

UNIVERSIDADE CEUMA - UNICEUMA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO
COORDENAÇÃO DO MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

CELSON HENRIQUE JORGE COSTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E SUA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA NO SOLO IMPACTADO COM AGROQUÍMICO-CULTURA
DE HORTALIÇAS**

São Luís
2018

CELSO HENRIQUE JORGE COSTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E SUA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA NO SOLO IMPACTADO COM AGROQUÍMICO-CULTURA
DE HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Meio Ambiente, nível de mestrado da
Universidade CEUMA para obtenção do grau de Mestre
em Meio Ambiente.

Orientadora: Prof.^a. Dra. Rita de Cássia Mendonça de
Miranda.

Co - Orientadora: Prof.^a. Maria Raimunda Chagas Silva.

São Luís
2018

CELSO HENRIQUE JORGE COSTA

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE MICROBIANA E SUA APLICAÇÃO
BIOTECNOLÓGICA NO SOLO IMPACTADO COM AGROQUÍMICO-CULTURA
DE HORTALIÇAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
Stricto Sensu em Meio Ambiente, nível de mestrado da
Universidade CEUMA para obtenção do grau de Mestre
em Meio Ambiente.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a. Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda (Orientadora)
Doutora em Biologia de Fungos - UFPE
Universidade CEUMA

Prof.^a. Dra. Maria Raimunda Chagas Silva (Co - Orientadora)
Universidade CEUMA

1º Examinador

2º Examinador

AGRADECIMENTOS

Ao pai de todas as coisas: Deus

Aos meus queridos pais, José Celso Santana Costa e Rita de Canaan Jorge Costa

Aos meus dois queridos irmãos e familiares.

A querida orientadora e amiga Prof.^a Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda pelos ensinamentos, incentivos e disponibilidade.

A Co- Orientadora Prof.^a Maria Raimunda Chagas Silva por ter disponibilizado o laboratório de análise de solos.

Aos técnicos de laboratório de química da instituição Universidade do CEUMA- UNICEUMA.

Aos alunos de iniciação científica que me ajudaram nas diversas etapas do processo de pesquisas que o referido trabalho necessitou.

Enfim, a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente ajudaram nesse trabalho de pesquisa.

RESUMO

A utilização de agroquímicos tem aumentado a preocupação com a poluição ambiental, principalmente a do solo, e com o advento da Revolução Verde onde as atividades agrícolas ganharam maior importância e destaque no Brasil. Sabe-se que os defensivos agrícolas causam impactos negativos ao ambiente, modificando com isso, a diversidade microbiana, exercendo pressões seletivas em micro-organismos do ambiente, alterando diversas atividades metabólicas. Uma alternativa para o tratamento de solos contaminados com agrotóxicos é a bioremediação, para tal é importante que se estude os aspectos físico-químicos do solo contaminado e se conheça a microbiota ali presente, para se utilizar microrganismos que já estejam com seu aparato enzimático pronto. Nesse contexto, esse trabalho objetivou isolar e selecionar microrganismos de ambiente contaminado com agrotóxico e a aplicação desses organismos na recuperação desse ambiente através de técnicas de bioremediação. Para isso, amostras de solo contaminados com agroquímico da classe dos organofosforado foram coletados de forma sistemática em dois períodos do ano e caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas. Com a finalidade de conhecer a microbiota endógena, foi realizado o isolamento e identificação clássica e molecular dos microrganismos. Destes foram selecionados através de teste colorimétrico do DCPIP, aqueles com capacidade para metabolizar o agroquímico, foi avaliada o potencial de produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, além da atividade emulsificadora. Posteriormente as melhores condições do processo foram estabelecidas e otimizadas através de metodologias estatísticas. Com as condições otimizadas realizou-se o ensaio em escala laboratorial, em reatores de solo de bancada, onde se avaliou a atividade biológica, a toxicidade do agrotóxico e produtos de degradação e a degradação do agrotóxico por CLAE. Foram isolados os três grupos microbianos, bactérias, fungos e leveduras, pelas técnicas clássicas observou-se um predomínio de bactérias Gram positivas, enquanto a identificação molecular mostrou haver uma frequência de bactérias Gram negativas no solo. Já os fungos foram identificados os gêneros *Aspergillus* sp. *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp. e *Coccidioide* sp. Dos microrganismos isolados, 39 foram selecionados macromorfologicamente para o teste de seleção do DCPIP, os que se apresentaram mais promissores foram avaliados quanto a capacidade de produzir enzimas oxidativas e atividade emulsificadora. Dois microrganismos foram selecionados para apresentarem um potencial para a remediação do solo, o fungo *Trichoderma* sp. (F1) e a levedura *Cândida glabrata* (L3). Com estes organismos realizou-se os 11 experimentos preconizados pelo planejamento experimental e observou-se que para ambos, as melhores condições do processo, estabelecidas pela atividade biológica foi quando se inoculou 8 bloquinhos em solo contaminado com 35% de agrotóxico. Com essas condições foi realizado tratamento de solo em escala laboratorial onde observou-se que o agrotóxico é extremamente tóxico para os modelos de toxicidade testados, entretanto os processos de bioamentação favorece a degradação do agrotóxico no solo. Com tudo que foi realizado pode-se concluir que os microrganismos são aptos para a degradação podendo ser utilizado em um modelo de recuperação para ambientes contaminados com agrotóxico.

Palavras-chave: Ambiente. Agroquímicos. Microrganismos. Biorremediação.

ABSTRACT

The use of agrochemicals has increased concern with environmental pollution, especially soil pollution, and with the advent of the Green Revolution, where agricultural activities have become more important and prominent in Brazil. It is known that agricultural pesticides cause negative impacts to the environment, thereby modifying microbial diversity, exerting selective pressures on microorganisms in the environment, altering several metabolic activities. An alternative for the treatment of soils contaminated with pesticides is bioremediation, for this it is important to study the physico-chemical aspects of contaminated soil and to know the microbiota present, to use microorganisms that are already with their enzymatic apparatus ready. In this context, this work aimed to isolate and select microorganisms from contaminated environment with pesticides and the application of these organisms in the recovery of this environment through bioremediation techniques. For this, soil samples contaminated with agrochemical of the organophosphorus class were collected systematically in two periods of the year and characterized as to their physicochemical properties. With the purpose of knowing the endogenous microbiota, the isolation and classic and molecular identification of the microorganisms was carried out. From these were selected by means of colorimetric test of the DCPIP, those with capacity to metabolize the agrochemical, the potential of the enzymes lacase, lignin peroxidase and manganese peroxidase were evaluated, besides the emulsifying activity. Subsequently the best conditions of the process were established and optimized through statistical methodologies. Under optimized conditions, the laboratory-scale test was carried out in bench-top reactors, where the biological activity, the toxicity of the pesticide and degradation products and the degradation of the pesticide by HPLC were evaluated. The three microbial groups, bacteria, fungi and yeasts were isolated. Classical techniques showed a predominance of Gram positive bacteria, while molecular identification showed a frequency of Gram negative bacteria in the soil. Already the fungi were identified the genera *Aspergillus* sp. *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp. and *Coccidioide* sp. Of the microorganisms isolated, 39 were selected macromorphologically for the DCPIP selection test, the most promising ones were evaluated for their ability to produce oxidative enzymes and emulsifying activity. Two microorganisms were selected to present a potential for soil remediation, the fungus *Trichoderma* sp. (F1) and yeast *Candida glabrata* (L3). With these organisms, the 11 experiments were carried out by the experimental planning and it was observed that for both, the best conditions of the process established by the biological activity were when 8 blocks were inoculated in soil contaminated with 35% of pesticide. With these conditions soil treatment was carried out on a laboratory scale where it was observed that the pesticide is extremely toxic to the toxicity models tested, however the bio-oxidation processes favors the degradation of the pesticide in the soil. With everything that has been accomplished it can be concluded that the microorganisms are apt for the degradation and can be used in a recovery model for environments contaminated with agrototoxic.

Keywords: Environment. Agrochemicals. Microorganisms. Bioremediation.

LISTA DE FIGURA

Figura 1	Classificação toxicológica.....	16
Figura 2	Isolamento de microrganismos nos meses de maio e janeiro nos meios seletivos Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) e Muller Hinton (MH).....	39
Figura 3	Aspectos macromorfológicos das colônias após o isolamento.....	40
Figura 4	Percentual dos grupos microbianos isolados de solo contaminado com agrotóxico.....	42
Figura 5	Frequências das espécies bacterianas encontradas no solo nos dois períodos de coleta janeiro (solo 1) e maio (solo 2).....	43
Figuras 6	Micromorfologia de <i>Aspergillus</i> sp. (A), <i>Coccidioides</i> sp. (B) e <i>Penicillium</i> sp. (C) isolados de solo contaminado com agrotóxico.....	45
Figura 7	Atividade biológica da microbiota contendo a levedura <i>Cândida.glabrata</i> (L3) nos onze experimentos preconizados pelo planejamento experimental fatorial do tipo DCCR.....	53
Figura 8	Atividade biológica da microbiota contendo fungo filamentoso <i>Trichoderma longibrachiatu</i> (F1) nos onze experimentos preconizados pelo planejamento experimental fatorial do tipo DCCR.....	53
Figura 9	Cinética de respiração do fungo <i>Trichoderma longibrachiatu</i> (F1)... e da levedura <i>Cândida glabrata</i> (L3) ao longo de 23 dias de tratamento de solo contaminado com agrotóxico.....	54
Figura 10	Gráfico superfície resposta da variável atividade biológica quando... o tratamento é realizado com a inoculação do fungo <i>Trichoderma longibrachiatu</i> (F1).....	55
Figura 11	Gráfico superfície resposta da variável atividade biológica quando... o tratamento é realizado com a inoculação da levedura <i>Cândida glabrata</i> (L3).....	55
Figura 12	Atividade biológica ao longo dos 30 dias de tratamento do solo contaminado com agrotóxico nos reatores.....	57

Figura 13	Percentual de sobrevivência da larva <i>Tenebrio molitor</i> exposta ao agrotóxico sem tratamento.....	58
Figura 14	Citotoxicidade do agrotóxico frente a células de fibroblastos após 48h de exposição.....	59
Figura15 A	Perda de massa das espécies de minhoca <i>Violeta do himalaia</i> nos reatores de solo contaminados com Korplan.....	60
Figura 15 B	Número de casulos das espécies de minhoca <i>Violeta do himalaia</i> nos reatores de solo contaminados com Korplan.....	60

LISTA DE TABELA

Tabela 1	Matriz do Planejamento Experimental Fatorial do Tipo Central Composto Rotacional (DCCR) com as variáveis dependentes e independentes do processo.....	33
Tabela 2	Características físicas e químicas dos solos contaminados com agrotóxicos coletados no horta de um sítio de agricultura familiar no bairro J. Lima em São José do Ribamar – MA.....	37
Tabela 3	Identificação e tempo de descoloração no teste DCPIP pelos microrganismos isolados de solo contaminado com agrotóxic.....	48
Tabela 4	Caracterização enzimática e índice de emulsificação (IE_{24}) dos 13 microrganismos selecionados no teste do DCPIP.....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRAFICA	14
2.1	História do Agrotóxico no Brasil	14
2.2	Agroquímicos e a saúde da população	14
2.3	Uso de defensivos e sua classificação	14
2.4	Contaminação dos solos	17
2.5	Bioremediação	18
2.6	Biodegradação em solos	18
2.7	Microrganismos degradadores	19
	REFERÊNCIAS	20
	 ARTIGO - Biorremediação de Solo Contaminado com Agroquímico por Microbiota Endógena	24
1	INTRODUÇÃO	27
2	MATERIAL E MÉTODOS	29
2.1	Local da coleta e Agrotóxico	29
2.2	Coleta e Caracterização Físico-química do Solo	29
2.3	Isolamento e Identificação dos Microrganismos do Solo	30
2.4	Seleção Qualitativa de Isolados Ambientais	31
2.5	Seleção quanto a produção de Metabólitos de Interesse	31
2.5.1	Caracterização Enzimática	32
5.2.2	Avaliação da Atividade Emulsificante	32
2.6	Determinação das Melhores Condições do Processo para Atividade Microbiana	33
2.6.1	Ensaio de Atividade Biológica	34
2.7	Avaliação da Degradação do Agroquímico em Escala Piloto	35
2.7.1	Análise de Degradação por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE).	35
2.7.2	Avaliação da toxicidade.....	35
2.7.2.1	<i>Toxicidade Aguda com a larva de Tenebrio molitor</i>	36
2.7.2.2	<i>Citotoxicidade</i>	36
2.7.2.3	<i>Toxicidade Aguda com a espécie de minhoca <i>Violeta do himalaia</i></i>	37

2.8	Análises estatísticas	37
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
3.1	Caracterização físico química do solo	38
3.2	Isolamento e Identificação dos Microrganismos	40
3.3	Seleção Qualitativa de Isolados Ambientais	47
3.4	Seleção quanto a produção de Metabólitos de Interesse	50
3.4.1	Caracterização Enzimática e atividade emulsificadora (IE ₂₄)	50
3.5	Determinação das Melhores Condições do Processo para Atividade Microbiana	53
3.6	Avaliação da Degradação do Agroquímico em Escala Piloto	57
3.7	Avaliação da toxicidade	58
3.7.1	Toxicidade Aguda com a espécie de minhoca <i>Violeta do himalaia</i>	60
4	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A problemática oriunda do uso cada vez maior dos agroquímicos no que refere a contaminação no solo e lençol freático, a resistência nas plantas e adoecimento da população exposta a cada dia tornando-se maior, desperta a necessidade de estudos e trabalhos que venham a identificar tais agravos. Diante do exposto, esse trabalho visa identificar a situação encontrada em uma área arrendada para plantio de hortaliças localizada no bairro J. Lima da grande Ilha de São Luís que utiliza agrotóxico.

A utilização de agroquímicos tem aumentado a preocupação com a poluição ambiental, principalmente a do solo. Entre os compostos dessa natureza utilizados, os herbicidas são os mais comercializados no mundo em face da necessidade de controle de ervas indesejável na agricultura (ARAÚJO, 2002).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agroquímicos e de acordo com um levantamento feito pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), anualmente são usados mais de 850 milhões de litros de agrotóxicos, o que corresponde a uma exposição média ambiental/alimentar de mais de 4 litros por indivíduo. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2006), esses produtos são classificados em 4 níveis de acordo com a toxicidade, que vão desde classe I (que são os extremamente tóxicos, identificados pela faixa vermelha) até os produtos da classe IV (que são os produtos pouco tóxicos, identificados pela faixa verde). O Maranhão está entre os 10 principais estados consumidores de agrotóxicos no País. Embora alguns defensores do uso de agroquímicos afirmem que estas substâncias são seguras e os resíduos gerados além de mínimos, causam pouco impacto negativo ao ambiente, os trabalhos científicos apontam que os efeitos agudos e crônicos gerados pelo uso de agroquímicos na saúde humana e no meio ambiente, mesmo aqueles classificados como menos tóxicos, são alarmantes e vão desde a manifestação de doenças neurológicas, endócrinas até mesmo o surgimento de câncer. No ambiente, deve-se levar em consideração a possibilidade de contaminação da água, causando poluição nos mananciais interferindo na dinâmica do solo, ciclagem de nutrientes podendo causar a mortandade de aves e peixes (PERES; MOREIRA, 2003; TAVELLA et al., 2011).

Os agrotóxicos mais usados no Brasil são os herbicidas, que representam quase metade do consumo de agroquímicos (48%), entre os quais se destaca o uso de glifosato. Em seguida, aparecem os inseticidas (25%) e os fungicidas (22%). Estes últimos apresentam baixa

toxicidade às células de mamíferos e o seu maior impacto ambiental é a toxicidade contra fungos benéficos do solo (TAVELLA et al., 2011).

Uma das principais finalidades do uso de agroquímicos é inibir o crescimento de patógenos frequentes na agricultura e de um modo geral possuem estruturas químicas e moleculares semelhantes a classes de antimicrobianos usados na clínica. Estes compostos possuem similaridade estrutural com azólicos clínicos e alguns passaram a ser proibido no Brasil pela ANVISA, motivado principalmente pela elevada toxicidade do produto (CHOWDHARY et al., 2011; FARIA-RAMOS et al., 2014; BRASIL, 2016).

A elevada toxicidade desse herbicida e de seu produto de degradação exige que se encontrem formas de eliminá-lo sem causar e/ou minimizar seus danos ao ambiente. A degradação biológica da molécula do contaminante (herbicida) em produtos menos tóxicos representa uma das formas de proteger o ambiente e de recuperar locais já contaminados. Nesse processo, denominado de biorremediação, o composto degrada-se completamente ou parcialmente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal, como CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S e HCL (MELO; AZEVEDO, 2008). Com isso, as técnicas de biorremediação tem despertado o interesse de vários pesquisadores (DOELMAN; BREEDVELK, 1999; FREIRE et al. 2000; BRITO, 2004; CELIS; ELEFSINIOTIS; SINGHAI et al., 2008; BAELUM; JACOBSEN; HOLBEN, 2010; GONZALÉZ et al., 2012).

O processo de biorremediação de herbicidas no solo é mediado por micro-organismos, dentre os quais as bactérias, podendo variar de apenas dias até anos para que ocorra o completo desaparecimento da molécula (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Nesse sentido, a inoculação de micro-organismos previamente selecionados para aumentar a velocidade de degradação vem sendo apontada como alternativa de recuperação de ambientes poluídos (FRANCO et al., 1992).

A utilização de micro-organismos na biorremediação tem se mostrado eficiente para biodegradar moléculas xenobióticas (estranhas ao ambiente natural) e recalcitrantes (de difícil degradação), devido sua capacidade para reciclar várias moléculas da biosfera, participando de diversos ciclos dos elementos químicos (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). A biodegradação dos herbicidas sofre influência das propriedades quantitativas e qualitativas da comunidade microbiana do solo, a qual definirá maior ou menor cota de degradação, além da disponibilidade do composto para os micro-organismos.

Segundo Araújo (2002), a ação de micro-organismos sobre os herbicidas constitui mecanismo da maior importância, pois a degradação microbiológica, na maioria dos casos, contribui para a dissipação da molécula no ambiente. A maioria dos estudos consultados sobre

os efeitos de agrotóxicos em micro-organismos do solo envolve experimentos de laboratório voltados para a aplicação de determinado composto. No campo, um ou mais agrotóxicos podem ser repetidamente aplicados no mesmo solo por vários anos e deixar resíduos com efeitos danosos sobre a biomassa microbiana.

Outro aspecto que precisa ser considerado é a geração de composto durante o processo de biodegradação do agroquímico. É interessante que se investigue a toxicidade dos metabólitos gerados durante o processo de biorremediação, para isso se faz necessário a escolha de organismos que sejam eficientes para esta finalidade. Os vegetais superiores têm características que os fazem excelentes modelos genéticos para medir poluentes ambientais, sendo frequentemente usados em estudos de monitoramento.

Todavia, esses fatores não são apenas devido a sensibilidade para detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes, mas principalmente, a possibilidade de identificar pelo teste diversas alterações genéticas, com uma ampla faixa de pontos de mutação nas alterações cromossômicas em células de diferentes tecidos tais como raízes, folhas e pólenes.

