



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRONÔMICAS E FLORESTAIS
CURSO DE AGRONOMIA

JARLAN LUCAS DOS SANTOS SILVA

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM
POTENCIAL NA BIODEGRADAÇÃO DO ATRAZINA**

MOSSORÓ

2022

JARLAN LUCAS DOS SANTOS SILVA

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM
POTENCIAL NA BIODEGRADAÇÃO DO ATRAZINA**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Orientador: Profa. Dra. Márcia
Michelle de Queiroz Ambrósio

MOSSORÓ

2022

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S586i Silva, Jarlan Lucas dos Santos.
Isolamento, seleção e caracterização de
bactérias com potencial na biodegradação do
atrazina / Jarlan Lucas dos Santos Silva. - 2022.
48 f. : il.

Orientadora: Márcia Michelle de Queiroz
Ambrósio.
Monografia (graduação) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Curso de , 2022.

1. Bioprospecção. 2. Biorremediação. 3.
Herbicidas. I. Ambrósio, Márcia Michelle de
Queiroz, orient. II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JARLAN LUCAS DOS SANTOS SILVA

**ISOLAMENTO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BACTÉRIAS COM
POTENCIAL NA BIODEGRADAÇÃO DO ATRAZINA**

Monografia apresentada a Universidade
Federal Rural do Semi-Árido como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Bacharel em Agronomia.

Defendida em: 22/ 11 / 2022.

BANCA EXAMINADORA

Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, Profa. Dra. (UFERSA)
Presidente

Jailma Suerda Silva de Lima, Profa. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Tatianne Raianne Costa Alves. M.a (UFERSA)
Membro Examinador

A minha avó (In Memoriam)

Francisca Ferreira da Silva

Aos meus pais

Francisca Francineide da Silva e José Pereira dos Santos

Dedico

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado saúde, determinação, oportunidade, proteção e graça sempre.

Agradeço a minha família em especial minha mãe Francisca Francineide da Silva, que sempre me proporcionou o melhor que conseguiu, desejando me oferecer uma melhor qualidade de vida e uma boa educação. Muito obrigado pelo amor, carinho e incentivo ao longo dessa jornada.

Agradeço à UFRSA pela oportunidade de experienciar um curso de graduação e me proporcionar tanta vivência e conhecimento.

Agradeço aos professores que me transmitiram seus conhecimentos e experiências ao longo do curso.

Agradeço muito a minha orientadora, professora Márcia Michelle de Queiroz Ambrósio, por sempre estimular minha curiosidade, desejando sempre o crescimento profissional e pessoal de todos os alunos, proporcionando sempre todo o suporte necessário, se tornando uma segunda mãe que eu adquiri na graduação.

Agradeço a Banca Examinadora, Jailma Suerda Silva de Lima e Tatiane Raianne Costa Alves, pela participação e contribuições para aperfeiçoamento deste trabalho.

Agradeço ao grupo de pesquisa do Laboratório de Microbiologia e Fitopatologia, onde conheci pessoas que me ajudaram grandemente não só de forma profissional e institucional, mas também de forma pessoal, as quais foram: Louise, Isadora, Sávio, Luan, Geovane, Darlan, Shamyra, Tatianne, Afonso, Bruna, Karol, Uilma, Isabel, Abdnego, Janderson, Vinícius, Romário, Ana Paula, Fernando, Ana Santana e Maria Helena.

Agradeço ao meu companheiro Ítalo Diego Rebouças Araújo, que sempre me estimula a dar o meu melhor e continuar sempre apesar das dificuldades, sempre torcendo pelo meu bem.

Agradeço aos meus amigos de graduação: Ana Clécia, Letycia, Vitória, Micharlyson, Maxynara, Albelina, Valéria, Gabriel, Alyson, Sayonara, Nathália, Railanda e Mariana pela amizade e ajuda ao longo da vida acadêmica.

Agradeço aos meus amigos que diretamente ou indiretamente fizeram parte da minha história. Muito obrigado!

RESUMO

No Brasil, o atrazina se destaca como um dos ingredientes ativos presente nos herbicidas mais utilizado na agricultura. Diversos são os problemas relacionados à presença desse herbicida no ambiente, sejam para humanos, animais, microrganismos ou plantas. Os microrganismos, especialmente as bactérias, possuem potencial biorremediador, e propõe uma tecnologia limpa, de baixo custo, e que visa à degradação de micropoluentes. Desta forma, o objetivo deste estudo foi isolar, selecionar e caracterizar bactérias presentes no solo, com potencial na biodegradação do atrazina. Foram isolados bactérias de três áreas agrícolas distintas com histórico de utilização desse herbicida. Os isolados obtidos inicialmente foram purificados e selecionados em meio nutriente ágar suplementado com 1000 ppm de atrazina. Aqueles que desenvolveram no meio de cultura com o herbicida, foram caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente, e de acordo com essas informações, foram associados aos seus respectivos gêneros. Os testes realizados foram: morfologia das colônias, coloração pelo método de Gram, produção de endósporos, motilidade, teste da catalase, citocromo-oxidase, via metabólica da glicose, fermentação da lactose, teste do vermelho de metila, Voges-Proskauer, utilização do citrato, descarboxilação da arginina, ornitina, lisina, desaminação da fenilalanina, produção de urease, gelatinase, lipases, esterases, redução do nitrato, indol, sulfeto de hidrogênio e produção de pigmentos. Foram isoladas 75 bactérias do solo, sendo que destas apenas 17 toleraram a presença do atrazina. Das 17 bactérias, 15 apresentaram características do gênero *Pseudomonas* (Bacilos Gram-negativos, móveis, produtores de pigmentos fluorescentes, e reações positivas para arginina, catalase, oxidase e nitrato), enquanto que as outras duas, apresentaram características do gênero *Bacillus* (Bacilos Gram-positivos, produtores de endósporo, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, e reações positivas para catalase e oxidase). As bactérias resistentes ao atrazina que foram isoladas nesse estudo apresentaram morfologia e perfil bioquímico característico de *Bacillus* e *Pseudomonas*, fazendo-se necessário a realização de análises mais sensíveis acerca da identificação dos isolados e da degradação do atrazina.

Palavras-chave: Bioprospecção, Biorremediação, Herbicidas.

ABSTRACT

In Brazil, atrazine stands out as one of the active ingredients present in the most used herbicides in agriculture. There are several problems related to the presence of this herbicide in the environment, whether for humans, animals, microorganisms or plants. Microorganisms, especially bacteria, have bioremediation potential, and propose a clean, low-cost technology that aims at the degradation of micropollutants. Therefore, the objective of this study was to isolate, select and characterize bacteria present in the soil, with potential for the biodegradation of atrazine. Bacteria were isolated from three different agricultural areas with a history of using this herbicide. The isolates obtained initially were purified and selected in nutrient agar medium supplemented with 1000 ppm of atrazine. Those that developed in the culture medium with the herbicide were morphologically and biochemically characterized, and according to this information, they were associated with their respective genera. The tests performed were: colony morphology, Gram staining, endospore production, motility, catalase test, cytochrome oxidase, glucose metabolic pathway, lactose fermentation, methyl red test, Voges-Proskauer, use of citrate, decarboxylation of arginine, ornithine, lysine, deamination of phenylalanine, production of urease, gelatinase, lipases, esterases, reduction of nitrate, indole, hydrogen sulfide and production of pigments. 75 bacteria were isolated from soil, of which only 17 tolerated the presence of atrazine. Of the 17 bacteria, 15 showed characteristics of the *Pseudomonas* genus (Gram-negative, mobile bacilli, producers of fluorescent pigments, and positive reactions for arginine, catalase, oxidase and nitrate), while the other two showed characteristics of the *Bacillus* genus (Gram-positive, endospore-producing, aerobic or facultative anaerobic, and positive reactions for catalase and oxidase). The atrazine-resistant bacteria that were isolated in this study showed morphology and biochemical profile characteristic of *Bacillus* and *Pseudomonas*, making it necessary to carry out more sensitive analyzes regarding the identification of the isolates and the degradation of atrazine.

Keywords: Bioprospection, Bioremediation, Herbicides.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REFERENCIAL TEÓRICO	12
2.1 HERBICIDAS	12
2.1.1 ATRAZINA	12
2.2 BIODEGRADAÇÃO.....	13
2.3 BIOPROSPECÇÃO e BIORREMEDIAÇÃO.....	14
2.4 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACTÉRIAS	15
2.4.1 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM	15
2.4.2 PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS	16
2.4.3 MOTILIDADE.....	16
2.4.4 CATALASE	17
2.4.5 CITOCROMO-OXIDASE	17
2.4.6 METABOLISMO OXIDATIVO/FERMENTATIVO.....	17
2.4.7 FERMENTAÇÃO DA LACTOSE, VERMELHO DE METILA E VOGES- PROSKAEUR	18
2.4.8 TESTE DO CITRATO.....	19
2.4.9 DESCARBOXILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS.....	19
2.4.10 DESAMINAÇÃO DA FENILALANINA	19
2.4.11 PRODUÇÃO DE UREASE, GELATINASE, LIPASES E ESTERASES..	20
2.4.12 REDUÇÃO DO NITRATO	20
2.4.13 PRODUÇÃO DE INDOL E SULFETO DE HIDROGÊNIO.....	21
2.4.14 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS.....	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 COLETA DE SOLO	23
3.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO SOLO.....	23
3.3 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ATRAZINA.....	23
3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS	41

1 INTRODUÇÃO

Defensivos agrícolas são compostos químicos, orgânicos ou inorgânicos, utilizados para o controle de pragas, doenças ou plantas invasoras em diversos ambientes de produção agrícola, afim de reduzir os danos e aumentar a produtividade. Esses compostos são utilizados em larga escala em todo o planeta, nos mais variados sistemas de cultivo, influenciando diretamente nas interações biológicas destes ambientes (CARBONERAS et al., 2017; CANEVAROLI et al., 2021; BHATT et al., 2022).

O atrazina (6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamineisopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é uma molécula pertencente à família das S-triazinas, amplamente utilizada nos cultivos de sorgo, cana-de-açúcar e principalmente na cultura do milho, para o controle de plantas dicotiledôneas e algumas monocotiledôneas. Este herbicida atua na inibição do transporte de elétrons na fase luminosa da fotossíntese (fotossistema II) (MARIN-MORALES et al., 2013; REIS et al., 2019; ANVISA---, 2021).

