ tem sido verificadas em águas superficiais (PARRA et al., 2004). De acordo com a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. EPA, 2002), a atrazina pertence ao grupo C - possível carcinógeno humano, sendo seu limite na água de consumo $3 \mu\text{g L}^{-1}$. No Brasil o Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA 357/2005 estabelece o padrão de $2 \mu\text{g L}^{-1}$ de atrazina como valor máximo permitido nos corpos d'água. De acordo com Grenni et al., (2009), aquíferos monitorados na Itália e na Espanha estão contaminados por simazina, terbutilazina e metabólitos com concentrações superiores

a $0,1\mu\text{g L}^{-1}$, valor máximo estipulado pela EG Drinking-Water Legislation (EG 98/83EEG).

Uma vez no meio ambiente, a atrazina pode alterar a estrutura e função das comunidades. Testes de toxicidade realizados com cinco espécies de microalgas de diferentes famílias taxonômicas revelaram diferentes graus de sensibilidade à exposição à atrazina. Em ordem crescente de sensibilidade, foram registradas: *Isochrysis galbana*, *Dunaliella tertiolecta*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Synechococcus* sp. (WEINER et al., 2004). Ao comparar a toxicidade aguda de 40 herbicidas de nove diferentes modos de ação sobre a alga verde *Raphidocelis subcapitata*, Ma et al., (2006) verificaram que a fotossíntese foi o processo mais sensível e a atrazina esteve entre os mais tóxicos herbicidas testados.

No trabalho de Rowe et al., (2006) os autores destacam que ao expor ratos Balb/c à atrazina no período pré-natal/lactacional teve como consequência uma alteração na função imune dos adultos. Os autores deixam claro que tal alteração pode potencializar doenças clínicas, tais como auto-ímmunes e de hipersensibilidade, sendo necessários maiores esclarecimentos sobre esse herbicida.

De acordo com Ross et al., (2009) a atrazina causa diversos efeitos biológicos em vários tecidos de roedores, podendo assim causar diversas anormalidades reprodutivas, perturbação da homeostase dos hormônios feminino e masculino e afetar o sistema nervoso.

Os compostos triazínicos, bem como seus metabólitos, principalmente 2-hidroxiatrazina, diaminoclorotriazina, dietilatrazina e deisopropilatrazina foram capazes de induzir tumores nas glândulas mamárias em ratos fêmeas Sprague-Dawley (SD) (STEVENS et al., 1994), além de sérias alterações no desenvolvimento sexual de sapos machos e em alguns aspectos da resposta imune (MURPHY et al., 2006).

Hayes et al., (2010) relatam que a atrazina é um potente disruptor endócrino, mesmo em baixas concentrações. Este trabalho demonstra as consequências reprodutivas da exposição de anfíbios adultos à atrazina. Os machos expostos sofreram depressão de testosterona, diminuição do tamanho das glândulas reprodutoras, demasculinização, supressão do comportamento de acasalamento, redução da espermatogênese e diminuição da fertilidade.

De acordo com Lim et al., (2009) os poluentes orgânicos persistentes (POPs) que contaminam o solo e a água, podem se acumular nos tecidos dos animais e serem transmitidos através da cadeia alimentar, levando à exposição humana. Alguns POPs têm sido recentemente associados com a prevalência do diabetes, e segundo o autor, a exposição crônica a baixas concentrações de atrazina pode causar obesidade ou resistência à insulina, prejudicando a função mitocondrial. Em seus estudos foi verificado que a atrazina bloqueou a atividade dos complexos da fosforilação oxidativa I e III, resultando em diminuição do consumo de oxigênio.

3.2 Diversidade bacteriana no solo

Os microrganismos são os principais agentes dos processos bioquímicos que ocorrem no solo, como a decomposição da matéria orgânica e liberação de nutrientes, a formação e estabilização de agregados, a ciclagem de nutrientes, transformações de elementos metálicos, produção de metabólitos, degradação de pesticidas e herbicidas e alterações nas características físicas do solo (EMBRAPA, 2002).

Várias técnicas são propostas para estudos da ecologia microbiana do solo, pois a diversidade biológica é utilizada como índice que reflete a qualidade do ecossistema. Técnicas que permitem o estudo da diversidade microbiana também podem indicar diferenças entre solos tanto com respeito às populações quanto a suas funções. As limitações das técnicas tradicionais diante do avanço das técnicas moleculares fazem com que estas últimas sejam muito utilizadas nos estudos de diversidade microbiana.

Os estudos filogenéticos fazem a relação evolutiva entre os organismos, assim, análises comparativas de rRNA (16S ou 18S rRNA) e seqüências de outros genes mostram que a vida está dividida em três principais domínios: Bacteria, Eucarya e Archaea. As bactérias com divisões definidas de rRNA são identificadas por Filos (Proteobacteria e Actinobacteria), ordens, famílias, nomes genéricos ou nomes comuns (bactérias gram-positivas). Os doze principais grupos de Bacteria foram determinados pelo sequenciamento de ácido ribonucléico ribossomal (Figura 2). A posição relativa das ramificações nessa árvore difere levemente (por razões estatísticas) das ramificações na árvore universal, mas o comprimento das ramificações são proporcionais à distância evolucionária calculada entre cada dois grupos.

As divisões Bacteria gram-positiva, Cianobactéria e Bactéria púrpura (também denominada Proteobacteria) são grupos grandes contendo muitos gêneros e espécies e são grupos dos quais muitas informações fenotípicas já eram conhecidas antes que seu “status” evolucionário fosse estudado (HUGENHOLTZ et al., 1998).

A divisão Bacteria gram-positiva é separada em dois grandes grupos, filogeneticamente distintos, cujos organismos podem ser, de maneira geral, discriminados de acordo com o teor de guanina e citosina (G+C) no DNA. O grupo dos organismos com baixo teor de G+C (Firmicutes) é bastante heterogêneo e congrega os organismos do gênero *Clostridium*, as bactérias formadoras de ácido láctico (*Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp.) e vários cocos (*Ruminococcus* spp., *Peptococcus* spp., *Peptostreptococcus* spp., *Sarcina* spp. e *Staphylococcus* spp.). O metabolismo inclui homo e hetero-fermentação e respiração, sendo alguns organismos micro-aerófilos, anaeróbios facultativos ou anaeróbios estritos. Os gram-positivos formadores de esporos podem ser exemplificados pelos gêneros *Bacillus*, *Clostridium* e *Sporosarcina*.

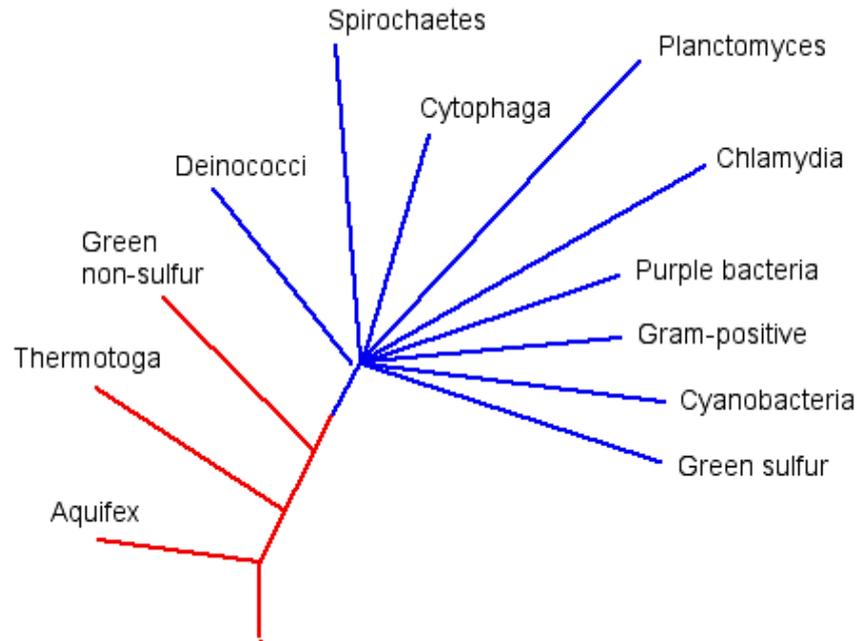


Figura 2 Árvore filogenética detalhada das principais linhagens (reinos) de Bacteria baseada na comparação de seqüência de 16S rRNA.

O filo de Bacteria gram-positiva com alto teor de G+C ou Actinobacteria compreende os organismos com alto teor de G+C da família *Actinomycetales* e gêneros relacionados. Exemplos comuns são os organismos dos gêneros *Arthrobacter*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Streptomyces* e *Mycobacterium*. Os actinomicetos incluem ainda os organismos microaerófilos/anaeróbios obrigatórios e formadores de ácido propiônico, alocados nos gêneros *Actinomyces*, *Bifidobacterium* e *Butyrivibrio*.

O filo Proteobacteria (Bactérias púrpuras) constitui o maior e mais diverso grupo de bactérias cultivadas, alocadas em 5 classes: alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ) e epsilon (ϵ). Os organismos alocados nesses grupos apresentam coloração gram-negativa e uma enorme diversidade de morfologia e metabolismo, mesmo dentro de uma mesma relação filogenética. A classe alfa compreende a maioria das bactérias púrpura não-sulfurosas e organismos não-fotossintéticos com metabolismo diverso. As ramificações dentro da subdivisão alfa são geralmente correlacionadas com propriedades fenotípicas, destacando-se os grupos das nitrificantes (*Nitrobacter* spp.) e denitrificantes (*Rhodopseudomonas* spp.), organismos com capacidade de fixação de nitrogênio (gêneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium* e outros), parasitas intracelulares de células eucarióticas (gêneros *Bartonella* e *Rochalimaea*). Organismos como *Caulobacter* e *Prosthecomicrobium*, também são alocados nesta subdivisão. No grupo beta estão alocadas as espécies de *Rhodocyclus*, *Spirillum*, *Thiobacillus* e *Zymomonas*, entre outros 12 gêneros definidos; o grupo gama compreende os gêneros *Chromatium*, *Escherichia* e outras bactérias entéricas, além de *Legionella*, *Vibrio*

e outros 9 gêneros. O grupo delta reúne os gêneros *Bdellovibrio*, *Myxococcus* e bactérias redutoras do íon sulfato e no grupo epsilon estão alocados os gêneros *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Thiovulum* e *Wolinella* (HUGENHOLTZ et al., 1998).

Além do conteúdo de informação filogenética, as regiões conservadas de estrutura primária de rRNAs fornecem locais-alvo para as sondas de hibridização específicas que são ferramentas poderosas para a identificação de microrganismos com base em suas relações filogenéticas (LUDWING ; SCHLEIFER, 2002).

Alguns dos grupos filogenéticos de distribuição cosmopolita são bem conhecidos a partir de estudos de isolamento e cultivo, ao passo que outros são ainda pouco conhecidos/estudados ou não foram ainda detectados através de cultivo. Os representantes de Proteobacteria, *Cytophagales* (grupo dos *Bacteroides/Cytophaga/Flexibacter*) e as duas divisões de organismos gram-positivos (Actinobacteria e Gram-positivos de baixo conteúdo de G+C ou Firmicutes), de distribuição cosmopolita, são exemplos de organismos bem conhecidos através de representantes cultivados. Em contraste, organismos das divisões Acidobacterium, Bactérias verdes não-sulfurosas e Verrucomicrobia, que também apresentam distribuição cosmopolita, evidenciada por estudos de seqüências de rRNA 16S clonadas do meio ambiente, são pouco representados por organismos cultivados e, conseqüentemente, pouco se sabe sobre a sua biologia e propriedades em geral .

Norris et al., (2002) ao estudarem a diversidade microbiana em um parque que sofreu um aumento brusco na temperatura do solo devido a uma atividade geotérmica, constataram através de análise filogenética de uma biblioteca de 16S rDNA bacteriano por PCR (Polymerase chain reaction) que a maioria microrganismos pertenciam às divisões Acidobacterium (51%) e *Planctomyces* (18%).

Sudini et al., (2011) em um trabalho que objetivou identificar as mudanças nas comunidades microbianas, em resposta a seqüências de culturas que podem desempenhar um papel na gestão de fitopatógenos presentes no solo cultivado com amendoim, verificaram que as divisões bacterianas Proteobacteria, Acidobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Actinomicetos foram os filos bacterianos predominantes encontrados em todas as seqüências de cultivo de amendoim. A taxa de Proteobacteria nesses solos foram negativamente correlacionados com a abundância de membros da divisão Firmicutes, mas por outro lado havia uma correlação positiva significativa com a taxa de *Gemmatimonadetes*. A prevalência da divisão Actinomicetos foi negativamente correlacionada com a abundância relativa de membros da divisão Verrucomicrobia, indicando interações complexas entre bactérias do solo que são importantes contribuintes para a saúde da cultura.

Chauham et al., (2011) ao avaliarem as bactérias da rizosfera do milho (*Zea mays L.*) com a utilização do método independente de cultura, baseada na amplificação direta e análise de 16S rRNA, constataram a presença de Proteobacteria (48%), Actinobacteria

(10,30%), Bacteroidetes (9,90%), Verrucomicrobia (6,60%), Acidobacteria (4,80%), Firmicutes (1,80%) Chloroflexi, TM7 (1,50%), Deinococcus-Thermus (1,10%), Planctomycetes (0,70%), Gemmatimonadetes (0,70%) e Cyanobacteria (0,40%).

3.3 Degradação da atrazina por bactérias

Embora os substituintes halogênio, metiltioéter e N-alkil no anel s-triazínico da classe de herbicidas s-triazínicos dificultem a biodegradação desses (WACKETT et al., 2002), vários trabalhos tem demonstrado a habilidade de alguns microrganismos do solo de degradá-los parcial ou totalmente a CO₂ e NH₃ (MANDELBAUN et al., 1995; ROSSEAUX et al., 2003; SINGH et al., 2004a).

