

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica **das Ciências** **Biológicas e** **da Natureza 3**

Atena
Editora
Ano 2019

José Max Barbosa de Oliveira Junior
(Organizador)

Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza 3

Atena Editora
2019

2019 by Atena Editora
Copyright © Atena Editora
Copyright do Texto © 2019 Os Autores
Copyright da Edição © 2019 Atena Editora
Editora Executiva: Prof^a Dr^a Antonella Carvalho de Oliveira
Diagramação: Natália Sandrini
Edição de Arte: Lorena Prestes
Revisão: Os Autores

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

Conselho Editorial

Ciências Humanas e Sociais Aplicadas

Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof^a Dr^a Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
Prof^a Dr^a Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
Prof^a Dr^a Juliane Sant’Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
Prof^a Dr^a Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
Prof^a Dr^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof^a Dr^a Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof^a Dr^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Ciências Agrárias e Multidisciplinar

Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano
Prof^a Dr^a Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
Prof^a Dr^a Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

Ciências Biológicas e da Saúde

Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás
Prof.^a Dr.^a Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof.^a Dr.^a Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Dr.^a Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof.^a Dr.^a Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

Ciências Exatas e da Terra e Engenharias

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará
Prof.^a Dr.^a Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

Conselho Técnico Científico

Prof. Msc. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo
Prof.^a Dr.^a Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico
Prof. Msc. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Prof.^a Msc. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia
Prof. Msc. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa
Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista
Prof. Msc. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão
Prof.^a Msc. Renata Luciane Polsaque Young Blood – UniSecal
Prof. Msc. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)	
A532	Análise crítica das ciências biológicas e da natureza 3 [recurso eletrônico] / Organizador José Max Barbosa de Oliveira Junior. – Ponta Grossa, PR: Atena Editora, 2019. – (Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza; v. 3) Formato: PDF Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader. Modo de acesso: World Wide Web. Inclui bibliografia ISBN 978-85-7247-359-0 DOI 10.22533/at.ed.590192705 1. Ciências biológicas – Pesquisa – Brasil. I. Oliveira Junior, José Max Barbosa de. II. Série. CDD 610.72
Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422	

Atena Editora
Ponta Grossa – Paraná - Brasil
www.atenaeditora.com.br
contato@atenaeditora.com.br

APRESENTAÇÃO

A obra *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* consiste de uma série de livros de publicação da Atena Editora. Com 96 capítulos apresenta uma visão holística e integrada da grande área das Ciências Biológicas e da Natureza, com produção de conhecimento que permeiam as mais distintas temáticas dessas grandes áreas.

Os 96 capítulos do livro trazem conhecimentos relevantes para toda comunidade acadêmico-científica e sociedade civil, auxiliando no entendimento do meio ambiente em geral (físico, biológico e antrópico), suprimindo lacunas que possam hoje existir e contribuindo para que os profissionais tenham uma visão holística e possam atuar em diferentes regiões do Brasil e do mundo. As estudos que integram a *“Análise Crítica das Ciências Biológicas e da Natureza”* demonstram que tanto as Ciências Biológicas como da Natureza (principalmente química, física e biologia) e suas tecnologias são fundamentais para promoção do desenvolvimento de saberes, competências e habilidades para a investigação, observação, interpretação e divulgação/interação social no ensino de ciências (biológicas e da natureza) sob pilares do desenvolvimento social e da sustentabilidade, na perspectiva de saberes multi e interdisciplinares.

Em suma, convidamos todos os leitores a aproveitarem as relevantes informações que o livro traz, e que, o mesmo possa atuar como um veículo adequado para difundir e ampliar o conhecimento em Ciências Biológicas e da Natureza, com base nos resultados aqui dispostos.

Excelente leitura!

José Max Barbosa de Oliveira Junior

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	1
INIBIÇÃO DA PEÇONHA DE <i>Bothrops alternatus</i> (URUTU) 'IN VIVO' PELO PRINCÍPIO ATIVO ISOLADO VEGETAL LUPEOL	
Benedito Matheus dos Santos Klaus Casaro Saturnino Vanderlúcia Fonseca de Paula Mirian Machado Mendes	
DOI 10.22533/at.ed.5901927051	
CAPÍTULO 2	7
INVESTIGAÇÃO DAS ATIVIDADES TÓXICA, ANTIDIARREICA E ANTIESPASMÓDICA DAS PARTES AÉREAS DE <i>SIDA RHOMBIFOLIA</i> L. (MALVACEAE)	
Rafael Lima Marinho Paiva Antônio Raphael Lima de Farias Cavalcanti Rayane Fernandes Pessoa Indyra Alencar Duarte Figueiredo Sarah Rebeca Dantas Ferreira Otemberg Souza Chaves Micaelly da Silva Oliveira Maria de Fátima Vanderlei de Souza Fabiana de Andrade Cavalcante	
DOI 10.22533/at.ed.5901927052	
CAPÍTULO 3	22
INVESTIGAÇÃO DE LECTINA E INIBIDOR DE TRIPSINA EM TUBÉRCULOS DE INHAME (<i>Dioscorea alata</i>) CULTIVADO NO NORDESTE DO BRASIL	
Julia Mariano Caju de Oliveira Edilza Silva do Nascimento Tatiane Santi Gadelha Carlos Alberto de Almeida Gadelha	
DOI 10.22533/at.ed.5901927053	
CAPÍTULO 4	38
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE FUNGOS FILAMENTOSOS ALERGÊNICOS ENCONTRADOS EM PEÇAS ANATÔMICAS HUMANAS CONSERVADAS EM SOLUÇÃO DE FORMALDEÍDO	
Hércules Gonçalves de Almeida Medeiros Adna Cristina Barbosa de Sousa	
DOI 10.22533/at.ed.5901927054	
CAPÍTULO 5	50
MEIO AMBIENTE GENÉTICO E EMBRIÕES EXCEDENTÁRIOS	
Odair Bufolo Daiane Silva Berdusco Freire Andréia de Fátima Selvati Bredariol	
DOI 10.22533/at.ed.5901927055	