No Brasil, o atrazina se destaca como um dos ingredientes ativos mais vendidos entre os anos de 2009 a 2019 (MATIAS et al., 2021a). Devido a seu baixo custo e alta eficácia, ocupa a posição de segundo pesticida mais utilizado no mundo, e seu consumo anual é de 70.000 a 90.000 toneladas (SINGH et al., 2018).

O comportamento do atrazina no solo varia de acordo com as suas características físico-químicas, uma vez que permanece adsorvido no solo, e torna-se suscetível ao processo de lixiviação, sendo carregada para camadas mais profundas do solo e para o lençol freático, sem sofrer os processos de degradação (DOUGLASS et al., 2014; MATIAS et al., 2021b). Uma vez introduzido nestes ecossistemas, pode apresentar diversos riscos para a saúde humana, animal, vegetal, aquática e para a microbiota (CARBONERAS et al., 2017; CANEVAROLI et al., 2021).

Diversos são os problemas relacionados à presença do atrazina nesses ambientes, desde seu potencial carcinogênico a problemas endócrinos já associados à exposição ao herbicida, o que o levou a ser banido da união europeia desde 2004 (SZEWCZYK et al., 2020; MATIAS et al., 2021b).

Em ambientes agrícolas, o uso consecutivo do herbicida, tem contribuído para a diminuição da diversidade biológica, e para o aumento da resistência de pragas agrícolas (MORAES, 2019). Apesar de alguns microrganismos possuírem a capacidade

de degradar herbicidas, estes princípios ativos podem apresentar efeitos deletérios sobre a microbiota natural do solo, inibindo a atividade e reduzindo sua diversidade microbiana (FLOCH et al., 2011; HUANG et al., 2020).

A biorremediação é uma técnica que utiliza organismos vivos, ou seus metabólitos, tais como: fungos, bactérias, plantas, biofilmes ou enzimas, afim de degradar, ou transformar qualquer tipo de contaminante em moléculas menos perigosas, como dióxido de carbono, sais inorgânicos, água ou outros subprodutos (ROSA; FRACETO; MOSCHINI-CARLOS, 2012).

A biorremediação do atrazina é uma tecnologia limpa, de baixo custo e que utiliza a capacidade fisiológica de alguns microrganismos capazes de utilizar este herbicida como fonte de carbono e nitrogênio, transformando-o em compostos não tóxicos, se mostrando eficiente em ambientes com condições aeróbias, e menos eficiente em condições anaeróbicas (ZHANG et al., 2019; MATIAS et al., 2021b; BHATT et al., 2022). Desta forma, objetivou-se isolar, selecionar e caracterizar bactérias presentes em solos agrícolas, com potencial na biodegradação do atrazina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 HERBICIDAS

Devido o grande aumento da demanda pelo aumento da produção alimentar, a alternativa mais atrativa aos produtores rurais é a utilização de defensivos agrícolas. Os herbicidas são moléculas destinadas ao controle de plantas invasoras, são os principais defensivos usados em todo o mundo, seja em ambientes agrícolas ou não (BARROSO; MURATA, 2021).

O solo, comumente é o destino de produtos químicos usados na agricultura, sejam eles destinados à aplicação direta no solo, ou aqueles aplicados sobre as plantas. Ao entrar em contato com o solo, ficam sujeitos aos processos físico-químicos que os carregam no ambiente (MANCUSO; NEGRISOLI; PERIM, 2011).

As moléculas que compõe os herbicidas possuem uma série específica de propriedades físico-químicas, que juntamente com as características do ambiente (edáfica, climática e presença de microrganismos), tornam-se propensos a processos de transporte, transformação e retenção.

A aplicação dos herbicidas de forma irresponsável, e em elevadas doses, sobre diferentes culturas agrícolas, tem aumentado sua propagação no solo, nos sedimentos, em águas superficiais e subterrâneas (VRYZAS et al., 2009; CANEVAROLI et al., 2021). Inevitavelmente, a contaminação por herbicidas atinge os mananciais de abastecimento, o que representa um potencial impacto para a saúde humana (BAGHAPOUR; NASSERI; DERA KHSHAN, 2013).

2.1.1 ATRAZINA

O atrazina (6-cloro-N²-etil-N⁴-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamineisopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamina) é um herbicida do grupo das s-triazinas, intensamente utilizado no Brasil, e no mundo, para o controle de plantas daninhas nas culturas de cana-de-açúcar, milho e sorgo (REIS et al., 2019; ANVISA, 2021).

No Brasil é um dos herbicidas mais comercializado (AENDA, 2019). É utilizada, principalmente devido a sua eficácia no controle seletivo de gramíneas de folha larga, sem trazer prejuízos significativos as plantações (SINGH et al., 2018).

Sua aplicação pode ser realizada tanto na pré quanto na pós-emergência de plantas invasoras, atuando no sistema fotossintético, de modo a atuar no bloqueio do transporte de elétrons na fase luminosa, no fotossistema II, o que resulta na morte da planta alvo (MARIN-MORALES; VENTURA- CAMARGO; HOSHINA, 2013).

Geralmente o tempo de meia vida no solo pode levar até 108 dias (SILVA et al., 2020; PPDB, 2022), no entanto, já foi relatado que atrazina marcada com ^{14}C , persistiu no solo por até 22 anos (JABLONOWSKI et al. 2009). Sua degradação gera metabólitos de maior relevância, sendo considerado como micropoluente (WHO, 2011).

A persistência tende a aumentar o potencial poluente e geração de efeitos fitotóxicos às culturas subsequentes, como já relatados em culturas sensíveis cultivadas em sucessão como arroz, feijão, soja, girassol, algodão, pepino e cenoura (CARVALHO; MORETTI; SOUZA, 2010; FURLAN et al., 2016).

O atrazina é uma molécula polar, com peso molecular de $215,69 \text{ g mol}^{-1}$. É solubilizada em diferentes solventes orgânicos, tais como: acetato de etila, acetona, benzeno, clorofórmio, etanol e éter. A solubilização do atrazina em água é considerada moderada ($33,0 \text{ mg L}^{-1}$), sendo uma substância suscetível a lixiviação e escoamento superficial (FAN; SONG, 2014).

Em um levantamento realizado sobre a presença do atrazina em águas doces no Brasil, foi observado concentrações da substância variando de $0,0027$ a $10,4 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em águas superficiais, e de $0,001$ a $42,77 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ em águas subterrâneas (DIAS et al., 2018; CANEVAROLI et al., 2021).

O atrazina é considerado um carcinógeno, que pode afetar o sistema nervoso, reprodutivo, imunológico e cardiovascular (SINGH; SINGH, 2016). Seus efeitos estão relacionados ao linfoma não Hodgkin em humanos e alguns estudos associaram este herbicida a 135 alterações na atividade de locomoção em roedores (BARDULLAS; GIORDANO; RODRÍGUEZ, 2011).

Devido à alta toxicidade deste herbicida em níveis baixos, o desenvolvimento de estratégias de biorremediação se faz necessário.

2.2 BIODERGRADAÇÃO

Em locais contaminados com atrazina, microrganismos nativos podem desenvolver a capacidade de degradar essa molécula. O atrazina pode ser utilizado

como fonte de carbono, e/ou nitrogênio por esses microrganismos, seja por vias metabólicas aeróbicas, ou anaeróbicas (ARIOLE; ABUBAKAR, 2015; ALMEIDA; GUIMARÃES, 2017).

A degradação aeróbia desse herbicida ocorre nas regiões mais aeradas do solo. Este processo consiste no uso de um doador de elétron onde o receptor final de elétrons é o oxigênio, e o processo se completa com a geração de dióxido de carbono (estado mais oxidado do carbono) e água (MATIAS et al., 2021b).

A biodegradação anaeróbia apresenta desempenho inferior ao das condições aeróbias, todavia, esse processo não é interrompido nas camadas mais profundas de solo, ocorrendo através do uso de diferentes receptores de elétrons, como o dióxido de carbono (CO_2), nitrato (NO_3^-) e sulfato (SO_4^{2-}) (DOUGLASS et al., 2014; FREEMAN; THANKI, 2017).

Apesar do alto potencial de degradação em condições aeróbias, o atrazina pode ser facilmente lixiviado para camadas mais profundas de solo, ficando sujeita a biodegradação de microrganismos anaeróbios. Os gêneros de bactérias aeróbias que se destacam na degradação de atrazina inclui: *Azospirillum*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Agrobacterium*, *Candidatus*, e *Micromonospora* (TOMASSONI et al., 2014; AGUIAR, L. M. et al., 2020).

A degradação anaeróbia da atrazina, já foi relatada em amostras de águas lóticas contaminada com atrazina pelos gêneros: *Pseudomonas*, *Bacillus* e *Micrococcus* (ARIOLE; ABUBAKAR, 2015).

Muitos trabalhos já relataram diversas espécies bacterianas como indivíduos potenciais na recuperação de áreas contaminadas, com destaque para cepa ADP de *Pseudomonas* sp. que conseguiu mineralizar totalmente o atrazina para CO_2 (BEHKI; KHAN, 1986; MANDELBAUM; ALLAN; WACKETT, 1995; SHARMA et al., 2019).

2.3 BIOPROSPECÇÃO e BIORREMEDIAÇÃO

Como alternativa para tornar mais eficiente o processo de degradação desses contaminantes, a técnica de bioprospecção visa à exploração de comunidades bacterianas em ambientes com essas moléculas, objetivando encontrar novas enzimas e metabólitos capazes de utilizar os poluentes como fontes nutricionais de carbono,

enxofre, nitrogênio e fósforo (ROJAS et al., 2001; HOLGUIN; VAZQUEZ; BASHAN, 2001; RAHMAN et al., 2009; BELO et al., 2011)

O processo biológico para tratamento de resíduos é chamado de biorremediação, que utiliza organismos vivos para acelerar a degradação de poluentes e controlar a poluição no meio ambiente. É uma tecnologia limpa, com bom custo-benefício e possível de ser realizado em larga escala (ELAHI; REHMAN, 2019).

As bactérias são uma ótima opção na produção de enzimas, devido à sua alta capacidade de produção, baixo custo de utilização e facilidade de serem geneticamente modificadas (MAMANGKEY et al., 2021)

As bactérias, assim como outros microrganismos são extremamente diversificadas. A identificação à nível de espécies bacterianas é de extrema importância para entender a biodiversidade de nichos ecológicos, no entanto, a identificação presuntiva utilizando-se técnicas morfofisiológicas, possibilita a diferenciação rápida e de baixo custo, de espécies e/ou grupos bacterianos (PANDEY et al., 2019; GARCIA et al., 2021).