Atualmente, dentre as espécies mais utilizadas como organismos testes no biomonitoramento ambiental se destacam: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zeamays*, *Tradescantia* spp., *Nicotianatabacum*, *Crepiscapillaris* e *Hordeumvulgare* (GRANT, 1982). Dentre as espécies mais utilizadas como sistemas teste, *A. Cepa* se destaca pela facilidade de se observar danos nos cromossomos e alterações nos ciclos celulares, pelo fato de que o cromossomo deste vegetal é grande e em número reduzido ($2n=16$). Por isso, este sistema teste tem se mostrado eficaz na detecção de químicos ambientais (FISKESJO, 1985). A espécie *A. cepa* tem sido considerada pela “Royal Swewdish Academyof Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene-ToxProgram” (GRANT, 1982) como um material-teste padrão para detecção de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais.

2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

2.1 História do Agrotóxico no Brasil

Segundo Romeiro (2007), o incremento sobre os rendimentos das culturas atribuídos ao uso dos agroquímicos desviou o olhar mais crítico para o uso dessa tecnologia e acabou retardando a introdução ou a continuidade das práticas mais ecológicas.

Konradsenet al. (2003) apontam como os subsídios governamentais distorceram os custos dos vários métodos de controle de pragas, colaborando para que o uso dos agroquímicos tenha se tornado economicamente preferível aos outros métodos não químicos. No Brasil, o uso dos agrotóxicos começou a se difundir em meados da década de 1940. No final da década de 1960, o consumo se acelerou em função da isenção de impostos, como o Imposto de Circulação de Mercadoria (ICM) e o Imposto de Produtos Industrializados (IPI), e das taxas de importação de produtos não produzidos no Brasil e de aviões de uso agrícola (BULL; HATHAWAY, 1986).

Segundo Porto e Soares (2012), o governo federal investiu milhões na implantação de um novo panorama da realidade agrícola brasileira seguida de propostas em busca de uma agenda de pesquisas provocando profundas transformações no parque industrial do país. Já a partir da década de 1980, o surgimento de novas tecnologias trouxe um novo impulso à agricultura brasileira ao proporcionar a produção em áreas até então pouco exploradas e com baixa fertilidade do solo, como é o caso do cerrado brasileiro. Somando-se a isso, as técnicas do plantio direto deram maior aproveitamento a áreas produzidas, no entanto, exigiam um maior uso dos herbicidas, que tiveram um crescimento de 540% entre 1978 e 1998 (PROGRAMA NACIONAL DE AGRICULTURA FAMILIAR, 2005). O cerrado brasileiro passou a se tornar a nova fronteira agrícola e hoje os incrementos de área se concentram predominantemente em Estados que compõem esse bioma.

A governança ambiental é remetida ao contexto do paradigma da modernização ecológica ou adequação ambiental, centrado nas estratégias técnicas mercadológicas e no consenso político com soluções para os ditos problemas sociais (ZHOURI, 2008).

2.2 agroquímicos e a saúde da população

São inúmeros os estudos que associam o uso de agrotóxicos e seus efeitos nocivos à saúde humana. De acordo com Lyznicki (1997), diferentemente dos efeitos agudos dos agrotóxicos na saúde humana, os crônicos não têm sido caracterizados de forma adequada,

tendo em vista que os efeitos tardios de alguns desses químicos podem se tornar aparentes após anos de exposição.

O Brasil é o maior consumidor de produtos agrotóxicos no mundo. Em decorrência da significativa importância, tanto em relação à sua toxicidade quando à escala de uso no Brasil, os agrotóxicos possuem uma ampla cobertura legal no Brasil, com um grande número de normas legais. O referencial legal mais importante é a Lei nº 7802/89, que rege o processo de registro de um produto agrotóxico, regulamentada pelo Decreto nº 4074/02 (BRASIL, 2002).

Esse Decreto regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989 (BRASIL, 1989), que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências.

O movimento da Reforma Sanitária brasileira (BRASIL, 2015) buscou colocar a saúde como uma das categorias centrais na construção de um projeto de desenvolvimento nacional.

O conceito ampliado de saúde, operacionalizado pela Lei nº 8.080/90 (BRASIL, 1990), reforça que somente alcançaremos melhores níveis de saúde com melhores salários, moradias, acesso ao saneamento, alimentação adequada, lazer, cultura, ou seja, alcançando um desenvolvimento sustentável. Iremos contar com uma população mais saudável.

Segundo dados da *Renast online*, além das repercussões no âmbito da saúde de trabalhadores e de comunidades que vivem próximas às grandes áreas de produção, os agrotóxicos representam um problema de saúde pública, para o qual o setor saúde vem buscando definir e implementar ações voltadas para atenção integral das populações expostas a agrotóxicos.

2.3 Uso de defensivos e sua classificação

Independentemente da questão terminológica, os dados do IBGE (BRASIL, 2015) apontam para a elevada utilização de uso de agrotóxicos. Os valores de comercialização de agrotóxicos e afins por área plantada registram aumento contínuo a partir de 2009, alcançando 6,9 kg/ha em 2012. Isto representa um acréscimo de 4,2 kg/ha num período de dez anos, tendo em vista que em 2002 o valor foi de 2,7 kg/ha.

Quanto aos resultados da análise por classes de periculosidade ambiental, as classes III (produto perigoso) e II (produto muito perigoso) foram as mais representativas no período 2009-2012, tendo participado com 64,1% e 27,7%, respectivamente, do total dos agrotóxicos comercializados em 2012. A classe IV (produto pouco perigoso) apresentou crescimento contínuo no período analisado. Em 2012, as classes de agrotóxicos mais comercializados foram os herbicidas (62,6%), seguidos pelos inseticidas (12,6%) e fungicidas (7,8%) (IBGE, 2015). Lopes (2010) afirma que a quantidade de agrotóxicos utilizados nos plantios nacionais atinge de forma grave os consumidores, especialmente depois de 2008, quando o Brasil passou a ser o maior usuário de agrotóxico no mundo.

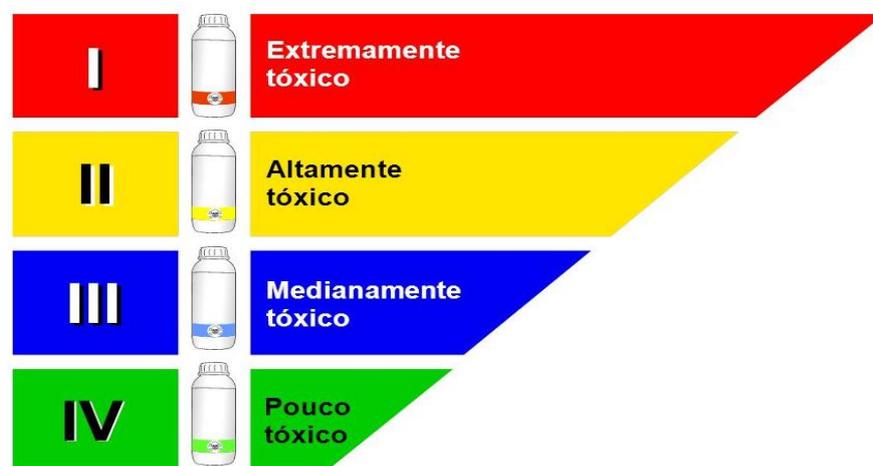


Figura 1- Classificação toxicológica

Desde a década de oitenta, o Ministério da Saúde e secretarias da saúde de alguns estados brasileiros, em conjunto com a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), vem envidando esforços no sentido da articulação institucional em prol do desenvolvimento do que foi nomeado como Programa de Vigilância a Populações Trabalhadoras Rurais Expostas a Agrotóxicos.

O Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX, 2012) tem como principal atribuição coordenar a coleta, a compilação, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no país. Os registros são realizados pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Ciats), localizados em vários estados brasileiros, parte deles integrantes da Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Renaciat). As notificações são encaminhadas ao Sinitox, responsável pela consolidação e divulgação anual dos dados, em âmbito nacional. Também desenvolve atividades de pesquisa nas áreas de intoxicação, informação em saúde e saúde pública, contribuindo para o

enriquecimento destas discussões no cenário brasileiro de intoxicação e envenenamento, principalmente no que concerne a questões preventivas (BRASIL, 2009).

2.4 Contaminação dos solos

Avanços importantes no cenário regulatório ocorreram nesses 20 anos pós Rio+, com destaque para a publicação da Lei 9.974, de 2000 (BRASIL, 2000), que estabeleceu diretrizes para o recolhimento das embalagens vazias de agrotóxicos e a promulgação do Decreto 4.074, de 2002, que regulamenta a Lei 7.802/89, importante documento jurídico que abordou temas relevantes relacionados à saúde humana e à proteção ambiental, com destaque para a criação do Sistema de Informação sobre Agrotóxicos (SIA), introdução dos produtos equivalentes, proibição de produtos sem antídotos, criação do Comitê Técnico de Assessoramento para Agrotóxicos (CTA), além do estabelecimento da exigência legal visando a implementação da avaliação de risco destes compostos, tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente.

Segundo a Embrapa (2006), a avaliação do risco ambiental, utilizando modelos matemáticos, é de extrema importância, pois permite a avaliação de um conjunto de cenários que não seria possível por meio exclusivamente de monitoramentos.

Importante estímulo ao consumo advém da diminuição dos preços e da absurda isenção de impostos dos agrotóxicos, fazendo com que os agricultores utilizem maior quantidade por hectare (PIGNATI; MACHADO, 2011). Quanto aos fertilizantes químicos, a média de consumo por hectare continuou no mesmo nível no período.

O impacto do aumento da produção de bens agrícolas no ambiente é notado pela perda da biodiversidade e da qualidade dos recursos hídricos. Os estudos de monitoramento de resíduos de agrotóxicos têm aumentado ano a ano e sinalizado que resíduos de agroquímicos estão presentes nos alimentos (BRASIL, 2016), na atmosfera (MOREIRA, et al., 2012), nas precipitações secas e úmidas, como chuvas (NOGUEIRA et al., 2012) e águas superficiais e subterrâneas (DORES et al., 2008). Referidos efeitos podem ser diminuídos se forem aplicadas técnicas agrícolas adequadas à conservação desses recursos, como terraceamento, curvas de nível, plantio direto e rotação de culturas. Todas essas medidas reduzem a compactação e o escoamento superficial e também a erosão, a qual pode carregar pesticidas adsorvidos às partículas.

2.5 Bioremediação

Os solos utilizados intensamente e de forma inadequada são levados à degradação. No mundo há dois bilhões de hectares de solos degradados, segundo a ONU e 100 milhões estão no Brasil (EMBRAPA, 2006).

Segundo Schenberg (2010), os processos biotecnológicos contribuem significativamente para promover o desenvolvimento sustentável, embora possam, por enquanto, não ser ainda competitivos em relação às tecnologias convencionais.

O procedimento para remediação e consequente recuperação dessas áreas é lento e está relacionado à capacidade de restabelecimento do solo, onde se recompõem as características químicas, físicas e biológicas a um nível mínimo, que permita o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana, tão importante para o estabelecimento e sucessão da microbiota (MENDES FILHO et al., 2010).

A estratégia de biorremediação consiste na utilização de processo ou atividade biológica por meio de organismos vivos (micro-organismos e plantas), que possuam a capacidade de modificar ou decompor determinados poluentes, transformando, assim, contaminantes em substâncias inertes (JACQUES et al., 2010).

Segundo Atlas (1981), a introdução de microrganismos exógenos que sintetizam os hidrocarbonetos são distribuídos após acidentes que envolvem contaminação do meio ambiente, mostra através de seus estudos a eficácia de biorremediação aumentando as taxas de biodegradação em torno de 3-5 vezes maior e mais rápida em relação a ação apenas da natureza.

2.6 Biodegradação em solos

A perda de solo por erosão, a redução da matéria orgânica e a compactação são alguns dos fatores que concorrem para a degradação física do solo, com consequente perda de uma ou mais destas funções. Dexter e Youngs (1992) argumentam que a quantificação e a compreensão das alterações físicas do solo devidas ao seu uso e manejo são fundamentais para o estabelecimento de sistemas agrícolas sustentáveis.

Botelho et al. (2013) refere que um ecossistema degradado é aquele que após distúrbios, teve eliminados, com a vegetação, os seus meios de regeneração biótica.

Nascimento (2007) inclui a degradação ambiental como consequência das atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem-estar da população; criem condições adversas às atividades sociais e econômicas; afetem

desfavoravelmente os fatores bióticos; afetem as condições estéticas ou sanitárias do Meio Ambiente e lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais estabelecidos.

Silva (2017) descreve que o homem desde a pré-história interfere consciente ou inconscientemente no meio ambiente, mais especificamente na distribuição da vegetação, seja pela dispersão de sementes durante processos migratórios, pela proteção de espécies consideradas úteis ou sagradas, pela seleção de espécies para domesticação, pela caça ou domesticação de animais XI Congresso Nacional de Excelência em Gestão 13 e 14 de agosto de 2015 6 necessários à polinização de espécies da floresta ou através de outros processos que envolvem fatores bióticos e abióticos.

2.7 Microrganismos degradadores

A biorremediação também pode ser limitada se as condições do solo não forem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores. A umidade do solo é considerada por Haider (1999) o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos. Além disso, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pela degradação dos HAPs.

Em ambientes naturais, o nutriente que normalmente limita o crescimento microbiano é o carbono (C), sendo que os nutrientes inorgânicos estão presentes em quantidades que normalmente excedem as demandas das comunidades microbianas (ALEXANDER, 1999). No entanto, a presença de elevadas concentrações de HAPs no solo com potencial para serem utilizados como substrato para o crescimento dos microrganismos pode fazer com que outros nutrientes, que não o C, tornem-se limitantes. A relação C: N: P de 100:10:1 no solo a ser biorremediado tem sido normalmente recomendada (CHENG et al., 2001). Entretanto, as pesquisas que avaliaram os efeitos da adição de N e P ao solo demonstraram resultados muito conflitantes, o que provavelmente se deve às especificidades de cada ambiente, no que se refere a teores de nutrientes no solo, tipo de contaminante e população microbiana envolvida (LEYS et al., 2005).

REFERÊNCIAS

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2. ed. New York: Academic, 1999.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, 04 de janeiro de 2002**. Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 2002. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm>. Acesso em: abr. 2018.

_____. **Lei no 8.080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, da organização e funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências (Lei Orgânica da Saúde). Diário Oficial da União, Brasília, DF, 1990.

_____. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Anuário Estatístico do Brasil 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015.

_____. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 1989. Disponível em: <www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm>. Acesso em: abr. 2018.

_____. **Lei nº 8080, de 19 de setembro de 1990**. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 20 set. 1990, Seção1.

_____. **Lei nº 9.974, de 6 de junho de 2000**. Altera a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 2000. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9974.htm>. Acesso em: abr. 2018.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (Para)**. Relatório anual. Brasília: ANVISA, 2016

_____. Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. **Projeto Avaliação e Controle da Exposição Humana e ambiental a Agrotóxicos no Distrito Federal**. Brasília: Fiocruz, 2009.

_____. Ministério da Saúde. **Plano Integrado de Ações de Vigilância em Saúde Relacionadas a Agrotóxicos**. 2015. Disponível em:

<Portalarquivos.saude.gov.br/imagens/pdf/2015/setembro/02/Plano- MA. >Acesso em: abr. 2017.

BAELUM, J.; JACOBSEN, C.S.; HOLBEN, W.E. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2, 4- dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 67-70, 2010.

BOTELHO, L.S. et al. Performance of common bean seeds infected by the fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. **Journal of Seed Science**, v. 35, p. 153-160, 2013.

BULL, D.; HATHAWAY, D. **Pragas e venenos, agrotóxicos no Brasil e no terceiro mundo**. Petrópolis: Vozes, 1986.

BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4, 2004, Rio Claro. **Anais...** Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.

CELIS, E.; ELEFSINIOTIS, P.; SINGHAI, N. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. **Water Research**, v.42, p.3218-3224, 2008.

CHEN, Y. C. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 4042-4051, 2001.

CHOWDHARY, A. et al. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var.*grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p.961-967, 2011.

DEXTER, A.R.; YOUNGS, I.M. Soil physics toward 2000. **Soil Till. Res.**, v. 24, p. 101-106, 1992.

DOELMAN, P.; BREEDVELK, G. In situ versus on site practices. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA, 1999.

EMBRAPA. **Viabilidade ambiental e econômica de dejetos de suínos**. Sete Lagoas-MG: EMBRAPA, 2006. ISSN 1518- 4277, Doc-59.

FARIA-RAMOS, I. et al. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 155, 2014.

FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

FRANCO, A.A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA – CNPAB, 1992.

FREIRE, R.S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p.504-511, 2000.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

GONZÁLEZ, A. J. et al. Degradation and detoxification of the herbicide 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) by an indigenous *Delftia* sp. Strain in batch and continuous systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.66, p.8-13, 2012.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in *Allium*. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291, 1982.

_____. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999.

IBGE, 2015

JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.280-287, 2010.

KONRADSEN, F. et al. Reducing acute poisoning in developing countries-options for restricting the availability of pesticides. **Toxicology**, v. 192, p.249-261, 2003.

]

LYZNICKI, M. S., 1997. Educational and information strategies to reduce pesticide risks. *Preventive Medicine*, 26:191-200

LOPES, M. E. B. M. **Agrotóxico na imprensa: análise de algumas revistas e jornais brasileiros**. Piracicaba: Esalq/USP, 2010.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa, 2008.

MENDES FILHO, P. F. et al. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 208, n.1/4, p.79-89, 2010.

PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.

PORTO, M. F.; SOARES, W. L. Modelo de desenvolvimento, agrotóxicos e saúde: um panorama da realidade agrícola brasileira e propostas para uma agenda de pesquisas inovadoras. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 37, n. 125, p.17-50, 2012.

PROGRAMA Nacional de Agricultura Familiar, 2005

ROMEIRO, R. S. **Controle biológico de doenças de plantas: fundamentos**. Viçosa: Universidade Federal Viçosa, 2007.

SCHEMBERG, A. C. G. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. **Estudo av.**, São Paulo, v. 24, n. 70, 2010.

SILVA, J. M. Impactos macroeconômicos de desenvolvimento agropecuário. **Revista de Economia e agronegócio-REA**, 2015. Disponível em: <rea.ufv.br>. Acesso em: 18 abr. 2017.

SINITOX. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas**. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 2012.

TAVELLA, L.B. et al. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, abr./jun. 2011.

ZHOURI, A. Justiça ambiental, diversidade cultural e accountability: desafios para a governança ambiental. **Rev. bras. Ci. Soc.**, São Paulo, v. 23, n. 68, p. 97-107, out. 2008.