A pesquisa de microrganismos degradadores de atrazina tem sido direcionada ao isolamento e caracterização de linhagens de ocorrência natural em ambientes contaminados com esse pesticida. Entre as bactérias, trabalhos relatam a degradação de atrazina por linhagens individuais tais como *Pseudomonas* sp. (MANDELBAUM et al., 1995; KATZ et al., 2001), *Rodococcus wratislaviensis* (GRENNI et al., 2009), *Acinetobacter* sp. (SINGH et al., 2004a), *Aerobacterium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus* sp., *Micrococcus* sp., *Deinococcus* sp. e *Deljia acidovorans* (VARGHA et al., 2005), bem como por consórcio de espécies como *Agrobacterium tumefaciens*, *Caulobacter crescentus*, *Pseudomonas putida*, *Sphingomonas yanikuyae*, *Nocardia* sp., *Rhizobium* sp., *Flavobacterium oryzihabitans* e *Variovorax paradoxus* (SMITH, et al., 2005).

As bactérias degradadoras de atrazina geralmente iniciam a degradação através de uma decloração hidrolítica, catalisada pela enzima atrazina clorohidrolase (AtzA), codificada pelo gene *atzA*, seguido por duas reações de deaminação catalisadas pela hidroxiatrazina etilaminohidrolase (AtzB) e N-isopropilamela isopropilaminohidrolase (AtzC), codificadas pelos genes *atzB* (*trzB*) e *atzC* (*trzC*), respectivamente (SOUZA, et. al., 1996; SOUZA, et. al., 1998; SADOWSKY, et al., 1998) que convertem a atrazina sequencialmente a ácido cianúrico, que em seguida é completamente mineralizado a CO₂ e NH₃ por outras três hidrolases (Figura 3).

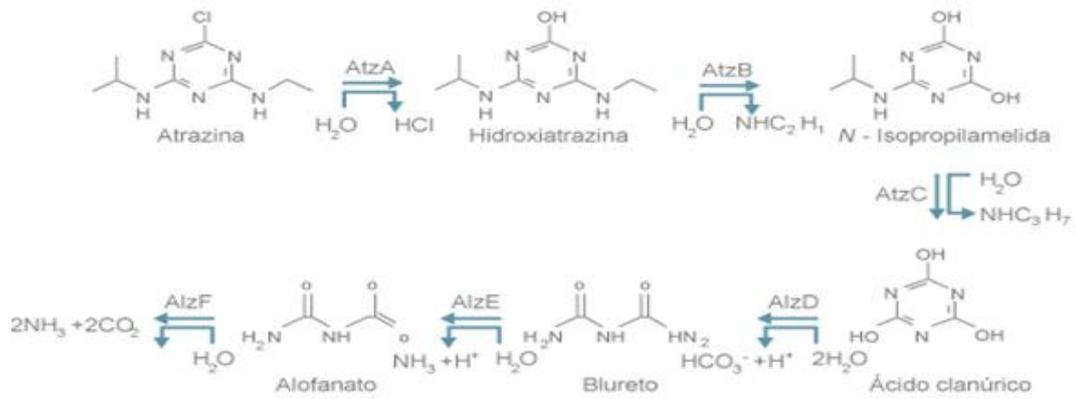


Figura 3 Degradação da molécula de atrazina por *Pseudomonas* ADP (MARTINEZ et al., 2001).

Em algumas bactérias a biodegradação da atrazina inicia-se através de uma N-dealquilação das cadeias laterais etil e isopropil levando à formação de dietilatrizona e deisopropilatrizona (KAUFMAN ; BLAKE, 1970).

Dentre as linhagens capazes de degradar a atrazina, *Pseudomonas* sp. ADP é a melhor caracterizada. A via de catabolismo da atrazina nesta bactéria contém seis passos enzimáticos codificados pelos genes *atzABC* e *atzDEF*. Os genes *atzABC* estão localizados em plasmídios e aparecem em vários isolados desta bactéria (de SOUZA et al., 1998; ROUSSEAU et al., 2001; WACKETT et al., 2002; LIU; PARALEL., 2009). Em *Pseudomonas* sp. ADP, os genes *atzABCDE* estão localizados no plasmídeo pADP-1 (Figura 4) (MARTINEZ et al., 2001).

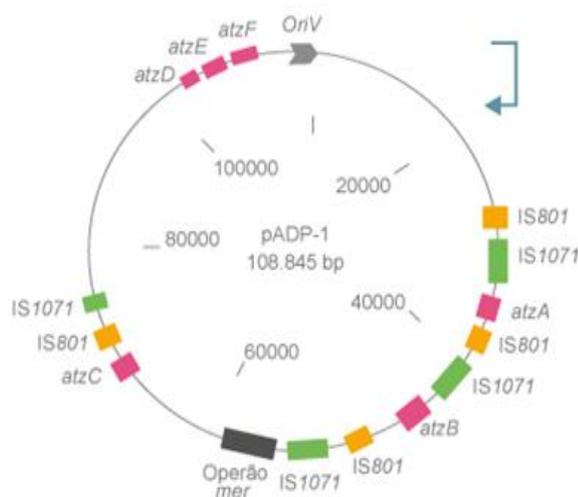


Figura 4 Plasmídeo pADP com localização dos genes de degradação da atrazina. Fonte: Martinez et al., (2001).

A habilidade de degradar a atrazina através dos produtos dos genes *atzABCDEF* não é uma exclusividade do gênero *Pseudomonas*. Recentemente, uma linhagem CDB21 foi identificada como uma nova β -proteobactéria exibindo 100% de identidade com a seqüência da bactéria HOCLCi25 (GenBank número de acesso AY328574). CDB21 também possui o “set” completo de genes da degradação de atrazina presente em *Pseudomonas* (IWASAKI et al., 2007). As seqüências de ácido nucléicos dos genes *atzABCDEF* de CDB21 foram 100% idênticas àquelas de *Pseudomonas* sp. ADP, o que sugere uma dispersão dos genes *atz* no meio ambiente. De fato, estudos revelaram que os genes *atzABC* estão espalhados, tendo sido detectados no Canadá, Estados Unidos da América, França, Croácia e China, além de serem altamente conservados (similaridade >97%) indicando sua recente dispersão dentro da microbiota do solo (de SOUZA, 1998; ROSSEAU et al., 2001; DEVERS et al., 2004).

De acordo com Ostrofsky et al. (2002), o gene *trzD*, presente na bactéria *Pseudomonas* NRRLB-12228, está envolvido na clivagem do anel s-triazínico, não sendo dominante entre a população degradadora de atrazina no solo. A bactéria *Chelatobacter heintzii* Cntl, que demonstrou capacidade de mineralizar até 80% de atrazina em 14 dias, possui os genes degradadores de atrazina *atzABC* e *trzD* (ROUSSEAU et al., 2003).

Segundo Piutti et al., (2003), *Nocardioides* sp. SP12 utiliza uma via de degradação diferente combinando o gene *trzN*, que codifica uma clorohidrolase, com *atzB* e *atzC*, levando a um produto com as mesmas características que o ácido cianúrico. *Arthrobacter* sp. isolada da rizosfera de uma planta resistente à atrazina por Vaishampayan et al. (2007), utiliza atrazina como única fonte de nitrogênio e carrega os genes *atzBCD* e *trzN* no DNA cromossomal com alta similaridade na seqüência com *trzN* de *Nocardioides* sp. C190.

Pseudomonas sp. ADP, isolada de solo contaminado com atrazina, mostrou-se capaz de mineralizar totalmente o anel triazínico (MANDELBAUM et al., 1995). Singh et al., (2004a) isolaram uma bactéria do gênero *Acinetobacter* capaz de degradar a atrazina como fonte de carbono numa concentração de 250 ppm. Em colunas com carvão ativado granular inoculados com *R. rhodochrous*, verificou-se uma degradação de 72,6% após 39 dias (JONES et al., 1998). A espécie *D. acidovorans* D24 mineralizou a atrazina como única fonte de carbono e nitrogênio (VARGHA et al., 2005).

De acordo com García González et al., 2003 a suplementação com nitrogênio diminuiu as taxas de degradação de atrazina em *Pseudomonas* sp. ADP, pois, como a maioria das bactérias degradadoras de atrazina, a utilizam como fonte de nitrogênio e a presença de uma fonte de nitrogênio preferencial no ambiente prejudica sua degradação.

De acordo com Rhine et al., (2003), a exposição repetida à atrazina pode aumentar sua biodegradação, principalmente como resultado de uma baixa disponibilidade de nitrogênio. Fang et al., (2001) verificaram que o número de bactérias degradadoras de atrazina não foi alterado com a exposição à atrazina, mas houve significativa redução do

período de aclimação que precedeu a mineralização. Silva et al., (2004) verificaram uma rápida mineralização após um período de aclimação de aproximadamente 28 dias.

Um aumento da degradação de compostos persistentes tem sido verificado no solo da rizosfera como resultado do co-metabolismo de substâncias orgânicas originadas dos exudatos das raízes, levando a um aumento global da atividade microbiana (FANG et al., 2001). A atrazina foi degradada mais rapidamente em solo contaminado plantado com *Pennisetum* (*Pennisetum clandestinum*), um tipo de gramínea, comparado ao solo não plantado, correspondendo a aproximadamente 45% e 22% respectivamente, dentro de 80 dias (SINGH et al., 2004b).

3.4 Hibridização fluorescente “in situ”

A hibridização fluorescente “in situ” (FISH) foi aplicada pela primeira vez por De Long et al., (1989). É uma técnica que permite a visualização de seqüências de ácidos nucleicos no interior das células sem alterar a morfologia ou integridade da sua estrutura celular, e tem sido modificada para permitir estudos de evolução cromossomal e citogenética de ampla variedade de espécies microbianas.

De acordo com Lew et al., (2010) esta técnica vem sendo aplicada com sucesso em microrganismos de diferentes ambientes, possibilitando demonstrar a estrutura das comunidades microbianas, assim como sua dinâmica no ambiente natural, facilitando o acompanhamento dos ecossistemas afetados por substâncias tóxicas e realizando análises sutis das propriedades fisiológicas das comunidades bacterianas.

A técnica FISH é baseada na hibridização com sondas fluorescentes que se ligam especificamente a sua seqüência-alvo complementar no interior da célula íntegra. A molécula-alvo mais comumente usada para FISH é o 16S rRNA devido a sua estabilidade genética e sua estrutura de domínio com regiões conservadas e variáveis, havendo várias razões para sua utilização: i) está presente no mecanismo de síntese protéica e tem a mesma função em todos os organismos; ii) toda sua estrutura é conservada, sendo a taxa de mutação durante a evolução baixa comparada com outros genes, dessa forma fornecendo informações filogenéticas seguras; iii) os rRNAs e seus genes são facilmente acessíveis; iv) as moléculas 16S rRNA e 23S rRNA contêm informações suficientes para comparações significativas e satisfatórias; v) parece não haver transferência de genes de rRNA entre organismos e relações entre rRNA refletem relações de evolução (AMANN et al., 1995).

A técnica FISH inclui os seguintes passos (Figura 5): i) fixação; ii) preparação da amostra, incluindo passos de pré-tratamento, caso necessário; iii) hibridização com as respectivas sondas para detecção das seqüências-alvo; iv) lavagem para remoção de

sondas não-ligadas e excesso de sais; v) montagem, visualização e documentação dos resultados. A etapa de fixação é importante para inativar a atividade celular e permeabilizar a parede celular do microrganismo para que a sonda fluorescente possa entrar na célula.

O pré-tratamento é em alguns casos necessário para certas bactérias gram-positivas e células em estágio dormente, que podem apresentar problemas de permeabilidade à sonda (AMANN et al., 1995), já que a etapa de hibridização diz respeito à ligação específica da sonda à seqüência alvo do rRNA. A temperatura exigida para cada sonda corresponde àquela de dissociação da molécula de rRNA, que é necessária para que o oligonucleotídeo fluorescente se ligue às bases complementares da cadeia simples de rRNA; por esta razão se deve ter cuidado com temperaturas que excedam as necessárias, pois a molécula de rRNA pode desnaturar-se nessas condições.

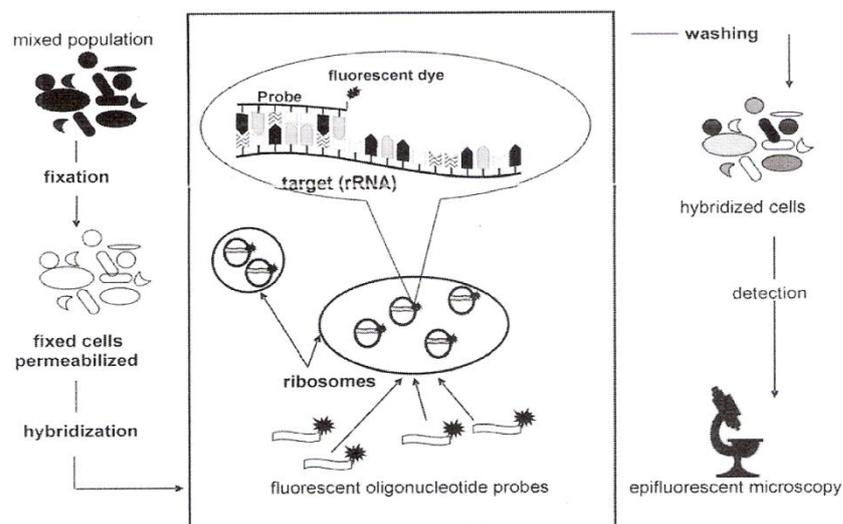


Fig. 2. Fluorescent *in situ* hybridization.

Figura 5 Etapas da hibridização fluorescente “in situ”: fixação, hibridização, lavagem e detecção.

Fonte: Lew et al., (2010).

Segundo Pernthaler et al., (2002) as sondas fluorescentes abreviam passos adicionais de detecção e podem ser marcadas com corantes de diferentes emissões de comprimento de onda, assim melhorando a detecção de várias seqüências alvo dentro de um único passo de hibridização. Neste tipo de marcação uma ou mais moléculas de corantes fluorescentes são direta ou quimicamente ligadas aos oligonucleotídeos na extremidade 5' da sonda durante a síntese.

Stoecker et al., (2010) demonstraram que a substituição de sondas de oligonucleotídeos marcados individualmente na região 5' por sondas duplamente marcadas nas regiões 3' e 5' dobra a intensidade do sinal sem causar problemas de especificidade.