CAPÍTULO 6 62

PRODUÇÃO DE ÁCIDOS PROPANOICO E ACÉTICO POR PROPIONIBACTERIUM ACIDIPROPIONICI ADSORVIDA EM MONTMORILONITA K-10

Taciani do Santos Bella de Jesus
Lucidio Cristovão Fardelone
Gustavo Paim Valença
José Roberto Nunhez
José Augusto Rosário Rodrigues
Paulo José Samenho Moran

DOI 10.22533/at.ed.5901927056

CAPÍTULO 7 72

PRODUÇÃO DE B-GLUCANASES E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E REDUÇÃO DE BIOFILME DE *Candida albicans*

Glaucia Hollaender Braun
Henrique Pereira Ramos
Maria Laura Lucas Natal
Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro

DOI 10.22533/at.ed.5901927057

CAPÍTULO 8 80

PRODUCTION AND STABILITY OF LIPASE AND PECTINASE PRESENT IN AGROINDUSTRIAL RESIDUES

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Maria Cecília Bezerra Caldas
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.5901927058

CAPÍTULO 9 84

PROPRIEDADES FÍSICAS E MECÂNICAS DE UM CIMENTO DE IONÔMERO DE VIDRO APÓS ADIÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE TiO₂

Luis Eduardo Genaro
Luana Mafra Marti
Ana Carolina Bosco Mendes
Rafael Amorim Martins
Angela Cristina Cilense Zuanon

DOI 10.22533/at.ed.5901927059

CAPÍTULO 10 91

PURIFICATION OF A XYLANASE FROM *Penicillium crustosum* AND ITS POTENTIAL USE IN CLARIFYING FRUIT JUICE

Jaina Caroline Lunkes
Vanessa Cristina Arfelli
Jorge William Fischdick Bittencourt
Rafael Andrade Menolli
Alexandre Maller
Jose Luís da Conceição Silva
Rita de Cássia Garcia Simão
Marina Kimiko Kadowaki

DOI 10.22533/at.ed.59019270510

CAPÍTULO 11 101

SENSIBILIDADE CELULAR E DE BIOFILME DE *Enterococcus* sp. AOS DESINFETANTES DE USO INDUSTRIAL

Luciana Furlaneto Maia
Naieli Mücke
Márcia Regina Terra
Danielle Karine Ohashi
Talita Butzske Bússolo
Márcia Cristina Furlaneto

DOI 10.22533/at.ed.59019270511

CAPÍTULO 12 115

SIMULAÇÃO NUMÉRICA DA PROPAGAÇÃO DE ONDAS CISALHANTES EM ROCHAS SEDIMENTARES A PARTIR DE IMAGENS MICROTOMOGRÁFICAS DE RAIOS X

Túlio Medeiros
José Agnelo Soares
Ronildo Otávio de Oliveira Neto
Juliana Targino Batista

DOI 10.22533/at.ed.59019270512

CAPÍTULO 13 127

STABILITY OF PECTINASE OF ASPERGILLUS NIGER IOC 4003 IN DIFFERENT SALTS FOR PURIFICATION IN BIPHASIC AQUEOUS SYSTEM

Millena Cristiane de Medeiros Bezerra Jácome
Murilo Ricardo do Nascimento Arrais
Carlos Eduardo de Araújo Padilha
Everaldo Silvino dos Santos

DOI 10.22533/at.ed.59019270513

CAPÍTULO 14 131

TÉCNICA DE FISH APLICADA NA IDENTIFICAÇÃO DA MICROBIOTA DE REATOR DE LODO ATIVADO UTILIZADO NA DEGRADAÇÃO DE BLENIDAS

Lívia Cordi
Nelson Durán

DOI 10.22533/at.ed.59019270514

CAPÍTULO 15 142

TEMPERATURE AND pH EFFECTS ON THE ACTIVITY AND STABILITY OF THR XYLANASES PRODUCED BY THE THERMOPHILIC FUNGUS *Rasamsonia emersonii* S10

Jéssica de Araujo Zandoni
Eleni Gomes
Gustavo O. Bonilla-Rodriguez

DOI 10.22533/at.ed.59019270515

CAPÍTULO 16 147

TRIAGEM DE TRATAMENTO DE *Luffa cylindrica* PARA IMOBILIZAÇÃO DE *Saccharomyces cerevisiae* VISANDO A PRODUÇÃO DE INVERTASE

Beatriz Paes Silva
Brenda Kischkel
Nicolle Ramos dos Santos
André Álvares Monge Neto

DOI 10.22533/at.ed.59019270516

CAPÍTULO 17 159

AÇÃO FIBRINOLÍTICA DE PROTEASES PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DE AMBIENTES AMAZÔNICOS

Thayana Cruz de Souza
Anni Kelle Serrão de Lima
Michele Silva de Jesus
Raimundo Felipe da Cruz Filho
Wim Maurits Sylvain Degrave
Leila de Mendonça Lima
Ormezinda Celeste Cristo Fernandes

DOI 10.22533/at.ed.59019270517

CAPÍTULO 18 164

ÁCIDO CÍTRICO: UM ENFOQUE MOLECULAR

Letícia Fernanda Bossa
Daniele Sartori

DOI 10.22533/at.ed.59019270518

CAPÍTULO 19 174

ACTINOBACTÉRIAS ISOLADAS DE MANGUEZAL E SEU POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO

Gabriela Xavier Schneider
Jean Carlos Ramos de Almeida
Kassiely Zamarchi
Débora Santos
Danyelle Stringari
Renata Rodrigues Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270519

CAPÍTULO 20 188

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar
Andressa Sbrano da Silva
Lidiane Coelho Berbert
Vinícius Ribeiro Flores
João Victor Rego Ferreira
Alexander Machado Cardoso
Ida Carolina Neves Direito