Artigo Biorremediação de Solo Contaminado com Agroquímico por Microbiota Endógena

Article Bioremediation of Soil Contaminated with Agrochemical by Endogenous Microbiota

Celso Henrique Jorge Costa^a, Thaís Castelo Branco^a, Jhessica Martins Ribeiro^b, Bruna de Oliveira Melo^c, Rodrigo Assunção de Holanda^c, Maria Rosa Quaresma^d, Keily Dammily Costa Menezes^b, Osman José de Aguiar Gomes Gerude^b, Maria Raimunda Chagas Silva^a
Rita de C. M. de Miranda^{*a,b}

RESUMO

A utilização de agroquímicos tem aumentado a preocupação com a poluição ambiental, principalmente a do solo, e com o advento da Revolução Verde onde as atividades agrícolas ganharam maior importância e destaque no Brasil. Sabe-se que os defensivos agrícolas causam impactos negativos ao ambiente, modificando com isso, a diversidade microbiana exercendo pressões seletivas em micro-organismos do ambiente, alterando diversas atividades metabólicas. Uma alternativa para o tratamento de solos contaminados com agrotóxicos é a biorremediação, para tal é importante que se estude os aspectos físico-químicos do solo contaminado e se conheça a microbiota ali presente, para se utilizar microrganismos que já estejam com seu aparato enzimático pronto. Nesse contexto, esse trabalho objetivou isolar e selecionar microrganismos de ambiente contaminado com agrotóxico e a aplicação desses organismos na recuperação desse ambiente através de técnicas de biorremediação. Para isso, amostras de solo contaminados com agroquímico da classe dos organofosforado foram coletados de forma sistemática em dois períodos do ano e caracterizados quanto a suas propriedades físico-químicas. Com a finalidade de conhecer a microbiota endógena, foi realizado o isolamento e identificação clássica e molecular dos microrganismos. Destes foram selecionados através de teste colorimétrico do DCPIP, aqueles com capacidade para metabolizar o agroquímico, foi avaliada o potencial de produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase, além da atividade emulsificadora. Posteriormente as melhores condições do processo foram estabelecidas e otimizadas através de metodologias estatísticas. Com as condições otimizadas realizou-se o ensaio em escala laboratorial, em reatores de solo de bancada, onde se avaliou a atividade biológica, a toxicidade do agrotóxico e produtos de degradação e a degradação do agrotóxico por CLAE. Foram isolados os três grupos microbianos, bactérias fungos e leveduras, pelas técnicas clássicas observou-se um predomínio de bactérias Gram positivas, enquanto a identificação molecular mostrou haver uma frequência de bactérias Gram negativas no solo. Já os fungos foram identificados os gêneros *Aspergillus* sp. *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp. e *Coccidioide* sp. Dos microrganismos isolados, 39 foram selecionados macromorfolologicamente para o teste de seleção do DCPIP, os que se apresentaram mais promissores foram avaliados quanto a capacidade de produzir enzimas oxidativas e atividade emulsificadora. Dois microrganismos foram selecionados por apresentarem um potencial para a remediação do solo, o fungo *Trichoderma* sp. (F1) e a levedura *Cândida glabrata* (L3). Com estes organismos realizou-se os 11 experimentos preconizados pelo planejamento experimental e observou-se que para ambos, as melhores condições do processo, estabelecidas pela atividade biológica foi quando se inoculou 8 bloquinhos em solo contaminado com 35% de agrotóxico. Com essas condições foi realizado tratamento de solo em escala laboratorial onde observou-se que o

agrotóxico é extremamente tóxico para os modelos de toxicidade testados, entretanto os processos de bioamentação favorece a degradação do agrotóxico no solo. Com tudo que foi realizado pode-se concluir que os microrganismos são aptos para a degradação podendo ser utilizado em um modelo de recuperação para ambientes contaminados com agrotóxico.

Palavras-chave: Ambiente. Agroquímicos. Microrganismos. Biorremediação.

^aUniversidade Ceuma, Mestrado em Meio Ambiente, Rua Josué Montello, nº01, Renascença II, 65075-120, São Luís-MA, Brazil.

^bUniversidade Ceuma, Graduação em Engenharia Ambiental, Rua Josué Montello, nº01, Renascença II, 65075-120, São Luís-MA, Brazil.

^cUniversidade Ceuma, Graduação em Biomedicina, Rua Josué Montello, nº01, Renascença II, 65075-120, São Luís-MA, Brazil.

^dUniversidade Ceuma, Mestrado em Biologia Microbiana, Rua Josué Montello, nº01, Renascença II, 65075-120, São Luís-MA, Brazil.

*Autor de Correspondência:

Tel/Fax: +55-98-992135500. E-mail: ritamend30@gmail.com

ABSTRAT

The use of agrochemicals has increased concern with environmental pollution, especially soil pollution, and with the advent of the Green Revolution, where agricultural activities have become more important and prominent in Brazil. It is known that agricultural pesticides cause negative impacts to the environment, thereby modifying microbial diversity by exerting selective pressures on microorganisms in the environment, altering several metabolic activities. An alternative for the treatment of soils contaminated with agrochemicals is bioremediation. For this it is important to study the physicochemical aspects of the contaminated soil and to know the microbiota present, to use microorganisms that are already with their enzymatic apparatus ready. In this context, this work aimed to isolate and select microorganisms from the environment contaminated with pesticides and the application of these organisms in the recovery of these environment through bioremediation techniques. For this, soil samples contaminated with agrochemical of the organophosphorus class were collected systematically in two periods of the year and characterized as to their physicochemical properties. With the purpose of knowing the endogenous microbiota, the isolation and classic and molecular identification of the microorganisms was carried out. From these were selected by means of colorimetric test of the DCPIP, those with capacity to metabolize the agrochemical, the potential of the enzymes lacase, lignin peroxidase and manganese peroxidase were evaluated, besides the emulsifying activity. Subsequently the best conditions of the process were established and optimized through statistical methodologies. Under optimized conditions, the laboratory-scale test was carried out in bench-top reactors, where the biological activity, the toxicity of the pesticide and degradation products and the degradation of the pesticide by HPLC were evaluated. The three microbial groups, fungi and yeasts were isolated. Classical techniques showed a predominance of Gram positive bacteria, while molecular identification showed a frequency of Gram negative bacteria in the soil. Already the fungi were identified the genera *Aspergillus* sp. *Penicillium* spp., *Trichoderma* sp. and *Coccidioide* sp. Of the microorganisms isolated, 39 were selected macromorphologically for the DCPIP selection test, the most promising ones were evaluated for their ability to produce oxidative enzymes and emulsifying activity. Two microorganisms were selected because they present a potential for soil remediation, the fungus *Trichoderma* sp. (F1) and yeast *Candida glabrata* (L3). With these organisms, the 11 experiments were carried out by the experimental planning and it was observed that for both, the best conditions of the process established by the biological activity were when 8 blocks were inoculated in soil contaminated with 35% of pesticide. With these conditions soil treatment was carried out on a labotarorial scale where it was observed that the pesticide is extremely toxic to the toxicity models tested. However, the bio-oxidation process favors the degradation of the pesticide in the soil. With everything that has been accomplished it can be concluded that the microorganisms are apt for the degradation and can be used in a recovery model for environments contaminated with agrototoxic.

Keywords: Environment. Agroquímicos. Microrganismos. Biorremediação.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de agroquímicos tem aumentado a preocupação com a poluição ambiental, principalmente a do solo. Entre os compostos dessa natureza utilizados, os herbicidas são os mais comercializados no mundo em face da necessidade de controle de ervas indesejável na agricultura (ARAÚJO, 2002).

Atualmente, o Brasil é o maior consumidor mundial de agroquímicos e de acordo com um levantamento feito pela Associação Brasileira de Saúde Coletiva (ABRASCO), anualmente são usados mais de 850 milhões de litros de agrotóxicos, o que corresponde a uma exposição média ambiental/alimentar de mais de 4 litros por indivíduo. Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA, 2006), esses produtos são classificados em 4 níveis de acordo com a toxicidade, que vão desde classe I (que são os extremamente tóxicos, identificados pela faixa vermelha) até os produtos da classe IV (que são os produtos pouco tóxicos, identificados pela faixa verde). O Maranhão está entre os 10 principais estados consumidores de agrotóxicos no País. Embora alguns defensores do uso de agroquímicos afirmem que estas substâncias são seguras e os resíduos gerados além de mínimos, causam pouco impacto negativo ao ambiente, os trabalhos científicos apontam que os efeitos agudos e crônicos gerados pelo uso de agroquímicos na saúde humana e no meio ambiente, mesmo aqueles classificados como menos tóxicos, são alarmantes e vão desde a manifestação de doenças neurológicas, endócrinas até mesmo o surgimento de câncer. No ambiente, deve-se levar em consideração a possibilidade de contaminação da água, causando poluição nos mananciais interferindo na dinâmica do solo, ciclagem de nutrientes podendo causar a mortandade de aves e peixes (PERES; MOREIRA, 2003; TAVELLA et al., 2011).

Os agrotóxicos mais usados no Brasil são os herbicidas, que representam quase metade do consumo de agroquímicos (48%), entre os quais se destaca o uso de glifosato. Em seguida, aparecem os inseticidas (25%) e os fungicidas (22%). Estes últimos apresentam baixa toxicidade às células de mamíferos e o seu maior impacto ambiental é a toxicidade contra fungos benéficos do solo (TAVELLA et al., 2011).

Uma das principais finalidades do uso de agroquímicos é inibir o crescimento de patógenos frequentes na agricultura e de um modo geral possuem estruturas químicas e moleculares semelhantes a classes de antimicrobianos usados na clínica. Estes compostos possuem similaridade estrutural com azólicos clínicos e alguns passaram a ser proibido no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), motivado principalmente pela

elevada toxicidade do produto (CHOWDHARY et al., 2011; FARIA-RAMOS et al., 2014; BRASIL, 2016).

A elevada toxicidade desse herbicida e de seu produto de degradação exige que se encontrem formas de eliminá-lo sem causar e/ou minimizar seus danos ao ambiente. A degradação biológica da molécula do contaminante (herbicida) em produtos menos tóxicos representa uma das formas de proteger o ambiente e de recuperar locais já contaminados. Nesse processo, denominado de biorremediação, o composto degrada-se completamente ou parcialmente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal, como CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S e HCL (MELO; AZEVEDO, 2008). Com isso, as técnicas de biorremediação tem despertado o interesse de vários pesquisadores (DOELMAN; BREEDVELK, 1999; FREIRE et al., 2000; BRITO et al., 2004; CELIS; ELEFSINIOTIS; SINGHAI, 2008; BAELUM; JACOBSEN; HOLBEN, 2010; GONZALÉZ et al., 2012). O processo de biorremediação de herbicidas no solo é mediado por micro-organismos, dentre os quais as bactérias, podendo variar de apenas dias até anos para que ocorra o completo desaparecimento da molécula (GAYLARD; BELLINASO; MANFIO, 2005). Nesse sentido, a inoculação de micro-organismos previamente selecionados para aumentar a velocidade de degradação vem sendo apontada como alternativa de recuperação de ambientes poluídos (FRANCO et al., 1992). A utilização de micro-organismos na biorremediação tem se mostrado eficiente para biodegradar moléculas xenobióticas (estranhas ao ambiente natural) e recalcitrantes (de difícil degradação), devido sua capacidade para reciclar várias moléculas da biosfera, participando de diversos ciclos dos elementos químicos (GAYLARD; BELLINASO; MANFIO, 2005). A biodegradação dos herbicidas sofre influência das propriedades quantitativas e qualitativas da comunidade microbiana do solo, a qual definirá maior ou menor cota de degradação, além da disponibilidade do composto para os micro-organismos. Segundo Araújo (2002), a ação de micro-organismos sobre os herbicidas constitui mecanismo da maior importância, pois a degradação microbiológica, na maioria dos casos, contribui para a dissipação da molécula no ambiente. A maioria dos estudos consultados sobre os efeitos de agrotóxicos em micro-organismos do solo envolve experimentos de laboratório voltados para a aplicação de determinado composto. No campo, um ou mais agrotóxicos podem ser repetidamente aplicados no mesmo solo por vários anos e deixar resíduos com efeitos danosos sobre a biomassa microbiana.

Outro aspecto que precisa ser considerado é a geração de composto durante o processo de biodegradação do agroquímico. É interessante que se investigue a toxicidade dos metabólitos gerados durante o processo de biorremediação, para isso se faz necessário a escolha de organismos que sejam eficientes para esta finalidade. Os vegetais superiores têm

características que os fazem excelentes modelos genéticos para medir poluentes ambientais, sendo frequentemente usados em estudos de monitoramento. Todavia, esses fatores não são apenas devido a sensibilidade para detectar agentes mutagênicos em diferentes ambientes, mas principalmente, a possibilidade de identificar pelo teste diversas alterações genéticas, com uma ampla faixa de pontos de mutação nas alterações cromossômicas em células de diferentes tecidos tais como raízes, folhas e pólenes. Atualmente, dentre as espécies mais utilizadas como organismos testes no biomonitoramento ambiental se destacam: *Allium cepa*, *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia* spp., *Nicotiana tabacum*, *Crepis capillaris* e *Hordeum vulgare* (GRANT, 1994). Dentre as espécies mais utilizadas como sistemas teste, *A. Cepa* se destaca pela facilidade de se observar danos nos cromossomos e alterações nos ciclos celulares, pelo fato de que o cromossomo deste vegetal é grande e em número reduzido ($2n=16$). Por isso, este sistema teste tem se mostrado eficaz na detecção de químicos ambientais (FISKESJO, 1985). A espécie *A. cepa* tem sido considerada pela “Royal Swewish Academy of Science” (FISKEJÖ, 1985) e pelo “Gene-Tox Program” (GRANT, 1982) como um material-teste padrão para detecção de possíveis danos genéticos resultantes da poluição ou do uso de químicos ambientais.

Dessa forma este trabalho objetiva estabelecer um protocolo de recuperação de solo contaminado com agrotóxico da classe dos organofosforado por microbiota endógena.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Local da coleta e Agrotóxico

O solo tratado neste trabalho foi coletado em uma propriedade de agricultores familiar que cultivava hortaliças no Município de J. Lima em São José do Ribamar - MA. Essa propriedade foi selecionada pelo uso semanal de agrotóxico pelos trabalhadores na propriedade.

O agrotóxico utilizado ao longo de todo o trabalho é o O-dietil O-3,5,6-trichloro-2-piridil phosphorothioato (Klorpan 480 EC), um inseticida da classe dos organofosforados cuja classificação toxicológica é extremamente tóxico. Esse agrotóxico foi selecionado para ser testado pelo uso constante do mesmo, no local da coleta do solo.

2.2 Coleta e Caracterização Físico-química do Solo

Com finalidade de comparar dois períodos sazonais, foram realizadas 2 coletas de solo impactado pelo uso de agroquímico da classe dos organofosforados nos meses de janeiro

(solo 1) e maio (solo 2) A coleta foi realizada de forma sistemática onde dez pontos equidistantes, cerca de 3m foram coletados obedecendo a profundidade de 20cm. As amostras foram acondicionadas separadamente em sacos plásticos e encaminhadas para análise. Os solos foram misturados para formar uma amostra composta e alíquotas para realização das análises. Posteriormente os microrganismos isolados foram armazenados a 4°C.

As análises das propriedades físico-químicas dos solos coletados nos meses de janeiro (solo 1) e maio (solo 2) foram realizadas com o objetivo de se conhecer as propriedades químicas e físicas do solo. Para tal foram realizadas análises físico-químicas do mesmo, coletados em 10 pontos e misturadas formando uma amostra composta, onde foram determinados os teores de matéria orgânica, pH, umidade e granulometria com base na metodologia preconizada por Alef (1995).

2.3 Isolamento e Identificação dos Microrganismos do Solo

O isolamento dos microrganismos foi realizado segundo a técnica de Clark, em 1965, no qual 10g de solo foram adicionados a 90 ml de água destilada esterilizada. Posteriormente foram feitas diluições seriadas de 1:10 até a diluição de 10^{-5} . Um volume de 0,1mL foi inoculado em meios de cultura seletivos pela técnica de espalhamento e as placas foram incubadas a $28^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ por no máximo 05 dias. Posteriormente, as características macromorfológicas das colônias foram observadas e estas foram então purificadas e repicadas para tubo de ensaio. Estas colônias foram armazenadas em geladeira a 4°C até a completa identificação. .

Os microrganismos presentes no solo foram identificados através de técnicas clássica e molecular.

Para identificação e estudo dos aspectos micromorfológico dos fungos filamentosos foi realizada a técnica de microcultivo para observação dos arranjos de hifas e esporos (PITT, 1988, 1991; DOMSCH et al. 2007; SAMSON; FRISVAD, 2004).

As bactérias serão identificadas quanto a morfologia, arranjo e coloração tintorial de parede celular, através do teste de Gram para os principais grupos bacterianos conhecidos.

A identificação molecular dos fungos isolados foi realizada a partir da extração e amplificação do DNA das regiões ITS-1, ITS-2 e subunidade 5.8 S do rDNA foram utilizados

Os *primers* ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') e ITS 5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'), conforme White et al. (1990).

As regiões de ITS-rDNA serão amplificadas em um termociclador, nas seguintes condições: 4 minutos a 95°C, seguido de 40 ciclos de 1 minuto a 92°C, 1 minuto a 55°C e 2 minutos a 72°C e, por último, uma etapa de 5 minutos a 72°C para extensão final. Os produtos de amplificação dos loci ITS1-5.8S-ITS2 do rDNA e o DNA Ladder 1kb plus (Fermentas) foram separados por eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão de corrida TBE 1X (pH 8,0) e fotografados em foto documentador de luz ultravioleta. As linhagens de microrganismos ambientais foram posteriormente identificadas por meio de sequenciamento dos produtos de PCR conforme descrito anteriormente (CHEN et al., 2001; RAKEMAN et al., 2005).

2.4 Seleção Qualitativa de Isolados Ambientais

A seleção qualitativa foi realizada utilizando a técnica do indicador redox 2,6-diclorofenol - indofenol (DCPIP) de acordo com metodologia preconizada por Hanson, Desai e Desai (1993). O princípio do teste consiste em uma transferência de elétrons até os aceptores como oxigênio, nitrato e sulfato, durante a oxidação microbiana dos compostos, ao incorporar um acceptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultivo, é possível verificar a capacidade dos microrganismos em utilizar os compostos xenobióticos como substrato pela observação da mudança da coloração do DCPIP de azul (oxidado) para incolor (reduzido).

Esses ensaios foram realizados em placas de 96 poços contendo 540µL de meio Bushnell Haas – BH, pH 7,0; 400 µL de uma suspensão microbiana padronizada em 10⁸UFC/ml, 10 µL do agroquímico e 50µL do indicador redox Diclorofenol Indofenol (DCPIP). Todos os ensaios foram realizados em triplicata, além dos controles abiótico (indicador, agroquímico e meio BH) e biótico (suspensão microbiana, glicose, indicador e meio BH) e mantido a 30°C em condições estáticas por um período de até cinco dias.

2.5 Seleção quanto a produção de Metabólitos de Interesse

A fim de avaliar se as linhagens selecionadas no ensaio qualitativo produziam compostos de interesse que indicassem alguns mecanismos de ação, as cepas promissoras foram avaliadas quanto a sua capacidade de produzir enzimas oxidativas e quanto ao Índice de Emulsificação (IE₂₄). Para tal as linhagens padronizadas em 10⁸UFC/ml foram cultivadas em frascos Erlenmeyer (250mL) contendo 50mL de meio Bushnell Haas utilizando agrotóxico como fonte de carbono. Os frascos foram incubados sob agitação de 180rpm por cinco dias, o

meio foi então filtrado e o extrato foi utilizado para a caracterização enzimática e a avaliação da atividade emulsificante.