Além disso, sondas Cy3 duplamente marcadas aumentam fortemente a acessibilidade dos locais de destino ao rRNA e, assim, oferecem maior flexibilidade para o projeto da sonda.

Existem alguns parâmetros que podem afetar a hibridização fluorescente “in situ”, pois esta ocorre quando existe o emparelhamento entre a seqüência de oligonucleotídeos da sonda e o rRNA alvo. Este emparelhamento ocorre em condições que permitem a formação de pontes de hidrogênio entre nucleotídeos complementares, com a formação de duas pontes de hidrogênio (entre adenina e timina) ou três pontes de hidrogênio (entre guanina e citosina). Estas pontes de hidrogênio formadas são relativamente fracas, podendo sofrer dissociação sob certas condições, influenciada pelo ambiente químico e físico. O termo *estringência* é usado para definir as condições químicas e físicas que determinam o grau de ligações formadas (NAKATSU et al., 1996). Segundo Perntaler et al., (2002) o método para controlar a *estringência* consiste em manter a temperatura de hibridização constante e incluir uma concentração adequada de formamida que auxilia no aumento da acessibilidade da sonda, pois enfraquece o efeito das pontes de hidrogênio entre os nucleotídeos.

Para Amann, et al., (1995) a temperatura de hibridização depende da temperatura de dissociação (*T_d*) do oligonucleotídeo e deve ser otimizada empiricamente, pois altas temperaturas danificam as células fixadas. A temperatura de dissociação é a temperatura onde 50% das ligações sonda-alvo permanecem intactas durante um período específico de lavagem. Outro fator importante é o tempo de hibridização, pois influencia na formação de híbridos sonda-alvo. Se a sonda for de cadeia única, o tempo de hibridização diminui com o aumento da concentração da mesma e aumenta com o comprimento da sonda, o que ocorre porque a taxa de difusão através do alvo é reduzida com o aumento do comprimento da sonda. Isso pode ser resolvido com a utilização de sondas mais curtas, as quais têm acesso mais fácil ao seu alvo, mas por outro lado podem conduzir a poucas marcações.

Embora a técnica de FISH traga muitas vantagens, as análises de imagem ainda permanecem um grande desafio, pois a intensidade do sinal é variável, mesmo numa mesma amostra (ZHANG et al., 2010).

A técnica tem várias aplicações, incluindo as áreas da saúde, ambiente, alimentos, estudos cromossômicos, entre outras. Para Amann, et al., (1995) a técnica de FISH é uma poderosa ferramenta para o estudo filogenético, ecológico, diagnóstico e ambiental na Microbiologia. FISH pode ser utilizada não só para avaliar o impacto de herbicidas como também de fármacos no meio ambiente. Barra Caracciolo et al., (2010b) aplicaram FISH em amostras de solo e água subterrânea contaminada com herbicidas s-triazínicos (simazina e terbutilazina) e água de superfície tratadas com o fármaco carboxilato de oseltamivir (Tamiflu).

Barra Caracciolo et al., (2005) estudaram a variação da estrutura da comunidade

bacteriana por meio da técnica FISH durante a biodegradação do herbicida simazina na presença e ausência de uréia. A subdivisão α -proteobactéria foi o grupo mais afetado pelos tratamentos, tendo aumentado em número na ausência de uréia e diminuído no tratamento que continha uréia como fonte adicional de nitrogênio, no período de 0 a 21 dias. Neste segundo caso, observou-se também que a uréia estimulou populações bacterianas específicas não envolvidas com a degradação do herbicida.

Oliveira et al., (2006) utilizaram a técnica de FISH para caracterização de bactérias nitrificantes presentes em biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*, sendo verificado a predominância dos grupos β e γ -proteobactéria relacionada com a variação de amônia e do grupo α -proteobactéria relacionada com a variação de nitrito.

Recentemente a técnica FISH foi utilizada para a detecção de bactérias degradadoras de simazina no solo, por meio de uma sonda AtzB1 desenhada com base na seqüência do gene *atzB* envolvido na deaminação hidrolítica das s-triazinas (MARTÍN et al., 2008). Uma maior porcentagem de células-alvo para AtzB1 foi verificada no solo que apresentou maior taxa de mineralização de simazina, mostrando que a técnica FISH, associada à análise química, é um indicador muito útil da capacidade natural de atenuação de um solo contaminado.

Grenni et al., (2009) isolaram uma bactéria da linhagem (FPA1) capaz de utilizar terbutilazina, simazina, atrazina, 2-hidroxisimazina, dietilatraxina, isopropilamina e etilamina como única fonte de carbono. Uma sonda de oligonucleotídeos baseada na seqüência 16S rRNA foi desenhada e com a otimização do protocolo de FISH, houve a detecção de *Rhodococcus wratislaviensis*.

Vázquez-Padín et al., (2010) através da técnica de FISH, realizaram a identificação de bactérias dos gêneros *Nitrosomonas* e *Candidatus kuenenia stuttgartiensis* como os principais microrganismos que realizam a oxidação aeróbia e anaeróbia de amônia, respectivamente, em reator, permitindo estabelecer estratégias de controle simples com base em medidas de NH_4^+ e NO_2^- e atuar sobre a concentração de oxigênio dissolvido no líquido a granel e no tempo de detenção hidráulica do reator CANON (Complete Autotrophic Nitrogen-removal Over Nitrite).

Barra Caracciolo et al., (2010) utilizaram a técnica FISH para detectar comunidades presentes em aquífero, localizado na Itália, contaminado com o herbicida s-triazínico terbutilazina, tendo verificado que as comunidades de bactérias conseguiram degradar a terbutilazina, em particular, as β -proteobactérias. Com o auxílio da técnica de PCR foi detectada a presença de duas espécies de β -proteobactérias capazes de degradar o herbicida, *Advenella incenata* e *Janthinobacterium lividum* e os genes que codificam enzimas que degradam as s-triazinas, ou seja, *atzA* e *atzB* em *A. incenata* e *atzB* e *atzC* em *J. lividum*. Isto mostra que a técnica FISH associada à técnica de PCR permite a

identificação de microrganismos com potencial atenuador natural também no tratamento de aquíferos poluídos.

Pereira et al., (2011) avaliaram tanto a dinâmica sazonal das comunidades bacterianas em geral como a qualidade microbiológica da água e bactérias causadoras de doenças em um sistema de aquicultura marinha da Ria de Aveiro (Portugal). A análise da diversidade bacteriana das amostras de água por eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) de fragmentos do gene 16S rRNA indicou que a estrutura da comunidade bacteriana variou sazonalmente, mostrando uma maior complexidade durante a estação quente. A técnica FISH mostrou os grupos específicos de bactérias que variaram durante o período do estudo e que os não-indígenas da família *Enterobacteriaceae* foi o grupo mais abundante, seguido de *Vibrio* e *Aeromonas*.

Liang et al., (2011) utilizaram a técnica FISH para conseguir uma mistura apropriada de íons de amônio e nitrito para a oxidação anaeróbia de amônio (anammox). Os resultados indicaram que a abundância de evolução de bactérias oxidantes de amônia (AOB) e de bactérias nitrito-oxidantes (NOB) coincidiram com o desempenho da nitrificação parcial. Além disso, as AOB foram altamente associadas com *Nitrosomonas* spp. e *Nitrospira* spp. que foram dominantes (64,1%) no biofilme com uma estrutura compacta, durante o período de nitrificação parcial estável de 50%.

No Brasil pouco se sabe ainda sobre a variação da estrutura da comunidade microbiana do solo em função da ausência e presença dos herbicidas s-triazínicos que são amplamente utilizados, principalmente no Estado do Paraná.

O presente trabalho permitirá o conhecimento das variações da estrutura e função das comunidades bacterianas causadas pela presença de atrazina. Por meio de sondas específicas para os genes envolvidos no catabolismo dos compostos s-triazínicos, será possível acompanhar o potencial de biodegradação deste herbicida no solo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta das amostras

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Enzimologia e Tecnologia das Fermentações (LAETF), Laboratório de Bioquímica, Laboratório de Foto-Microscopia e Laboratório de Saneamento Ambiental (LASAM) da UNIOESTE, campus de Cascavel.

Foram utilizados dois tipos de solo: um para controle sem exposição à atrazina e um com exposição prolongada ao herbicida (5L/hectare Atranex). O solo sem atrazina foi proveniente de uma área não cultivada (solo virgem) no município de Cascavel/PR. O solo contaminado com atrazina foi coletado em uma área de cultivo de cana-de-açúcar no

município de Assis Chateaubriand, na qual a atrazina foi utilizada como herbicida durante 6 anos.

Para a coleta de ambos os tipos de solos foram utilizados sacos de polipropileno (15 x 20 cm) estéreis e identificados. Amostras de cada uma das áreas escolhidas foram coletadas de forma aleatória, retirando-se amostras de seis pontos diferentes, identificados através de um sistema de posicionamento global - GPS (GARMIN ETREX- VISTA), a uma profundidade de 10-20 cm. Os pontos de coleta e suas coordenadas estão expostos na Tabela 1 e nas Figuras 6 e 7.

As amostras foram transportadas ao laboratório dentro de caixas de isopor e armazenadas a 4°C para serem utilizadas para a extração de bactérias dentro de no máximo 14 dias.

Tabela 1 Coordenadas dos pontos de coleta de amostras de solo

Ponto	S	WO
Solo com atrazina		
07	24 28'11.3"	53 38'54.6"
08	24 28'11.6"	53 38'54.7"
09	24 28'11.8"	53 38'54.8"
10	24 28'12.1"	53 38'54.7"
11	24 28'12.4"	53 38'54.8"
12	24 28'12.7"	53 38'54.7"
Solo sem atrazina		
07	25 07'57.1"	53 48'24.5"
08	25 07'57.2"	53 48'24.3"
09	25 07'58.2"	53 48'24.5"
10	25 07'58.3"	53 48'24.6"
11	25 07'58.1"	53 48'25.8"
12	25 07'58.0"	53 48'26.7"



Figura 6 Pontos de coleta de amostras de solo sem atrazina no município de Cascavel – PR.

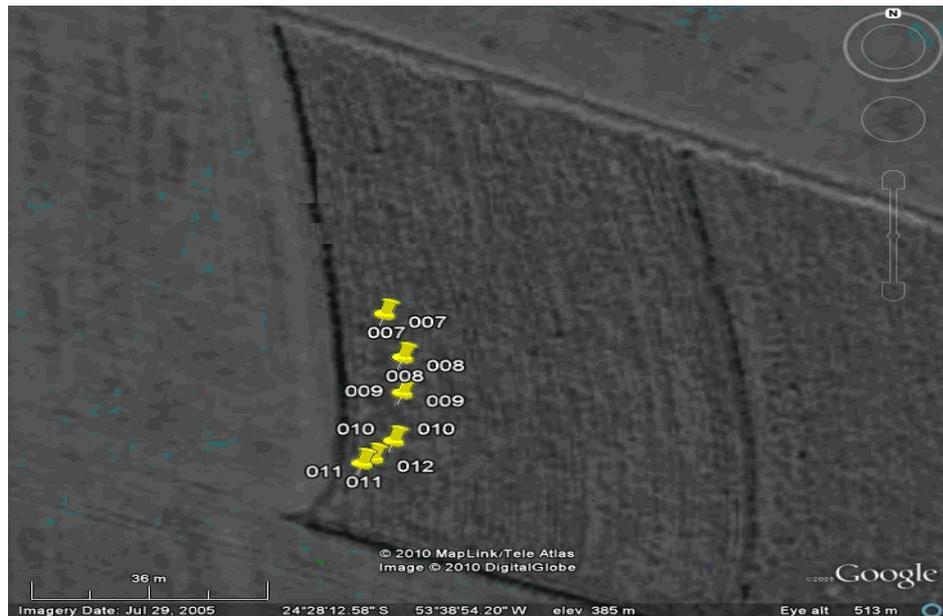


Figura 7 Pontos de coleta de amostras de solo contaminado com atrazina no município de Assis Chateaubriand – PR.

4.2 Caracterização do solo

As características físico-químicas dos solos utilizados foram analisadas pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC, localizada no município de Cascavel – PR. Para a análise dos macronutrientes potássio e fósforo e para a análise dos micronutrientes foi utilizado o método Mehlich-1; para alumínio, cálcio e magnésio foi utilizado o cloreto de potássio como extrator; para o pH o extrator utilizado foi o cloreto de cálcio, para a matéria orgânica o extrator foi o dicromato de sódio e as análises granulométricas foram realizadas utilizando o extrator hidróxido de sódio. (EMBRAPA, 2009)

Para a determinação da umidade do solo foi realizada a secagem em estufa de uma massa conhecida do material durante 24 horas a uma temperatura de 105°C.

4.3 Fixação das amostras e extração das células

A fixação e extração das células das matrizes do solo foram realizadas conforme descrito em Barra Caracciolo et al., (2005a) com modificações. Amostras de 1g de solo foram colocadas em tubos estéreis de 15 mL e fixadas com 9 mL de solução salina tamponada -- PBS (NaCl 130 mM; Na₂HPO₄.12H₂O 7 mM; NaH₂PO₄.2H₂O 3mM) contendo 0,5 % (v/v) Tween 20, 2% (v/v) formaldeído e 1 g L⁻¹ de pirofosfato de sódio, a um pH final de 7,4. Em seguida, as amostras foram armazenadas a 4 °C até a etapa posterior de extração das células das matrizes do solo.

Para a extração, as amostras fixadas foram colocadas em agitador orbital a 400 rpm

por 15 minutos para separação das bactérias aderidas a partículas. Após agitação, um volume de Optiprep (solução de iodixanol a 60% p/v em água estéril, densidade aprox. $1,3 \text{ g mL}^{-1}$, Sigma) foi adicionado por meio de uma seringa com agulha de comprimento adequado de modo que atingisse o fundo do tubo (Figura 8). O Optiprep foi utilizado em substituição ao Nycodenz utilizado no protocolo de Barra Caracciolo et al., (2005a). Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 G , a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, por 90 minutos, em centrífuga refrigerada Eppendorf 5810.