2.4 IDENTIFICAÇÃO PRESUNTIVA DE BACTÉRIAS

A diferenciação de indivíduos bacterianos é baseada principalmente na presença, ou na ausência de diversas enzimas codificadas pelo material genético do cromossomo bacteriano. Através de uma série de meios que avaliam certas características metabólicas dos microrganismos estudados, é possível definir um perfil bioquímico que pode levar à identificação do gênero e/ou espécie (PROCOP et al., 2018).

2.4.1 COLORAÇÃO PELO MÉTODO DE GRAM

O método de coloração de Gram é uma das técnicas mais empregadas na microbiologia, permitindo dividir as bactérias em dois grandes grupos, de acordo com a estrutura e composição da parede celular: Gram-positivas e Gram-negativas.

As bactérias Gram-positivas possuem uma parede celular de peptídeoglicano mais espessa do que as bactérias Gram-negativas, além disso, as bactérias Gram-

negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeos (lipídeos e polissacarídeos) como parte de sua parede celular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

Durante a aplicação dos corantes, o cristal violeta e iodo penetram facilmente na parede celular das bactérias, onde se combinam, formando uma molécula denominada complexo cristal violeta-iodo. Esta molécula não pode ser lavada pelo álcool para fora da camada de peptídeoglicano intacta das células Gram-positivas, resultando na retenção da cor do corante cristal violeta. Nas células gram-negativas, a lavagem com álcool rompe a camada externa de lipopolissacarídeos, e o complexo cristal violeta-iodo é removido através da fina camada de peptídeoglicano. Em função disso, as células gram-negativas permanecem incolores até serem coradas com a safranina, quando se tornam avermelhadas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; PROCOP et al., 2018; AMORIM; REZENDE; FILHO, 2018).

Essas reações ao corante de Gram, quando interpretadas em conjunto com a morfologia (cocos e bacilos) e as respostas bioquímicas dos isolados, podem ser usadas para fazer identificações presuntivas (PROCOP et al., 2018).

2.4.2 PRODUÇÃO DE ENDÓSPOROS

Endósporos são estruturas esféricas ou ovais formados dentro de algumas espécies de bactérias, que são produzidos em resposta à escassez de nutrientes ou condições adversas no ambiente (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017).

O tamanho, forma e localização dos endósporos nas células, ajudam a caracterizar e identificar algumas espécies de *Clostridium*, *Bacillus* e outros gêneros de menor importância. Em geral, os endósporos não se coram com as técnicas de coloração e aparecem como corpúsculos incolores (PROCOP et al., 2018).

2.4.3 MOTILIDADE

A motilidade bacteriana é outra característica utilizada na identificação presuntiva. As bactérias movimentam-se por meio de flagelos, sua quantidade e localização variam a depender das espécies. Os meios para estudo da motilidade têm

concentração de ágar igual ou menor que 0,4 % do volume total. Concentrações mais altas dificultam que os microrganismos se espalhem livremente (PROCOP et al., 2018).

O acréscimo de sal de tetrazólio ao meio para estudar motilidade facilita a detecção visual do crescimento bacteriano. Esse reagente é incolor, mas é convertido em complexos insolúveis de vermelho de formazan, pelas propriedades redutoras das bactérias em crescimento. A formação dessa cor vermelha ajuda a acompanhar a dispersão das bactérias a partir da linha de inoculação (GERSHMAN; O'MEARA; CHUTE, 1959; PROCOP et al., 2018).

2.4.4 CATALASE

No teste de catalase é detectada a presença desta enzima. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é utilizado como substrato para atuação da enzima, convertendo esta molécula em água e gás oxigênio. Este teste é um dos mais importantes na diferenciação de *Staphylococcus* e *Streptococcus* (OKURA; RENDE, 2008).

2.4.5 CITOCROMO-OXIDASE

O teste da citocromo-oxidase é um teste-chave na diferenciação das famílias Pseudomonadaceae (Oxidase positiva) e Enterobacteriaceae (Oxidase negativa), sendo útil também, para especificação e identificação de outros gêneros de bactérias. Essa enzima está envolvida com a redução do oxigênio no final da cadeia de transporte de elétrons. Entre as bactérias que produzem citocromo-oxidase estão as espécies de *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Pseudomonas* (SHIELDS; CATHCART, 2010; PROCOP et al., 2018).

2.4.6 METABOLISMO OXIDATIVO/FERMENTATIVO

Grande parte das espécies bacterianas encontradas em ambientes laboratoriais obtém sua energia da utilização dos carboidratos por uma das várias vias metabólicas.

Os íons hidrogênio (elétrons) são transferidos sucessivamente aos compostos com potencial redox maior, o que resulta na liberação de energia na forma de trifosfato de adenosina (ATP). Glicose é a principal fonte de carboidrato para as bactérias, que pode ser metabolizado na presença ou ausência de oxigênio (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; PROCOP et al., 2018).

Algumas bactérias, não são capazes de metabolizar carboidratos, como os membros do gênero *Moraxella*, mas conseguem obter energia da decomposição de outros compostos orgânicos, como: aminoácidos, alcoóis e ácidos orgânicos (PROCOP et al., 2018)

Algumas bactérias de vida livre, incluindo grupos fixadores de nitrogênio ou que conseguem oxidar enxofre ou ferro, podem obter energia de compostos químicos inorgânicos simples (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017; PROCOP et al., 2018).

2.4.7 FERMENTAÇÃO DA LACTOSE, VERMELHO DE METILA E VOGES-PROSKAEUR

A lactose é um dissacarídeo composto de glicose e galactose reunidas por uma ligação de oxigênio conhecida como ligação galactosídica. Com a hidrólise, essa ligação é desfeita e a reação ácida final resulta da decomposição da glicose. Esse processo é detectado pela observação de alterações da cor dos indicadores de pH (MACCONKEY, 1905).

Os testes do vermelho de metila (VM) e Voges-Proskauer (VP) diferenciam espécies bacterianas com base nas vias metabólicas da glicose.

Bactérias que utilizam preferencialmente a via de fermentação ácida mista, produzem ácidos suficientes para manter o pH abaixo de 4,4 (ponto de mudança de cor do indicador vermelho de metila). O teste de VP detecta bactérias que utilizam a via do acetilmetilcarbinol (acetoína), normalmente são cepas do grupo *Klebsiella*–*Enterobacter*–*Serratia*–*Hafnia*. A ação do hidróxido de potássio e do oxigênio atmosférico converte a acetoína a diacetilo, que é convertido a um complexo vermelho sob a ação catalítica do α -naftol e da creatina (MCDEVITT, 2009).

Embora a maioria das bactérias que metabolizam carboidratos seja representada por microrganismos anaeróbios facultativos, a utilização desses compostos nem sempre

ocorre em condições estritamente anaeróbias, na microbiologia esse termo é utilizado comumente por conveniência (PROCOP et al., 2018).

2.4.8 TESTE DO CITRATO

O teste do citrato diferencia bactérias que são capazes de metabolizar este composto das que não metabolizam. Quando o carbono utilizado provém do citrato de sódio, o nitrogênio também é extraído do fosfato de amônio presente no meio e há liberação de amônia, alcalinizando o meio de cultura, que devido o azul de bromotimol torna-se azul (MACWILLIAMS, 2009).

2.4.9 DESCARBOXILAÇÃO DE AMINOÁCIDOS

Algumas espécies de bactérias metabolizam enzimas capazes de descarboxilar certos aminoácidos. Essas enzimas removem uma molécula de CO₂, formando aminas alcalinas que variam a depender do aminoácido: Lisina decompõe em cadaverina, Ornitina decompõe em putrescina e Arginina decompõe em citrulina. Uma coloração azul arroxeada após a incubação do microrganismo testado, indica a ocorrência de uma mudança no pH do meio para a faixa alcalina quando o teste é positivo (PROCOP et al., 2018).

2.4.10 DESAMINAÇÃO DA FENILALANINA

A determinação da produção de fenilalanina-desaminase é útil na diferenciação inicial entre as espécies de *Proteus*, *Morganella* e *Providencia* de outros bacilos Gram-negativos, pois apenas os membros desses gêneros e algumas cepas relativamente raras têm a enzima responsável pela desaminação oxidativa da fenilalanina (PROCOP et al., 2018).

O ácido fenilpirúvico é o produto obtido dessa reação, que é detectado após a adição do reagente cloreto férrico, que desenvolve coloração verde caso o teste seja positivo (EDERER; CHU; BLAZEVIC, 1971).

2.4.11 PRODUÇÃO DE UREASE, GELATINASE, LIPASES E ESTERASES

Bactérias que produzem a enzima urease hidrolisam ureia, que resulta na liberação de amônia e alcalinização do meio, provocando uma mudança de cor do amarelo para o rosa no meio (EDERER; CHU; BLAZEVIC, 1971).

A gelatina é uma proteína derivada dos tecidos conjuntivos dos vertebrados que é hidrolisada na presença de gelatinases. Estas enzimas são proteases secretadas extracelularmente por espécies bacterianas que hidrolisam gelatina (PROCOP et al., 2018).

Quando tubos contendo meio gelatina são inoculados com uma bactéria gelatinase positiva, a hidrólise da gelatina resulta na liquefação do meio. Como a gelatina é digerida, sendo não mais capaz de gelificar, o meio permanece líquido quando colocado a baixas temperaturas (PROCOP et al., 2018).

As lipases são enzimas capazes de hidrolisar o triacilglicerol. Estas enzimas são produzidas por bactérias de diversos habitats, tanto aquelas que ocorrem no solo até algumas espécies presentes em leite cru, como nos gêneros: *Pseudomonas*, *Propionibacterium*, *Acinetobacter*, *Achromobacter*, *Corynebacterium*, *Myxococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Lactobacillus* (SZTAJER; MALISZEWSKA; WIECZOREK, 1988).

A atividade de esterases de ácidos graxos pode também ser útil na diferenciação de isolados de bactérias. *Pseudomonas* spp. comumente são produtoras de esterases que decompõe o tween 80 em ácido oleico e sorbitol polioxietilado (STERNISA; CARGO; SMOLE-MOZINA, 2019).

2.4.12 REDUÇÃO DO NITRATO

A redução do nitrato é um processo onde o nitrato é reduzido a nitrito e/ou outros compostos, que depois são convertidos em amônia para assimilação. A

assimilação do nitrato é muito comum entre os microrganismos e requer a enzima redutase de nitrato e nitrito. Determinados bacilos não fermentadores conseguem reduzir nitrato e/ou nitrito em nitrogênio gasoso (PROCOP et al., 2018).