DOI 10.22533/at.ed.59019270520

CAPÍTULO 21 199

REABILITAÇÃO DE ÁREAS DEGRADADAS PELA MINERAÇÃO DE QUARTZITO COM INSTALAÇÃO DE USINA SUSTENTÁVEL

Gabriel Silva Gomes

DOI 10.22533/at.ed.59019270521

CAPÍTULO 22	218
COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E TOXICIDADE DAS FOLHAS DE <i>Nectandra megapotamica</i> (Spreng.) Mez (LAURACEAE)	
Viviane Mallmann	
Lucas Wagner Ribeiro Aragão	
Edineia Messias Martins Bartieres	
Valdeci José Pestana	
Shaline Séfara Lopes Fernandes	
Rogério César de Lara da Silva	
Tauane Catilza Lopes Fernandes	
Ana Francisca Gomes da Silva	
DOI 10.22533/at.ed.59019270522	
CAPÍTULO 23	223
CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae) EM SUBSTRATOS ORGÂNICOS COMPOSTOS COM RESÍDUOS DE CASTANHA-DO-BRASIL	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270523	
CAPÍTULO 24	236
SUBSTRATOS ORGÂNICOS NO CRESCIMENTO DE MUDAS DE <i>Dipteryx odorata</i> (Aubl.) Willd. (Fabaceae)	
Givanildo Sousa Gonçalves	
Lúcia Filgueiras Braga	
Letícia Queiroz de Souza Cunha	
DOI 10.22533/at.ed.59019270524	
SOBRE O ORGANIZADOR	253

IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS COM A CAPACIDADE DE BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO

Juliana Barbosa Succar

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

Andressa Sbano da Silva

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

Lidiane Coelho Berbert

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

Vinícius Ribeiro Flores

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

João Victor Rego Ferreira

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

Alexander Machado Cardoso

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

Ida Carolina Neves Direito

Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO), Laboratório de Pesquisa em Biotecnologia Ambiental, Rio de Janeiro - RJ

RESUMO: O uso de pesticidas aumentou significativamente no mercado brasileiro nos

últimos anos. Os herbicidas constituem o segundo grupo de pesticidas mais utilizados no Brasil, sendo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) um dos mais utilizados nas lavouras brasileiras. O uso indiscriminado destes compostos pode levar a contaminação ambiental e a prejuízos à saúde humana. Estudos buscam identificar microrganismos do solo com a capacidade de degradação destes pesticidas para uso em biorremediação. Este trabalho teve como objetivo identificar cepas bacterianas, com capacidade de degradação do herbicida 2,4-D, oriundas da rizosfera de chicória (*Cichorium endivia L.*). Foi realizado o isolamento bacteriano e identificação de uma cepa através de testes bioquímicos e sequenciamento. A cepa isolada foi identificada como do gênero *Delftia*, que apresenta espécies relacionadas com degradação de pesticidas.

PALAVRAS-CHAVES: 2,4-D, microbiota do solo, pesticida

IDENTIFICATION OF BACTERIA
WITH THE BIODEGRADATION
CAPACITY OF THE HERBICIDE

2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID

ABSTRACT: The pesticide use has increased significantly on the Brazilian market in the recent years. The herbicides are the second

group more used in Brazil, being the 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) one of the most used in the Brazilians crops. The indiscriminate use of these compounds may result in an contamination and damage to human health. Studies aim to identify novel soil microorganisms with the degradation capacity of these pesticides for use in bioremediation. This work aimed to identify bacterial strains with degradation capacity of the 2,4-D herbicide from the chicory rhizosphere (*Cichorium endivia* L.). Bacterial isolation and identification of a strain were performed through biochemical tests and sequencing. The isolated strain was identified as *Delftia* sp., which presents many species related to pesticide degradation.

KEYWORDS: 2,4-D, soil microbiota, pesticide

1 | INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a agricultura mundial vem crescendo em produtividade e área cultivada, acompanhada pelo uso intenso de pesticidas para atender a demanda da população mundial (ARMAS & MONTEIRO, 2005; EMBRAPA, 2018). Segundo Veiga (2007), no Brasil, a produção agrícola é dependente da utilização de pesticidas para controlar pragas, doenças e plantas daninhas que reduzem a produção nas lavouras, tendo como consequência o aumento da produtividade, ou seja, uma maior produção agrícola em uma determinada área plantada.

Desde 2009, o Brasil está entre os maiores consumidores de pesticidas a nível mundial, sendo responsável por 1/5 do consumo deste tipo de produto (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014; FAO, 2019). Trata-se de 19% de todos os pesticidas sintetizados ao redor do mundo (CASSAL *et al.*, 2014). Economicamente falando, a venda de pesticidas movimentou 7,3 bilhões de dólares no mundo (CASSAL *et al.*, 2014). Dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná mostraram que, no período de 1992 a 2012, o mercado mundial de agrotóxicos cresceu 93%, enquanto que o mercado brasileiro cresceu 190% (CASSAL *et al.*, 2014).

O uso de maneira inadequada de pesticidas pode levar à contaminação dos solos e do ambiente de um modo geral, o que tem gerado preocupações com relação ao comportamento destes compostos no ambiente. Apesar de serem muito utilizados na agricultura, podem oferecer perigo para o homem dependendo da toxicidade, do grau de contaminação e do tempo de exposição (CASTRO & CONFALONIERI, 2005; EMBRAPA, 2018). Estima-se que só no setor agrícola, cerca de 12 milhões de trabalhadores rurais são expostos diariamente aos pesticidas (OLIVEIRA-SILVA & MEYER, 2003). Sem as devidas precauções e cuidados em relação a manipulação, produção, estocagem e destino final dos pesticidas, não só o meio ambiente corre risco, mas também a saúde das pessoas que de alguma forma entram em contato com tais produtos (FERREIRA *et al.*, 2014; EMBRAPA, 2018). A utilização destes agentes químicos gerou a contaminação de grãos, frutas, legumes, hortaliças e verduras,

trazendo inúmeros malefícios ao meio ambiente, produtores rurais e aos consumidores (CISCATO, 2008). Os efeitos sobre a exposição ocupacional de trabalhadores rurais podem variar desde sintomas menos severos como dificuldades para dormir, dor de cabeça, tontura, náusea, vômito e suor excessivo, até a diminuição das defesas imunológicas, o desenvolvimento de fraqueza muscular e broncoespasmos que podem progredir para convulsões e coma, além de aborto, impotência sexual, alterações do humor e distúrbios do comportamento, como surtos psicóticos e até mesmo câncer (LUNDBERG *et al.*, 1997; FERREIRA *et al.*, 2014; INCA, 2018).