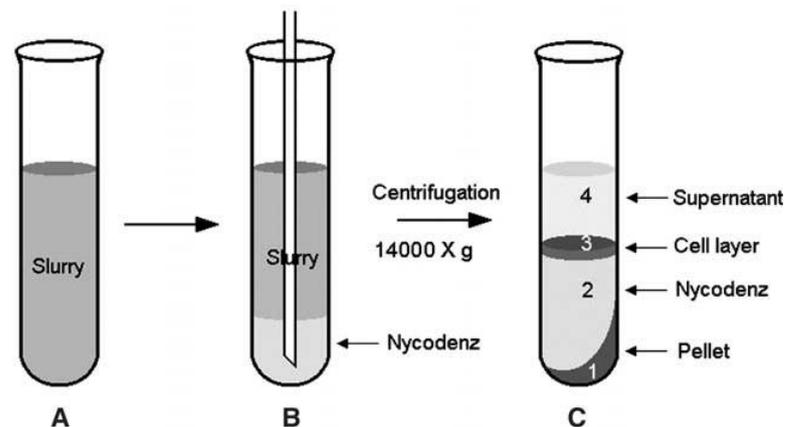


Figura 8 Procedimento de extração de bactérias em amostras de solo. (A) Amostra de solo após agitação com Tween 20 para separação de bactérias e partículas associadas; (B) Adição de Optiprep (em substituição do Nycodenz) no fundo do tubo; (C) Aparência da amostra após centrifugação. A maioria das células ficam concentradas na camada 3. Fonte: Barra Caracciolo et al., (2005a).

4.4 Preparo das membranas

Alíquotas em triplicata da camada de células separada por gradiente de densidade (situada acima da camada de Optiprep) foram coletadas e coradas com DAPI (4', 6' - diamino-2-fenilindol) como agente fluorescente, a uma concentração final de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, por 30 minutos, em ambiente escuro. Após filtração das alíquotas ($100 \mu\text{L}$) a vácuo ($< 0,02 \text{ Mpa}$) em membrana de policarbonato de poro $0,2 \mu\text{m}$, 25 mm diâmetro, cor preta (Millipore), as membranas foram secas ao ar e foram adicionadas entre lâmina e lamínula gotas de Vectashield H-1200. Em seguida, as células foram quantificadas por contagem direta em microscópio Olympus BX60, equipado com filtros de epifluorescência.

As membranas que continham número adequado de células (no mínimo 100 células por campo) foram armazenadas a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento de serem utilizadas nos trabalhos de hibridização.

4.5 Hibridização fluorescente “in situ” (FISH) e quantificação celular

Anteriormente à hibridização, cada membrana foi cortada em seções, mantendo-se sempre algumas seções reservadas para a necessidade de repetição do procedimento. As seções foram tratadas com uma solução de lisozima (Tris-HCl 0,1M, EDTA 0,05M, lisozima 12 mg mL⁻¹, pH 8,0,) a 37°C, por 60 minutos, para melhor permeabilização à sonda.

Em seguida, em ambiente escuro, 20 µL do tampão de hibridização (NaCl 0,9M, Tris-HCl 20 mM, SDS 0,01%, pH 7,4) contendo 50 ng de sonda fluorescente e quantidade adequada de formamida foram aplicados sobre cada seção da membrana filtrante, previamente acomodada sobre uma lâmina. Para promover a hibridização, a lâmina foi transferida para um tubo de polipropileno (50 mL) com tampa de rosca, revestido com papel alumínio e contendo papel filtro umedecido com tampão de hibridização no seu interior. Este tubo funcionou como uma câmara escura e úmida, evitando a secagem indevida das células e a alteração das concentrações dos componentes da solução de hibridização. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 46 °C por 90 minutos e após decorrido esse período, as membranas foram lavadas com tampão de lavagem (NaCl 0,9 M; Tris-HCl 20 mM, SDS 0,01%, pH 7,4), a 48 °C, por 15 minutos. Em seguida, as membranas foram imediatamente mergulhadas em água destilada e secas ao ar, na ausência de luz.

Na etapa de montagem das lâminas, cada lâmina foi devidamente identificada e recebeu uma seção da membrana e antes da colocação da lamínula foram adicionadas gotas de Vectashield H-1200, que tem a função de preservar a fluorescência por mais tempo, evitando a rápida fotodegradação dos fluorocromos.

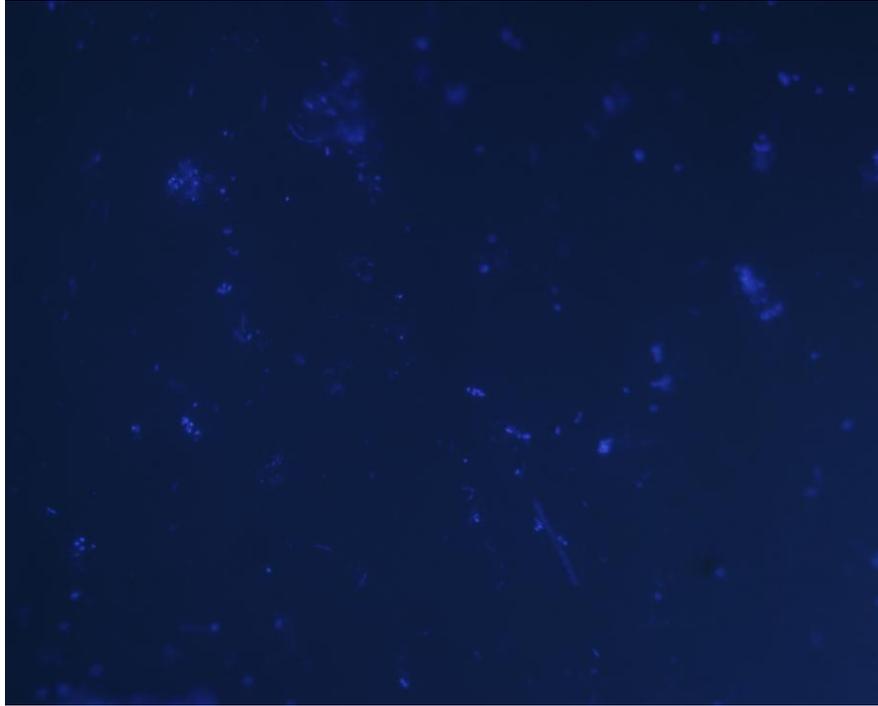
As sondas filogenéticas marcadas com o corante fluorescente Cyanine (Cy3) foram sintetizadas pela empresa Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Alemanha. Para a verificação da presença de bactérias degradadoras de compostos s-triazínicos, foi utilizada a sonda AtzB1 específica para a seqüência de DNA do gene *atzB*. O desenho da sonda AtzB1 e o alinhamento genético para construção dos iniciadores foram realizados por meio dos programas Primer Select e Meg Align (DNASTart, inc. 1999, 5th Edition, Wisconsin e Blast Search do National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). A relação de sondas utilizadas e suas características estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sequências das sondas filogenéticas utilizadas

Sonda	Sequência 5' para 3'	Estringência	Molécula alvo	Organismo
EUB 338	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	0-50%	16S rRNA	Domínio Bacteria
EUB338 II	GCA GCC ACC CGT AGG TGT	0-50%	16S rRNA	Domínio Bacteria
EUB338 III	GCT GCC ACC CGT AGG TGT	0-50%	16S rRNA	Domínio Bacteria
ALF1B	CGT TCG YTC TGA GCC AG	20%	16S rRNA	α -Proteobacteria
BET42a	GCC TTC CCA CTT CGT TT	35%	23S rRNA	β -Proteobacteria
GAM42a	GCC TTC CCA CAT CGT TT	35%	23S rRNA	γ -Proteobacteria
Nsr1156	CCC GTT CTC CTG GGC AGT	30%	16S rRNA	<i>Nitrospira</i> spp.
Nso190	CGA TCC CCT GCT TTT CTC C	55%	16S rRNA	β -Proteobacteria
NIT3	CCTGTGCTCCATGCTCCG	40%	16S rRNA	<i>Nitrobacter</i> spp.
HGC69a	TAT AGT TAC CAC CGC CGT	25%	23S rRNA	Actinobacteria
PLA46a	GACTTGATGCCTAATCC	30%	16S rRNA	Planctomicetos
PLA886	GCCTTGCGACCATACTCCC	30%	16S rRNA	Planctomicetos
AtzB1	GGA GAG CAC CGA TAC TTT TCT T	15%	DNA	Bactérias com o gene <i>atzB</i>

As amostras coradas com DAPI foram excitadas por laser Ar a 488nm e a fluorescência recuperada através do filtro U-MWU2 para luz UV, enquanto que as sondas marcadas com Cy3 foram excitadas por laser a 543 nm e a fluorescência recuperada com o filtro U-MSWG2 para luz verde (Figura 9).

(A)



(B)

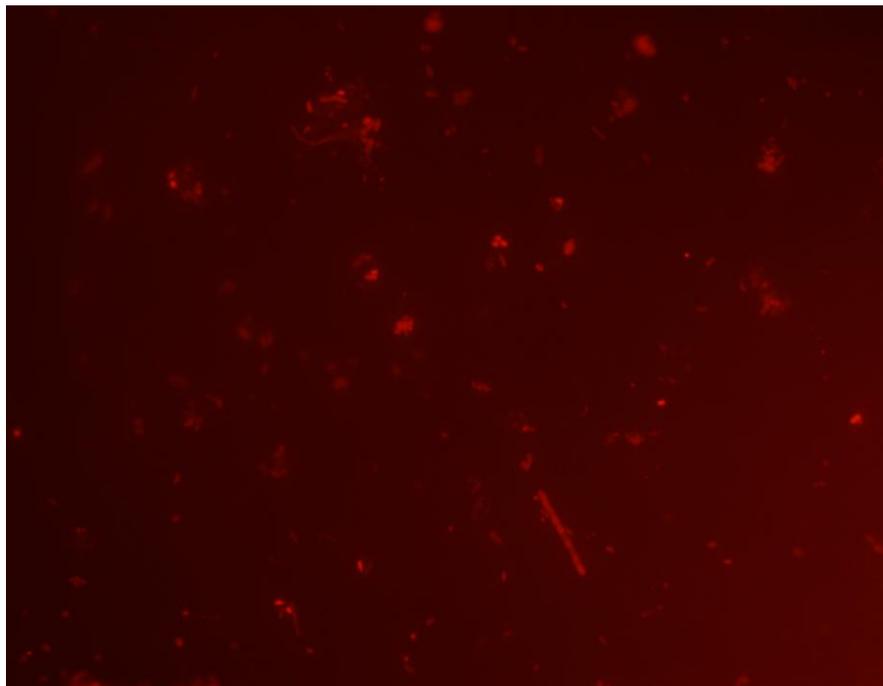


Figura 9 Fotografia de teste com células extraídas de amostras de lodo proveniente de Reator em Bateladas Sequenciais operando em ambiente aerado e anóxico para promover nitrificação e desnitrificação de efluente de abatedouro de aves, hibridizadas com a sonda EUB338 I,II,III. A escala Bar é de 10 μ m (A) células coradas com DAPI, (B) células hibridizadas com a sonda EUB338 I,II,III, coradas com CY3. Fonte: Arquivo pessoal.

Para avaliar a proporção de cada grupo bacteriano presente nas amostras, primeiramente realizou-se a contagem total das células coradas com DAPI e posteriormente a contagem das células hibridizadas com a sonda, no mesmo campo microscópico.

Foram realizadas contagens em 10 campos aleatórios, sendo que a porcentagem de células hibridizadas em cada campo foi calculada em relação ao número total de células coradas com DAPI. A contagem foi realizada com o auxílio do programa “freeware” Image Tool-UTHSCA (University of Texas Health Science Center, San Antonio – Texas/USA).

4.6 Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada através de análise de variância (ANOVA, $\alpha= 0.05$) com auxílio do programa SISVAR 5.0. As médias de abundância dos diferentes grupos filogenéticos foram submetidas ao teste de Tukey para detectar a ocorrência de diferenças significativas ($\alpha= 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização do solo

Os resultados da caracterização físico-química do solo estão apresentados na Tabela 3. Todos os valores com seus respectivos resultados de classificação (alto, baixo e médio) foram comparados com padrões dos solos das mesmas regiões, analisados anteriormente pela Cooperativa Central de Pesquisa Agrícola – COODETEC.

Conforme pode ser verificado, ambos os solos foram classificados como solo tipo 3, ou seja, Latossolo vermelho-escuro com textura argilosa (> 35% de argila) segundo o SiBCS (Sistema Brasileiro de Classificação de Solos). Solos argilosos caracterizam-se por serem pouco arejados, porém armazenam mais água quando bem estruturados. São geralmente menos permeáveis, embora alguns solos brasileiros muito argilosos apresentem grande permeabilidade. Sua composição é de boa quantidade de óxidos de alumínio e de ferro.

Além de composição semelhante de macro e micronutrientes (Tabela 3), verificou-se que os solos deste estudo possuem valores de pH bastante próximos (pH 4,2 solo com atrazina e pH 4,3 solo sem atrazina), o que elimina o efeito do pH e permite que seja avaliada a interferência da atrazina sobre a estrutura da comunidade bacteriana. Segundo Zarda et al., (1997) o solo é um ambiente complexo para o crescimento de microrganismos e a quantidade e os tipos de microrganismos presentes dependem de fatores ambientais tais como a quantidade de nutrientes, umidade, grau de aeração, temperatura e pH.