2.4.13 PRODUÇÃO DE INDOL E SULFETO DE HIDROGÊNIO

O triptofano é um aminoácido essencial que pode sofrer oxidação pelas atividades enzimáticas de algumas bactérias. A enzima triptofanase consegue clivar o triptofano e, desse modo, formam indol, ácido pirúvico e amônia. O indol pode ser detectado no meio por observação do aparecimento de cor vermelha depois do acréscimo de uma solução contendo p-dimetilaminobenzaldeído (reativo de Kovac's) (DARKOH et al., 2015).

Outro fator importante na identificação de bactérias é a capacidade de liberar enxofre a partir de aminoácidos com esse elemento na forma de sulfeto de hidrogênio (H_2S), sendo bastante útil na diferenciação entre *Salmonella* e *Shigella*.

Em todos os sistemas de detecção do H_2S , ocorre a liberação do sulfeto da cisteína ou do tiosulfato presente no meio por ação enzimática da bactéria, onde há acoplamento do sulfeto (S_2^-) ao íon hidrogênio (H_1) para formar H_2S . Este composto, na presença de metais pesados como ferro, bismuto ou chumbo, forma sulfetos insolúveis, que são evidenciados por um precipitado preto (PROCOP et al., 2018).

2.4.14 PRODUÇÃO DE PIGMENTOS

Os pigmentos produzidos pelas bactérias em meio de cultura variam de acordo com o gênero e espécie, desta forma alguns pigmentos auxiliam na identificação de algumas bactérias. Os pigmentos hidrossolúveis difusíveis incluem fluoresceína (pioverdina), piocianina, piorrubina, melanina e diversos outros subprodutos pigmentados (PROCOP et al., 2018).

Para induzir a formação de piocianina e pioverdina existem meios que contêm peptonas especiais e concentração mais alta de íons magnésio e sulfato para aumentar a produção de pigmentos (KING; WARD; RANEY, 1954). Algumas cepas de *Pseudomonas* produzem ambos os pigmentos, enquanto outras produzem apenas um

deles, o que ajuda na identificação e diferenciação entre espécies de *Pseudomonas* (PROCOP et al., 2018).

O sulfato de magnésio é um sal catiônico que amplia a produção de pigmentos, mas a presença de fosfato dipotássico estimula a pioverdina enquanto diminui a produção de piocianina. A pioverdina é um pigmento amarelo esverdeado que se difunde no meio ao redor das colônias, e fluoresce sob iluminação ultra violeta (254 nm) (KING; WARD; RANEY, 1954).

A produção de piocianina é utilizada para diferenciar a *Pseudomonas aeruginosa* das outras *Pseudomonas* e organismos relacionados. A adição no meio de cloreto de magnésio e sulfato de potássio inibe a formação de fluoresceína e estimula a produção de piocianina, um pigmento difusível azul, que é solubilizado na presença de clorofórmio (CHCl_3) (PROCOP et al., 2018).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DE SOLO

O experimento foi conduzido no laboratório de Microbiologia e Fitopatologia na Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), no município de Mossoró, RN.

Os isolados bacterianos foram obtidos a partir de amostras de solo, coletadas em áreas produtoras da região com histórico de utilização do atrazina, sendo elas: Horta didática da UFERSA (latitude 5°12'26,122" Sul; longitude 37°19'7,979" Oeste), Fazenda Barrocas (latitude 5°34'57,695" Sul; longitude 37°16'37.668" Oeste) e Fazenda Agrícola Bom Jesus (latitude 5°0'26,54" Sul; longitude 37° 23' 53,16" Oeste). Foram coletadas dez amostras simples, em seguida as mesmas foram homogeneizadas e retirou-se uma amostra composta, na qual foram realizadas as análises. Esse procedimento foi realizado em cada uma das três localidades, tendo-se assim uma amostra composta de cada área.

3.2 ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO SOLO

Inicialmente pesou-se 1 g de cada amostra de solo, adicionando-se em tubo de ensaio contendo 9 mL de água destilada e esterilizada, homogeneizado em agitador tipo vórtex, e transferiu-se 1 mL para um novo tubo realizando-se uma diluição seriada (TORTORA; FUNKE; CASE, 2017), e então foram transferidos 100 µL para placas de *Petri* contendo meio Nutriente Ágar (NA), e espalhado com alça de Drigalski. As placas foram mantidas em estufa incubadora do tipo BOD (*Biochemical Oxygen Demand*), a $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 48 horas.

3.3 SELEÇÃO DE BACTÉRIAS RESISTENTES A ATRAZINA

Após o crescimento das colônias bacterianas, as mesmas foram repicadas para as placas de *Petri* com NA suplementado com 1000 ppm de Atrazina comercial (Herbitrin 500 BR[®]) (BILLET et al., 2021), objetivando-se selecionar isolados tolerantes a presença do herbicida. Os isolados que apresentaram crescimento foram purificados em NA e preservados em tubos de ensaio contendo meio NA inclinado.

3.4 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E BIOQUÍMICA DAS BACTÉRIAS

Os isolados foram caracterizados morfolologicamente e bioquimicamente, a fim de identificar de forma presuntiva o gênero destas bactérias.

Os testes e provas bioquímicas utilizadas nesse processo foram: morfologia das colônias, coloração pelo método de Gram, produção de endósporos, motilidade, teste da catalase, teste da citocromo-oxidase, via metabólica da glicose O/F, fermentação da lactose, teste do VM, teste de VP, utilização do citrato como fonte única de carbono, descarboxilação da arginina (arg), descarboxilação da ornitina, descarboxilação da lisina (lis), desaminação da fenilalanina (fen), produção de urease, hidrólise da gelatina, produção de lipases, produção de esterases, redução do nitrato, produção de indol, produção de sulfeto de hidrogênio, produção de pioverdina e produção de piocianina (BENSON, 2002; PROCOP et al., 2018).

As bactérias foram cultivadas, inicialmente, em meio NA, e mantidas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 horas, de onde foram repicadas para os respectivos meios de cada teste.

Para avaliação morfológica, as colônias isoladas foram observadas em microscópio estereoscópico (Carl Zeiss do Brasil) e avaliadas de acordo com suas características (tipo, coloração, elevação e borda) (BENSON, 2002).

Para a coloração de Gram, com o auxílio de uma alça bacteriológica, diluiu-se em lâminas de vidro, colônias isoladas de cada bactéria, onde foram fixadas pelo calor e coradas com cristal violeta, lugol, álcool acetonado, e safranina nos respectivos tempos de 1 minuto, 1 minuto, 10 segundos e 30 segundos, respectivamente. Após a secagem, as lâminas foram levadas ao microscópio óptico (Olympus CX31), e observadas em aumento de 1000x, com óleo de imersão, onde foram classificadas de acordo com a coloração das células em Gram-positivas (roxo), ou Gram-negativas (vermelho), e ausência ou presença de endósporos.

Na avaliação de motilidade inoculou-se as bactérias até a base dos tubos contendo meio semi-sólido Clark-Lubz (7 g/L peptona; 5 g/L fosfato de potássio; 5 g/L glicose; 2 g/L ágar) e suplementado com 0,005 % de sal de tetrazólio após a esterilização do meio (GERSHMAN; O'MEARA; CHUTE, 1959).

Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas, o resultado foi positivo se observado turvação vermelha ao longo do tubo, além da linha de inoculação, e considerado negativo se houve crescimento apenas na linha de inoculação (Figura 1).

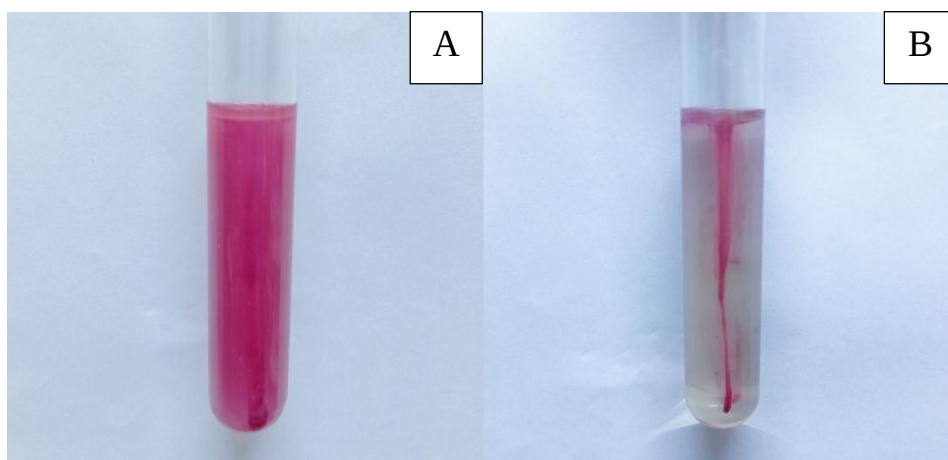


Figura 1: Teste de motilidade. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

Para o teste de catalase, utilizou-se uma alça bacteriológica para transferir colônias isoladas para uma lâmina de vidro, contendo uma gota de peróxido de hidrogênio 2 %. A formação de bolhas foi considerada resultado positivo, e a ausência de bolhas foi considerada resultado negativo (OKURA; RENDE, 2008) (Figura 2).

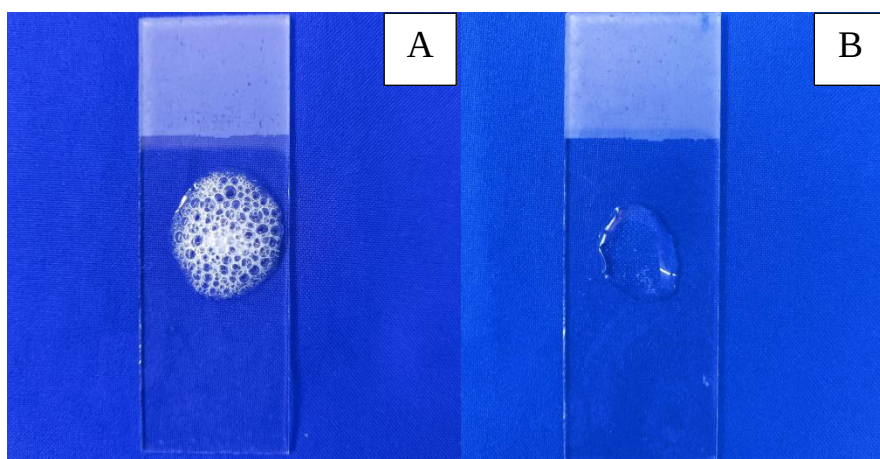


Figura 2: Teste de catalase. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

No teste da citocromo-oxidase, colônias isoladas foram transferidas para tiras de oxidase (Laborclin[®]), e após dois minutos, foram classificadas como oxidase positiva (coloração roxa) ou oxidase negativa (sem alteração na cor) (PROCOP et al., 2018) (Figura 3).