2.5.1 Caracterização Enzimática

Com os microrganismos que apresentaram melhor resultado no teste de seleção qualitativo foi realizado a caracterização quanto a produção de enzimas oxidativas.

As enzimas Lacase (Lac), Lignina Peroxidase (Lip) e Manganês Peroxidase (MnP) foram quantificadas após cinco dias de incubação.

A atividade de Lac foi determinada de acordo com o método descrito por Buswell et al. (1995), em que 100 µl de tampão de acetato de sódio 0,1 M (pH 5,0), 800 µL de 0,03% (m/v) de solução de ABTS (2,2-azino-bis- (3-etilbenzotiazolino-6-sulfonato) e 100 µL do extrato enzimático foram utilizados e a atividade enzimática, descrita em termos de unidades enzimáticas (U), foi determinada como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µmol do substrato por minuto.

A MnP foi avaliada de acordo com metodologia descrita por Kuwahara et al. (1984), onde foram utilizados 250µL do extrato enzimático, juntamente com 100 µL de fenol vermelho (0,01% p/v), 50µL de MnSO₄ (2mM) e 50µL de peróxido de hidrogênio (20 mM, pH 4,5) A mistura foi incubada a 30°C por 10 min, e em seguida foi adicionado 100µL de NaOH 2 N à reação. A absorvância foi registrada em 610 nm uma unidade de enzima (1U) é descrita como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1,0 µmol de vermelho de fenol por minuto, sendo o coeficiente utilizado no cálculo para obter U foi $\epsilon = 4466 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A enzima LiP foi medida seguindo a metodologia descrita por Buswell et al. (1995) onde uma reação de 1000 ml de tampão tartarato de sódio a 125 mM (pH 3,0), 500 ml de álcool veratrílico a 10 mM, 500 ml de peróxido de hidrogênio a 2 mM e 500 ml do extrato enzimático foi realizada. A absorvância foi determinada a 310 nm aos 5 min de reação. Uma unidade de enzima (1U) é equivalente a 1 µmol do produto formado por minuto. O coeficiente utilizado para o cálculo para obter U foi $\epsilon = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. A atividade enzimática específica foi descrita como $\mu\text{mol min}^{-1}$.

2.5.2 Avaliação da Atividade Emulsificante

A atividade emulsificante foi avaliada adicionando 6 ml de querosene a 4 ml do extrato microbiano e submetendo a agitação vigorosa durante 2 min. As medições foram feitas

24 horas depois. O índice de emulsificação foi avaliado (IE_{24}), conforme a equação 1 segundo metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987).

$$IE_{24} = \frac{\text{altura da camada de emulsificação}}{\text{altura total}} \times 100 \quad \text{Equa 1.}$$

2.6 Determinação das Melhores Condições do Processo para Atividade Microbiana

A metodologia de planejamento experimental é amplamente utilizada para minimizar o volume de experimento quando é necessário estabelecer as condições específicas de um processo.

As condições do processo de degradação do agrotóxico no solo foram estabelecidas em frascos estáticos por um período de 30 dias. Para isso foi utilizado a metodologia do planejamento experimental fatorial fracionado (2^n) do tipo Delineamento Central Composto Rotacional (DCCR), que consiste de dois níveis (-1, +1), dois pontos axiais (-1,41 e +1,41) e três pontos centrais, totalizando 11 experimentos. A matriz experimental, bem como as análises dos resultados serão processadas com o auxílio do software Statistic® 8.0. As variáveis independentes foram as concentração do agroquímico e inóculo, e a variável dependentes do processo foi a atividade biológica no microcosmo conforme pode ser visualizado na Tabela 1.

Com as condições do processo selecionadas, os valores ótimos serão estabelecidos utilizando a metodologia estatística de Superfície Resposta. Para isto foi utilizado o software Statistic® 8.0.

Tabela 1 – Matriz do Planejamento Experimental Fatorial do Tipo Central Composto Rotacional (DCCR) com as variáveis dependentes e independentes do processo.

Corridas	Variáveis independentes				Variável dependente
	Valores codificados		Valores reais		Atividade Biológica
	Inóculo	Agroquímico (%)	Inóculo	Agroquímico (%)	
1	-1	-1	1	3	
2	+1	-1	7	3	
3	-1	+1	1	4	
4	+1	+1	7	4	
5	-1,41	0	0	3,5	
6	+1,41	0	8	3,5	
7	0	-1,41	4	1	
8	0	+1,41	4	6	
9	0	0	4	3,5	
10	0	0	4	3,5	
11	0	0	4	3,5	

2.6.1 Ensaio de Atividade Biológica

A atividade biológica do solo foi mensurada através da avaliação da respiração basal do solo por meio de titulação volumétrica utilizando método proposto por Alef (1995) como a variável resposta do planejamento experimental. Para tal foram utilizados frascos contendo o solo, umidade ajustada e concentrações variadas de agroquímico conforme previsto no planejamento. Para avaliação do CO₂ demandado foram colocados nos frascos, pequenos recipientes contendo 10ml de NaOH. Durante o período de incubação (cerca de 23 dias), o conteúdo dos recipientes foi regularmente substituído e, após a adição de 10 ml de BaCl₂ e 2 gotas de fenolftaleína, titulado em HCl, para determinar as concentrações de CO₂. A taxa de respiração em mg de C-CO₂ evoluído foi calculada por meio da equação 2:

$$(C - CO^2) = (B - V) \times M \times \sigma \times \left(\frac{V1}{V2}\right) \text{Equa 2}$$

Onde B é o volume de HCl usado na bureta, V o volume de HCl utilizado para titular a amostra, M a molaridade real de HCl, 6 é a massa atômica do C (12) dividida pelo número de mols de CO₂ que reagem com o NaOH (2), V1 a quantidade de NaOH usado nos frascos e V2 a quantidade de NaOH usada na titulação.

2.7 Avaliação da Degradação do Agroquímico em Escala Piloto

Os experimentos foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vaz et al. (2012). Onde 10,5kg de solo contaminado com 3,65mL de agrotóxico/grama de solo foi pesada e adicionada a um reator de dimensões 50 x 80 x 24, juntamente com uma solução de 50mL de uma suspensão microbiana padronizada em 10^8 de esporos fúngicos. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente por 30 dias. Para garantir uma umidade suficiente, o solo foi regado periodicamente. Alíquotas do solo foram coletadas a cada três dias para avaliação da atividade biológica e degradação do agrotóxico. As toxicidades aguda, crônica e citotoxicidade serão avaliadas no primeiro, 15 e 30 dias de processo.

2.7.1 Análise de Degradação por Cromatografia de Alta Eficiência (CLAE)

Anterior a análise em CLAE, o agrotóxico e seus produtos de degradação foram extraído do solo, utilizando as técnicas de agitação mecânica e extração assistida por micro-ondas preconizadas por Ribani et al. (2004). O agrotóxico foi extraído de 5g de solo utilizando 10 ml de acetato de etila e 1 ml de água pH 2,5, ajustada com ácido fosfórico. A extração no micro-ondas caseiro foi feita durante 1 min na potência nominal de 20 W e a extração por agitação foi feita por 2 h.

As determinações quali/quantitativas do agroquímico foram realizadas utilizando-se cromatógrafo líquido marca Varian, equipado com uma coluna de fase reversa C-18 Polaris (25 cm x 4,6 mm x 5 μ m), pré-coluna C-18 Polaris (2,5 cm x 4,6 mm x 5 μ m) e detector UV. As análises realizadas por gradiente de eluição utilizando-se 50% acetonitrila grau HPLC e 50% água ultrapura v/v de 0 a 6 min; 100% acetonitrila grau HPLC de 6 a 10 min e 50% acetonitrila grau HPLC e 50% água ultrapura v/v de 10 a 20 min. O comprimento de onda utilizado de 254 nm e fluxo de 1 ml min^{-1} com volume de injeção de 20 μ L a 35°C. Para o cálculo das concentrações realizado a comparação das áreas obtidas no cromatograma, pelo método da calibração externa e identificação pelos tempos de retenção específico para o composto analisado.

2.7.2 Avaliação da toxicidade

A toxicidade do agroquímico e seus produtos intermediários de degradação foram avaliadas através da toxicidade aguda utilizando a larva *Tenebrio molitor* e a espécie de

minhoca *Violeta do himalaia*, com a mesma espécie de minhoca foi avaliada também a toxicidade crônica e a citotoxicidade com células de fibroblasto.

2.7.2.1 Toxicidade Aguda com a larva de *Tenebrio molitor*

A toxicidade aguda foi avaliada empregando modelo *in vivo* da larva *Tenebrio molitor*, onde, com auxílio de uma seringa, foram inoculados 10 µL do controle PBS, do agrotóxico em 10 larvas cada e acondicionada em placas devidamente identificadas. As larvas foram mantidas em temperatura ambiente por um período de dez dias e a cada 24h eram quantificadas as larvas mortas ou que não respondiam a estímulos. Os resultados obtidos foram comparados, observado a discrepância entre os dados analisados, através de teste de significância ($p < 0,05$), além disso, foi montado gráfico da curva de sobrevivência usando o teste de Kaplan-Meier utilizando o software GraphPad Prism 5.0.

2.7.2.2 Citotoxicidade

A avaliação da citotoxicidade do agrotóxico e seus produtos intermediários de degradação foi realizada utilizando a técnica para células aderentes através da avaliação da viabilidade celular, com células de fibroblastos, pela técnica do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio). Para isso foi adicionada 200µL de uma suspensão celular padronizada em 3×10^5 cels/m em cada poço da placa e incubada em estufa de CO₂ a 37°C por 24h. Após este período as células foram tratadas com as soluções controle, o agrotóxico e seus produtos intermediários e as placas foram novamente incubadas em estufa de CO₂ por um período de 48h, o meio foi retirado e os poços lavados com 200 µL de PBS à 37°C, posteriormente foi adicionado 100 µL de uma solução de MTT padronizada à 0,5mg/ml e as placas foram incubadas em estufa de CO₂ por 3h. A solução de MTT foi retirada e adicionado nos poços 100 µL de DMSO (Dimetil sulfóxido) puro. As placas foram agitadas por 5min e depois permaneceram em repouso pelo mesmo período de tempo para realização da leitura à 540nm para a realização dos cálculos de acordo com metodologia preconizada por Jorge et al. (2008).

2.7.2.3 Toxicidade Aguda com a espécie de minhoca *Violeta do himalaia*

Para avaliação das toxicidades aguda e crônica 20 indivíduos foram pesados, lavados com água desionizada e introduzidos nos reatores no T0 com 15 dias e com 30 dias de tratamento a fim de avaliar a toxicidade do agrotóxico e de seus produtos intermediários. Os reatores foram fechados e mantidos a temperatura ambiente, depois de 15 dias, as minhocas mortas foram removidas e os indivíduos vivos contados e pesados. Todos os espécimes foram novamente colocados nos mesmos vasos e após outros 15 dias (30 dias no total), as minhocas mortas foram removidas e as sobreviventes contadas e pesadas para determinação de biomassa úmida.

Para avaliação da toxicidade crônica foi realizado o mesmo procedimento do ensaio anterior e após 30 dias os casulos e juvenis foram cuidadosamente selecionados, contados e pesado. Os ensaios de teste de toxicidade aguda e crônica foram realizados de acordo com a diretriz ISO 11268-28

A perda de biomassa nos ensaios crônicos e agudos foi expressa como a porcentagem de perda em relação ao peso inicial, de acordo com a equação 3:

$$PM = 100 - \frac{(W_x \times 100)}{W_0} \quad \text{Equa. 3}$$

Onde PM é a perda de biomassa, W0 é o peso médio do minhocas de cada réplica (vaso) no início do ensaio e Wx é o peso médio das minhocas encontrado em cada réplica em x dias após o início do ensaio.

Foi gerado um modelo linear para avaliar o efeito dos tratamentos nos parâmetros avaliados (biomassa perda, número do casulo e número juvenil). Todo os dados foram comparados através de análise de variância (ANOVA) considerando $p < 0.05$ com auxílio do Software Statistic 8.0.

2.8 Análises estatísticas

Os resultados foram analisados estatisticamente quanto a diferenças significativas por meio do teste de Log Rank utilizando análise de variância (ANOVA) para verificar a associação entre as variáveis. O nível de correlação entre os parâmetros testados foi avaliado

de acordo com o Índice de Correlação de Spearman. O nível de significância de 95% foi considerado significativamente diferente ($p < 0,05$).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização físico química do solo

As amostras de solo cotaminado com agrotóxico coletadas foram caracterizadas a fim de se conhecer as suas características físicas e químicas. A textura, os teores de matéria orgânica, pH e umidade podem ser visualizados na tabela 2.

Tabela 2 – Características físicas e químicas dos solos contaminados com agrotóxicos coletados no horta de um sítio de agricultura familiar no bairro J. Lima em São José do Ribamar – MA.

Características	Solo 1	Solo 02
Silte	32,40% ^a	32,69% ^a
Argila	03,90% ^b	02,43% ^c
Areia	63,69% ^d	64,89% ^d
Mat.Inorg	87,83% ^e	88,64% ^e
Mat. Orgânica	12,17% ^f	11,36% ^f
pH	06,95 ^h	06,95 ^h
Umidade %	13,76 ⁱ	13,65 ⁱ

Após a caracterização físico-química dos solos 1 e 2 contaminados, observou-se que ambos possuíam um perfil muito semelhante, o que mostra que o período mais e menos chuvoso influenciou pouco na estrutura e nas características químicas avaliadas. A textura de ambos os solos é arenosa o que facilita a percolação e conseqüentemente a disponibilidade do agrotóxico para os micorganismos é diminuída. Ambos são muito mais ricos em material inorgânico (87,83% solo 01 e 88,64% solo 2) do que orgânico, o que pode ser explicado pela presença do agrotóxico, e o pH está em torno da neutralidade (6,95 para ambos os solos) o que favorece a atividade da maioria dos grupos microbianos. A mesma característica pode ser observado quando o parâmetro avaliado é a umidade, em ambos os solos (1 e 2) está em torno de 13%, o que sugere que esse solo não retém muita água em seus poros, o que pode ser confirmado pela textura predominantemente arenosa. Quando realizada a análise estatística das características entre os dois solos coletados nos períodos distintos, o único parâmetro que apresentou diferença estatística significativa foi o teor de argila no solo com $p = 0,032$.

A biorremediação depende diretamente das condições do solo serem favoráveis à sobrevivência e à atividade dos microrganismos degradadores. Haider (1999) considera a umidade o fator ambiental mais crítico na biodegradação, pois uma alta atividade microbiana somente ocorrerá se houver adequada disponibilidade de água aos microrganismos devido, a maioria das reações metabólicas necessárias para a quebra dos compostos xenobióticos ser hidrolíticas. Deve-se considerar que, o teor de água no solo tem relação inversa com a disponibilidade de oxigênio e, conseqüentemente, com a atividade dos microrganismos aeróbios, que são os principais responsáveis pelos mecanismos de degradação. A temperatura afeta a atividade metabólica, o consumo de substrato pelos microrganismos e, por consequência, a biodegradação dos agrotóxicos. Apesar de a biodegradação ocorrer numa ampla faixa de temperatura, as maiores taxas ocorrem entre os microrganismos mesofílicos (25 e 35°C) (HAIDER, 1999). De acordo com o mesmo autor o pH do solo afeta diretamente a atividade dos microrganismos através dos efeitos dos íons H^+ na permeabilidade celular e na atividade enzimática, assim como, indiretamente, pela influência na disponibilidade de macro e micronutrientes e na solubilidade do alumínio e demais metais pesados, que podem ser tóxicos aos microrganismos.

A matéria orgânica é um fator de extrema relevância nos processos de degradação por estarem diretamente relacionadas com os processos de sorção no solo. Segundo Schwarzenbach (1993) a matéria orgânica é a principal matriz hidrofóbica do solo, por ser constituída essencialmente de átomos de carbono (C) e Hidrogênio (H), fazendo com que as ligações de H estejam limitadas a determinados locais de sua estrutura. Além disso, por se encontrarem em um meio hidrofílico, que é o solo, as moléculas de matéria orgânica expõem suas superfícies com carga para o exterior e formar espaços hidrofóbicos em seu interior, nos quais os compostos apolares podem penetrar. Os fenômenos de sorção dos agrotóxicos são influenciados diretamente pelo conteúdo de matéria orgânica, sendo que vários autores demonstraram relações lineares positivas entre o conteúdo de C orgânico do solo e a capacidade de sorção desses compostos (CARMICHAEL; PFAENDER, 1997; NAM; CHUNG; ALEXANDER, 1998; LUEKING et al.,2000).

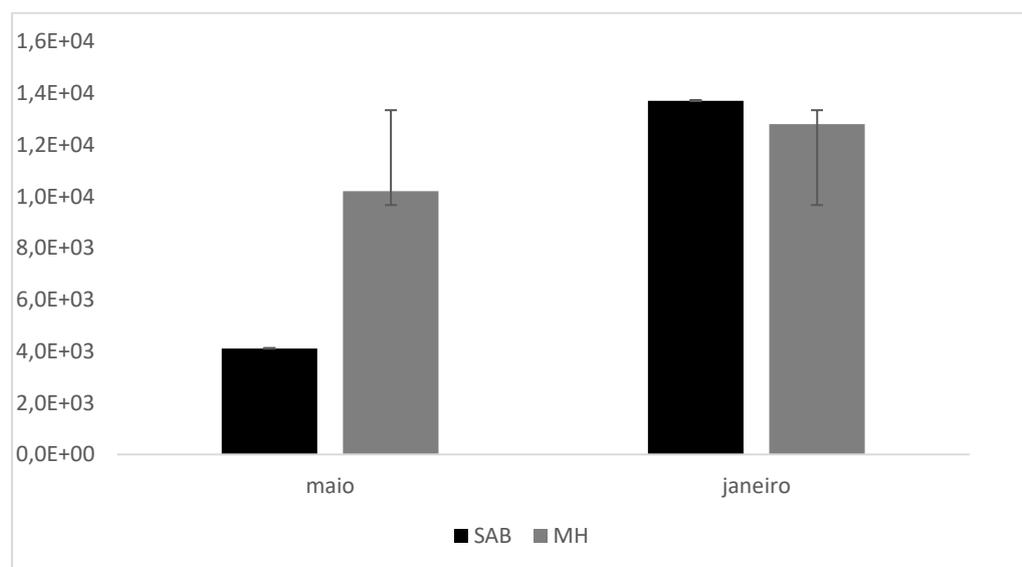
A caracterização do solo continua sendo a maneira mais rápida de conhecer melhor as propriedades desse habitat e entender os efeitos da ação antrópica. Anda, Husnain e Subardja (2015) caracterizou um solo de plantação de arroz na Indonésia. Os autores coletaram solo de várias partes das ilhas indonésias e observaram um perfil similar encontrado neste trabalho. Solo com textura arenosa e baixo teor de matéria orgânica. O único parâmetro que divergiu foi o pH que os autores relataram ser ácido. Corroborando com nossos resultados, os autores

também atribuíram as características físico-químicas encontradas ao uso de compostos químicos no solo. Miguel, Barreto e Pereira (2017) caracterizou um solo contaminado com ferro, manganês e flúor de um mineiro e observou que as características também foram muito semelhantes às encontradas neste trabalho. Solo arenoso, em torno da neutralidade e pobre em matéria orgânica. Os autores relacionaram todas essas características à ação do homem ao longo do processo de extração dos minerais além da contaminação com substâncias químicas utilizadas ao longo do processo. Dias et al. (2017) caracterizou o solo coletado do ecossistema manguezal para o isolamento de microrganismos de interesse biotecnológico. Dos cinco pontos coletados, todos apresentavam um perfil arenoso, dois eram pobres em matéria orgânica e o pH dos cinco pontos coletados era de neutro a alcalino. Os autores atribuíram essas características ao solo ser de um ambiente estuarino, rico em vegetação, o que explica a alta matéria orgânica e a coleta foi feita em período de maré baixa, apresentando o sedimento um perfil arenoso.