Os pesticidas são divididos em diferentes classes, dentre as quais os herbicidas, fungicidas, acaricidas, algicidas, larvicidas e inseticidas (BRASIL, 1989). Os pesticidas cujos alvos são as plantas daninhas são classificados como herbicidas, sendo um exemplo deste grupo o ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). As plantas daninhas têm efeitos negativos na produção, uma vez que competem com a cultura por espaço, água, luz e, principalmente, nutrientes; além de serem muitas vezes hospedeiras de pragas e doenças. O herbicida 2,4-D é o segundo mais utilizado nas lavouras brasileiras (IBGE, 2015), principalmente nas plantações de cana-de-açúcar.

Uma dificuldade para o desenvolvimento de uma forma eficiente de remoção de resíduos de pesticidas do meio ambiente é o fato de que a persistência do pesticida no solo depende das características do solo, especialmente do tipo de argila, e dos fatores climáticos tais como radiação, temperatura, umidade e oxigenação (BURNS, 1975; *apud* DIREITO, 2009). É a associação destes fatores, juntamente com as características da molécula, que determinam o tempo de vida dos pesticidas no ambiente.

No solo, o destino do 2,4-D pode ser afetado por vários processos como, por exemplo, o escoamento superficial, adsorção, lixiviação, degradação química e microbiológica (ATTERBY *et al.*, 2002). Segundo Atterby *et al.* (2002), os microrganismos e as plantas são capazes de degradar diferentes compostos e devolver ao meio ambiente, de modo a reciclar estas substâncias e minimizar seu impacto ambiental, sendo os agentes biológicos mais importantes para biorremediação. Os microrganismos assumem papel ainda mais relevante que os vegetais quando consideramos sua grande adaptabilidade tanto ao uso de diferentes moléculas como fonte de carbono e energia como em relação às mais variadas condições ambientais (MADIGAN *et al.*, 2004a).

Existem vários estudos quanto à distribuição dos microrganismos nos mais diferentes ambientes (MADIGAN *et al.*, 2004a). Quando se pensa em solo, especialmente em sistemas agrícolas, a comparação é feita entre rizosfera (solo sob influência radicular) e bulk (solo sem influência radicular). A rizosfera apresenta maior abundância das populações bacterianas nas proximidades das raízes do que a observada em bulk (SMALLA *et al.*, 2001).

Segundo SINGER *et al.* (2003), a existência de similaridades entre compostos aromáticos vegetais e alguns herbicidas com estrutura aromática (ANVISA, 2004)

poderia explicar a ocorrência dessas rotas de degradação nos microrganismos do solo. A diversidade dos compostos oriundos do metabolismo secundário vegetal é a resposta às perturbações bióticas e abióticas (FLORES *et al.*, 1999) e o reflexo da interação entre plantas, microrganismos e insetos (SINGER *et al.*, 2003). A co-evolução entre estas três categorias de organismos é, provavelmente, a responsável pelo desenvolvimento das rotas de degradação presentes nos microrganismos do solo. Outro aspecto levantado por Singer *et al.* (2003) é a existência de similaridades estruturais entre os compostos aromáticos vegetais e os poluentes, o que apresenta a ideia de que as rotas de degradação de pesticidas existem naturalmente em função dessas similaridades. Essa influência pode ser percebida pelo fato da degradação de pesticidas ser mais eficiente na rizosfera devido ao elevado número de microrganismos e/ou a absorção da substância pelas plantas (PIUTTI *et al.*, 2003; SUN *et al.*, 2004).

Embora a aplicação de pesticidas em monocultivos realizados em grande escala seja uma prática difícil de ser abolida em função da dificuldade de práticas rápidas e eficientes de controle de pragas, doenças e plantas daninhas, existe uma busca por tecnologias alternativas que gerem menor impacto ao meio ambiente. Segundo Rodrigues e Andrietta (2010), também há uma preocupação geral em desenvolver formas eficientes de remoção de resíduos de pesticidas do meio ambiente. É neste contexto que a biodegradação é uma alternativa para a remoção de herbicidas do ambiente, uma vez que na microbiota do solo existem microrganismos capazes de degradarem pesticidas, entre eles o herbicida 2,4-D. A identificação destes microrganismos é a primeira etapa para os estudos de biorremediação. Neste trabalho, apresentamos a estratégia de estudo para a identificação de bactérias com a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D.

2 | METODOLOGIA

2.1 Isolamento Das Bactérias Do Solo Com Capacidade De Degradação Do 2,4-D

Uma vez coletada amostra de solo da rizosfera de Chicória (*Cichorium endivia* L.), foi pesado 0,5 g de amostra do solo e diluído a 10^{-1} em solução salina 0,85% (NaCl p/v). O material foi incubado a 30°C, por 50 minutos a 150 rpm. Foi preparada diluição seriada em solução salina de 10^{-2} a 10^{-7} . De cada diluição de amostra foram plaqueados 200 µL em cada placa de petri contendo meio diferencial MEMB (CHONG, 2005). Este meio permite uma pré-seleção das bactérias pela coloração das colônias, uma vez que bactérias degradadoras do 2,4-D devem apresentar a coloração avermelhada. O plaqueamento foi realizado a partir da diluição 10^{-2} , em triplicata. Após o plaqueamento as placas foram incubadas a 30°C. Os isolados do meio MEMB foram obtidos após 9 dias da inoculação. O isolamento foi realizado através da seleção por visualização morfológica das colônias, sendo isoladas colônias de todas as cores, a exceção das azuis (colônias sem capacidade de degradação do 2,4-D pré-identificadas através do

uso do meio diferencial MEMB), utilizando meio Luria Bertani (LB) enriquecido com 2,4-D (Sigma-Aldrich com pureza > 98%) a 500 mg.L⁻¹.