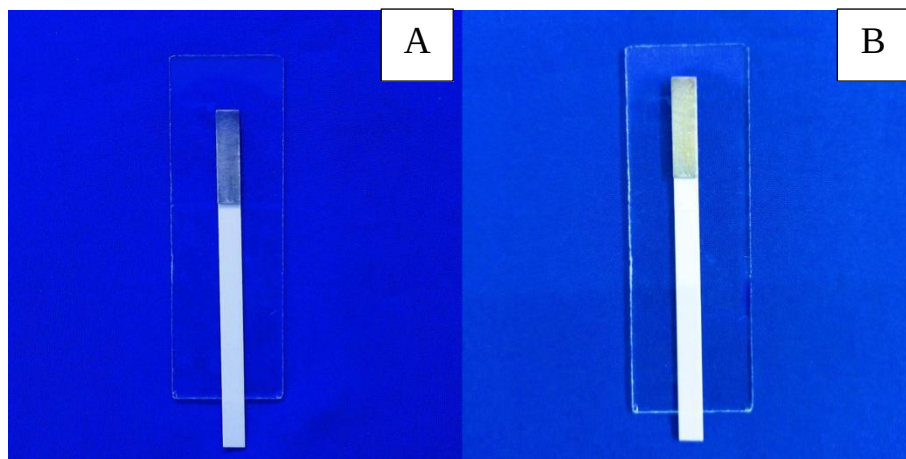


Figura 3: Teste da citocromo-oxidase. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

Avaliou-se o tipo de metabolismo empregado na utilização da glicose, onde cada isolado bacteriano foi transferido para dois tubos de ensaio contendo meio O/F (2 g/L caseína; 5 g/L cloreto de sódio; 3 g/L fosfato de potássio; 0,08 g/L azul de bromotimol; 10 g/L glicose; 10 g/L ágar). Um dos tubos foi coberto com uma camada de óleo mineral, e após 48 horas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, avaliou-se a mudança de pH de acordo com a coloração dos tubos, de verde (neutro) para amarelo (ácido) em ambos os tubos.

Isolados que apresentaram mudança de coloração em ambos os tubos foram considerados fermentadores, aqueles que apresentaram mudança de coloração apenas no tubo sem óleo mineral foram considerados oxidativos, e aqueles em que não houve mudanças de coloração em ambos os tubos, foram considerados assacarolíticos (PROCOP et al., 2018) (Figura 4).

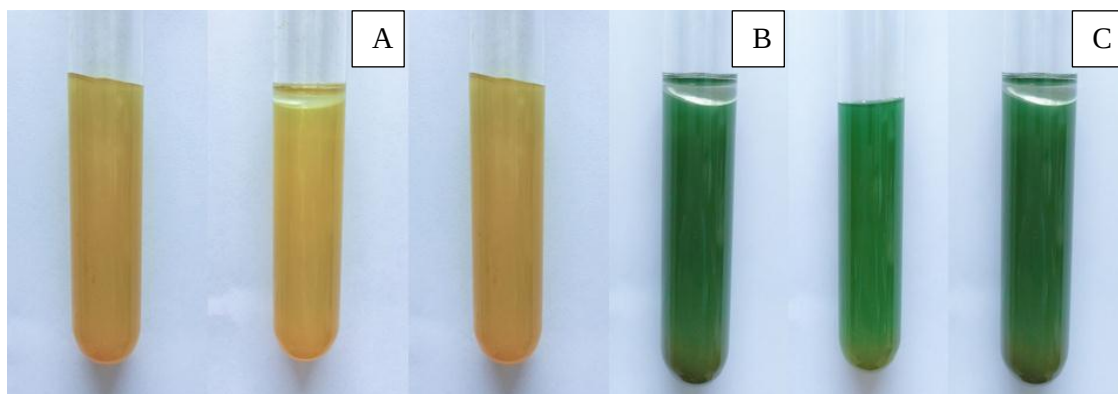


Figura 4: Teste de O/F. Metabolismo fermentativo (A), metabolismo oxidativo (B) e metabolismo assacarolíticos (C).

Utilizou-se o meio MacConkey (HiMedia[®]) e V8 para *Lactobacillus* (HiMedia[®]) para avaliar a capacidade das bactérias de fermentar a lactose. O resultado foi avaliado após 24 horas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, e considerado positivo para as bactérias que apresentaram colônias de coloração rosa em Macconkey, e coloração verde com halo amarelo em V8. O resultado foi considerado negativo para colônias que apresentaram coloração bege ou incolor em Macconkey, e coloração azul ou incolor em V8 (MACCONKEY, 1905; PROCOP et al., 2018) (Figura 5).

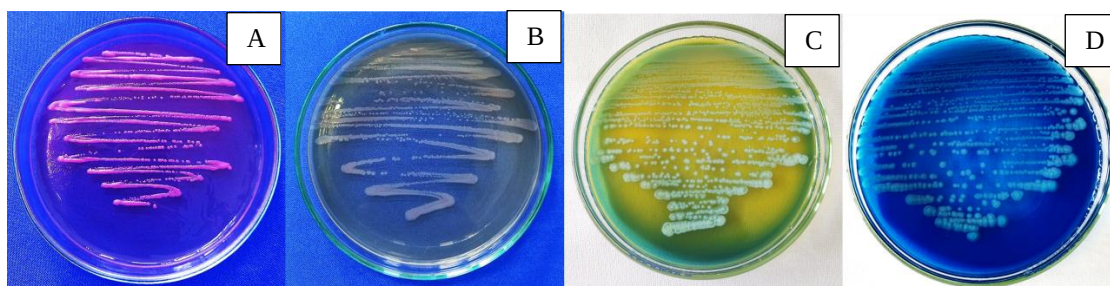


Figura 5: Resultado positivo (A) e negativo (B) para fermentação da lactose em MacConkey. Resultado positivo (C) e negativo (D) para fermentação da lactose em V8.

Para avaliação do teste de VM e VP, os isolados foram transferidos para tubos de ensaio contendo caldo Clark-Lubz, os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas, após o período de incubação, transferiu-se 3 mL de inóculo para tubos de ensaio em duplicata.

Em um dos tubos foi adicionado três gotas de solução hidroalcóolica de vermelho de metila (0,6 g/L álcool etílico; 0,2 g/L vermelho de metila), o resultado foi considerado positivo quando houve o surgimento de coloração vermelha, e negativo se a coloração foi amarela (MCDEVITT, 2009) (Figura 6).

Em outro tubo foi adicionado três gotas de solução de NaOH 40%, e três gotas de reativo de Barrit (50 g de α -naftol/L de álcool etílico), o resultado foi considerado positivo se em até 15 minutos houve o aparecimento de coloração vermelha, e negativo quando não houve mudança de coloração em até 15 minutos (MCDEVITT, 2009) (Figura 6).

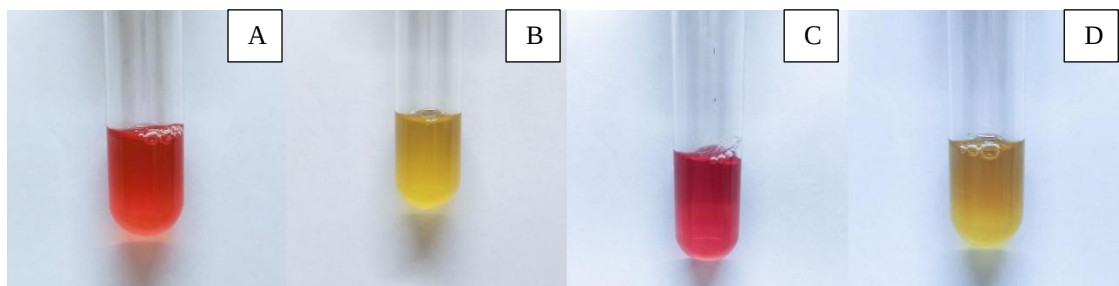


Figura 6: Resultado positivo (A) e negativo (B) para teste de Vermelho de metila. Resultado positivo (C) e negativo (D) para teste de Voges-Proskauer.

Verificou-se a capacidade dos isolados de utilizar o citrato de sódio como fonte única de carbono através da inoculação em tubos de ensaio contendo meio Citrato de Simmons (0,2 g/L sulfato de magnésio; 1 g/L fosfato de amônio monobásico; 5 g/L cloreto de sódio; 2 g/L citrato de sódio; 0,08 g/L azul de bromotimol; 15 g/L ágar).

Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas e o resultado foi avaliado pela mudança de coloração dos tubos de verde para azul (positivo) ou permanecendo verde (negativo) (MACWILLIAMS, 2009) (Figura 7).

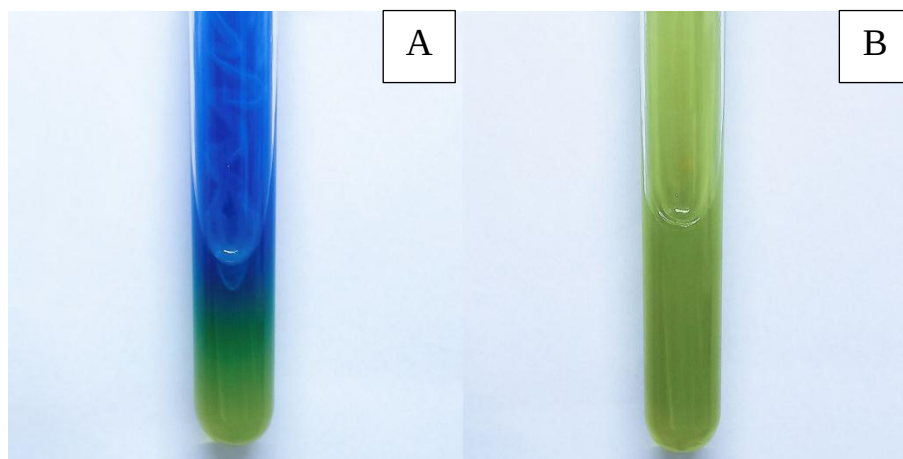


Figura 7: Teste do citrato. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

A descarboxilação de arginina foi verificada em tubos de ensaio contendo meio Arginina ágar (2 g/L extrato de carne; 2 g/L caseína; 5 g/L cloreto de sódio; 3 g/L fosfato de potássio; 1 g/L glicose; 10 g/L L-Arginina; 0,08 g/L púrpura de bromocresol; 10 g/L ágar). As bactérias foram inoculadas e uma camada de óleo mineral foi adicionada na superfície do meio com intuito de deixar os isolados em condição de anaerobiose. Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas.