Tabela 3 Principais características físico químicas dos diferentes solos utilizados

Solo com atrazina		Solo sem atrazina	
Macronutrientes		Macronutrientes	
P mg/dm ³	1,00 (baixo)	P mg/dm ³	1,00(baixo)
K+ cmol/dm ³	0,12 (médio)	K+ cmol/dm ³	0,09(baixo)
C g/dm ³	11,30 (baixo)	C g/dm ³	9,74(baixo)
Ca+ cmol/dm ³	0,74(baixo)	Ca+ cmol/dm ³	0,32(baixo)
Mg ²⁺ cmol/dm ³	0,30(m.baixo)	Mg ²⁺ cmol/dm ³	0,08(m. baixo)
H+ +Al ³⁺ cmol/dm ³	8,36(-)	H+ +Al ³⁺ cmol/dm ³	7,76(-)
Ph	4,20 (baixo)	pH	4,30 (baixo)
Al ³⁺ cmol/dm ³	1,12(alto)	Al ³⁺ cmol/dm ³	0,77(médio)
N* g/dm ³	0,565	N* g/dm ³	0,487
Micronutrientes		Micronutrientes	
Cu mg/dm ³	10,00 (alto)	Cu mg/dm ³	13,20(alto)
Zn mg/dm ³	0,80(baixo)	Zn mg/dm ³	0,80(baixo)
Fe mg/dm ³	77,00(alto)	Fe mg/dm ³	33,00(alto)
Mn mg/dm ³	16,00(alto)	Mn mg/dm ³	10,00(alto)
Granulometria (%)		Granulometria (%)	
Argila	75	Argila	63
Silte	15	Silte	19
Areia	10	Areia	18
Classe Argila =	Solo tipo 3	Classe Argila =	Solo tipo 3

* Valor estimado a partir do Carbono – fator correção 20

De acordo com a EMBRAPA, a faixa de pH ideal dos solos para a agricultura é entre 5,5 e 6,5, pois é nesta faixa que os nutrientes ficam mais disponíveis às plantas. Quanto aos microrganismos, estes crescem em sua grande maioria em meios cujo pH esteja entre 5 e 9, preferencialmente entre 6,5 e 7,5. O pH afeta as funções celulares como o transporte através da membrana, o transporte através das proteínas, e também o equilíbrio das reações catalisadas por ter impacto na conformação tridimensional das enzimas (SUTHERSAN, 1999).

O pH pode afetar a quantidade e diversidade de microrganismos num “habitat”, pois a disposição e toxicidade de nutrientes minerais estão relacionadas a esse fator químico. Em ambientes com pH maior que 7, os íons ferro, manganês e zinco são menos disponíveis para a absorção pelas plantas e pelos microrganismos. O ferro e o alumínio tornam-se tóxicos em pH menor que 5, sendo menos disponíveis em pH baixo ou alto. Processos como germinação e crescimento de esporos e fungos micorrízicos são afetados de forma negativa devido à maior concentração de alumínio (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

De acordo com os resultados encontrados, era de se esperar uma baixa contagem de bactérias presentes em ambos os solos, pois os valores de pH encontrados estavam abaixo da faixa ideal e podem tornar o ferro tóxico às mesmas, visto que os níveis de Fe encontrados no presente trabalho são altos em ambos os solos. Solos brasileiros classificados como Latossolos são ricos em argilominerais e oxi-hidróxidos de ferro e alumínio. Seta; Karathanasis (1997) observaram que níveis maiores de ferro e alumínio no

solo inibem o transporte da atrazina, possivelmente pela adsorção nesses componentes inorgânicos.

Pode-se verificar na Tabela 3 que as quantidades de íons cálcio, magnésio, ferro e manganês no solo com atrazina são praticamente o dobro do solo sem atrazina, fatores que também podem influenciar a quantidade e qualidade de microrganismos presentes. Faoro et al., (2010) analisaram o ecossistema da Mata Atlântica para determinar sua biodiversidade bacteriana, usando sequenciamento do gene 16S rRNA e mudanças nos perfis taxonômicos correlacionados com as características físico-químicas do solo. O trabalho demonstrou a prevalência de Acidobactéria (63%), seguido por Proteobacterias (25,2%), Gemmatimonadetes (1,6%), Actinobacteria (1,2%), Bacteroidetes (1%), Chloroflexi (0,66%), *Nitrospira* (0,4%), Planctomicetos (0,4%), Firmicutes (0,26%), e OP10 (0,13%). Quarenta e oito seqüências (6,5%) representaram bactérias não identificadas. Os autores verificaram que o solo possui um alto nível de diversidade. A análise estatística mostrou que a diversidade de bactérias é influenciada por fatores como altitude, cálcio/magnésio, alumínio e o teor de fósforo, que também afetou a diversidade dentro da mesma espécie. Altas altitudes e níveis altos de cálcio/magnésio foram associados a níveis elevados de biodiversidade, já níveis mais elevados de alumínio e fósforo estavam associados a menores níveis de biodiversidade.

As práticas de manejo do solo podem alterar suas propriedades químicas, influenciando dessa forma a quantidade e o tipo de matéria orgânica, a qual desempenha importante papel na degradação de herbicidas. Zilli et al., (2003) demonstraram em seu trabalho que nos solos com alto teor de nutrientes disponíveis, há uma seleção positiva de bactérias com altas taxas de crescimento. Por sua vez, em solos com baixo teor de nutrientes disponíveis, ou alto teor de substratos recalcitrantes, há uma seleção de bactérias com baixo potencial de crescimento, mas com alta capacidade de competir por substratos.

No estudo com dois solos agrícolas no oeste da Noruega perto de Bergen com um solo arenoso de campo, frequentemente lavrado e submetido a rotações de colheita, e outro um solo orgânico de terra de pastagem permanente, muitas vezes cultivado ao longo de décadas, a diversidade genética da comunidade bacteriana no solo orgânico foi o dobro do que foi encontrado no solo arenoso. Uma possível explicação para a diferença na diversidade desses solos, pode ser que o solo arenoso foi lavrado uma vez por ano por vários anos. A perturbação juntamente com as rotações de colheita, provavelmente resultou em sucessões e instabilidade das populações bacterianas. Comunidades instáveis são caracterizadas pela dominância de alguns organismos e, portanto, uma baixa diversidade. O solo orgânico não foi perturbado com a mesma intensidade do solo arenoso e sua vegetação era mais diversificada e permanente. Isto implica que a comunidade bacteriana foi mais madura e estável no solo orgânico do que no solo arenoso. Outra explicação poderia ser que os solos orgânicos possuem uma maior complexidade físico-química. A

diversidade bacteriana nos solos agrícolas foi 2-5 vezes menor do que o solo da floresta. Provavelmente esse solo possuía uma comunidade já aclimatada bem desenvolvida e estável (TORSVIK et al, 1996).

A matéria orgânica apresenta uma acentuada capacidade de sorver herbicidas reduzindo a atividade biológica e a mobilidade dos compostos químicos aplicados no solo. Os autores (Zilli et al., 2003) relatam que nos solos com alto teor de matéria orgânica, a biodegradação da atrazina foi limitada pelos mecanismos de sorção. Também relata que a mineralização da atrazina decresceu quando o teor de C e N aumentaram, demonstrando assim que a sorção da atrazina aumenta com o aumento do teor de matéria orgânica e a biodisponibilidade para degradação microbiana diminui quando aumenta a sorção e a formação de resíduo ligado.

No presente trabalho a quantidade de carbono em ambos os solos foi de 1,13% no solo com atrazina e 0,97% no solo sem atrazina, valor considerado baixo segundo a COODETEC, fator este que pode afetar a atividade microbiana, afetando também a auto-remediação de s-triazinas (BARRA-CARACCILO et al., 2005b).

De acordo com Raj, 1987 o nitrogênio possui grande mobilidade no solo e suas formas inorgânicas são muito variáveis e afetadas por condições climáticas, temperatura em climas temperados e umidade em climas tropicais. Os valores podem variar de alguns a centenas de quilogramas de nitrogênio por hectare, com variações muito grandes em pequenos períodos; em poucas regiões do mundo tem sido possível estabelecer critérios de análise do solo eficientes para nitrogênio. No presente trabalho o valor de nitrogênio foi apenas estimado e por esta razão não foi utilizado na análise dos resultados.

O teste de umidade realizado em ambos os solos antes da etapa de extração e fixação das células resultaram nos valores de 46,9% para o solo com atrazina e 36,2% para o solo virgem. De acordo com Moreira; Siqueira (2006) condições físicas e químicas do solo influenciam a atividade biológica, especialmente temperatura que deve estar entre 30 e 35°C e umidade próxima a capacidade de campo (50 a 60%) e aeração adequada. Num microambiente do solo, a disponibilidade e atividade de água dependem, em dado momento, de interações entre o conteúdo de água, temperatura e natureza do ambiente coloidal (distribuição do tamanho de poros, estabilidade do agregado e composição mineralógica). Variações sazonais de temperatura e umidade afetarão as comunidades biológicas do solo e sua atividade. Geralmente, potencial hídrico de -0,01 MPa é ótimo para a atividade microbiana, ou seja, crescimento microbiano só é possível em atividade hídrica (a_w) entre 0,998 e 0,6. Em baixos potenciais, a maioria das bactérias é inativa, espécies de bactérias esporulantes toleram potenciais bem menores que bactérias não esporulantes, a maioria das bactérias precisa de a_w maior que 0,98 (MOREIRA;SIQUEIRA 2006).

Vários autores relatam que a umidade está relacionada com a abundância bacteriana e quanto maior o teor de umidade, maior será o número de bactérias presentes. No entanto,

o excesso de água reduz a porcentagem de ar presente no solo, o que afeta muito o desenvolvimento e a sobrevivência de microrganismos que necessitam de oxigênio (SUTHERSAN, 1999). No trabalho de Melz;Tiago (2009) verificou-se que as bactérias foram afetadas no período chuvoso, predominando na área de reserva natural que sofreu um aumento de umidade. Os fungos predominaram no período chuvoso, enquanto que os actinomicetos predominaram no período seco.

5.2 Hibridização fluorescente “in situ”

5.2.1 Sondas filogenéticas

A aplicação da FISH em solos é relativamente recente em comparação com o seu uso em ambientes marinhos e de água doce. Estudos sobre a estrutura das comunidades em solos têm utilizado sondas de oligonucleotídeos específicos para bactérias de gêneros filogeneticamente relacionados.

No presente trabalho, a técnica FISH permitiu a análise da estrutura das comunidades bacterianas nas amostras de solo coletadas, estando os resultados expressos em porcentagem (relativa à contagem total de células coradas com DAPI) na Tabela 4.

Neste estudo, células positivas para todas as sondas filogenéticas utilizadas foram encontradas em ambos os solos, indicando a presença de bactérias pertencentes ao Domínio Bacteria e aos grupos α , β -, γ - Proteobacterias, Planctomicetos, Actionobacteria, Bactérias oxidantes de amônia e Bactérias oxidantes de nitrito.

Ao aplicar a análise estatística - ANOVA e o teste de Tukey a 5% de significância foi possível verificar que a presença do herbicida atrazina pode ter influenciado nas comunidades bacterianas do solo e quais foram os grupos mais afetados, estando esses resultados apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Composição do Domínio Bactéria detectado por FISH em amostras de solo sem exposição à atrazina e com exposição à atrazina. Os valores representam as médias de seis amostras e estão expressas em porcentagem relativa à contagem total com DAPI para cada amostra.

Sonda	Porcentagem relativa	
	Solo s/ atz	Solo c/ atz
EUB I,II,III (Domínio bactéria)	62,45a	52,20a
ALF1B (α -Proteobactéria)	16,06a	12,41a
BET42a (β -Proteobactéria)	17,24a	8,26b
GAM42a (γ -Proteobactéria)	17,85a	10,96b
HGC69a (Actionobactéria ou Gram + com alto G+C)	9,72a	5,31b
Nso190 (β -Proteobactéria Oxidantes de amônia)	8,86 a	5,25 b
Nsr1156 (Oxidantes de nitrito)	8,76 a	7,09 a
NIT3 (Oxidantes de nitrito)	10,40a	4,90b
PLA46a/886 (Planctomicetos)	7,56a	3,24b

*Letras iguais nas linhas correspondem a médias iguais pelo teste de Tukey a 5% de significância.

A fração de células detectadas com as sondas EUB338 I, II e III representou $1,5 \times 10^8$ céls mL⁻¹ e $2,6 \times 10^8$ céls mL⁻¹ no solo que não utilizava o herbicida atrazina e no solo que utilizava o herbicida, respectivamente. Essa semelhança na contagem obtida após a separação das células por gradiente de centrifugação mostrou que a presença do herbicida não influenciou na quantidade de bactérias presentes no solo. A porcentagem de células hibridizadas representou 62% da contagem total com DAPI no solo não contaminado com o herbicida atrazina, enquanto que o percentual verificado no solo contaminado com o herbicida foi de 52,2%, entretanto essa diferença não é estatisticamente significativa ($P < 0.05$). Contudo, é possível verificar que o valor de Eubacteria foi superior no solo sem atrazina em relação ao solo contaminado com o herbicida (Tabela 4) indicando influência negativa do herbicida na comunidade bacteriana do solo.

Esse resultado é semelhante ao verificado no trabalho de Barra-Caracciolo et al., (2007), que ao utilizarem FISH para avaliar as comunidades bacterianas na degradação do herbicida simazina, detectaram em solo controle 50% de células positivas para EUB338 I,II,III em relação à contagem total com DAPI; já em solos tratados com o herbicida simazina o percentual caiu para cerca de 40% nos 77 dias de experimento.

Barra-Caracciolo et al., (2005a) no trabalho que estudou o método de extração celular e separação por gradiente de densidade combinados com análise por FISH conseguiram detectar uma abundância de Eubacteria de 47% da contagem total com DAPI em amostras de água e 58% em amostras de solo, em relação à contagem total com DAPI.

No trabalho de Grenni et al., (2009) no qual os autores isolaram uma bactéria da linhagem (FPA1) capaz de utilizar terbutilazina, simazina, atrazina, 2-hidroxisimazina, dietilatrazina, isopropilamina e etilamina como única fonte de carbono, bem como desenharam uma sonda de oligonucleotídeos baseada na seqüência 16S rRNA para a detecção de *Rhodococcus wratislaviensis*, conseguiram detectar 78% do Domínio Bacteria aplicando a sonda para EUB338 I,II,III.

Barra-Caracciolo et al., (2010) na avaliação da degradação do herbicida terbutilazina, pela comunidade bacteriana de amostras de água subterrânea, conseguiram verificar que a detecção de EUB338 I,II,III caiu drasticamente de 80% em 0 dia para 35%, 20% e 35% em amostras com 80, 120 e 124 dias, respectivamente.