Para verificação que os isolados obtidos podem crescer em meio exclusivamente com 2,4-D, estes foram repicados para meio mineral líquido contendo 2,4-D como única fonte de carbono (FÜSCHSLIN *et al.*, 2003) e incubados a 30°C durante 15 dias sob agitação de 180 rpm. Os isolados obtidos foram agrupados com base nas características morfológicas e de coloração da colônia no meio MEMB e em meio LB. Também foram consideradas a coloração de Gram e a morfologia das células. A coloração de Gram foi realizada como descrito em MADIGAN *et al.* (2004b) e a visualização da morfologia das células realizada por microscopia de campo claro (MADIGAN *et al.*, 2004b). A identificação dos isolados foi feita através dos testes bioquímicos e da amplificação do fragmento do gene *16S rDNA* (Subunidade do 16S do ácido desoxirribonucléico ribossomal). O esquema da metodologia utilizada é apresentado na Figura 1.

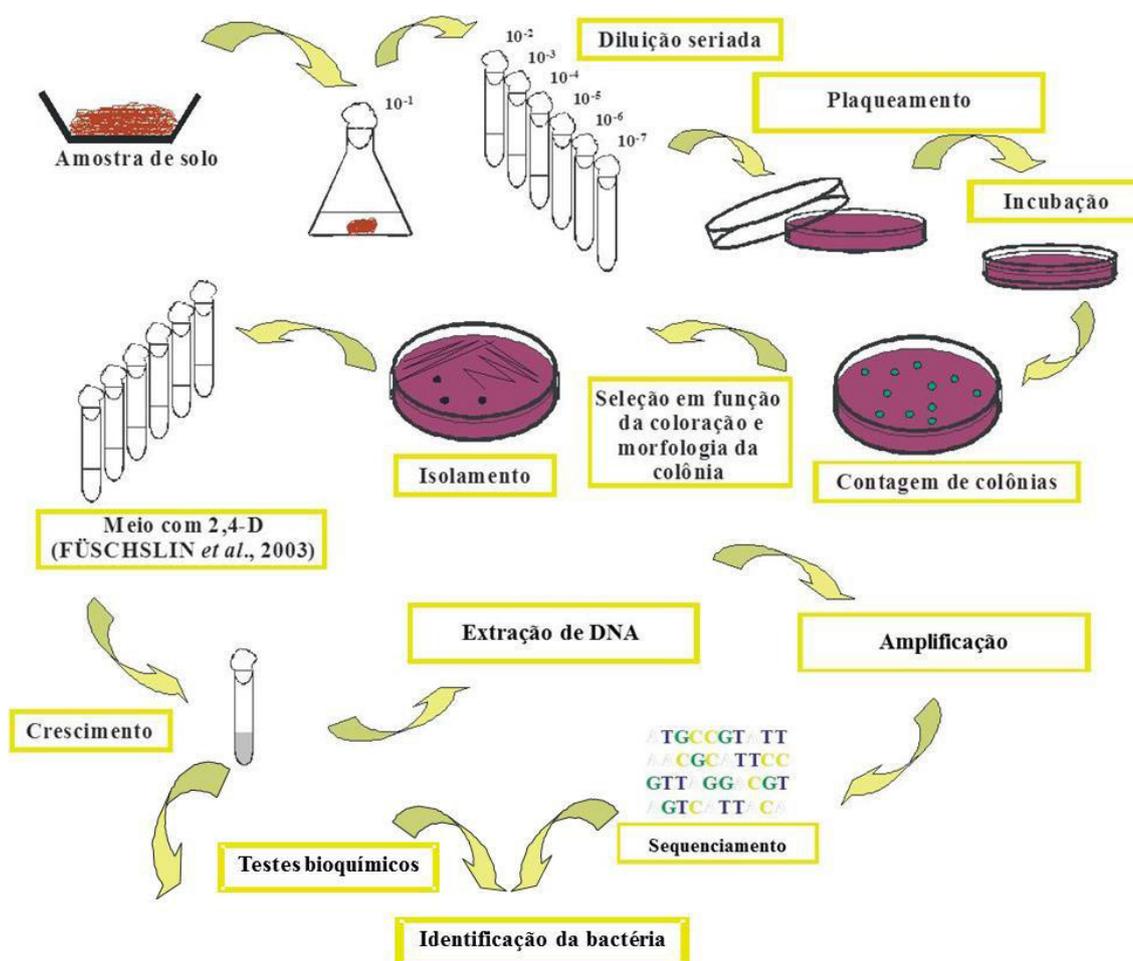


Figura 1. Esquema da metodologia para obtenção e identificação das bactérias isoladas com capacidade de degradação do herbicida 2,4-D.

2.2 Potencial de degradação do herbicida 2,4-d pelas bactérias isoladas do solo

Os isolados bacterianos foram repicados para tubos de ensaio com meio de cultura mineral usando o 2,4-D como a única fonte de carbono (FÜSCHSLIN *et al.*, 2003). O experimento foi realizado em triplicata. Foi utilizado o próprio meio de cultivo

sem o inóculo como controle. Os tubos inoculados foram incubados por 21 dias a 30°C. Após este período foi realizada a leitura dos tubos para verificação do crescimento dos isolados por turbidimetria a 550 nm e coletado o material para a análise cromatográfica. A coleta do material para análise cromatográfica foi através da filtração do meio de cultura empregando membrana durapore 0,22 µm de porosidade. A amostra filtrada foi conservada a -20°C até o momento da injeção.

O cromatógrafo utilizado na quantificação do 2,4-D foi o da marca Merck equipado com detector *Diode Array*. A aquisição e tratamento dos dados foi feita com o *software EZchrom* (Merck). A corrida cromatográfica foi realizada utilizando o método selecionado por Sbano *et al.* (2013).

Foram injetados o 2,4-D e possíveis derivados da degradação deste: 2,4-diclorofenol, 2- clorofenol, 4-clorofenol, 4-cloro-2-metilfenol e 2-metilfenol, todos da Sigma-Aldrich com pureza > 98%.