O resultado foi considerado positivo se houve mudança de coloração no meio de púrpura para coloração amarelada, e desta para púrpura intenso, e considerado negativo quando não houve mudança na coloração (PROCOP et al., 2018) (Figura 8).

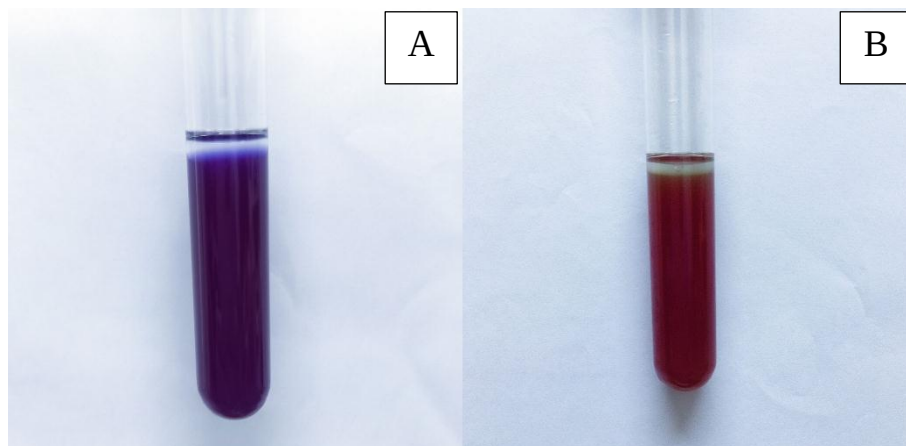


Figura 8: Teste de descarboxilação da arginina. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

Para os testes de produção de indol e descarboxilação da ornitina, utilizou-se tubos de ensaio contendo meio Motilidade Indol Ornitina (MIO) (3 g/L extrato de levedura; 10 g/L peptona; 10 g/L triptona; 5 g/L L-Ornitina; 1 g/L dextrose; 2 g/L ágar). Os isolados foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas. O resultado foi considerado positivo para descarboxilação da ornitina quando no final do período de incubação, o tubo mudou da coloração púrpura para amarelo, e de volta para púrpura, e negativo se permaneceu amarelo (PROCOP et al., 2018) (Figura 9).

Após o período de incubação, cinco gotas do reativo de Kovac's foram adicionadas na superfície do meio de cultura, e o resultado do teste foi considerado positivo quando houve aparecimento de coloração rósea, e negativo se não houve alteração na cor do reagente (DARKOH et al., 2015) (Figura 9).

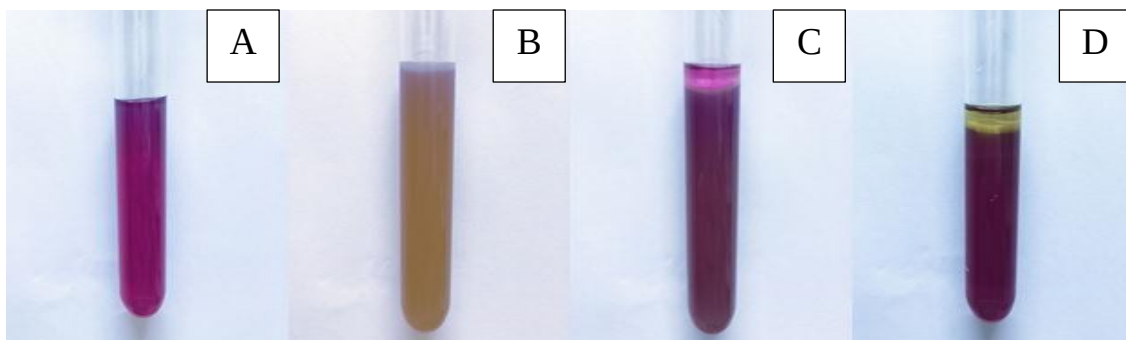


Figura 9: Resultado positivo (A) e negativo (B) para descarboxilação da ornitina. Resultado positivo (C) e negativo (D) para o teste do indol.

No teste de descarboxilação de lisina e produção de sulfeto de hidrogênio, foram utilizados tubos de ensaio contendo meio Lisina Ferro Ágar (LIA) (5 g/L peptona; 3 g/L extrato de levedura; 1 g/L dextrose; 10 g/L L-Lisina; 0,5 g/L citrato férrico amoniacal; 0,04 g/L L-Cisteína; 0,02 g/L púrpura de bromocresol; 15 g/L ágar). As bactérias foram repicadas para o meio de cultura, e incubadas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas.

O resultado para descarboxilação da Lisina foi avaliado pela mudança de coloração do meio de cultura, sendo considerado positivo quando houve mudança de amarelo para roxo, e negativo quando a coloração permaneceu amarela (PROCOP et al., 2018) (Figura 10). A presença de sulfeto de hidrogênio foi considerada positiva quando foi possível constatar a presença de um precipitado negro formado no interior do meio de cultura (PROCOP et al., 2018) (Figura 10).

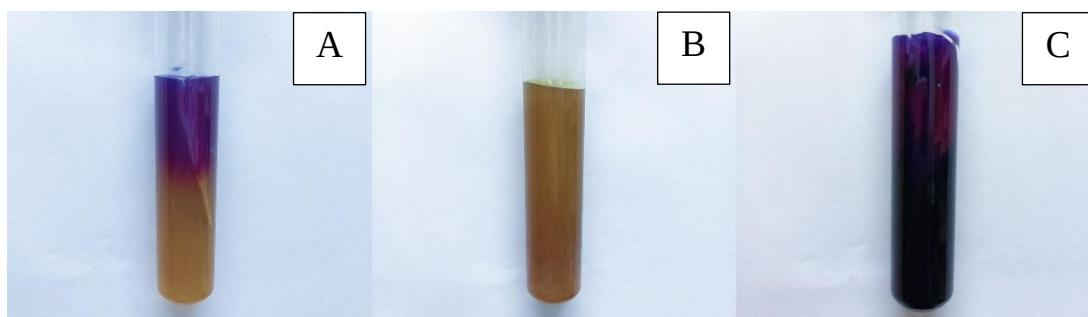


Figura 10: Resultado positivo (A) e negativo (B) para descarboxilação da lisina. Produção de sulfeto de hidrogênio em tubo (C).

O teste de desaminação da fenilalanina constituiu de transferir os isolados para tubos contendo meio Fenilalanina ágar, (3 g/L extrato de levedura; 5 g/L cloreto de sódio; 1 g/L fosfato de potássio; 2 g/L L-Fenilalanina; 12 g/L ágar). Os tubos foram

mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas. O resultado foi considerado positivo quando houve o surgimento de uma cor verde intensa, após a adição de três gotas de solução de cloreto férrico 12 % e negativo quando não houve alteração na coloração (EDERER; CHU; BLAZEVIC, 1971) (Figura 11).

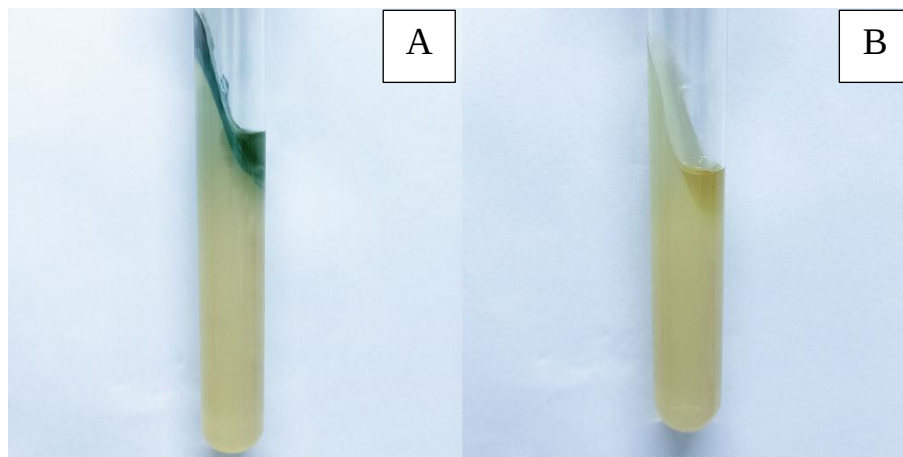


Figura 11: Teste de desaminação da fenilalanina. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

Para o teste de urease, as bactérias foram inoculadas em tubos de ensaio com meio Urease (1 g/L extrato de levedura; 1 g/L dextrose; 5 g/L cloreto de sódio; 2 g/L fosfato de potássio; 0,012 g/L vermelho fenol; 15 g/L ágar). Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas, o resultado foi considerado positivo quando houve mudança no meio de amarelo para rosa, e negativo quando o meio permaneceu inalterado (EDERER; CHU; BLAZEVIC, 1971) (Figura 12).

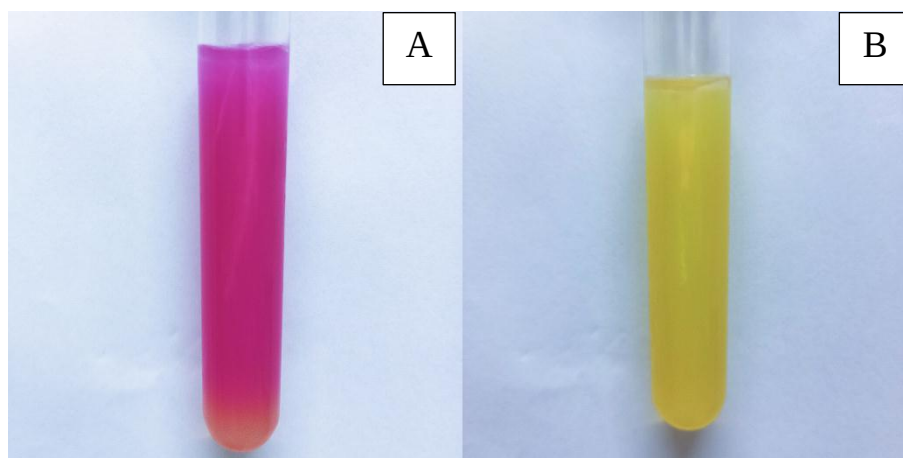


Figura 12: Teste da urease. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

A prova de hidrólise da gelatina foi realizada, repicando-se os isolados para tubos contendo meio gelatina (3 g/L extrato de carne; 5 g/L peptona; 5 g/L cloreto de sódio; 120 g/L gelatina). Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas e após o período de incubação, foram mantidos durante 30 minutos a 5°C , com o objetivo de solidificar a gelatina.