Eickhorst; Tippkötter (2008) ao analisarem através da técnica de FISH a comunidade bacteriana de diferentes tipos de textura de solo, tais como agrícola e de floresta em Hope e em Stöckendrebber, na Alemanha, através da técnica de FISH, encontraram nos solos agricultáveis de Hope e Stöckendrebber 53% e 58% de EUB338 I,II,III, respectivamente, enquanto que nos solos de floresta de Hope e Stöckendrebber foram detectados 71% e 75%, respectivamente.

Pernthaler et al., (2002) ao utilizarem a técnica FISH, porém em amostras de bactérias marinhas, conseguiram detectar cerca de 48% de EUB338I,II,III marcada com CY3 comparado à contagem total com DAPI.

Alfreider et al., (1996) em um estudo de comunidades bacterianas em amostras de neve, lama e água de lago verificaram que a quantidade de bactérias detectadas com a sonda EUB338 I,II,III em diferentes "habitats" variou consideravelmente; Para as amostras de neve, foram detectados cerca de 40%; nas amostras de lodo, a quantidade de bactérias detectadas foi de aproximadamente 76% e para amostras da água de lago, o resultado foi em torno de 64%, quando comparados com a contagem total com DAPI.

Rogers et al., (2007) relatam que há uma potencial limitação para o uso de FISH no meio ambiente, inclusive no solo, e que a detecção de células de Eubacteria e Archaea é de um a dois terços da contagem total obtidas por corantes comumente utilizados como o laranja de acridina, SYBR Green, ou DAPI, que se ligam de forma inespecífica ao DNA celular. Discutem ainda a discrepância na contagem de EUB338 I,II,III em relação a células coradas com DAPI, atribuindo as diferenças à baixa eficiência de fixação no procedimento de hibridização e à pouca quantidade de conteúdo ribossomal, fatores que agiriam de forma independente ou em combinação. Segundo os autores, a detecção de células desses grupos pode variar numa faixa de 34-95%.

Bouvier; Giorgio (2003) no trabalho de revisão sobre os fatores que influenciam a detecção de células bacterianas utilizando o método de FISH, relatam que o número de células detectadas com a sonda EUB338 I,II,III varia de 1 a 100% com uma média geral de 56%, fato que se deve à sensibilidade de FISH tanto nos aspectos metodológicos do

protocolo, como também nas condições ambientais. É possível que haja um significativo efeito do tipo de fluorocromo e a condição de estrigência da reação na variação de porcentagem encontrada de EUB. Independentemente de saber se existe uma ligação entre a composição filogenética e a resposta das células à FISH, é provável que a sensibilidade de detecção dependerá, em parte, do estado fisiológico das células-alvo. Células com rápido crescimento ou altamente ativas tendem a ter mais ribossomos, resultando em células hibridizadas com um sinal fluorescente mais forte. A variabilidade na eficácia de FISH para um determinado nível de atividade bacteriana poderia ser esperado se considerado que a maior parte do “pool” de ribossomos não é necessário para síntese de proteínas, e que os ribossomos não são o fator limite que contribui para uma baixa taxa de crescimento bacteriano.

Quanto às subdivisões α , β e γ das Proteobactérias detectadas no presente trabalho, também apresentaram valores superiores no solo sem atrazina em relação ao solo contaminado com o herbicida. Do grupo Proteobactéria, α -Proteobactéria apresentou maior abundância no solo contaminado com o herbicida atrazina, já no solo sem atrazina a maior abundância foi do grupo γ -Proteobactéria seguido pelo grupo β -Proteobactéria. No entanto, houve diferença estatística somente entre as subdivisões β e γ , sendo que no solo contaminado o valor encontrado para β foi 52% inferior ao solo sem atrazina, demonstrando que este foi o mais afetado do grupo Proteobactéria. Segundo Faoro et al., (2010) em solos perturbados é comum a ocorrência da dominância de Proteobactérias, fato também observado no presente trabalho em ambos os solos analisados.

Diante das constatações de que bactérias das classes γ -Proteobactéria tais como *Pseudomonas* (SOUZA 1998, MANDELBAUM et al., 1997; KATZ et al., 2001) e *Acinetobacter* (SINGH et al., 2004a); Actinobactéria tais como *Rhodococcus* (JONES et al., 1998; GRENNI et al., 2009) e *Arthrobacter* (VAISHAMPAYAN et al., 2007); bem como β -Proteobactéria como *Delftia* (VARGHA et al 2005) são potencialmente degradadoras de atrazina, era esperado um predomínio de células hibridizadas com as sondas GAM42a, HGC69a e BET42a, respectivamente, no solo contaminado com atrazina, diferente do que foi verificado. Como já mencionado anteriormente, a presença de um substrato recalcitrante leva a uma seleção de bactérias com baixo potencial de crescimento (ZILLI et al., 2003), o que provavelmente justifica os resultados encontrados. Fang et al., (2001) observaram que o número de bactérias degradadoras de atrazina não se altera significativamente antes da exposição à atrazina, mas ocorre uma redução do período de aclimação que precede a mineralização.

Grenni et al., (2009) encontraram 13,9% para a subdivisão α -Proteobactéria e 22,89% para β - Proteobactéria, sendo este o grupo filogenético mais abundante presente

em amostras de água subterrânea; já as subdivisões γ - Proteobacteria, Actinobacteria e Planctomicetos apresentaram abundância de cerca de 14,58%, 3% e 1% respectivamente.

Barra-Caracciolo et al., (2005b) examinaram as mudanças na estrutura da comunidade bacteriana causadas pelo herbicida simazina ou por adições de uréia ao solo. Dos grupos estudados, as subdivisões α -Proteobacteria, β -Proteobacteria e Planctomicetos foram os mais dominantes no solo tratado apenas com simazina. Já no solo contaminado pelo herbicida simazina e também por uréia, os grupos mais afetados foram α -Proteobacteria e β -Proteobacteria. Foram também detectadas bactérias oxidantes de amônia no solo contaminado, sugerindo um possível papel na degradação da simazina.

Barra-Caracciolo et al., (2010) ao aplicarem FISH com as sondas para as subdivisões das α , β e γ -Proteobacterias verificaram uma abundância de cerca de 13%, 22% e 14% respectivamente, destacando que houve dominância do grupo β -Proteobacteria na comunidade bacteriana de água subterrânea, fato que sugere que β -Proteobacteria seria mais capaz de sobreviver na presença do herbicida terbutilazina e poderiam estar envolvidas na degradação do mesmo. Já para as subdivisões Actinobacteria e Planctomicetos, a abundância foi de aproximadamente de 4% e 2%, respectivamente. Vale ressaltar que o valor encontrado para a subdivisão β -Proteobacteria contraria o encontrado por esses mesmos autores no estudo com o herbicida simazina (Barra-Caracciolo et al., 2005b), bem como ao encontrado no presente trabalho, visto que conforme já exposto, o grupo β -Proteobacteria foi negativamente afetado na presença do herbicida atrazina.

Barra-Caracciolo et al., (2007) ao avaliarem a biodegradação e a formação dos principais metabólitos da simazina na presença e ausência da uréia, verificaram com FISH, que do grupo Proteobacteria, o que apresentou maior abundância foi a subdivisão alfa na ausência de uréia, seguido pela subdivisão β quando adicionado uréia. Também houve detecção dos grupos *Nitrossomonas* e *Nitrospira*, que são oxidantes de amônia.

Hesselsoe, et al., (2001) relatam que há dificuldade na utilização de FISH no solo, principalmente na detecção de subpopulações específicas como bactérias oxidantes de amônia, constituindo apenas uma proporção menor da população de microrganismos totais do solo. Relatam também que o limite de detecção para o total das populações é principalmente determinado pela extratabilidade das bactérias oxidantes de amônia das partículas do solo que pode ser melhorada em curto prazo com o enriquecimento inorgânico reduzido de fontes de nitrogênio.

No presente estudo, além da presença de bactérias oxidantes de amônia que pertencem ao filo β -Proteobacteria (Nso190 e Nsr1156) também foi confirmada a presença de bactérias oxidantes de nitrito (Nit3), sendo este grupo de bactérias oxidantes de nitrito um dos mais afetados pela presença do herbicida atrazina com abundância 53% menor no solo contaminado. Bactérias nitrificantes são amplamente distribuídas no solo e na água desempenhando importante papel na fertilidade do solo e no ciclo do nitrogênio

(MADINGAN et al., 1997). Como era esperado, as porcentagens de células hibridizadas com as sondas Nso190, Nit3 e Nsr1156 são baixas (Tabela 4) visto que tais bactérias se desenvolvem melhor em ambientes que recebem efluentes ricos em amônia. Embora a maioria das bactérias nitrificantes sejam quimiolitotróficas obrigatórias, *Nitrobacter* é uma exceção, podendo crescer, embora lentamente, na presença de alguns compostos orgânicos e mostrou ser a mais afetada deste grupo pela presença de atrazina no presente trabalho. Além de *Nitrobacter*, o gênero *Nitrospira* é um representante das bactérias oxidantes de nitrito, presentes em “habitats” marinhos.

No entanto, Bartosch et al.,(2002), enriqueceram bactérias quimiolitotróficas oxidantes de nitrito a partir de cinco diferentes solos, as quais foram monitoradas durante o processo de cultivo. Os resultados comprovaram que *Nitrospira* mostrou não ser somente uma bactéria aquática, mas também uma bactéria comumente encontrada em solos.

Goldfarb et al., (2011) compararam taxas de crescimento de bactérias em substratos orgânicos de recalcitrância química e verificaram a ocorrência de predominância de dois filos, Proteobacteria e Actinobacteria.

Margesin et al., (2011) avaliaram a comunidade microbiana em amostras de solo a partir de dois locais contaminados por um longo período por grandes quantidades de metais pesados. Foram utilizados métodos de cultura-dependente e independente. Os dois locais investigados eram localizados na parte superior industrial da Região Silésia no sul da Polônia. A avaliação da população microbiana do solo aeróbico demonstrou claramente a presença de um número considerável de bactérias viáveis cultiváveis em ambos os locais. Uma alta fração da população bacteriana foi capaz de crescer na presença de quantidades elevadas de metais. O local 1 continha significativamente ($P < 0,05$) menor número de crescimento de bactérias na presença de 10 mM de zinco, enquanto que no local 2, o oposto foi observado para as bactérias que toleram 1mM de cobre. Isso coincidiu com o conteúdo desses dois metais em ambos os locais. Análises indicaram que havia uma alta diversidade bacteriana em ambos os locais e a utilização de FISH indicou que Actinobacteria e Proteobacteria (com representantes das classes α , β e γ) representaram a fração fisiologicamente ativa de bactérias nos dois locais.

No presente trabalho também houve predominância do filo Proteobacteria em ambos os solos utilizados como já citado anteriormente, enquanto bactérias do filo Actinobacteria (gram-positiva com alto teor de G+C) tiveram uma abundância 45% menor no solo contaminado com o herbicida atrazina.

Outro grupo detectado pelo presente trabalho foi o dos Planctomicetos, representando 7,56% e 3,24% em relação à contagem total com DAPI. A diferença foi estatisticamente significativa, sendo este grupo um dos mais afetados negativamente pelo herbicida atrazina, com uma abundância 57% menor no solo contaminado.

Zarda et al. (1997) relataram que com a utilização da técnica de FISH em amostras de solo, os grupos filogenéticos que apresentaram dominância foi o grupo da subdivisão α -Proteobacteria e a subdivisão Planctomicetos. Os autores relatam ainda que a detecção de Planctomicetos em solo confirma sua ocorrência no mesmo, e indica uma significância ecológica pouco conhecida sobre esse grupo. A abundância encontrada para este grupo representou cerca de 7% em solo de floresta, assim, os autores afirmam que as diferentes taxas de detecção são devidas às diferentes atividades de microrganismos no solo e que a baixa atividade fisiológica pode ser diretamente correlacionada com o conteúdo de rRNA celular, levando à ligação insuficiente das sondas de oligonucleotídeos em células bacterianas em estágio latente.

Esse fato também é relatado no trabalho de Detmers et al., (2004), que afirmam que a detecção e a quantificação dos grupos filogenéticos por FISH em amostras ambientais dependem não só da viabilidade celular, mas também do conteúdo de rRNA celular, que está ligado à atividade metabólica celular.

Segundo Madigan et. al. (1997), o gênero *Planctomyces* está relacionado com o gênero *Pirella*, mas não apresenta relação filogenética com qualquer outro grupo de Bacteria. Bactérias do gênero *Planctomyces* são pouco comuns porque sua parede celular consiste principalmente de proteína. Os Planctomicetos são um grupo microbiano generalizado e numericamente abundante que representam um dos principais ramos de descendência do domínio Bacteria. Antes de sua descoberta em solo australiano em 1992, imaginava-se que os Planctomicetos só ocorressem em ambientes aquáticos. Buckley et al., (2006) ao avaliarem a diversidade de Planctomicetos em solo agrícola para estudar os efeitos de manejo, tais como cobertura de solo e a adição de compostos que afetam a comunidade dos Planctomicetos, verificaram que tanto a história de manejo do solo e alterações de compostagem tiveram efeitos significativos sobre a diversidade de Planctomicetos, e que as variações na matéria orgânica do solo, como conteúdo de Ca e também o pH foram associados com as variações na composição desta comunidade. Além disso, houve um aumento na proporção de Planctomicetos na área amostrada que foi correlacionada com a heterogeneidade espacial do nitrato, o que foi associado com a história de manejo do solo no local examinado.

5.2.2 Sonda AtzB1

Para a verificação da presença de bactérias degradadoras de compostos s-triazínicos foi utilizada a sonda AtzB1 específica para a seqüência de DNA do gene *atzB*: 5'CY3-AtzB1 (5'GGA GAAC CAC CGA TAC TTT TCT T-3'). A escolha do gene *atzB* se deve ao fato de codificar uma enzima que serve como um ponto de intersecção de múltiplas

vias de biodegradação das s-triazínicas e de ser completamente essencial para o crescimento microbiano em herbicidas s-triazínicos.