2.3 Testes bioquímicos para identificação bacteriana

Foi utilizado o equipamento VITEK® 2 Compact para identificar os microrganismos por meio de testes, que medem a utilização da fonte de carbono, resistência do microrganismo e a atividade enzimática. A metodologia empregada é baseada nas características dos dados e no conhecimento sobre o microrganismo e reações analisadas com base no banco de dados que este equipamento possui. Caso não seja reconhecido um padrão único de identificação, é fornecida uma lista de possíveis microrganismos ou a estirpe é determinada não identificável pela base de dados. Para identificação das amostras pelo VITEK® 2 Compact foram utilizados os protocolos do fabricante para uso do sistema.

2.4 Identificação bacteriana por análise de fragmento do 16s rdna

A extração do DNA do isolado foi realizada seguindo o protocolo de Berbert e colaboradores (2018). O isolado foi identificado através da amplificação e sequenciamento de fragmento do 16S rDNA gerado utilizando os iniciadores 926F (5'-AAA CTC AAA KGA ATT GAC GG – 3') (LANE,1991) e 1378R (5' GCG TGT GTA CAA GAC CC 3') (HEUER & SMALLA, 1997) nas condições descritas por Direito (2009). O Programa de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 98°C durante 5min, seguido por 30 ciclos com desnaturação a 95°C por 1min, anelamento a 55°C por 40s e extensão a 72°C por 2min, com extensão final a 72°C por 10min. O produto da amplificação foi enviado à empresa comercial que realizou a purificação e o sequenciamento capilar bidirecional. A sequência de nucleotídeos obtida foi analisada através do *software* BLAST, utilizando a ferramenta BLASTn.

3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Bactérias isoladas do solo com capacidade de degradação do 2,4-d

O isolamento das bactérias oriundas das amostras de solo da rizosfera de chicória foi realizado com o meio MEMB. O MEMB é uma variação do meio EMB empregado na microbiologia para identificação de bactérias fermentadoras de lactose (DIREITO, 2009). No MEMB, as colônias de microrganismos degradadores de 2,4-D possuem coloração avermelhada e as não degradadoras a coloração azulada (DIREITO, 2009). Como relatado por Direito (2009), além das colônias de coloração azulada e avermelha, houve o crescimento de colônias com coloração verde e amarela, o que também foi observado no isolamento de bactérias de amostra de solo da rizosfera de chicória (Figura 2). A visualização das colônias que degradam o 2,4-D pela alteração da cor da colônia é induzida pela acidificação do meio (CHONG, 2005; DIREITO, 2009). Como as colônias verdes e amarelas não são nem avermelhadas (degradadoras do 2,4-D) nem azuladas (não degradadoras do 2,4D), estas também foram selecionadas. Seguindo este critério, foram isoladas 45 bactérias, compreendendo microrganismos Gram positivos e Gram negativos.

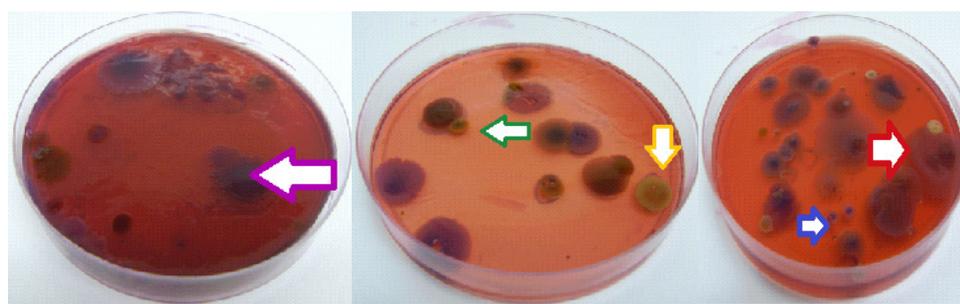


Figura 2. Fotos das placas com meio MEMB para isolamento de bactérias degradadoras do herbicida 2,4-D através da coloração das colônias. As setas identificam em: A, colônias com coloração roxa; B, colônias com coloração verde (seta verde) e amarela (seta amarela); C, colônias com coloração azul (seta azul) e vermelha (seta vermelha).

3.2 Potencial de degradação do herbicida 2,4-d pelas bactérias isoladas do solo

A capacidade de degradação do 2,4-D pelas bactérias isoladas foi analisada pelo perfil cromatográfico obtido após crescimento bacteriano em meio mineral contendo 2,4-D como única fonte de carbono. Foi realizada a sobreposição dos perfis cromatográficos gerados pelo crescimento dos isolados bacterianos com o perfil cromatográfico do 2,4-D com os seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol (Figura 3). Dentre os isolados estudados, teve destaque o identificado pelo código CH05 pelo perfil gerado demonstrar uma molécula com tempo de retenção (Figura 4) e espectro distintos das estudadas (dados não apresentados). Esta estirpe foi submetida ao processo para identificação taxonômica.