3.2 Isolamento e Identificação dos Microrganismos

Após o período de incubação pode-se observar o aparecimento das colônias. Após a contagem, constatou-se que a quantidade de microrganismos no período chuvoso é maior que no período seco em ambos os meios utilizados, como se pode visualizar na Figura 1.

Figura 2 – Isolamento de microrganismos nos meses de maio e janeiro nos meios seletivos Sabouraud Dextrose Ágar (SAB) e Muller Hinton (MH)



Segundo Alexander (1999), o grande número de enzimas envolvidas na degradação de compostos xenobióticos, a maioria dos microrganismos do solo não possui a aparato

metabólico capaz de degradar compostos muito recalcitrantes, justificando a necessidade de se isolar e selecionar microrganismos degradadores, visando a sua utilização na biorremediação de solos contaminados. Para isso é essencial a escolha de meios de cultura que favoreçam o aparecimento desses organismos. O Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) é utilizado para o cultivo de fungos patogênicos e comensais. A alta concentração de dextrose pH ácido da fórmula deste ágar permitem a seletividade dos fungos, já o Muller Hinton (MH) é uma composição de micronutrientes definida com concentrações conhecidas de CaCl_2 , MgCl_2 e ZnCl_2 , bem como peptona e caseína que transmitem os macronutrientes ao meio, favorecendo assim o crescimento de bactérias.

Embora o quantitativo microbiano geral tenha sido maior no mês de janeiro, pode-se observar a constância no aparecimento das bactérias em ambos os períodos. O quantitativo microbiano maior em período chuvoso, se deve provavelmente, a umidade do solo está maior, possibilitando a prevalência de um grupo microbiano. Uma outra observação interessante é a prevalência dos fungos no mês de janeiro, período de maior chuva, este fato pode ser explicado por este grupo permanecer em forma de esporos e se adaptar melhor e condições adversas como a saturação do solo pela água da chuva.

Com a finalidade de fazer uma comparação estatística entre os dois períodos, observou-se que após a análise houve diferença estatística significativa de crescimento dos fungos entre os meses de janeiro e maio com o $p=0.047$. Quando o grupo comprado foi o das bactérias também observou-se uma diferença estatística significativa entre os meses janeiro e maio com $p=0.048$, comprovando um maior quantitativo microbiano no mês de janeiro ocorre uma maior precipitação de chuvas.

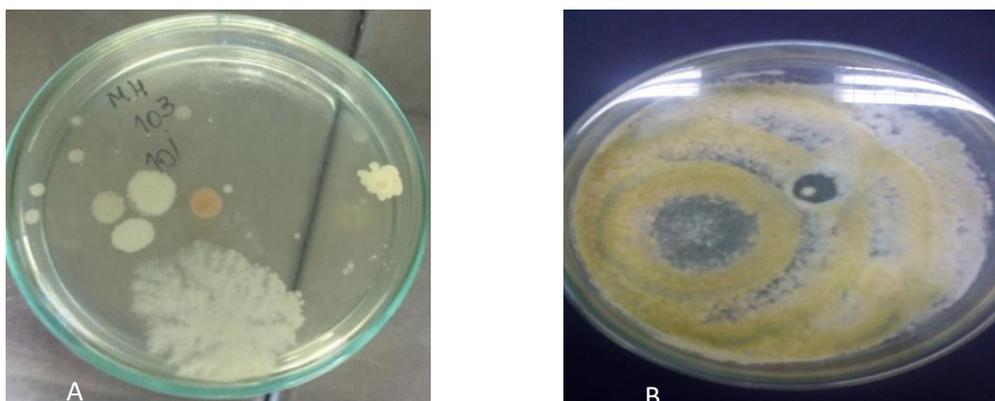
O isolamento por técnicas clássicas é a melhor alternativa para obtenção de microrganismos de interesse biotecnológico. Observou-se com o isolamento que ambos os meios de cultura utilizados são propícios para isolamento de microrganismos por serem ricos e apresentarem colônias de todos os grupos microbianos. Segundo Previati et al. (2012), a avaliação das densidades populacionais na comunidade microbiana em solos inclui técnica de cultura em placa, exame microscópico direto e técnica de enriquecimento, e na comunidade bacteriana também há variabilidade entre populações bacterianas em geral e actinomicetos em relação ao uso de nutrientes manifestados no meio de cultura. Vários autores relatam o isolamento de microrganismos por técnicas clássicas. Jariyal et al. (2014) com o objetivo de obter bactérias de um solo com histórico de contaminação por pesticida organofosforado, utilizaram a técnica de isolamento clássico em Placas de Petri pela técnica de espalhamento utilizando o meio MSMO Ágar. Os autores relataram que todas as colônias tinham aspectos

semelhantes, eram redondas com bordas bem definidas, todavia variavam de cor e de textura. Deng et al (2015) isolaram por técnica de isolamento clássica, uma espécie bacteriana com capacidade de degradar o, O-dialquil fosfato, um inseticida organofosforado. Os autores relataram que o sucesso do isolamento foi devido a utilização do agrotóxico como fonte de carbono em um meio mineral mínimo (MRS). Hyung et al. (2018) isolaram espécies bacterianas de 41 amostras de solo contaminadas com organofosforado. Os autores utilizaram técnica clássica de enriquecimento do solo em meio mínimo mineral e posteriormente plaqueadas em meio R2S. Duraisamy, Muthusamy e Balakrishnan (2018), isolaram espécies de bactérias de solo contaminado com agrotóxico da classe dos organofosforados na Índia. Os autores utilizaram a técnica de diluição seriada com plaqueamento em meio mineral mínimo (MSM) com o agrotóxico como fonte de carbono.

Logo após a observação macroscópica, observou-se três grupos distintos de colônias. No meio de cultivo Muller Hinton Ágar o crescimento foi mais uniforme, as colônias se mostraram mais uniformes em relação ao tamanho, os bordos liso ou em forma de ondas, sugerindo colônias formadas por bactérias do gênero *Bacillus* (Figura 2A). No meio de cultivo Sabouraud Dextrose Ágar observou-se colônias de aspecto algodinoso, sugerindo a formação de micélio aéreo de fungos filamentosos e colônias leitosas opacas e com bordas lisas bem delimitadas características de leveduras. Neste meio também se pode observar a formação de halo de antibiose (Figura 2B).

A antibiose é um fenômeno comum entre microrganismos de solo, é um dos mecanismos de defesa utilizados por grupos microbianos. Os fungos filamentosos são grandes produtores de metabólitos secundários, essa característica está associada a produção de micélio aéreo. A pigmentação também é um indício de produção de compostos bioativos.

Figura 3 – Aspectos macromorfológicos das colônias após o isolamento. Figura A colônias com cores, textura e bordos distintos. Figura B colônia de aspecto algodinoso com colônia no centro formando halo de antibiose.

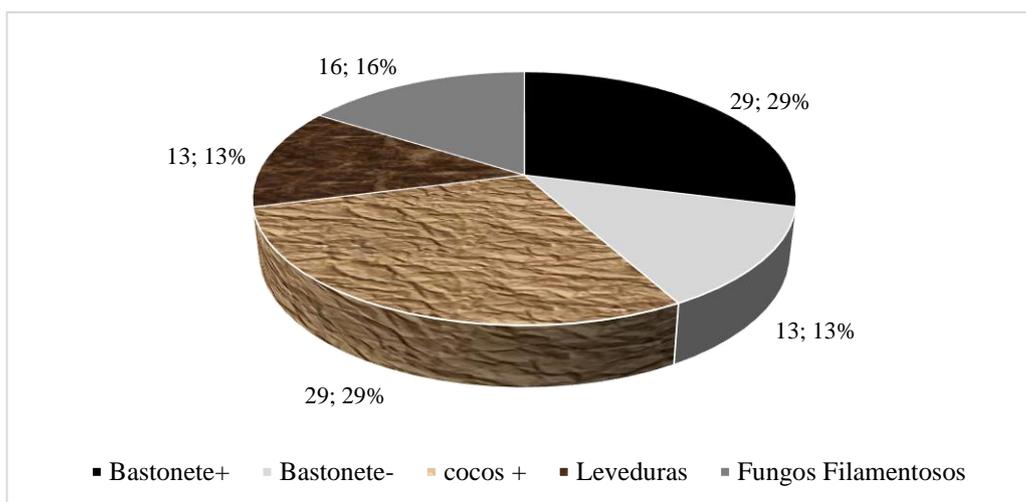


Após a contagem e purificação das colônias deu-se início a identificação dos microrganismos, foi realizado o teste de coloração tintorial de parede celular (Gram) para as bactérias com a finalidade de dividir nos dois grandes grupos Gram positivas (G^+) e Gram negativas (G^-). Para a identificação dos fungos foi realizado a identificação em nível de gênero pela técnica de microcultivo para observação das hifas e dos arranjos de esporos. Após a identificação o que se observou foi que dos microrganismos isolados 29% eram Bastonetes G^+ , 13% Bastonetes G^- , 29% Cocos G^+ , 16% de Fungos Filamentosos e 13% de Leveduras como pode ser visualizado na Figura 3.

Após a coloração tintorial da parede celular (coloração de Gram) pode se observar a duas formas bacterianas distintas, cocos e bastonetes de ambas as colorações, positiva e negativa. Além disso, foi possível observar alguns arranjos bacteriano como cacho, duas células juntas e uma fileira de células arranjadas.

Em relação aos fungos, observou-se crescimento de fungos leveduriformes e filamentos no meio de cultura Sabouraud. Os fungos são organismos que apresentam uma grande capacidade adaptativa quando o ambiente é contaminado. Além dos fungos filamentosos serem grandes produtores de metabólitos bioativos, são também grandes produtores enzimáticos. Já as leveduras, se caracterizam por produzirem substâncias tensoativas, os surfactantes, que auxiliam na manutenção desse grupo no ambiente inóspito.

Figura 4 – Percentual dos grupos microbianos isolados de solo contaminado com agrotóxico.



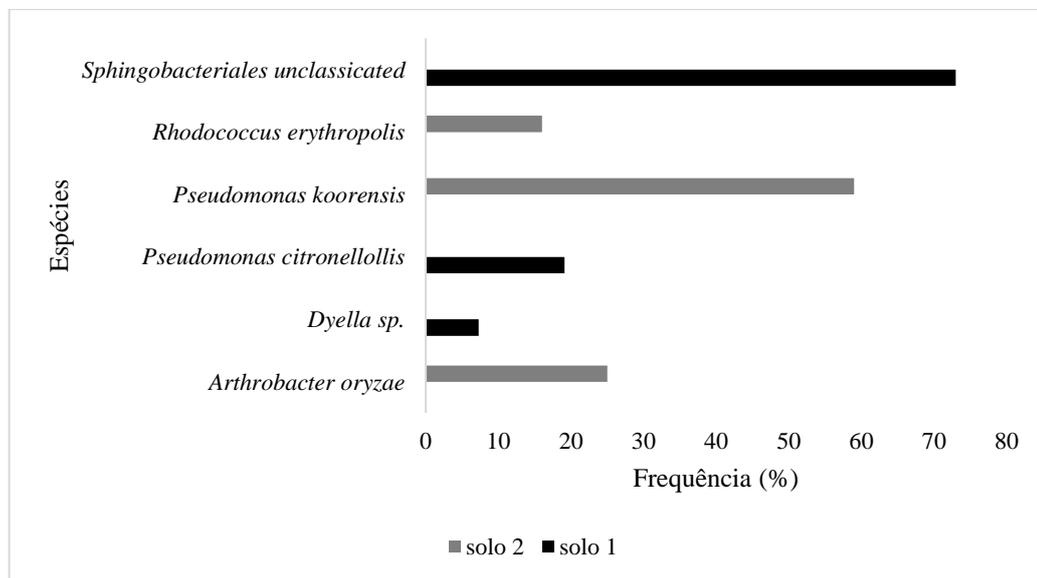
Com exceção do grupo das leveduras, pode-se observar diversidade entre os microrganismos, tanto nos aspectos macroscópicos quanto nos microscópicos. A prevalência de bactérias G^+ pode ser explicada pela habilidade desse grupo bacteriano de resistir a

ambientes inóspitos, e também por abrigar o grupo dos Actinomicetales, que são bactérias Gram Positivas filamentosas, diferenciadas das demais Eubactérias.

Com a finalidade de conhecer as espécies bacterianas mais prevalentes no solo contaminado, foi realizada a identificação molecular através da análise do DNA total do solo. As espécies bacterianas mais frequentes podem ser visualizadas na Figura 4.

Quando se observa o perfil e a frequência das bactérias nas amostras de solos coletadas percebe-se que o solo coletado o mês de janeiro é mais abundante e apresenta uma prevalência das bactérias da ordem das Sphingobacteriales com frequência de 70% em todo o solo. As bactérias do gênero *Pseudomonas* spp. também se mostraram abundantes e nos dois meses coletados, com frequência de 60% para *Pseudomonas koarensis* (solo 1) e 20% para *Pseudomonas citronellallis* (solo 2). As espécies bacterianas *Rhodococcus erythropolis* e *Arthrobacter oryzae* também mostraram uma boa frequência quando isolada do solo 2 (20% e 25%). A espécie que se mostrou e nos abundante foi a *Dyella* sp. com 7% de frequência quando isolada do solo 1.

Figura 5 – Frequências das espécies bacterianas encontradas no solo nos dois períodos de coleta janeiro (solo 1) e maio (solo 2).



Ao contrário da identificação clássica, que predominou o grupo de bactérias Gram positivas, na identificação molecular a frequência maior foi de bactérias Gram Negativas. Dentre os gêneros mais frequentes deve-se destacar as bactérias da ordem *Sphingobacteriales*, pertencentes ao Filo Bacteroidetes, são bactérias comumente encontradas no trato digestório, interstício intestinal, nas mucosas e membranas de animais de sangue quente. Um fator que

chama a atenção é que essas bactérias são causadoras de doenças como a colite, enterocolite e diverticulite e não tem o solo como seu habitat natural. O surgimento dessas bactérias nesse tipo de solo pode ser explicada pela prática de usar penas e vísceras de aves para enriquecimento do solo agrícola, uma atividade comum entre pequenos agricultores. As bactérias presentes nas penas e vísceras das aves podem ter migrado para o solo e se adaptado ao esse ambiente se tornado predominante frente a outras espécies.

Há tempos se relata a capacidade degradativa das bactérias frente as diversas classes de agrotóxicos, vários autores relatam o isolamento de bactérias Gram positivas e Gram negativas de solos contaminados e sua capacidade de degradar agrotóxicos. Ohshiro et al. (1997) isolaram uma espécie de *Arthrobacter* sp. B-5 e avaliaram a sua capacidade de degradar agrotóxicos da classe dos organofosforados. Os autores do trabalho enfatizaram que essa habilidade se deve ao aparato de enzimas hidrolases expressas por essas bactérias quando em contato com esses compostos.

Cycon et al. (2013), isolaram e identificaram através de técnicas moleculares a bactéria Gram negativa *Serratia marcescens* de solo contaminado. Os autores relataram a capacidade dessa bactéria em degradar herbicida em meio mínimo mineral contendo 50mg/g de solo do agrotóxico. Embora não tenha-se isolado bactérias do gênero *Serratia* neste trabalho, a predominância foi de bactérias Gram-negativas.

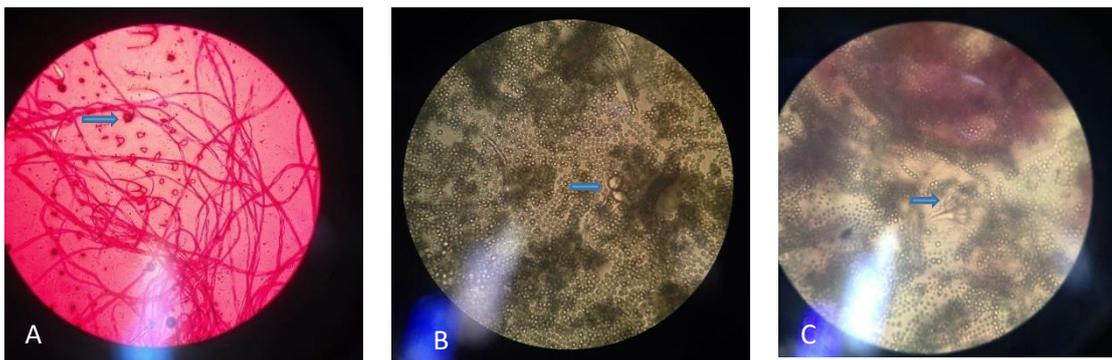
Barman et al. (2014) relataram o isolamento e a identificação por técnicas moleculares de bactérias endofíticas do gênero *Pseudomonas* spp. s. Os autores destacaram que essas bactérias foram isoladas de flores cultivadas em solos contaminados com organofosforado o que possibilitou a preparação do seu aparato enzimático para utilizar o agrotóxico como fonte de nutriente.

Corroborando com este trabalho Yao et al. (2015), isolaram duas bactérias do gênero *sphingomonads* spp. de solo contaminado om herbicida da classe dos organofosforado. Os autores utilizaram a quantificação do DNA 16s ribossomal para identificar os gêneros bacterianos.

Dentre os fungos filamentosos foram identificados quatro gêneros diferente: três *Penicillium* spp, 01 *Aspergillus* sp., 01 *Trichoderma* sp e um *Coccidioide* sp., fungo patogênico, comum em solo causador de meningite como pode ser visualizado na Tabela 1. Nas observações micromorfológica dos fungos pode-se observar a conformação dos esporos nas extremidades das hifas, além disso pode-se observar se tratavam de hifas hialinas ou septadas corroborando com a identificação dos fungos. Nas figuras 5A, 5B e 5C se pode visualizar a micromorfologia dos fungos *Aspergillus*, sp. *Coccidioide* sp e *Penicillium* sp. respectivamente. As características

macromorfológicas avaliadas consistiram no tamanho da colônia, características dos bordos, textura, relevo e pigmentação. Já as análises micromorfológicas foram realizadas pela técnica de microcultivo em ágar-batata, visando identificar as estruturas vegetativas e especialmente as estruturas reprodutivas específicas dos gêneros de fungos filamentosos como pode ser visualizada na figura 5. Após a identificação micromorfológica, pode-se observar a predominância dos principais gêneros de fungos relatados na literatura. Os gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são fungos encontrados comumente em solo, embora sejam gêneros cosmopolitas. O *Trichoderma* é um gênero comum tanto no solo com endofítico. Entretanto o gênero *Coccidioides* é um fungo patogênico e não encontra-se relato no solo do Maranhão. Este fungo é preocupante pois por ser extremamente virulento, pode transmitir doenças graves aos agricultores e familiares. Uma outra possibilidade é a questão da resistência cruzada aos antibióticos ser adquirida pelo contato maciço com o agrotóxico presente no solo.