Em ambos os solos utilizados foi detectada a presença do gene *atzB*. Na Figura 10 é possível observar a hibridização com a sonda AtzB1 de células extraídas de um solo contaminado com herbicida atrazina.

(A)



(B)

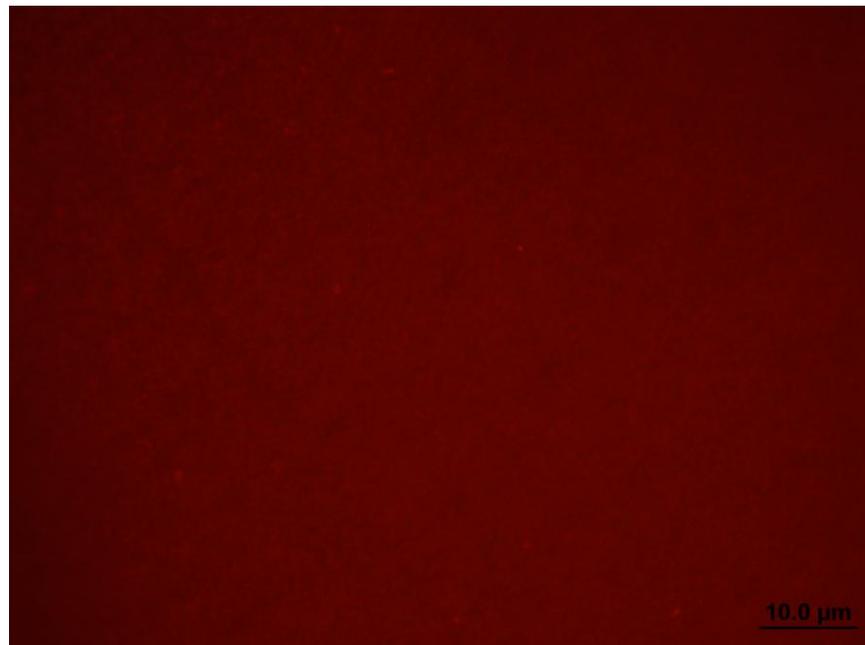


Figura 10 Fotografia de células extraídas de amostras de solo exposto ao herbicida atrazina, (A) células coradas com DAPI, (B) células hibridizadas com sonda AtzB1 corada com CY3. Fonte: arquivo pessoal.

No solo com histórico de 6 anos de utilização do herbicida atrazina foi possível detectar 7,35% da presença do gene *atzB*, já no solo sem exposição ao herbicida atrazina a detecção do gene foi de 6,86%. A diferença entre os valores detectados não é estatisticamente significativa, porém era esperada uma maior abundância de bactérias que possuem o gene *atzB* no solo exposto ao herbicida atrazina com longo histórico de utilização do mesmo, pois estas bactérias já poderiam estar aclimatadas àquele tipo de solo.

Esses resultados indicam que ambos os solos contém microrganismos com capacidade de degradação do herbicida atrazina, permitindo verificar que a presença do gene *atzB* em um “pool” de genes microbianos pode ser usado como um indicador de um potencial degradador de s-triazinas no solo. Martínez-Iñigo et al., (2010) encontraram em bactérias indígenas do solo seqüências *atz* que codificam as enzimas que transformam simazina em ácido cianúrico, já em atrazina os autores encontraram as enzimas clorohidrolase AtzA e duas amidohidrolases, AtzB e AtzC que são codificadas pelos genes *atzA*, *atzB* e *atzC*. Considerando que os metabólitos cloro-s-triazinas mantêm a toxicidade, o uso de bactérias nativas do solo que são capazes de degradar herbicidas triazínicos podem ser promissores agentes biológicos para a desintoxicação de água e solo contaminados por herbicidas.

Martín et al., (2008) ao avaliarem a capacidade natural de atenuação do solo, utilizaram dois solos agricultáveis com histórico de utilização de simazina (Lodi na Itália e Henares na Espanha) e dois solos naturais não expostos ao herbicida (Monza na Itália e Soto na Espanha). Ao utilizarem a técnica de FISH e a sonda AtzB1 específica para detecção do gene *atzB*, detectaram 13,42% (Lodi) e 6,5% (Henares). No entrando, no solo nunca exposto ao herbicida simazina não houve detecção dos genes *atzB*.

Barra-Caracciolo et al., (2010) em estudo de duas cepas de bactérias provenientes de um solo contendo terbutilazina, utilizaram a sonda AtzB1, tendo detectado a presença do gene *atzB* no “pool” de genes de ambas as cepas *J. lividum* e *A. incenata*. Em ambos os casos, a porcentagem de AtzB1-positivas foi maior que 70%. O fato da hibridização ter sido obtida em cultura pura dessas bactérias resultou em alta porcentagem de células hibridizadas e que possuem potencial genético para degradar s-triazinas. Curiosamente, a variação dos genes *atz* nessas bactérias sugere a hipótese de que a via de degradação do herbicida terbutilazina pode resultar de diferentes elementos genéticos nas comunidades microbianas.

Martínez-Iñigo et al., (2010) avaliaram a utilização do gene *atzB* como um biomarcador funcional para detectar a capacidade natural dos microrganismos na remoção de simazina em solos e verificaram que a porcentagem de células positivas para a sonda AtzB1 em solo suplementado somente com simazina era maior do que em solos tratados com simazina e uréia. Os resultados demonstraram diferenças na população que degradava simazina nas duas condições experimentais que foram avaliadas. A amostra de

solo suplementada com uma fonte de nitrogênio adicional (simazina + uréia) tinha menor capacidade de degradar simazina, e se correlacionou com o menor número de bactérias AtzB1 positivo. Com base nisso, a sonda AtzB1 foi considerada um biomarcador útil funcional.

Os genes *atzABC* são constitutivamente expressos e não são regulados nem induzidos por atrazina ou pela repressão de outras fontes de nitrogênio em *Pseudomonas* sp. ADP (MARTÍNEZ et al., 2001; DEVERS et al., 2004).

Conforme já mencionado, a habilidade para degradar atrazina utilizando produtos de *atzABCDEF* não é exclusividade do gênero *Pseudomonas*. Recentemente, uma linhagem CDB21 foi identificada como β -Proteobactéria exibindo 100% de sua seqüência idêntica com a bactéria não cultivada HOCLCi25. CDB21 também possui todo o conjunto de genes de degradação de atrazina presente em *Pseudomonas* (IWASAKI et al., 2007).

A seqüência nucleotídica dos genes *atzABCDEF* na linhagem CDB21 é idêntica aos de *Pseudomonas* sp. ADP, que sugere uma dispersão dos genes *atz* no ambiente. De acordo com este estudo os genes *atzABC* estão espalhados, sendo detectados no Canadá, U.S.A., França, Croácia e China, e foram altamente conservados (>97% similaridade) indicando sua recente dispersão na microbiota do solo (SOUZA, 1998; ROSSEAU et al., 2001; DEVERS et al., 2004).

Shapir et al., (2007) relatam que seqüências de genes *atz* são idênticas aos relatados em todas as espécies de bactérias que degradam atrazina examinadas até o momento, indicando que estes genes são altamente conservados e largamente distribuídos entre os diferentes gêneros de bactérias.

6 CONCLUSÕES

- Através da utilização da técnica de hibridização fluorescente “in situ” – FISH foi possível conhecer quais os grupos de bactérias indígenas predominantes no solo com e sem atrazina;
- As porcentagens em relação à contagem total com DAPI de vários grupos bacterianos hibridizados com as diferentes sondas filogenéticas foram inferiores no solo com atrazina, sendo os grupos β -Proteobactéria, oxidantes de nitrito (NIT3) e Planctomicetos (PLA46A/886) os mais afetados;
- A presença do herbicida pode ter influenciado negativamente na atividade metabólica da comunidade bacteriana do solo e conseqüentemente no conteúdo de rRNA, resultando em baixas porcentagens de hibridização nas células extraídas do solo contaminado com o herbicida;

- A utilização da sonda AtzB1 específica para o gene *atzB*, o qual codifica a enzima hidroxiatrazina etilaminohidrolase, mostrou que o gene encontra-se disperso no solo, visto que sua presença foi também detectada no solo virgem.
- O longo histórico de aplicação de atrazina no solo cultivado não levou a uma seleção nem ao aumento do número de microrganismos degradadores de herbicidas s-triazínicos;
- A alta concentração de alumínio juntamente com o baixo pH encontrado no solo com atrazina podem ter influenciado de forma negativa a abundância dos grupos;
- Embora a técnica FISH possua a vantagem de permitir a análise de comunidades microbianas sem necessitar de etapas anteriores de cultivo, o que poderia favorecer alguns grupos microbianos, bem como de permitir a quantificação de microrganismos não cultiváveis, a mesma apresenta limitações para o estudo de amostras provenientes de ambientes naturais, nos quais as células estão com baixa atividade metabólica, resultando em baixas taxas de hibridização.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A técnica FISH é uma ferramenta que contribui para uma caracterização minuciosa das comunidades bacterianas, seja na sua distribuição espacial ou identificação, porém pode subestimar a presença dos diferentes grupos devido às baixas taxas de hibridização, dependendo das condições fisiológicas que as células apresentam.

No entanto, em ambientes bioestimulados e com condições controladas, como as áreas de biorremediação, a técnica FISH pode permitir o conhecimento das características e condições fisiológicas dos microrganismos de interesse, possibilitando delinear as estratégias e condições necessárias para alcançar os objetivos no tratamento de solo, bem como avaliar o potencial de degradação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, R.I. In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes. **Molecular Microbial Manual**, Munich, v. 3.3.6, p. 1-15. 1995.

BARRA CARACCILO, A.; GRENNI, P.; CUPO, C.; ROSSETI, S. In situ analysis of native microbial communities in complex samples with high particulate loads. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 253, p. 55-58. 2005a.

BARRA CARACCILO, A.; GRENNI, P.; CICCOLI, R.; LANDA, G.; CREMISINI, C. Simazine biodegradation in soil: analysis of bacterial community structure by *in situ* hybridization. **Pest Management Science**, West Sussex, v.61, n. 9, p. 863-869. 2005b.

BARRA CARACCILO, A.; GRENNI, P.; SACCA, M.L.; FALCONI, F.; LANDA, G., CICCOLI, R. The role of the bacterial community of an agroecosystem in simazina degradation. **Italian Journal Agronomy**, v. 2, p. 163-169. 2007.

BARRA CARACCILO, A.; FAJARDO, C.; GRENNI, P.; SACCA, L.M.; AMALFITANO, S.; CICCOLI, R.; MARTIN, M.; GIBELLO, A. The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 71, p. 127-136. 2010.

BARRA CARACCILO, A.; BOTTONI, P.; GRENNI, P. Fluorescence in situ hybridization in soil and water ecosystems: a useful method for studying the effect of xenobiotics on bacterial community structure. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 92, n. 3, p. 567-579. 2010b.

BARTOSCH, S.; HARTWIG, C.; SPIECK, E.; BOCK, E. Immunological detection of Nitrospira-like bacteria in various soils. **Microbiology Ecology**. New York. v.43, p. 26-33. 2002.

BUCKLEY, D.H.; HUANGYUTITHAM, V.; NELSON, T.A.; RUMBERGER, A.; THIES, J.E. Diversity of Planctonycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 72, n. 7, p. 4522-4531. 2006.

BOUVIER, T.; GIORGIO, P.A. Factors influencing the detection of bacterial cells using fluorescence in situ hybridization (FISH): a quantitative review of published reports. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.44, p. 3-15. 2003.

CHAN, K. H. ; CHU, W. Atrazine removal by catalytic oxidation processes with or without UV irradiation Part II: an analysis of the reaction mechanisms using LC/ESI-tandem mass spectrometry. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 58, p. 165 – 174. 2005.

CHAUHAN, P.S.; CHAUDHRY, V.; MISHRA, S.; NAUTIYAL, C.S. Uncultured bacterial diversity in tropical maize (*Zea mays L.*) rhizosphere. **Journal Basic Microbiology**, Berlin, v. 51, p. 15-32. 2011.

DEVERS, M.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazina catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. **Journal of Microbial Methods**, v. 56, p. 3-15. 2004.

DETMERS, J., STRASS, H., SCHULTE, U., BERGMANN, A., KNITTEL, K., KUEVER, J. FISH shows that *Desultotomaculum spp.* are the dominating sulphate-reducing bacteria in a pristine aquifer. **Microbial Ecology**, v. 47, n. 3, 236-242. 2004.

EICKHORST, T.; TRIPPKÖTTER, R. Detection of microorganisms in undisturbed soil by combining fluorescence in situ hybridization (FISH) and micropedological methods. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, v. 40, p. 1284-1293. 2008.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Uso de ferramentas moleculares em estudos da diversidade de microrganismos do solo**. 1. ed. Brasília: Embrapa Cerrado, 33p. 2002.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Manual de análises químicas do solo, plantas e fertilizantes**. 2.ed. Brasília: Embrapa informação tecnológica, 627p. 2009.

FANG, C.; RADOSEVICH, M.; FUHRMANN, J.J. Atrazine and phenanthrene degradation in grass rhizosphere soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 3, p. 671-678, 2001.

FAORO, H.; ALVES, A. C. ; SOUZA, E. M. ; RIGO, L. U. ; CRUZ, L. M. ; AL-JANABI, S. M.; MONTEIRO, R. A. ; BAURA, V. A.; PEDROSA, F. O. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, n. 14, p. 4744-4749. 2010.

GARCIA-GONZÁLEZ, V.; GOVANTES, F.; SHAW, L.J.; BURNS, R.G.; SANTERO, E. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 69, p. 6987-6993, 2003.

GRENNI, P.; GIBELLO, A.; BARRA CARACCILO, A.; FAJARDO, C.; NANDE, M.; VARGAS, R.; SACCA, L.M.; MARTINEZ-INIGO, J.M.; CICCOLI, M.M. A new fluorescent oligonucleotide probe for *in situ* detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. **Water Research**, Oxford, v. 43, p. 2999-3008. 2009.