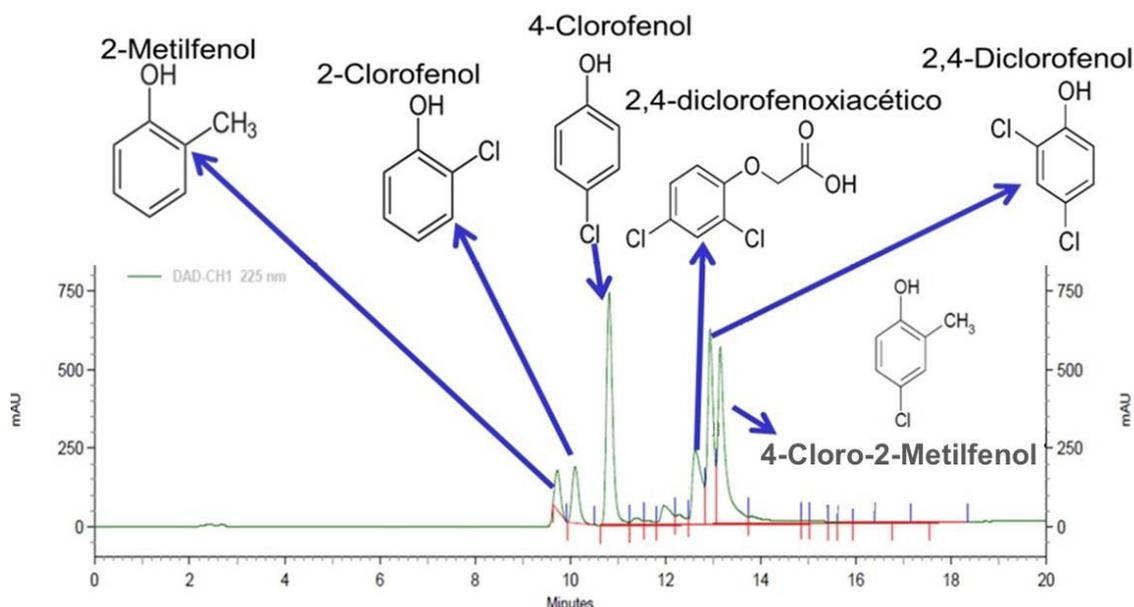


Figura 3. Perfil cromatográfico do 2,4-D com seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol. TR do 4-Clorofenol: 10,820 min; TR do 2,4-Diclorofenol: 12,940 min; TR do 2-Clorofenol: 10,107 min; TR do 2-Metilfenol: 9,727 min; e, TR do 4-Cloro-2-Metilfenol: 13,153 min.

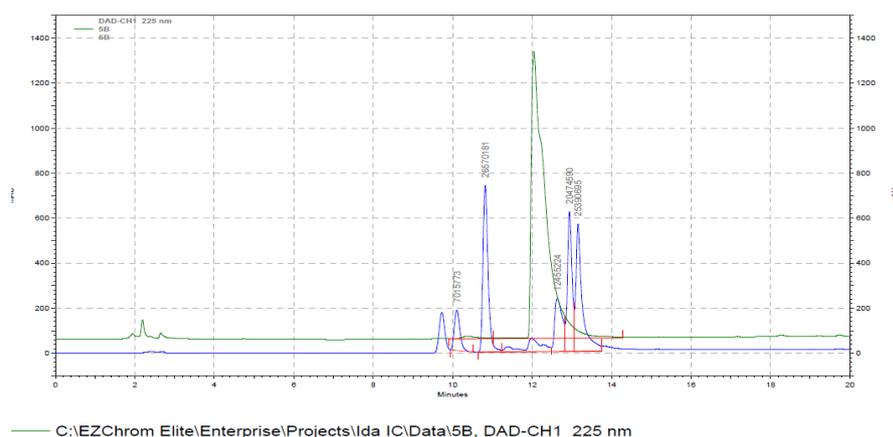


Figura 4. Perfil cromatográfico do isolado bacteriano identificado como CH05 obtido após o cultivo em meio mineral com 2,4-D (linha verde) sobreposto ao perfil cromatográfico do 2,4-D com seus derivados 4-Clorofenol; 2,4-Diclorofenol, 2-Clorofenol, 2-Metilfenol e 4-Cloro-2-Metilfenol (linha azul). Linha verde: Tempo de retenção (TR) do pico gerado após crescimento da bactéria: 12,047 min; Linha azul: TR do 4-Clorofenol: 10,820 min; TR do 2,4-Diclorofenol: 12,940 min; TR do 2-Clorofenol: 10,107 min; TR do 2-Metilfenol: 9,727 min; e, TR do 4-Cloro-2-Metilfenol: 13,153 min.

3.3 Identificação taxonômica do isolado bacteriano

Após a caracterização morfo-tintorial do isolado, a bactéria CH05 foi submetida aos testes bioquímicos pelo sistema VITEK® 2 Compact. O resultado da análise bioquímica obtido por este sistema apresentou 99% de probabilidade para a bactéria *Delftia acidovorans*. Este percentual indica que todos os testes bioquímicos analisados no equipamento atenderam ao esperado do banco de dados do VITEK® 2 Compact.

Em seus estudos, Hoffmann e colaboradores (2003) observaram que a bactéria *Delftia acidovorans* foi capaz de mineralizar o herbicida 2,4-D. Segundo os autores, essa espécie microbiana apresenta dois conjuntos de genes que participam da rota

de degradação descrita na literatura como presente na estirpe *Ralstonia eutropha* JMP134, bacteriana modelo no estudo de degradação do herbicida 2,4-D.

O resultado do sequenciamento corrobora com a identificação realizada pelo sistema VITEK® 2 Compact até o nível de gênero, pois apresentou 100% de cobertura e identidade com *Delftia sp.*.

4 | CONCLUSÕES

A metodologia empregada neste estudo é adequada para o isolamento e identificação taxonômica de bactérias com a capacidade de degradação do herbicida 2,4-D de amostras do solo. A estirpe isolada do gênero *Delftia* com capacidade de biotransformação do herbicida 2,4-D deve ser investigada tanto em nível de genoma quanto em experimentos laboratoriais para verificação da sua capacidade de uso em biorremediação.

5 | AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento FAPERJ e CNPq pelo apoio ao desenvolvimento deste estudo.

REFERENCIAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)**. Disponível em: <<http://www4.anvisa.gov.br/agrosia/asp/default.asp>> Acesso em: 13 Fev. 2004.

ARMAS, E. D.; MONTEIRO, R. T. R. **Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica**. Química Nova, v. 28, n. 6, p. 975 - 982, 2005.

ATTERBY, H.; SMITH, N.; CHAUDHRY, Q. E STEAD, D. **Exploiting microbes and plants to clean up pesticide contaminated environments**. Journal Pesticide Outlook, p. 9 – 13, 2002.

BERBERT, L.C.; SUCCAR, J.B.; FLORES, V.R.; DIREITO, I.C.N. **Protocolo para extração de DNA para utilização em aulas práticas no ensino superior**. Acta Scientiae et Technicae, v. 6, n. 1, 2018.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989**. Diário Oficial da União. Poder Executivo. Brasília, DF: Congresso Nacional, 1989.