Figuras 6 – Micromorfologia de *Aspergillus* sp. (A), *Coccidioides* sp. (B) e *Penicillium* sp. (C) isolados de solo contaminado com agrotóxico.



Os cinco fungos filamentosos isolados foram identificados molecularmente em nível de espécie como *Trichoderma longibrachiatu* (F1) *Trichoderma viren* (F2), *Penicillium javanicum* (F3), *Penicillium* sp (F4), *Penicillium simplicissimun* (F5), *Hypoxyylon fragiforme* (F6) e *Aspergillus* sp.(F7)

Devido ao intenso aparato enzimático que os fungos filamentosos possuem, vários autores buscam isolar esses organismos em diversos habitats diferentes, inclusive em solos contaminados com compostos xenobióticos. Sua capacidade adaptativa a condições adversas está atrelada principalmente a sua morfologia e fisiologia. Corroborando com este trabalho Carranza et al. (2014) isolaram espécies de fungos de solo de plantação de arroz e soja contaminados com herbicida glifosato. Após identificação por técnica de microcultivo e bioquímica, os autores relataram nove gêneros, entre eles, o *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp. e *Trichoderma*. Zhao, Bao e Liu(2010), isolaram seis fungos de solo contaminado com pesticida

da classe dos organofosforado. Os autores relataram que o isolamento foi realizado por meio da técnica de diluição seriada com plaqueamento por espalhamento em meio seletivo. Dos seis isolados apenas um fungo do gênero *Penicillium* sp. foi capaz de degradar o composto testado.

3.3 Seleção Qualitativa de Isolados Ambientais

Trinta e nove microrganismos entre bactérias (B), leveduras (L) e fungos filamentosos (F) foram selecionados por características macromorfológicas e identificados por técnicas micromorfológicas. Dentre esses, foi utilizada a técnica do DCPIP para selecionar os mais promissores em relação a metabolização do agrotóxico. Ao longo dos sete dias, as placas multipoços eram avaliadas diariamente quanto a descoloração por observação visual. O que se constatou foi que dos 39 microrganismos selecionados e testado, 13 descoloriram totalmente o meio até o quinto dia de incubação como pode ser visualizado na Tabela 3. Dentre os microrganismos que se apresentaram promissores, pode-se destacar os fungos filamentosos, onde observa-se que dos sete fungos filamentosos isolados, cinco descoloriram totalmente o meio até o quinto dia de incubação. As bactérias foi o segundo grupo microbiano mais promissor, das 23 bactérias isoladas, seis descoloriram o meio até o quinto dia e por fim o grupo das leveduras, onde 08 isoladas duas descoloriram totalmente o meio com até cinco dias de incubação. Vale ressaltar que, as bactérias Bastonetes G^+ se destacaram dentre as mais promissora, representando 62,5% das bactérias que descoloriram totalmente o meio em até cinco dias.

A seleção de microrganismos com potencial para uso de agrotóxicos como fonte de nutrientes pode ser avaliada de diversas formas. Algumas alternativas rápidas e práticas para fazer esta avaliação são as técnicas colorimétricas, que são baseadas em reações de descoloração do meio devido à liberação de elétrons pelos organismos estudados, permitindo não apenas a avaliação de seu potencial como a velocidade de metabolização. Vários autores usam essas técnicas para selecionar microrganismos potenciais, especialmente quando eles têm um grande número de microrganismos a serem testados. Uma das técnicas amplamente relatadas na literatura é a técnica de 2,5, Diclorofenol Indofenol (DCPIP). Esta técnica foi descrita pela primeira vez como eficiente para a seleção de microorganismos por Hanson, Desai e Desai (1993) quando os autores decretaram o uso deste indicador com meio BH e o óleo como fonte de carbono em placas de múltiplos poços para seleção de bactérias com poder de degradação. Apesar de amplamente utilizada para compostos hidrocarbônicos derivados de Petróleo, a literatura relatando o uso dessa técnica para agrotóxico é escassa.

Bidoia, Montagnolli e Lopes (2010) dizem que a técnica de 2,5-diclorofenol-indofenol (DCPIP) é amplamente relatada, a qual é baseada na redução da forma oxidada pela mudança da cor de azul para incolor. Desde então, vários autores têm utilizado a técnica como alternativa para a seleção de microrganismos degradadores. O potencial de microrganismos isolados de ambientes contaminados com resíduos petrodirecionados em hidrocarbonetos degradantes foi avaliado utilizando a técnica de descoloração indicada pelo DCPIP. Os autores relatam a seleção de microrganismos que apresentaram potencial de degradação com até 24 horas de testes (MIRANDA et al., 2007; GOMES et al., 2009). Atualmente, a técnica ainda é amplamente utilizada. Varjani e Upasani (2016) relataram a degradação do óleo cru por uma linhagem de *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. Os autores mostraram o potencial de degradação da bactéria usando o teste de seleção de indicador DCPIP, eluindo a descoloração com 24h com um aumento da biomassa microbiana na placa avaliada pela técnica de absorvância. Almeida et al. (2017) usaram a técnica do indicador redox DCPIP para selecionar o melhor consórcio microbiano capaz de degradar o combustível marítimo MF-8. Os autores relataram que obtiveram descoloração por um consórcio composto por bactérias diferentes em 24h. Joy, Rahman e Sharma (2017) utilizaram a técnica do Diclorofenol Indolfenol (DCPIP) para selecionar microrganismos degradadores de óleo cru. Os autores relataram enfatizaram a eficiência e rapidez da técnica quando se faz necessário uma seleção mais rápida com muitos microrganismos. Marchand et al. (2017) relataram o uso da metodologia DCPIP para selecionar bactérias e fungos com potencial de degradação do petróleo bruto. Os autores enfatizaram a eficiência e velocidade da técnica. Adnan et al. (2018) utilizaram a técnica de DCPIP para estimar a capacidade de fungos do gênero *Penicillium* spp. na degradação do petróleo bruto. Os autores relataram que a alteração da coloração de azul para incolor em 14 dias a 30 ° C de incubação determinou que os fungos tinham a capacidade de degradar o óleo.

O mecanismo de degradação de bactérias e fungos são bem descritos na literatura, embora diferentes, eles se complementam e poder ser usados com o objetivo de mineralização de moléculas xenobióticas como pesticidas. Embora ambos os grupos microbianos tenham predileção por iniciar a degradação por compostos policíclicos aromáticos, os fungos filamentosos são os principais produtores de enzimas monooxigenases, dioxigenases e fenoloxidasas, essas enzimas atuam catalisando as reações de oxirredução que ocorrem na quebra dos compostos e são em sua maioria mais eficazes em condições aeróbicas. Embora semelhantes, os mecanismos de degradação de bactérias e leveduras diferem quanto a natureza dos compostos utilizados. Embora ambos os grupos sejam grandes produtoras de surfactantes.

Pode ocorrer uma diferença na natureza química do surfactante, que são compostos de natureza lipopolissacarídica que confere uma característica anfipática.

Tabela 3 – Identificação e tempo de descoloração no teste DCPIP pelos microrganismos isolados de solo contaminado com agrotóxico.

Microorganismo	Identificação		Tempo de Descoloração (h)				
	Gram	Morfologia	24	48	72	96	120
Bactérias							
B1	+	Bastonete	-	+	++	+++	+++
B2	+	Cocos	-	-	-	-	-
B3	+	Cocos	-	-	-	-	-
B4	+	Bastonete	-	++	+++	+++	+++
B5	+	Cocos	-	++	+++	+++	+++
B6	+	Bastonete	++	+++	+++	+++	+++
B7	+	Cocos	-	-	-	-	-
B8	-	Bastonete	-	-	-	-	-
B9	-	Bastonete	+	+	+	++	++
B10	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B11	+	Cocos	-	-	+	+	++
B12	+	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	+	+	++
B13	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B14	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B15	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B16	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B17	+	<i>Staphylococcus</i> sp.	-	-	+	+	++
B18	-	Bastonete	++	++	++	+++	+++
B19	+	Bastonete	-	-	+	+	++
B20	-	Bastonete	-	-	+	+	++
B21	+	Bastonete	+++	+++	+++	+++	+++
B22	+	Cocos	-	+	++	++	++
B23	+	Bastonete	-	-	++	++	++
Levedura							
L1			-	+	++	++	++
L2			-	+	++	++	++
L3			+++	+++	+++	+++	+++
L4			-	-	-	-	-
L5			++	++	+++	+++	+++
L6			-	-	-	-	-
L7			-	-	-	-	-
L8			-	-	-	-	-
Fungos							
F1		<i>Trichoderma longibrachiatu</i>	+++	+++	+++	+++	+++
F2		<i>Trichoderma virens</i>	-	+	++	+++	+++
F3		<i>Penicillium javanicum</i>	-	++	+++	+++	+++
F4		<i>Penicillium</i> sp.,	-	+	++	+++	+++
F5		<i>Penicillium simplicissimum</i>	+	+	+	++	++
F6		<i>Hypoxylon fragiforme</i>	+	+	+	++	++
F7		<i>Aspergillus</i> sp.	+++	+++	+++	+++	+++

+ - ligeiramente descolorido; ++ - meio incolor; +++ - totalmente descolorido

3.4 Seleção quanto a produção de Metabólitos de Interesse

3.4.1 Caracterização Enzimática e atividade emulsificadora (IE₂₄)

Os mecanismos de degradação das moléculas xenobióticas variam de acordo com o grupo microbiano, por isso é importante se ter uma ideia de qual mecanismo de ação os grupos microbianos envolvidos estão utilizando. Para isso foi realizada caracterização enzimática e a avaliação do índice de emulsificação. Os fungos filamentosos são os principais produtores de enzimas, enquanto que as bactérias e leveduras são grandes produtores de biosurfactantes. Dentre as enzimas produzidas pelos fungos, as oxidativas são sem dúvida, as mais importantes na degradação de moléculas xenobióticas. Sua inespecificidade permite que os microrganismos utilizem os compostos poluidores como se fossem os que naturalmente seriam metabolizados pelas enzimas devido a sua semelhança química estrutural. A caracterização enzimática e a atividade emulsificadora dos 13 microrganismos selecionados podem ser visualizadas na Tabela 4.

Tabela 4 –Caracterização enzimática e índice de emulsificação (IE₂₄) dos 13 microrganismos selecionados no teste do DCPIP.

Microrganismos	(%) IE ₂₄	Enzimas (U/L)		
		Lac	LiP	MnP
B1	58	24 ^a ±2	265 ^a ±12	567 ^a ±13
B4	4	67 ^b ±4	278 ^a ±14	528 ^a ±23
B5	48	90 ^c ±2	543 ^b ±11	602 ^a ±22
B6	50	56 ^b ±8	348 ^c ±10	345 ^b ±25
B17	16	11 ^d ±3	69 ^d ±4	67 ^c ±11
B21	18	10 ^d ±2	72 ^d ±5	83 ^c ±10
L3	87	21 ^a ±4	66 ^d ±2	35 ^d ±9
L5	56	23 ^a ±2	32 ^e ±2	39 ^d ±9
F1	12	1045 ^e ±15	589 ^b ±11	790 ^e ±11
F2	13	782 ^f ±19	304 ^a ±16	340 ^b ±13
F3	10	602 ^f ±11	311 ^a ±15	397 ^b ±15
F4	11	745 ^f ±25	437 ^b ±10	285 ^f ±11
F7	9	356 ^g ±18	440 ^b ±10	156 ^g ±12

Quando os microrganismos selecionados foram avaliados quanto a caracterização enzimática os fungos foram os que apresentaram valores mais altos dentre todos os microrganismos testados. Dos cinco fungos selecionados e testados quanto a caracterização enzimática e o IE₂₄, o *Trichoderma longibrachiatu*. (F1) se destacou pela elevada produção das três enzimas analisadas. Dentre as enzimas destaca-se a quantificação da enzima Lac que com

produção de 1045U/L, seguida da MnP com 790U/L e finalmente a LiP com 589U/L. Quando analisa-se apenas a produção da enzima Lac, os fungos *Trichoderma virens* (F2) e os *Penicillium javanicum* e *Penicillium* sp. (F3 e F4) também se mostraram promissores, com produções de 782U/L, 602U/L e 745U/L respectivamente. Quando comparada a produção dessas enzimas entre os organismos selecionados, observou-se que, apesar do grupo dos fungos ter se destacado, o *Trichoderma* sp. é o que apresenta uma diferença estatística significativa dos demais.

Quando a enzima avaliada foi a LiP, os fungos *Trichoderma longibrachiatu* (F1), *Penicillium* sp. (F4) e *Aspergillus* sp. (F7) se destacaram. Algumas espécies bacterianas também se destacaram na produção dessa enzima como a B1, B4 B5 e B6 com valores de 265U/L, 278U/L, 543U/L e 348U/L. Deve-se destacar que, com exceção da bactéria B5, todas as outras eram Bastonetes Gram positivos. Em relação a análise estatística da produção desse enzima, a bactéria B5 e o fungo F4 e F7 demonstraram diferença estatística significativa dos demais.

O perfil de produção da enzima MnP foi um pouco diferente das demais, apesar do fungo *Trichoderma longibrachiatu*. (F1) também ter se destacado dos demais com produção de 70U/L, o grupo de bactérias mostrou uma maior capacidade em produzir essa enzima. As bactérias B1, B4 e B6 destacam-se por produzirem 567U/L, 528U/L e 602U/L, respectivamente da enzima MnP. A análise estatística reforça esse perfil, quando demonstra que o grupo de bactérias apresenta semelhança estatística entre elas, porém é estatisticamente diferente dos demais. Já o fungo *Trichoderma longibrachiatu* mostrou diferença estatística significativa dentre todos os organismos testados.

Diante dos resultados obtidos o fungo *Trichoderma longibrachiatu*. (F1) foi o microrganismo selecionado para prosseguir para a etapa posterior.

Enzimas são moléculas de natureza basicamente proteica. Sua principal função é agir como catalisador biológico, acelerando as reações químicas sem alterá-las. Cada reação gerada em uma célula precisa de uma enzima específica. Em geral, as enzimas possuem três propriedades: poder catalítico, alta especificidade e capacidade de regular seu poder catalítico na presença de outros íons ou moléculas (FERNANDES, 2010). O mecanismo usado pelos fungos para a remoção de compostos xenobióticos é complexo; envolve enzimas inespecíficas de caráter lignolítico, de natureza proteica, que atuam como catalisadores biológicos e diminuem a energia de ativação das reações. Os Fungos, no entanto, diferem em sua capacidade de degradar os agrotóxicos por via enzimática, devido a diferenças qualitativas e quantitativas na produção dessas enzimas (KAMIDA et al., 2005; BARRETO et al., 2011).

Vários autores relatam a utilização de enzimas para a recuperação de ambientes contaminados por moléculas xenobióticas. Almeida et al. (2012) relataram a seleção de fungos produtores de enzimas oxidativas, os autores relataram que dos 37 fungos testados 56,7% demonstraram potencial para a produção de enzimas lignolíticas. Dentre os fungos selecionados, o *Penicillium* spp. FDG 36 se mostrou o melhor produtor de enzimas lacase após 120h de tratamento de meio contaminado com compostos xenobióticos. Baptista et al. (2015) relatam o isolamento de fungos do gênero *Penicillium* sp. e *Arpergillus* sp. de ambiente marinho contaminado com esgoto doméstico. Os autores enfatizaram que várias espécies de fungos dos dois gêneros foram capazes de produzir as enzimas Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase, e que essa produção foi acentuada após submeter esses organismos a radiação gama.

Com o objetivo de investigar microrganismos com potencial para a produção de surfactante, foi avaliado o índice de Emulsificação dos treze microrganismos selecionados no teste DCPIP. Na tabela 4 pode-se observar que, ao contrário das enzimas onde os fungos foram os mais promissores, neste ensaio o grupo de bactérias e leveduras se destacaram quanto a avaliação do IE₂₄. Dentre os microrganismos testados, as leveduras L3 e L5 se mostraram mais promissoras com valores de IE₂₄ de 87% e 56%. As bactérias B1, B5 e B6 também mostraram potencial na produção de surfactante com valores de IE₂₄ de 58%, 48% e 50% respectivamente. A bactéria B4 e os fungos filamentosos não apresentaram potencial para atividade emulsificadora.

A produção de biossurfactantes por bactérias e leveduras é amplamente relatada na literatura, neste estudo as bactérias que obtiveram os maiores valores de IE₂₄ apresentaram na identificação micromorfológica dois bastonetes e um coco Gram positivo. As bactérias Bastonetes Gram-positivas, são os principais produtores de surfactantes da classe dos lipopeptídeos. Para isso, numerosos substratos têm sido utilizados, desde a glicose até resíduos agroindustriais. As leveduras são amplamente relatadas como grandes produtoras de glicolipídeos e soforolipídeos, utilizando diferentes substratos, desde a glicose, amido de milho e óleo de cozinha até moléculas xenobióticas como resíduos hidrocarbônicos e agrotóxicos. Diante dos resultados obtidos quanto ao IE₂₄ a levedura L3 foi o microrganismo selecionado para prosseguir na etapa posterior.

Após esta etapa a Levedura L3 foi identificada como sendo da espécie *Cândida glabrata*

A finalidade de se conhecer o potencial emulsificante dos microrganismos é inferir mecanismos de ação de grupos microbianos específicos. Dos 13 microrganismos selecionados

de ambientes contaminados com agrotóxicos 05 mostraram potencial na produção de surfactante. Este mecanismo é amplamente relatados na literatura. Bezerra et al. (2012) relatam a produção de biosurfactante por *Pseudomonas aeruginosa* GVII-A utilizando resíduos agroindustriais como fonte de carbono. Para a seleção inicial, foi realizado um teste IE₂₄, onde as bactérias foram fermentadas em meio mínimo de sais com resíduos agroindustriais e a partir dos testes de emulsificação para posterior produção do surfactante. Vários autores usam a técnica do IE₂₄ para relatar o potencial de bactérias do gênero *Bacillus* para produzir compostos tenso-ativos, como biosurfactantes. Os autores demonstram a capacidade deste gênero em produzir surfactantes em meio com diferentes fontes de carbono. O gênero é capaz de produzir substâncias tensoativas em meio contendo glicose como fonte de carbono inerte ou fonte oleosa como resíduos de hidrocarbonetos (COOPER; GOLDENBERG, 1987; BARROS; QUADROS; PASTORE, 2008; MORAIS et al., 2015). Lins et al. (2017) avaliaram a capacidade do fungo *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 de produzir biosurfactante a partir de óleo de soja e licor de milho, controlando a temperatura do Arduino. Os autores reportaram valores do Índice de Emulsificação (EI₂₄) semelhantes aos obtidos neste estudo, inferindo a capacidade do fungo em produzir compostos bioativos. Miguel, Barreto e Pereira (2017) avaliaram o Índice de Emulsificação (EI₂₄) utilizando querosene como fonte de emulsificante. Os autores isolaram e cultivaram os fungos amazônicos em meio líquido suplementado com óleo de soja e incubados sob agitação. Os valores de IE₂₄ foram semelhantes aos obtidos neste trabalho com a mesma fonte de emulsificante.