O resultado foi considerado positivo, quando o meio não solidificou após o período em baixa temperatura, e considerado negativo quando o meio de cultura se tornou sólido na mesma condição já descrita (PROCOP et al., 2018) (Figura 13).

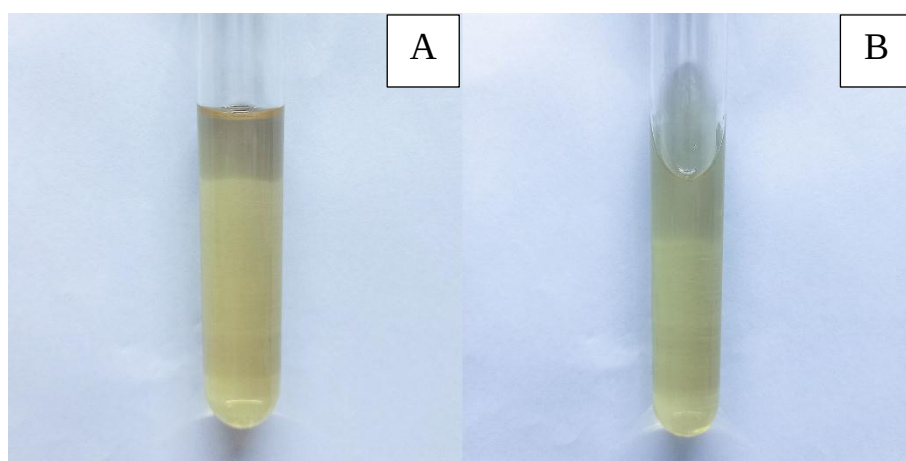


Figura 13: Hidrólise da gelatina. Resultado positivo (A) e resultado negativo (B).

Para a detecção de lipases, as bactérias foram transferidas para placas de *Petri* contendo meio NA, e suplementado com 2,5% (m/v) de óleo de soja e 0,001% de rodamina B (KOUKER; JAEGER, 1987). Para detecção de esterases, as bactérias foram plaqueadas em placas de *Petri* contendo meio de cultura composto de: 10 g/L peptona; 5 g/L cloreto de sódio; 0,5 g/L cloreto de cálcio; 10 g/L tween 80; 20 g/L ágar (SIERRA, 1957).

As placas foram mantidas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas, e o resultado para produção de lipases foi positivo quando houve detecção de colônias com brilho laranja fluorescente na luz ultravioleta, e negativo quando as colônias não apresentaram esse brilho (Figura 14). O resultado para produção de esterases foi considerado positivo quando houve formação de halo turvo ao redor da colônia e negativo quando houve ausência desse halo (Figura 14).

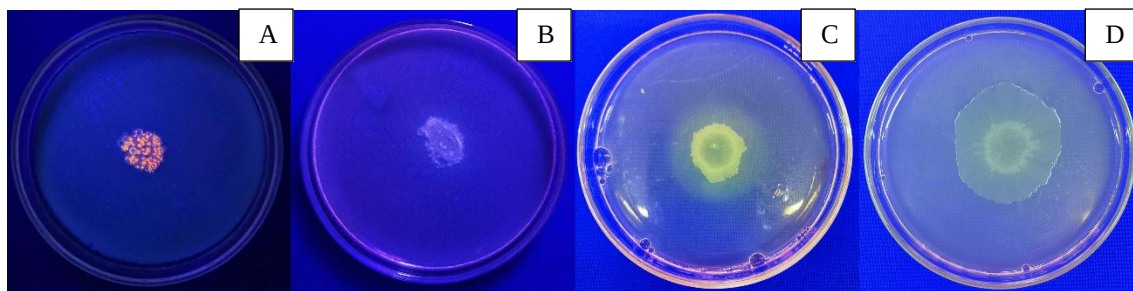


Figura 14: Resultado positivo (A) e negativo (B) para teste de lipases. Resultado positivo (C) e negativo (D) para teste de esterases.

Para verificar a capacidade dos isolados em reduzir o nitrato a nitrito, foram transferidas colônias isoladas para tubos de ensaio contendo caldo Nitrato (3 g/L extrato de carne; 5 g/L peptona; 1 g/L nitrato de potássio). Os tubos foram mantidos em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas.

O resultado foi interpretado após adicionar aos tubos, três gotas das soluções A (0,04 g ácido sulfanílico; 5 ml ácido acético; 10 ml água destilada) e B (0,025 g α -naftilamina; 5 ml ácido acético; 10 ml água destilada.) de Greiss-Ilosvay. O desenvolvimento de coloração rósea a vermelha indicou a presença de nitrito de potássio, sendo considerado resultado positivo (PROCOP et al., 2018) (Figura 15). Aos tubos que não desenvolveram esta coloração, foi adicionada uma pitada de zinco em pó como contra prova, onde o surgimento de uma coloração vermelha indicou a presença de nitrato de potássio, sendo considerado um resultado negativo para a redução de nitrato. A ausência de cores indica que o nitrato foi reduzido a nitrito, e este a gás nitrogênio livre (azoto), sendo considerado um resultado positivo (PROCOP et al., 2018) (Figura 15).

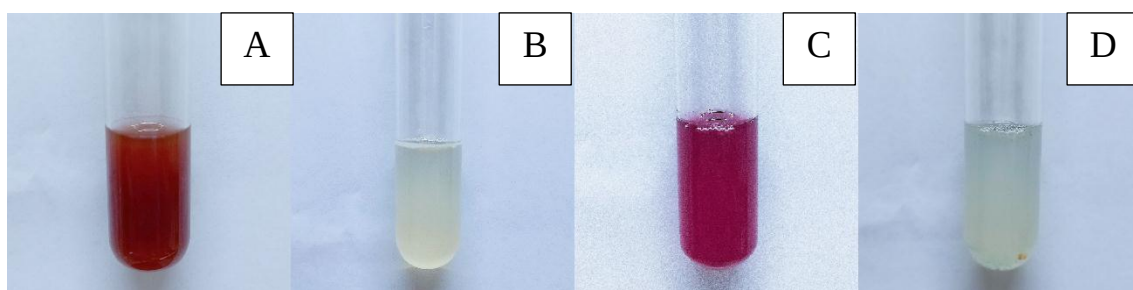


Figura 15: Redução do nitrato a nitrito. Resultado positivo (A) e negativo (B). Presença de nitrato após adicionar zinco (C) e ausência de nitrato e nitrito indicando azoto após adicionar zinco (D).

Para verificar a capacidade dos isolados de produzirem pioverdina ou piocianina, os isolados foram semeados em placas de *Petri* contendo meio de cultura *Pseudomonas* Ágar Piocianina (20 g/L peptona; 1,4 g/L cloreto de magnésio; 10 g/L sulfato de potássio; 10 g/L glicerol; 15 g/L ágar). As placas foram mantidas em BOD a $30 \pm 2^\circ\text{C}$, por 48 horas, o resultado foi observado utilizando-se luz ultravioleta (KING; WARD; RANEY, 1954) (Figura 16). Para aqueles isolados que apresentaram pigmento fluorescente, foi adicionado 5 mL de clorofórmio afim de solubilizar e diferenciar a piocianina (solúvel em clorofórmio) da pioverdina (não solúvel em clorofórmio) (PROCOP et al., 2018).

Considerou-se para os isolados que apresentaram pigmento azul ciano no clorofórmio, resultado positivo para produção de piocianina, e para os que não foram solubilizados em clorofórmio, considerou-se positivo para pioverdina (Figura 16). Os isolados que não produziram pigmentos fluorescentes em luz ultravioleta foram considerados resultado negativo.

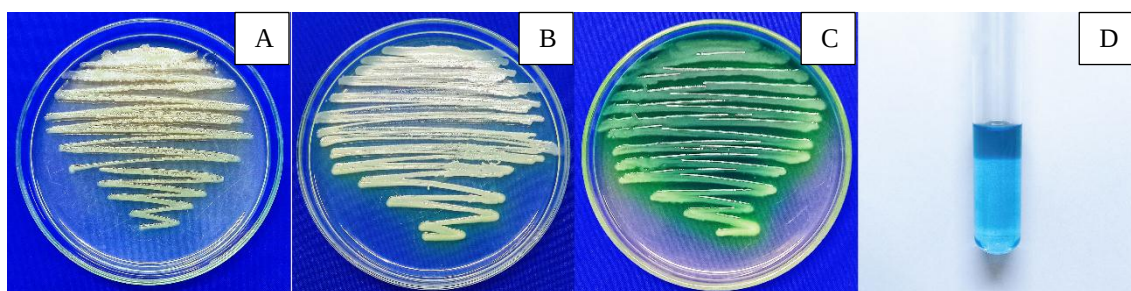


Figura 16: Produção de pigmentos fluorescentes. Ausência de pigmentos (A), pioverdina (B), piocianina em placa de *Petri* (C) e piocianina solubilizada em clorofórmio (D).

Após obtenção dos resultados dos testes bioquímicos os resultados foram comparados com aqueles descritos em chave de identificação, para identificar de forma presuntiva o gênero destes isolados (BERGEY, 1994).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram isolados do solo 75 bactérias das três localidades, sendo 15 da Horta Didática da UFERSA, 28 da Fazenda Barrocas, e 32 da Fazenda Agrícola Bom Jesus. Após a triagem em meio NA com atrazina (1000 ppm), apenas 17 isolados bacterianos desenvolveram no meio de cultura (Tabela 1).

Tabela 1: Isolados de bactérias que desenvolveram no meio NA com atrazina

Locais onde foram isoladas as bactérias		
Horta Didática da UFERSA (HDU)	Fazenda Barrocas (FB)	Fazenda Agrícola Bom Jesus (ABJ)
HDU01	BRS01	ABJ01
HDU02	BRS02	ABJ02
HDU03	BRS03	ABJ03
HDU04	BRS04	ABJ04
HDU05	BRS05	ABJ05
	BRS06	ABJ06

Os 17 isolados apresentaram colônias redondas, translúcidas, com bordas suaves e elevação convexa.