CASSAL, V. B.; AZEVEDO, L. F.; FERREIRA, R. P.; SILVA, D. G.; SIMÃO, R. S. **Agrotóxicos: uma revisão de suas consequências para a saúde pública**. Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET, v. 18, n. 1, p. 437 - 445, 2014.

CASTRO, J. S. M.; CONFALONIERI, U. **Uso de agrotóxicos no Município de Cachoeiras de Macacú (RJ)**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 10, n. 2, p. 473 -482, 2005.

CHONG, N. M. **Development of a tool for measuring the degradation capacity of microorganisms for a xenobiotic**. Enzyme and Microbial Technology, v. 37, p. 467 – 471, 2005.

CISCATO, C. H. P. **Resíduos de praguicidas em amostras de ovo comercializadas na cidade de São Paulo**. 2008. Tese (Doutorado em Patologia Experimental e Comparada) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. **Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas**. Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, v. 18, n. 12, p. 1296 - 1301, 2014.

DIREITO, I. C. N. **Bioprospecção e interações de populações bacterianas degradadoras do herbicida 2,4-D em solos agrícolas**. 2009. 190f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas), Biotecnologia Vegetal - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

EMBRAPA. **Visão 2030: O Futuro da Agricultura Brasileira**. 2018. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/documents/10180/9543845/Vis%C3%A3o+2030+-+o+futuro+da+agricultura+brasileira/2a9a0f27-0ead-991a-8cbf-af8e89d62829>>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Pesticides Use**. Disponível em: <www.fao.org/faostat/en/#data/RP/visualize>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; SILVA, A. S.; GOMES, A. S.; SANTANA, V. M.; DIREITO, I. C. N. **Pesticidas aplicados na lavoura e o risco à saúde pública: uma revisão da literatura**. Cadernos UniFOA, v. 9, n. 24, p. 87 - 103, 2014.

FLORES, H. E.; VIVANCO, J. M.; LOYOLA-VARGAS, V. M. **'Radicle' biochemistry: the biology of root-specific metabolism**. Trends in Plant Science, v. 4, n. 6, p. 220 - 226, 1999.

FÜSCHSLIN, H. P.; RÜEGG, I.; VAN DER MEER, J. R.; EGLI, T. **Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid**. Environmental Microbiology, v. 5, p. 878 - 887, 2003.

HEUER, H.; SMALLA, K. **Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) for studying soil microbial communities**. In: VAN ELSAS, J. D., TREVORS, J. T.; WELLINGTON, E. M. H. Modern soil microbiology. New York: Marcel Dekker. p. 353 - 373, 1997.

HOFFMANN, D.; KLEINSTEUBER, S.; MULLER, R. H.; BABEL, W. **A transposon encoding the complete 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation pathway in the alkalitolerant strain *Delftia acidovorans* P4a**. Microbiology, v. 149, p. 2545 - 2556, 2003.

IBGE. **Indicadores de desenvolvimento sustentável: Brasil 2015**. Rio de Janeiro: IBGE, 2015. 352p. – (Estudos e pesquisas. Informação geográfica; n. 10)

INCA. **Agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>>. Acesso em: 10 Abr. 2019.

LANE, D. J. **16s/23s rRNA sequencing**. In: STACKEBRANDT, E.; GOODFELLOW, M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. New York: Wiley, p. 115 -175, 1991.

LUNDBERG, I.; HOGBERG, M.; MICHEISEN, H.; NISSE, G. **Effects of long term organophosphate exposure on neurological symptoms, vibration sense and tremor among South African farmer workers**. Occupational and Environmental Medicine, v. 3, p. 343 – 350, 1997.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Habitats microbianos, ciclos de nutrientes e interações com plantas e animais**. In: _____. Microbiologia de Brock. Trad. C. M. Kyan. 10 ed. United States of America: Prentice Hall, 2004a. (Tradução de: Brock biology of microorganisms) Cap. 20. CD-ROM.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Estrutura/Função celular**. In: _____. Microbiologia de Brock. Trad. C. M. Kyan. 10 ed. United States of America: Prentice Hall, 2004b. (Tradução de: Brock biology of microorganisms) Cap. 4. p. 52 - 94.

OLIVEIRA-SILVA, J. J.; MEYER A. O. **Sistema de notificação das intoxicações: o fluxograma da joeira**. In: PERES, F.; MOREIRA, J. C. É veneno ou é remédio? Agrotóxicos, saúde e ambiente, cap. 14, p. 317 - 326, 2003.

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

RODRIGUES, N. R.; ANDRIETTA, M. G. S. **Biodegradação do diclosulam por bactérias isoladas de solos cultivados com soja**. Planta Daninha, v. 28, n. 2, p. 393 - 400, 2010.

SBANO, A.; FERREIRA, J. V. R.; PECKLE, B. A.; MACRAE, A.; DIREITO, I. C. N. **Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D)**. Acta Scientiae et Technicae, v. 1, n. 2, p. 37 - 46, 2013.

SINGER, A. C.; CROWLEY, D. E.; THOMPSON, I. P. **Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation**. TRENDS in Biotechnology, v. 21, n. 3, p. 123 - 130, 2003.

SMALLA, K.; WIELAND, G.; BUCHNER, A.; ZOCK, A.; PARZY, J.; KAISER, S.;

ROSKOT, N.; HEUER, H.; BERG, G. **Bulk and rhizosphere soil bacterial communities studied by denaturing gradient gel electrophoresis: plant-dependent enrichment and seasonal shifts revealed**. Applied and Environmental Microbiology, v. 67, n. 10, p. 4742 - 4751, 2001.

SUN, H.; XU, J.; YANG, S.; LIU, G.; DAI, S. **Plant uptake of aldicarb from contaminated soil and its enhanced degradation in the rhizosphere**. Chemosphere, v. 54, p. 569-574, 2004.

VEIGA, M. M. **Agrotóxicos: Eficiência econômica e injustiça socioambiental**. Ciência e Saúde Coletiva, v. 12, n. 1, p. 145 - 152, 2007.

Agência Brasileira do ISBN
ISBN 978-85-7247-359-0