3.5 Determinação das Melhores Condições do Processo para Atividade Microbiana

Com a finalidade de estabelecer as melhores condições do processo e otimiza-las foi utilizado o planejamento experimental fatorial do tipo Central Composto Rotacional (DCCR) para cada microrganismo selecionado nas etapas anteriores. Foram realizados 11 experimentos para o F1 e 11 experimentos para a L3 totalizando 22 experimentos. Objetivando analisar a capacidade de sobrevivência e metabolização desses microrganismos foi simulado um microcosmo contendo solo contaminado com agroquímico e, em cada frasco foi avaliado a respiração basal dos microrganismos nas onze condições preconizadas pelo planejamento experimental. Os resultados podem ser visualizados nas Figuras 7 e 8.

Figura 7 – atividade biológica da microbiota contendo a levedura *Cândida glabrata* (L3) nos onze experimentos preconizados pelo planejamento experimental fatorial do tipo DCCR.

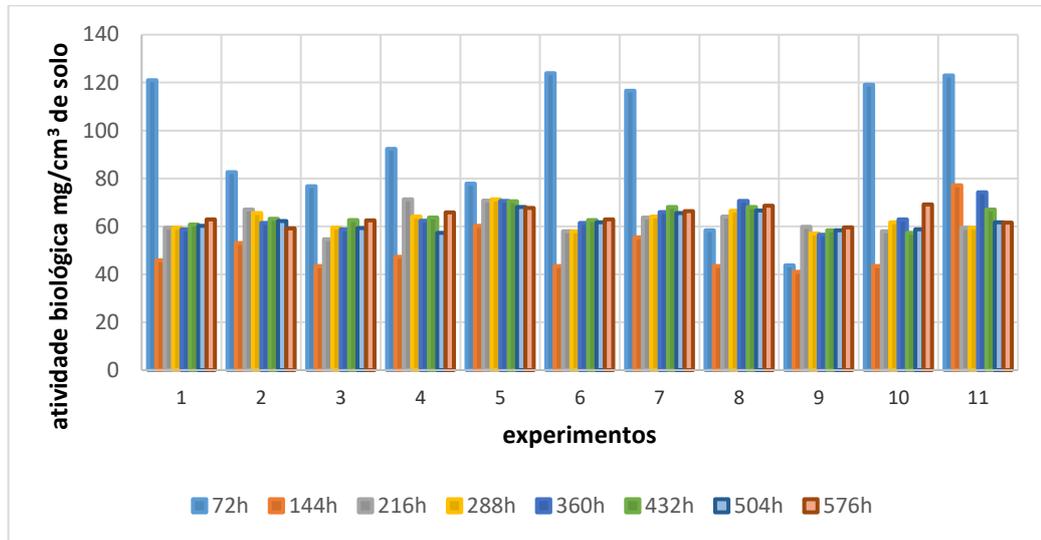
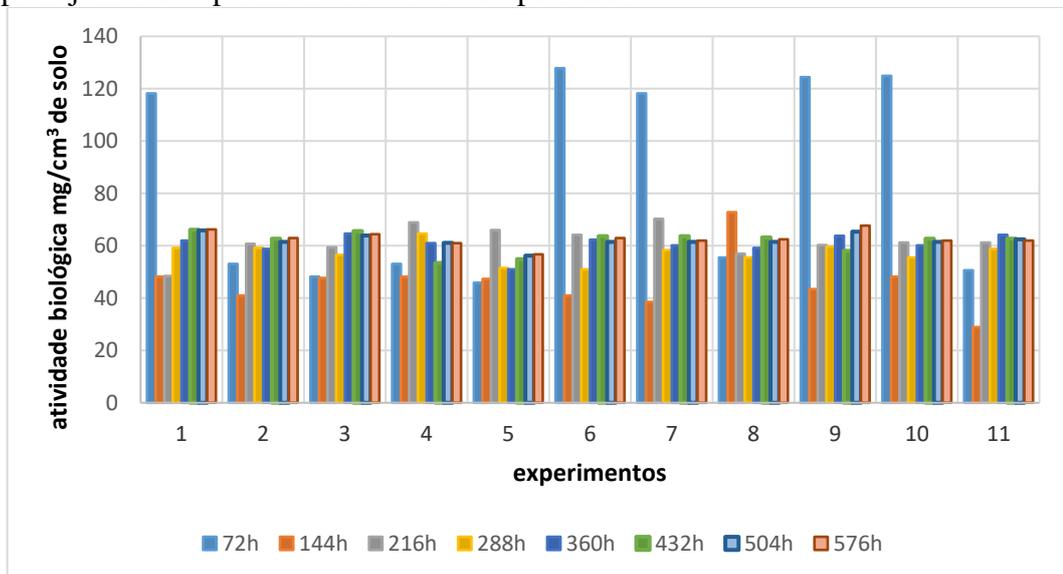


Figura 8 – atividade biológica da microbiota contendo fungo filamentososo *Trichoderma longibrachiatu* (F1) nos onze experimentos preconizados pelo planejamento experimental fatorial do tipo DCCR.



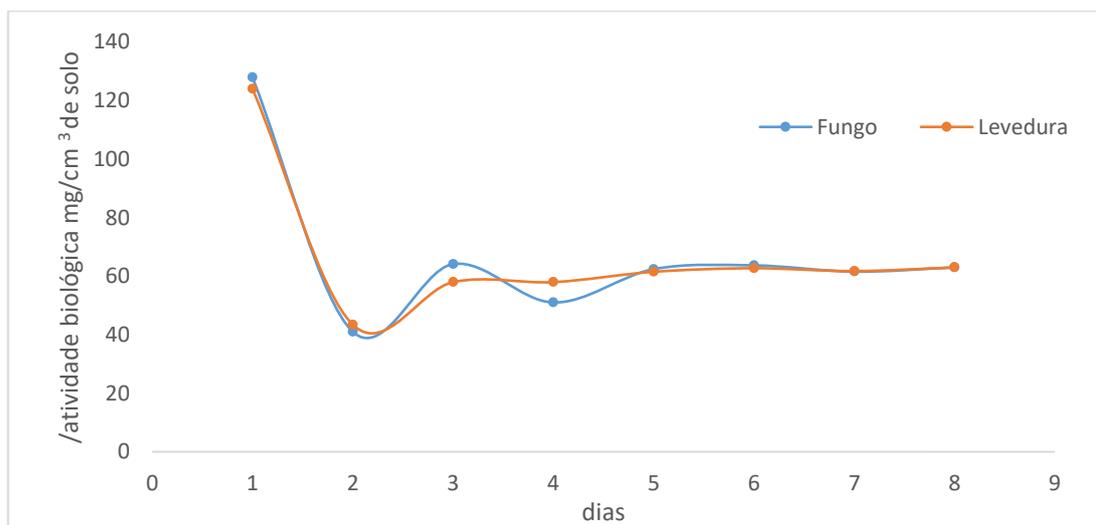
O planejamento experimental é uma metodologia estatística que tem como principal objetivo a confiabilidade dos resultados com uma quantidade mínima de experimentos que garanta o grau de liberdade.

Nas figuras 6 e 7 pode-se observar o perfil da atividade biológica ao longo de 23 dias de tratamento do solo contaminados com diferentes concentrações de agrotóxico. Nos onze experimentos realizados para cada microrganismo, observou-se uma maior atividade biológica

com 72 horas de inoculação com demandas de CO₂ nos frascos variando de 43,74mg/cm³ a 123,93 mg/cm³ quando testada com a levedura e 45,82 a. 127,83 mg/cm³ quando testado com o fungo filamentososo. O perfil de respiração foi muito semelhante tendo nos dois planejamentos uma maior taxa de respiração quando se teve a maior bioaumentação (8 bloquinhos) e 3,5% de agrotóxico aplicado no solo.

Esse perfil de atividade biológica sugere que a bioaumentação com os microrganismos selecionados está influenciando nos três primeiros dias de tratamento, onde se tem taxas mais altas de respiração naquelas condições preconizadas pelo tratamento após este período a taxa respiratória cai e permanece constante sugerindo uma diminuição da atividade biológica naquele ambiente como do ser visualizado na Figura 9.

Figura 9 – cinética de respiração do fungo *Trichoderma longibrachiatu*. (F1) e da levedura *Cândida glabrata* (L3) ao longo de 23 dias de tratamento de solo contaminado com agrotóxico.



A metodologia de superfície de resposta denominada em inglês por RSM (*Response Surface Methodology*) é um conjunto de técnicas estatísticas e matemáticas úteis para desenvolver, melhorar e otimizar uma resposta de interesse, que é influenciada por diversas variáveis dentro de um processo de medição e análise experimental (MYERS et al,2009). A fim de determinar as condições ótimas do processo de tratamento que continham os fungos *Trichoderma longibrachiatu* (F1) e *Cândida glabrata* (L3) foram estabelecidos os modelos predito para a variável atividade biológica, os quais podem ser visualizados nos modelos 1 e 2.

$$\text{Atividade Biológica (F1)} = 93.14 + 12.97 - 23.50^2 - 14.20 - 0.58^2 \text{ modelo 1}$$

$$\text{Atividade Biológica (L3)} = 93.84 + 10.2 + 4.5^2 - 12.08 - 0.52^2 \text{ modelo 2}$$

A partir dos modelos, foram gerados os gráficos superfície de resposta da variável atividade biológica para os tratamentos com adição do fungo filamentososo e levedura, onde pode-se visualizar a tendência para os valores ótimos de tratamento do solo contaminado. Quando se considera a variável atividade biológica a tendência pode ser visualizada nas Figuras 10 e 11. Pode-se observar que existe uma região de concentração este parâmetro, que são as áreas em vermelho escuro, e uma região de baixa concentração, que são as áreas vermelho vermelhas mais claras e amarelas. Pode-se verificar a existência de um apontamento para valores mais altos de atividade biológica quando os valores do inóculo são mais altos (vermelho escuro) enquanto que a concentração do agrotóxico está na região de transição entre valores médios a mais baixos (vermelho claro a amarelo). A tendência é a mesma para ambos os microrganismos testados.

Figura 10 – Gráfico superfície resposta da variável atividade biológica quando o tratamento é realizado com a inoculação do fungo *Trichoderma longibrachiatu* (F1).

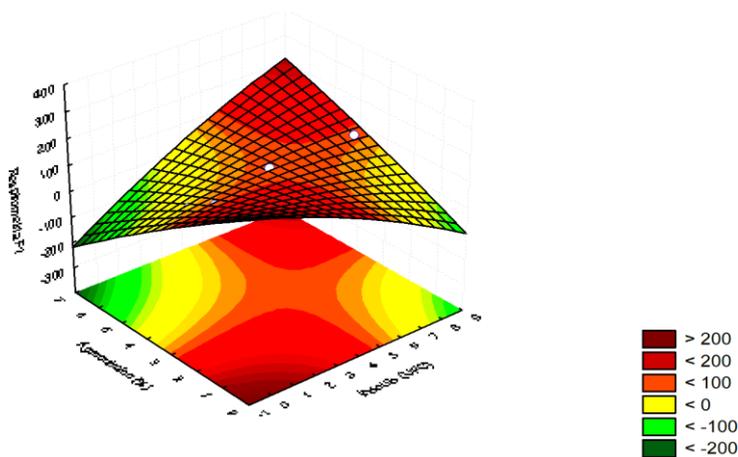
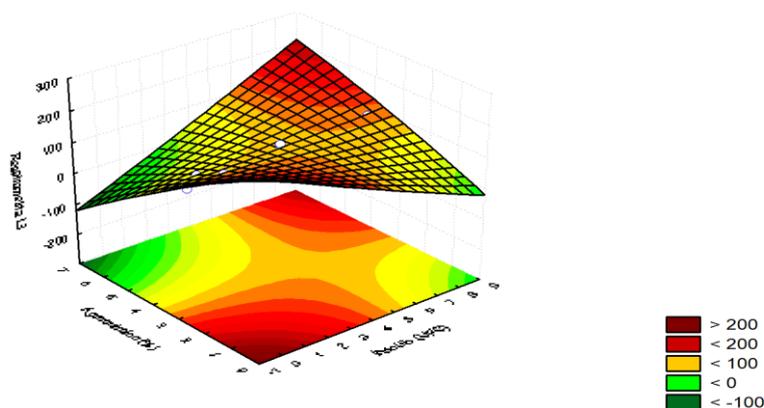


Figura 11 – Gráfico superfície resposta da variável atividade biológica quando o tratamento é realizado com a inoculação da levedura *Cândida glabrata* (L3).

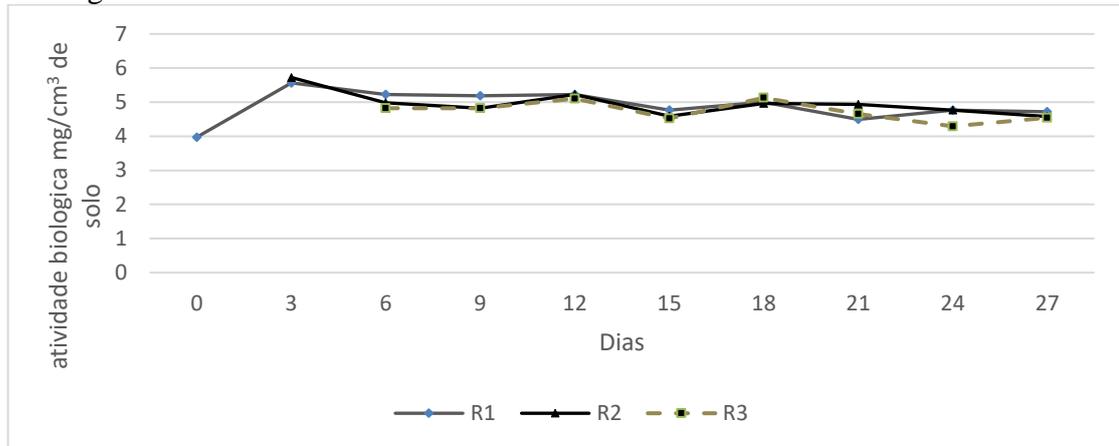


O planejamento experimental é uma metodologia estatística amplamente utilizada para otimizar as condições em vários tipos de processos biotecnológicos. Islam, Sakkas e Albanis (2009) aplicaram a metodologia de planejamento experimental para estabelecer as melhores condições de tratamento de água contaminada com pesticida organofosforado. Os autores utilizaram as variáveis pH, concentração inicial de inóculo e dose adsorvente como variáveis independentes para avaliar o percentual de degradação. Miranda et al. (2007), estabeleceu as condições de tratamento de efluente gerado por lavanderia têxtil utilizando planejamento estatístico do tipo DCCR com quatro variáveis independentes. Corroborando com este trabalho os autores também obtiveram a agitação como uma das variáveis interferente no processo de tratamento do efluente têxtil por fungos filamentosos. Deng et al. (2015) utilizaram a metodologia de planejamento experimental para estabelecer os parâmetros para degradação rápida de um pesticida organofosforado por *Stenotrofomonas* sp. As variáveis independentes preconizadas pelos autores foram inóculo inicial, concentração de substrato inicial e temperatura de incubação para estabelecer os parâmetros de cinética de degradação biológica. Várias moléculas xenobióticas podem ser tratadas com parâmetros estabelecidos pelo planejamento experimental. Almeida et al. (2017) utilizaram a metodologia de planejamento experimental para estabelecer as melhores condições de degradação de combustível marítimo MF-8 por consórcio microbiano.

3.6 Avaliação da Degradação do Agroquímico em Escala Piloto

Uma característica que determina a eficiência da biodegradação é o fato dos microrganismos endógenos e exógenos permanecerem metabolicamente ativos. Com os microrganismo *Trichoderma longibrachiatu* e *Cândida glabrata* selecionados foi estabelecido no planejamento experimental, através a metodologia de superfície resposta, que para o ensaio em reator seriam inoculados 8 “pluges” de 6mm (10^8 esporos) de cada microrganismo no solo contaminado com 3.5% de agroquímico e acompanhar a degradação. Para isso foi avaliado o teor de CO₂ demandado nos reatores aos longos dos ensaios de degradação do agrotóxico. A atividade biológica ao longo dos 30 dias de tratamento do solo contaminado com agrotóxico nos reatores pode ser visualizado na Figura 12.

Figura 12 - Atividade biológica ao longo dos 30 dias de tratamento do solo contaminado com agrotóxico nos reatores



Quando observa-se a demanda de CO₂ nos três reatores testados pode-se constatar que houve um equilíbrio na respiração biológica desde o início do processo com a aplicação do agrotóxico no solo até o final com a formação dos metabólitos intermediários de degradação. O reator 01 demonstra um pico de atividade respiratória nos três primeiros dias tendo no T0 uma atividade de 3.9mg/cm³ de solo aumentada para 5.7mg/cm³ de CO₂ no terceiro dia de tratamento. Os valores permanecem constantes até o décimo quinto dia quando cai para 4.77mg/cm³ de CO₂, voltando a aumentar no décimo oitavo dia para 5mg/cm³ de CO₂ mantendo-se estável até o vigésimo sétimo dia. O mesmo perfil de atividade metabólica foi observada nos reatores R2 e R3

Embora os mecanismos de degradação de compostos tóxicos no solo sejam de difícil entendimento por ter muitos interferentes, alguns relatos são encontrados na literatura. Thelusmond et al. (2018) relataram a degradação de compostos como o Diiclofenaco, carbamazepina e triclocarbano presente em solo agrícola no distrito de Michigan, EUA. Os autores relataram a capacidade de *Proteobacteria*, *Gemmatimonadale* e *actinobactérias* em degradar esses compostos ao longo de 21 dias de tratamento. Gallego (2019) relata a degradação do oxamil, um pesticida utilizado frente a nematoides patógenos agrícolas, em solo de plantação em Lasithi. Os autores elaboraram um ensaio de degradação com 21 microcosmos contendo diferentes concentrações do agrotóxico e observaram que as actinobacterias eram predominantes em solos com concentrações mais altas.

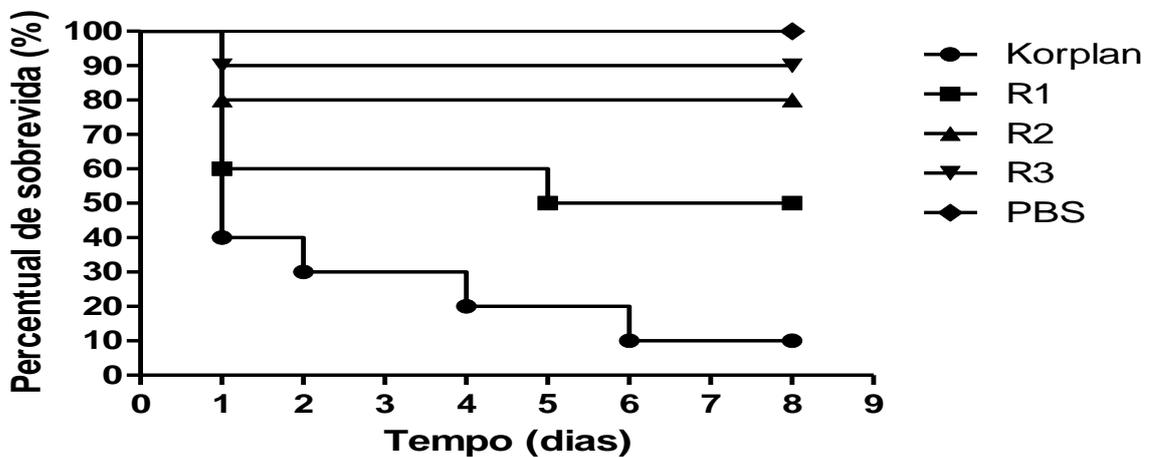
3.7 Avaliação da toxicidade

Os perfis de sobrevivência das larvas de *Tenebrio molitor* quando submetidas ao contato com o agrotóxico e intermediários de degradação podem ser visualizados na Figura 12.