GOLDFARB, K.C.; KARAOZ, U.; HANSON, C.A.; SANTEE, C.A.; BRADFORD, M.A.; TRESEDER, K.K.; WALLENSTEIN, M.D.; BRODIE, E.L. Differential growth responses of soil bacterial taxa to carbon substrates of varying chemical recalcitrance. **Frontiers in Microbiology**. Michigan State University, USA. v.2 .2011.

HAYES, B.T.; KHOURY, V.; NARAYAN, A.; NAZIR, M.; PARK, A.; BROWN, T.; ADAME, L.; CHAN, E.; BUCHHOLZ, D.; STUEVE, T.; GALLIPEAU, S. Atrazine induces complete feminization and chemical castration in male african clawed frogs (*Xenopus laevis*). **Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America - PNAS**, Berkeley, v. 107, p. 4612-4617. 2010.

HESSELOE, M.; BRANDT, K.K.; SORENSEN, J. Quantification of ammonia oxidizing bacteria in soil using microcolony technique combined with fluorescence in situ hybridization (MCFU-FISH). **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v.38, p. 87-95. 2001.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B.M. & PACE, N.R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 4765-4774. 1998.

IWASAKI, A., TAKAGI, K.; YOSHIOKA, Y., FUJI, K.; KOJIMA, Y.; HARADA, N. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading beta-proteobacterium and detection of genes encoding s-triazine-degrading enzymes. **Pest Management Science**, West Sussex, v. 63, p.261-268. 2007.

JONES, L. R.; OWEN, S.A.; HORRELL, P.; BURNS, R.G. Bacterial inoculation of granular activated carbon filters for the removal of atrazine from surface water. **Water Research**, Oxford, v. 32, p. 2542-2549, 1998.

KAUFMAN, D.D.; BLAKE, J. Degradation of atrazine by soil fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, Oxford, v. 2, p. 73 – 80. 1970.

KATZ, I; DOSORETZ, C.G.; MANDELBAUM, R.T.; GREEN, M. Atrazine degradation under denitrifying conditions in continuous culture of *Pseudomonas* ADP. **Water Research**, Oxford, v. 35, p. 3272-3275. 2001.

KHOURI, A.G. Análises de resíduos de atrazina e simazina em abacaxi no Estado de Goiás. Dissertação de Mestrado em Ecologia e Produção Sustentável, Universidade Católica de Goiás-UCG, 2007.

LEE, S.-Y.; BOLLINGER, J.; BEZDICEK, D. & OGRAM, A. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 62, p. 3787-3793.1996.

LEW, S.; MIESZCZYNSKI, T.; SZAREK, J. Selected fluorescent techniques for identification of the physiological state of individual water and soil bacterial cells – review. **Folia Microbiology**, New York, v. 55, p. 107-118, 2010.

LIANG, Z.; HAN, Z.; YANG, S.; DU, P.; LIU, G.; YANG, Y. A control strategy of partial nitrification in a fixed bed biofilm reactor. **Bioresource Technology**, New York, v.102, p. 710-5. 2011.

LIM, S.; AHN, S.Y.; SONG, I.C.; CHUNG, M.H.; JANG, H.C.;PARK, S.K.; LEE, K.; PAK, K.Y.; LEE, K.H. Chronic exposure to the herbicide atrazine causes mitochondrial dysfunction and insulin resistance. **PLoS ONE**, Malaga,v. 4, p. 5186. 2009.

LIU, X. & PARALES, E.R. Bacterial chemotaxis to atrazine and related s-triazines. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 75, p. 5481-5488. 2009.

LUDWING, W.; SCHLEIFER, K.H. Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 15, p. 155-173. 2002.

MA, L.; WANG, S.; WANG, P.; CHEN, X. Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 63, p. 456-462. 2006.

MADINGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. Brock Biology of Microorganisms. Prentice- Hall, 8 Ed., 986p., 1997.

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**, Washington, v. 61, p. 1451 – 1457. 1997.

MARGESIN, R.; PLAZA, G.A.; KASENBACHER, S. Characterization of bacterial communities at heavy-metal-contaminated sites. **Chemosphere**, Oxford, v.82, p. 1583-1588. 2011.

MARTÍN, M.; GIBELLO, A.; LOBO, C.; NANDE, M.; GARBI, C.; FAJARDO, C.; BARRA CARACCILO A.; GRENNI, P.; MARTINEZ-INIGO, M.J. Application of fluorescence in situ hybridization technique to detect simazine-degrading bacteria in soil samples. **Chemosphere**, Oxford, v. 71, p. 703-710. 2008.

MARTINEZ, B.; TOMKINS, L.; WACKETT, R.; WING, R.; SADOWSKY, M.L. Complete nucleotide sequence and organization of the atrazine catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 183, p. 5684-5697.

2001.

MELZ, M.; TIAGO, P. V. Propriedades físico-químicas e microbiológicas do solo de um Parque em Tangará da Serra, MT, uma área de transição entre Amazônia e Cerrado. **Acta Amazônica**, Manaus, p. 39. 2009.

MOREIRA, F.M.S; SIQUEIRA, J.O. **Microbiologia e bioquímica do solo**. UFLA, Lavras. 2ed. 729p. 2006.

MURPHY, M.B.; HECKER, M.; COADY, K.K.; TOMPSETT, A.R.; IONES, P.D.; PREEZ, L.H.D.; EVERSON, G.L; SOLOMON, K.R.; CARR, L.A.; SMITH, E.E.; KENDALL, R.J.; KRAAK, V.D.; GIESY, L.P. Atrazine concentrations, gonadal gross morphology and histology in ranid frogs collected in Michigan agricultural areas. **Aquatic Toxicology**, New York, v. 76, p. 230 – 245. 2006.

NAKATSU, C. H.; FORNEY, L. J. Parameters of nucleic acid hybridization experiments. **Molecular Microbiology Ecology**. Manual. v. 2.1.2, p. 1-12. 1996.

NORRIS, T.; WRAITH, J.M.; CASTENHOLZ, R.W.; MCDERMOTT, T.R.B. Soil microbial community structure across a thermal gradient following a geothermal heating event. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington v. 68, p. 6300-6309. 2002.

OLIVEIRA, S.S.; WASIELESKY, J. W.; BALLESTER, C.L.E.; ABREU, P.C. Caracterização da assembléia de bactérias nitrificantes pelo método “Fluorescent *in situ* hybridization” (FISH) no biofilme e água de larvicultura do camarão-rosa *Farfantepenaeus paulensis*. **Atlântica**, Rio Grande, v. 28, p. 33-45. 2006.

OSTROFSKY, E.B.; ROBINSON, LB.; TRAINA, S.J.; TUOVINEN, O.H. Analysis of atrazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration, DNA hybridization, and inhibitors. **Soil Biology & Biochemistry**, New York, v. 34, p. 1449-1459. 2002.

PARRA, S.; STANCA, S. E.; GUASAQUILLO, I.; THANPI, K. R. Photocatalytic degradation of atrazine using suspended and supported TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 51, p. 107-116. 2004.

PEREIRA, C.; SALVADOR, S.; ARROJADO, C.; SILVA, Y.; SANTOS, A.L.; CUNHA, A.; GOMES, N.; ALMEIDA, A. Evaluating seasonal dynamics of bacterial communities in marine fish aquaculture: a preliminary study before applying phage therapy. **Journal of Environmental Monitoring**, Cambridge, v.13, n. 4, p. 1053-1058. 2011.

PERNTHALER, J. F.; O. GLÖCKNER, W.; SCHÖNHUBER; R. AMANN. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with rRNA-targeted oligonucleotide probes. **Marine Microbiology**, London, v. 30, p. 207-226. 2002.

PIUTTI, S.; SEMON, E.; LANDRY, D.; HARTMANN, A.; DOUSSET, S.; LICHTFOUSE, E.; TOPP, E.; SOULAS, G.; MARTIN-LAURENT, F. Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk-and maize rhizosphere soil. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 221, p. 111 - 117. 2003.

RAIJ, B.V. **Avaliação da fertilidade do solo**. 3 ed. Piracicaba, Potafos, 142p. 1987.

RHINE, E.D.; FUHRMANN, L.L.; Radosevich, M. Microbial community responses to atrazine exposure nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. **Microbial Ecology**, Oslo, v. 46, p. 145 - 160. 2003.

ROGERS, S.W.; MOORMAN, T.B.; ONG, S.K. Fluorescent in situ hybridization and microautoradiography applied to ecophysiology in soil. *Soil Science Society of America Journal*, New York, v.71, n.2, p. 2007.

ROSS, M. K.; JONES, T.L.; FILIPOV, N.M. Disposition of the herbicide 2-chloro-4(ethylamino)-6-(isopropylamino)-s-triazine (Atrazine) and its major metabolites in mice: A liquid chromatography mass spectrometry analysis of urine, plasma, and tissue level. **DMD**, Mississippi, v. 37, p. 776-786, 2009.

ROUSSEAU, S.; HARTMANN, A.; SOULAS, G. Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 36, p. 211-222. 2001.

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

ROWE, M. A.; BRUNDAGE, M. K.; SCHAFER, R.; BARNETT, B. J. Immunomodulatory effects of maternal atrazine exposure on male Balb/c mice. **Toxicology Applied Pharmacology**, New York, v.214, p. 69-77. 2006.

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

SETA, A. K.; KARATHANASIS, A. D. Atrazine adsorption by soil colloids and Cotransport through subsurface environments. **Soil science society of America journal**, v. 61, n. 2, p. 612-617. 1997.

SHAPIR, J.; ALEEM, A.; OSBORNE, J.; JOHSON, G.; SADOWSKI, M.; WACKETT, L.P. Hydroxiatrize N-ethylaminohydrolase (AtzB): an amidohydrolase superfamily enzyme catalyzing deamination and dechlorination. **Journal of Bacteriology**, Washington, v.189, p. 689-6997. 2007.

SILVA, E.; FIALHO, A.M.; SA-CORREIA, I.; BURNS, R.G.; SHAW, L.J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environmental Science Technology**, Easton, v. 38, p. 632 - 637. 2004.

SINGH, P.; SURI, C.R.; CAMEOTRA, S.S. Isolation of a member of *Acinetobacter* species involved in atrazine degradation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 317, p. 697 -702. 2004a.

SINGH, N.; MEGHARAJ, M.; KOOKANA, R. S.; NAIDU. R.; SETHUNATHAN, N. Atrazine and simazine degradation in *Pennisetum* rhizosphere. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 56, p. 257-263. 2004b.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY D. E. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. **FEMS Microbiology Ecology**, Amsterdam, v. 53, p. 65 - 273. 2005.

STEVENS, L T.; BRECKENRIDGE, C.B.; WETZEL, L.T.; GILLIS, LH.; LUEMPET L.U.; ELDRIDGE, I.C. Hypothesis for mammary tumorigenesis in Sprague-Dawley rats exposed to certain triazine herbicides. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 43, p. 139-153. 1994.

STOECKER, K.; DORNINGER, C.; DAIMS, H.; WAGNER, M. Double labeling of oligonucleotide probes for fluorescence *in situ* hybridization (DOPE-FISH) improves signal intensity and increases rRNA accessibility. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 76, p. 922–926. 2010.

SOUZA, M.L.; WACKETT, L.P.; SADOWSKY, M.J.. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification and protein characterization. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 4894-4900.1996.

SOUZA, M.L.; SEFFERNICK, J.; MARTINEZ, B.; SADOWSKY, M.J., AND WACKETT, L.P. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 180, p. 1951-1954. 1998.

SUDINI, H.K.; LILES, M.; ARIAS, C.; BOWEN, K.; HUETTEL, R. Exploring soil bacterial communities in different peanut cropping sequences using multiple molecular approaches. **Phytopathology**, v.101, n.7, p. 819-827. 2011.

SUTHERSAN, S.S. Remediation Engineering Design Concepts. Ed. Lewis Publishers. 1999.

TORSVIK, V.; SORHEIM, R.; GOKSOYR, J. Total bacterial diversity in soil and sediment communities – a review. **Journal of Industrial Microbiology**, Houndsmills , v.17, p.170-178. 1996.

United States Environmental Protection Agency. Office of pesticide programs health effects division. Grouping of triazines based on a common mechanism of toxicity - Discusses the available evidence for determining if a common mechanism of toxicity exists among certain triazine - containing pesticides. 2002. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/cumulative/triazines/triazines/triazinescommonmrch.pdf>>. Acesso em: 09 Jun. 2010.

VARGHA, M., TAKATS, Z., MÁRIALIGETI K . Degradation of atrazine in a laboratory scale model system with Danube river sediment. **Water Research**, Oxford, v. 39, p. 1560 -1568. 2005.

VAISHAMPAYAN, P.A.; KANEKAR, P.P.; DHAKEPHALDAR, P.K. Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. **Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 60, p. 273-278. 2007.

VÁZQUEZ-PADÍN, J.; MOSQUERA-CORRAL, A.; CAMPO, J.L.; MÉNDEZ, R.; REVSBECH, P. N. Microbial community distribution and activity dynamics of granular biomass in a CANON reactor. **Water Research**, Oxford, v. 44, p. 4359-4370. 2010.

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

WEINER, J. A.; DELORENZO, M.E.; FULTON, M.H. Relationship between uptake capacity and differential toxicity of the herbicide atrazine in selected microalgal species. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 68, p. 121-128, 2004.

ZARDA,B; HAHN, D; CHATZINOTAS, A.; SCÖNHUBER, W.; NEEF, A.; AMANN, R.I.; ZEYER, J. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by *in situ* hybridization. **Archives of Microbiology**, Berlin, v.168, p. 185-192. 1997.

ZHANG, X.; TANI, A.; FUSAKO, K.; KIMBARA, K. Rapid and multiple *in situ* identification and analyses of physiological status of specific bacteria based on fluorescent *in situ*

hybridization. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 110, p. 716-719. 2010.

ZILLI, J.E., RUMJANEK, N.G., XAVIER, G.R., COUTINHO, H.L.C., NEVES, M.C.P. Diversidade microbiana como indicador de qualidade do solo. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, Brasília, v. 20, n. 3, p. 391-411, set./dez. 2003.