Como pode ser observado, os resultados demonstraram que apenas 01 larvas sobrevive ao final de dez dias de experimento quando contaminado com o agrotóxico. Já quando o teste é realizado para avaliar a toxicidade dos intermediários de degradação observa-se uma quantidade maior de sobrevivência das larvas na rês reatores. Com destaque para o R3 com sobrevivência de 09 larvas ao final de dez dias de experimento.

Figura 13 – Percentual de sobrevivência da larva *Tenebrio molitor* exposta ao agrotóxico sem tratamento.

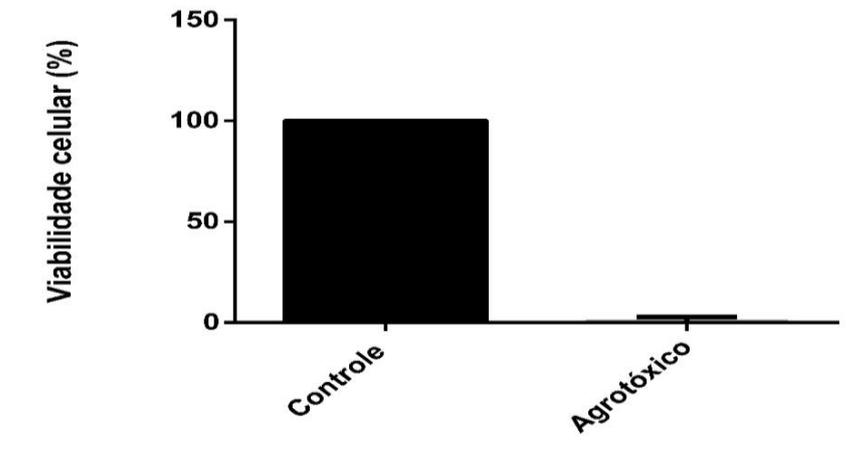
	Korplan XPBS	R1 XPBS	R2 XPBS	R3 XPBS
Valor de p	<0,0001	0,0121	0,1462	0,3173
Média de Sobrevida (dias)	1	6,5	N.D.	N.D.



A análise estatística pelo teste da ANOVA foi realizada para avaliar o nível de relação entre o agrotóxico e o controle quanto ao parâmetro toxicidade aguda. Após o ensaio de toxicidade do agrotóxico, foi constatado que existe uma diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre o agrotóxico e o controle com $p = 0.0251$. Associando esse dado com o quantitativo de sobrevivência das larvas pode-se concluir que o agrotóxico apresenta toxicidade aguda que justifica o tratamento.

Após a avaliação da citotoxicidade das células de fibroblastos frente ao agrotóxico utilizando a avaliação da viabilidade celular pela técnica de MTT, foi observado que, após 48h de exposição das células de fibroblasto ao agrotóxico, houve uma perda de 77,2% e 74,9%, respectivamente, do total de células testadas, indicando uma toxicidade moderada dos efluentes, como pode ser visualizado na figura 14.

Figura 14 - Citotoxicidade do agrotóxico frente a células de fibroblastos após 48h de exposição



Os estudos de toxicidade de agrotóxico vêm aumentando nos últimos anos. Halstead, Civitello e Rohr (2015) relataram a toxicidade de três agrotóxicos da classe dos organofosforados quando utilizados quando utilizados macroartrópodes aquáticos. Os autores avaliaram a toxicidade aguda e crônica dos agrotóxicos e constataram as duas com a utilização do modelo. Bianchi, Fernandes e Marin-Morales (2016) relataram a toxicidade de dois pesticidas organoclorados utilizando o modelo *Allium cepa*. Os autores relataram que os agrotóxicos individualmente e a mistura deles apresenta citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

3.7.1 Toxicidade Aguda com a espécie de minhoca *Violeta do himalaia*

A toxicidade aguda do tratamento frente a espécie de minhoca *Violeta do himalaia* pode ser avaliada através da perda da massa dos indivíduos e presença de casulos nos reatores 1, 2 e 3 ao longo dos 45 dias de experimento como mostra as Figuras 14A e 14B.

Ao longo dos 45 dias de experimentos observou-se que o R1 apresentou a maior toxicidade com percentuais elevados de perda de massa com 15 e 30 dias de tratamento, seguido do R2 e R3 respectivamente. Esse perfil pode ser visualizado quando a quantificação do número de casulo onde observa-se que o R1 apresenta um quantitativo de casulos menor que os R2 e R3. Esse comportamento pode ser explicado devido a toxicidade do agrotóxico ser maior que a dos compostos intermediários formados ao longo do processo de tratamento, o que explicaria a diminuição da toxicidade com 45 dias no modelo testado.

Figura 15A – Perda de massa das espécies de minhoca *Violeta do himalaia* nos reatores de solo contaminados com Korplan com 15, 30 e 45 dias de tratamento.

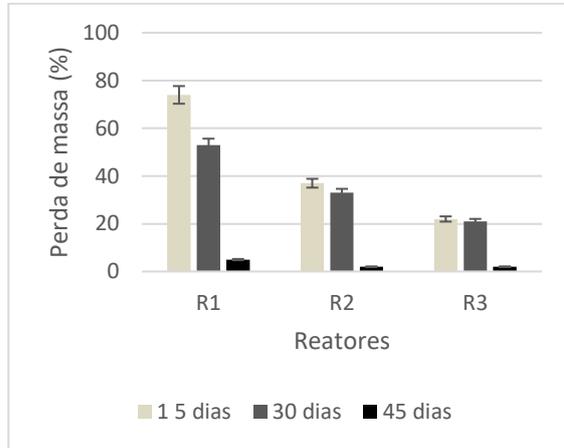
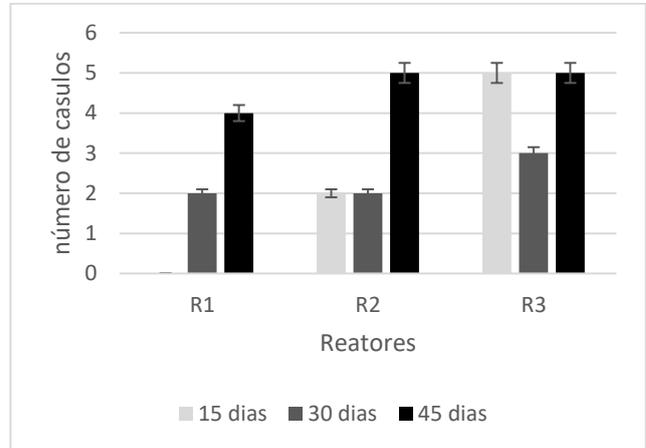


Figura 15B – Número de casulos das espécies de minhoca *Violeta do himalaia* nos reatores de solo contaminados com Korplan com 15, 30 e 45 dias de tratamento.



Dominguez et al. (2016) utilizaram espécie de minhoca para avaliar diferentes concentrações de ácido aminometilfosfórico (AMPA), o principal intermediário do glifosato, um agrotóxico de uso comum na agricultura brasileira.

4. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, observa-se que embora o agrotóxico seja tóxico é possível estabelecer um protocolo de tratamento com os microrganismos isolados e selecionados do próprio ambiente, utilizando as condições otimizadas do processo e avaliando o comportamento dos organismos com a microbiota endógena. A avaliação em escala piloto corrobora com a eficiência do processo e se faz necessária como alternativa de tratamento para os pequenos agricultores por se tratar de uma forma mais econômica e ecoamigável de recuperar o solo saturado com o agrotóxico.

REFERÊNCIAS

- ADNAN, B. et al. Isolation and characterization of two crude oil-degrading fungi strains from Rumaila oil field, Iraq. **Biotechnology Reports**, v. 17, p. 104-109, 2018.
- ALEF, K. Soil respiration. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, D. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. London: Academic Press, 1995. p. 214-216.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. 2. ed. New York: Academic, 1999.
- ALMEIDA, D.G. et al. Descoloração do corante Índigo Carmim e produção de Lacase por fungos filamentosos. **Scisntia Plena**, v. 8, n. 5, 2012.
- _____. Biodegradation of marine fuel MF-380 by microbial consortium isolated from seawater near the petrochemical Suape Port, Brazil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 73-82, 2017.
- ANDA, M.; HUSNAIN, E. S.; SUBARDJA, D. Strategy to reduce fertilizer application in volcanic paddy soils: Nutrient reserves approach from parent materials. **Soil & Tillage Research**, v. 150, p. 10-20, 2015.
- ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solo**. 2002. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.
- BAELUM, J.; JACOBSEN, C.S.; HOLBEN, W.E. Comparison of 16S rRNA gene phylogeny and functional *tfdA* gene distribution in thirty-one different 2,4- dichlorophenoxyacetic acid and 4-chloro-2-methylphenoxyacetic acid degraders. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 33, p. 67-70, 2010.
- BAPTISTA, N. M. Q. et al. Effects of gamma radiation on enzymatic production of lignolytic complex by filamentous fungi. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 7, p. 612-621, 2015.
- BARRETO, W. J. et al. Biodegradação de uma mistura de corantes têxteis usando o fungo *Ganoderma* sp: um estudo cinético. **Quim. Nova**, n. 34, p. 568-572, 2011.
- BARROS, F.F.C.; QUADROS, C.P.; PASTORE, G. M. Propriedades emulsificantes e estabilidade do biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis* em manieira, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, n. 4, p. 979-985, 2008.
- BEZERRA, M. S. et al. Produção de Biotensoativos Utilizando *Pseudomonas aeruginosa* (P.A.) e Resíduo Agroindustrial (Manieira) como Substrato. **HOLOS**, v.1, p. 14-27, 2012.

BIANCHI, J.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of mitotic and chromosomal abnormalities on *Allium cepa* cells by pesticides imidacloprid and sulfentrazone and the mixture of them. **Chemosphere**, v. 144, p. 475-483, 2016.

BIDOIA, E.D.; MONTAGNOLLI, R.E.; LOPES, P.R.M. Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study. **Current Research Technology and Education Topics in Applied Biotechnology and Microbial Biotechnology**. A. Mendez Vilas, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos (PARA)**. Relatório anual. Brasília: ANVISA, 2016.

BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4, 2004, Rio Claro. **Anais...** Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.

CARMICHAEL, L. M.; PFAENDER, F. K. The effect of inorganic and organic supplements on the microbial degradation of phenanthrene and pyrene in soils. **Biodegradation**, Dordrecht, v.8, n.1, p.1-13, 1997.

CELIS, E.; ELEFSINIOTIS, P.; SINGHAI, N. Biodegradation of agricultural herbicides in sequencing batch reactors under aerobic or anaerobic conditions. **Water Research**, v.42, p.3218-3224, 2008.

CHEN, Y. C. et al. Polymorphic internal transcribed spacer region 1 DNA sequences identify medically important yeasts. **J Clin Microbiol**, v. 39, p. 4042-4051, 2001.

CHOWDHARY, A. et al. *In vitro* antifungal susceptibility profiles and genotypes of 308 clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and *Cryptococcus gattii* serotype B from north-western India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 60, p.961-967, 2011.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-Active Agents from Two *Bacillus* Species. **Appl Environ Microbiol.**, v. 53, n. 2, p.224-229, Feb. 1987.

CYCON, M. et al. Biodegradation and bioremediation potential of diazinon-degrading *Serratia marcescens* to remove other organophosphorus pesticides from soils. **Journal of Environmental Management**, v. 117, p. 7-16, 2013.

DENG, S. et al. Rapid biodegradation of organophosphorus pesticides by *Stenotrophomonas* sp. G1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 27, p. 17-24, 2015.

DIAS, L.R.L. et al. Bioprospecção de Microorganismos de Interesse Biotecnológico Isolados em Ecosistema de Manguezal. **Revista de Investigação Biomédica**, v. 9, p. 24-30, 2017.

DOELMAN, P.; BREEDVELK, G. In situ versus on site practices. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed.). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA, 1999.

DOMÍNGUEZ, A. et al. Toxicity of AMPA to the earthworm *Eisenia andrei* Bouché, 1972 in tropical artificial soil. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, 2016.

DURASAMY, K.; MUTHUSAMY, S.; BALAKRISHNAN, S. An Eco-friendly detoxification of chlorpyrifos by *Bacillus cereus* MCAS02 native isolate from agricultural soil, Namakkal, Tamil Nadu, India. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.13, n. 283-290, 2018.

EMBRAPA. **Viabilidade ambiental e econômica de dejetos de suínos**. Sete Lagoas-MG: EMBRAPA, 2006. ISSN 1518- 4277, Doc-59.

FARIA-RAMOS, I. et al. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 155, 2014.

FERNANDES, P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysis. **Enzyme Res.**, v. 2010, n. 862537,29 Sep. 2010. doi:10.4061/2010/862537.

FISKESJO, G. The Allium test as a standard in environmental monitoring, **Hereditas**, v.102, p. 99-112, 1985.

FRANCO, A.A. et al. **Revegetação de solos degradados**. Seropédica: EMBRAPA – CNPAB, 1992.

FREIRE, R.S. et al. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, São Paulo, v.23, n.4, p.504-511, 2000.

GALLEGO, S. Assessment of the effects of oxamyl on the bacterial community of an agricultural soil exhibiting enhanced biodegradation. **Science of The Total Environment**, v. 651, p. 1189-1191, 2019.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>>. Acesso em: 12 fev. 2013.

GOMES, E. B. et al. Biodegradation of Stored jet Fuel by a *Nocardia sp.* Isolated from Contaminated Soil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 5, p.1279-1284, 2009.

GONZÁLEZ, A. J. et al. Degradation and detoxification of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) by an indigenous *Delftia sp.* Strain in batch and continuous systems. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.66, p.8-13, 2012.

GRANT, W. F. Chromosome aberration assays in Allium. **Mutation Research**, v. 99, p. 273-291,1982.

_____. The present status of higher plant bioassays for detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, p. 175-185, 1994.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D. C. et al. (Ed). **Bioremediation of contaminated soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999.

HALSTEAD, N. T.; CIVITELLO, D. J.; ROHR, J. R. Comparative toxicities of organophosphate and pyrethroid insecticides to aquatic macroarthropods. **Chemosphere**, v. 135, p. 265-271, 2015.

HANSON, K.G.; DESAI, J.; DESAI, A. J. Rapid and Simple Screening Technique for Potential Crude Oil Degrading Microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, n.10, p. 745-748, 1993.

HYUNG, A. J. et al. Biodegradation of organophosphorus insecticides with PeS bonds by two *Sphingobium* sp. Strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.132, p.59-45, 2018.

ISLAM, M. A.; SAKKAS, V.; ALBANIS, T. A. Application of statistical design of experiment with desirability function for the removal of organophosphorus pesticide from aqueous solution by low-cost material. **Journal of Hazardous Materials**, v. 170, p. 230-238, 2009.

JARIYAL, M. et al. Isolation and characterization of novel phorate-degrading bacterial species from agricultural soil. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 21, p. 2214-2222, 2014.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journ. of Ethnoph.**, v. 118, n. 3, p. 361-366, 2008.

JOY, S.; RAHMAN, P. K. S.; SHARMA, S. Biosurfactant production and concomitant hydrocarbon degradation potentials of bacteria isolated from extreme and hydrocarbon contaminated environments. **Chemical Engineering Journal**, v. 317, p. 232-241, 2017.

KAMIDA, H. M. et al. Biodegradação de efluente têxtil por *Pleurotus sajor-caju*. **Quim. Nova**, v. 28, p. 629-632, 2005.

LINS, A.B. et al. Biosurfactant Production by *Cunninghamella phaeospora* UCP 1303 Using Controlled Temperature Through of Arduino. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 6, p. 2708-2715, 2017.

LUEKING, A. D. et al. Relationship of soil organic matter characteristics to organic contaminant sequestration and bioavailability. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v.29, n.1, p.317-323, 2000.

MARCHAND, C. et al. Petroleum biodegradation capacity of bacteria and fungi isolated from petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 48-57, 2017.

MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia ambiental**. 2. ed. rev. e ampl. Jaguariúna: Embrapa, 2008.

MIGUEL, M.G.; BARRETO, R. P.; PEREIRA, S. Y. Study of a tropical soil in order to use it to retain aluminum, iron, manganese and fluoride from acid mine drainage. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 563-570, 2017.

- MIRANDA, R. C. M. et al. Biodegradation of Diesel Oil by Yeasts Isolated from the Vicinity of Suape Port in the State of Pernambuco-Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, n.1, p.147-152, 2007.
- MORAIS, K. A. D. et al. Produção de Biossurfactante por *Bacillus* sp. em Meio Mínimo Contendo Glucose. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p.3085-3094, 2015.
- NAM, K.; CHUNG, N.; ALEXANDER, M. Relationship between organic matter content of soil and the sequestration of phenanthrene. **Environmental Science and Technology**, Washington, v.32, n.23, p.3785-3788, 1998.
- OHSHIRO, K. et al. Characterization of Isofenphos Hydrolases from *Arthrobacter* sp. Strain B-5. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 83, n. 3, p. 238-245, 1997.
- PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? **Agrotóxicos, saúde e ambiente**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2003.
- PITT, J. I. A laboratory guide to common *Penicillium* species. North Ryde, Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. **Division of Food Processing**, 1988.
- PREVIATI, R. et al. Isolamento e quantificação das populações de bactérias em geral e de actinomicetos presentes no solo. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 15, n. 2, p. 155-160, 2012.
- RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771, 2004.
- SCHWARZENBACH, R.P. **Environmental organic chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1993.
- TAVELLA, L.B. O uso de agrotóxicos na agricultura e suas consequências toxicológicas e ambientais. **Agropecuária Científica no Semi-árido**, v. 7, n. 2, p. 6-12, abr./jun. 2011.
- THELUSMOND, J. R. et al. Diclofenac, carbamazepine and triclocarban biodegradation in agricultural soils and the microorganisms and metabolic pathways affected. **Science of The Total Environment**, v. 641, p. 1393-1410, 2018.
- VARJANI, S. J, UPASANI, V. N. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by oleophilic strain of *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 222, p. 195–201, 2016.
- YAO, L. et al. Degradation of the herbicide dicamba by two sphingomonads via different O-demethylation mechanisms. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.104, p. 324-332, 2015.
- ZHAO, R.; BAO, H.; LIU Y. Isolation and Characterization of *Penicillium oxalicum* ZHJ6 for Biodegradation of Methamidophos. **Agricultural Sciences in China**, v. 9, n. 5, p. 695-703, 2010.