Quanto à morfologia das células, 15 isolados (88 %) foram caracterizados como bacilos móveis, Gram-negativos, e não formadores de endósporo. Os outros dois isolados (12 %), BRS01 e BRS03 foram caracterizados como bacilos Gram-positivos, produtores de endósporo, sendo que o BRS01 não possui flagelos enquanto o BRS03 possui, sendo considerado móvel.

Todas as bactérias apresentaram respostas positivas para o teste de catalase e de oxidase. A maioria das bactérias apresentou metabolismo oxidativo, capazes de utilizar a glicose apenas em condições de aerobiose, no entanto o isolado BRS01 apresentou metabolismo assacarolítico para a glicose, enquanto que o BRS03 fermentativo.

O gênero *Pseudomonas* engloba diversos representantes, descritos principalmente como bacilos móveis, Gram-negativos e aeróbicos. No entanto, sabe-se que algumas espécies como *P. aeruginosa* e *P. denitrificans* são capazes de crescer em

anaerobiose devido serem aceptores alternativos de elétrons (PROCOP, 2018; AL-DHABAAN, 2019; KOLBECK, S. et al., 2021).

O gênero *Bacillus* é caracterizado por bactérias Gram-positivas, com formato bacilo, geralmente móveis, podendo ser aeróbias, ou anaeróbicas facultativas, catalase positivas e oxidase variável de acordo com a espécie, estas bactérias ainda produzem endósporos e permanecem com as células viáveis por um longo período. (AMIN; RAKHISI; AHMADY, 2015; KUEBUTORNYE; ABARIKE; LU, 2019; AL-DHABAAN, 2019; CHENG et al., 2019; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019).

No teste do citrato, apenas o isolado BRS01 não foi capaz de utilizar o citrato como fonte de carbono. A metabolização desse carboidrato foi observada durante a caracterização de isolados de *Pseudomonas* e *Bacillus* provenientes da rizosfera em cultivos de milho e de solos poluídos com petróleo (BERGEY, 1994; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; CHENG et al., 2019; AL-DHABAAN, 2019).

A maior parte das bactérias foi capaz de descarboxilar a arginina com exceção do BRS01. A maioria das bactérias demonstrou produção de urease, exceto os isolados HDU03 e ABJ03. Os isolados HDU01, HDU05, BRS05, BRS06, ABJ04, ABJ05 e ABJ06, demonstraram resultado positivo na hidrólise da gelatina. Resultados semelhantes foram observados em cepas de *Pseudomonas*, provenientes de solos agrícolas, e solos contaminados com resíduos de petróleo. Enquanto que bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus* demonstraram resultados variáveis (BERGEY, 1994; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; CHENG et al., 2019; AL-DHABAAN, 2019; KOLBECK, S. et al., 2021; WANG et al., 2021).

Os isolados HDU03, HDU04, BRS04 e BRS03 mostraram resultados negativos para produção de lipases. No teste de produção de esterases, os isolados HDU01, HDU05, BRS02, ABJ03 e BRS01 demonstraram resultado positivo.

Em isolamentos de microrganismos de solos contaminados com óleo, observou-se que bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas* durante a caracterização bioquímica, foram capazes de produzir lipases em meio de cultura (ILESANMI et al. 2020; KOMESLI et al. 2021). Na seleção de bactérias produtoras de esterases, espécies de *Pseudomonas* demonstraram resultado positivo nesse ensaio (STERNISA; CARGO; SMOLE-MOZINA, 2019).

No teste do nitrato, os isolados BRS01 e BRS03, e BRS04, reduziram o nitrato a nitrito, enquanto que os isolados BRS05, BRS06, ABJ01, ABJ02, ABJ04, ABJ05 e

ABJ06 reduziram o nitrato a nitrito, e em seguida a gás nitrogênio. Os gêneros *Bacillus* e *Pseudomonas*, possuem diversos representantes com reação positiva para esse teste. Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* são normalmente utilizadas como controle positivo (BERGEY, 1994; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; CHENG et al., 2019; AL-DHABAAN, 2019; KOLBEC et al., 2021).

Todos os isolados exceto por BRS01 e BRS03 demonstraram a produção de pioverdina em meio de cultura, dentre estas, os isolados BRS05, BRS06, ABJ01, ABJ02, ABJ04, ABJ05 e ABJ06 demonstram também a capacidade de produzir piocianina.

A capacidade de produzir esses pigmentos é bastante utilizada para fins de classificação. A pioverdina é um pigmento amarelo esverdeado e fluorescente, com função de sideróforo, que são quelantes de ligação de ferro envolvidos no transporte desse elemento para dentro da célula (RINGEL; BRÜSER, 2018). A piocianina é uma fenazina azul-esverdeada produzida por *Pseudomonas aeruginosa* e bastante utilizada na diferenciação dessa espécie de outras *Pseudomonas*. Algumas cepas de *Pseudomonas* podem apresentar produção de ambos os pigmentos, apenas um deles ou nenhum (PROCOP, 2018; SILVA et al., 2021).

Os resultados de todos os isolados para fermentação da lactose, VM, VP, produção de indol, sulfeto de hidrogênio, descarboxilação da lisina, ornitina e desaminação da fenilalanina foram negativos. Foram observados os mesmos resultados, em estudos que realizaram esses testes na caracterização de *Pseudomonas* e *Bacillus*. (BERGEY, 1994; ABEDINZADEH; ETESAMI; ALIKHANI, 2019; CHENG et al., 2019; AL-DHABAAN, 2019, WANG et al., 2021; GUZMÁN-MORENO et al., 2022).

Baseado na caracterização bioquímica e morfológica, os isolados obtidos no referido estudo foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus* e *Pseudomonas* (Tabela 2). Esses gêneros juntamente com *Actinobacteria*, *Arthrobacter*, *Citricoccus*, *Klebsiella* e *Rhodococcus* são os mais conhecidos pela capacidade de biodegradação de atrazina seja *in vitro* ou em solo (YANG et al., 2018; JIANG et al., 2019; ZHANG et al., 2019; BHATT et al., 2022).

Tabela 2: Isolados obtidos no estudo e seus respectivos gêneros

Isolado	Gênero bacteriano	Isolado	Gênero bacteriano
HDU01	<i>Pseudomonas</i> sp.	BRS05	<i>Pseudomonas</i> sp.
HDU02	<i>Pseudomonas</i> sp.	BRS06	<i>Pseudomonas</i> sp.
HDU03	<i>Pseudomonas</i> sp.	ABJ01	<i>Pseudomonas</i> sp.
HDU04	<i>Pseudomonas</i> sp.	ABJ02	<i>Pseudomonas</i> sp.
HDU05	<i>Pseudomonas</i> sp.	ABJ03	<i>Pseudomonas</i> sp.
BRS01	<i>Bacillus</i> sp.	ABJ04	<i>Pseudomonas</i> sp.
BRS02	<i>Pseudomonas</i> sp.	ABJ05	<i>Pseudomonas</i> sp.
BRS03	<i>Bacillus</i> sp.	ABJ06	<i>Pseudomonas</i> sp.
BRS04	<i>Pseudomonas</i> sp.		

O perfil morfológico e bioquímico de todos os isolados pode ser visualizado na tabela 3.

Tabela 3: Caracterização morfológica e bioquímica dos isolados (+: reação positiva; -: reação negativa; O: metabolismo oxidativo; F: metabolismo fermentativo; A: metabolismo assacarolítico; VM: vermelho de metila; VP: Voges-Proskauer; Lis: lisina; Fen: fenilalanina; Arg: arginina; G: redução do nitrato à azoto).

Código	Gram	Formato	Endósporo	Motilidade	Catalase	Oxidase	O/F	Citrato	Lactose	VM	VP	Indol	Sulfeto	Lis	Ornitina	Fen	Arg	Urease	Lipases	Tween 80	Nitrato	Gelatinase	Pioverdina	Piocianina
HDU01	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
HDU02	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
HDU03	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-
HDU04	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
HDU05	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-
BRS01	+	Bacilo	+	-	+	+	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
BRS02	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-
BRS03	+	Bacilo	+	+	+	+	F	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-
BRS04	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-
BRS05	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	+	+	+
BRS06	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	+	+	+
ABJ01	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	-	+	+
ABJ02	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	-	+	+
ABJ03	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
ABJ04	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	+	+	+
ABJ05	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	+	+	+
ABJ06	-	Bacilo	-	+	+	+	O	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	G	+	+	+

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foram isoladas e caracterizadas 17 bactérias resistentes ao atrazina (1000 ppm) e possíveis biodegradadoras dessa molécula, nas diferentes áreas agrícolas estudadas. Dois isolados foram classificados como pertencentes ao gênero *Bacillus*, e os demais pertencentes ao gênero *Pseudomonas*.

Faz-se necessário aprofundar os estudos, visando quantificar o atrazina degradado por estes isolados *in vitro* e *in vivo*, além de sequenciar o genoma destas bactérias.

REFERENCIAS

ABEDINZADEH, M.; ETESAMI, H.; ALIKHANI, H. A. Characterization of rhizosphere and endophytic bacteria from roots of maize (*Zea mays* L.) plant irrigated with wastewater with biotechnological potential in agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. 03-05, 2019

AENDA-ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DEFENSIVOS PÓS-PATENTE. Saiba quais são os princípios ativos dos agrotóxicos mais vendidos no mundo. **Aenda**, [s.d.]. Disponível em: <https://www.aenda.org.br/noticia_imprensa/saiba-quais-sao-os-principios-ativos-dos-agrotoxicos-mais-vendidos-no-mundo/>. Acesso em: 28 out. 2022

AGUIAR, L. M. et al. Metagenomic analysis reveals mechanisms of atrazine biodegradation promoted by tree species. **Environmental Pollution**, v. 267, p. 115-636, 2020.

AL-DHABAAN, F. A. Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, p. 1247–1252, 2019.

ALMEIDA, L. DA S.; GUIMARÃES, E. C. Distribuição espacial da CTC e da relação dos macronutrientes em um Latossolo Vermelho-Amarelo cultivado com cafeeiro. **Revista Cultura Agronômica**, v. 26, p. 625–639, 2017.

AMIN, M.; RAKHISI, Z.; AHMADY, A. Z. Isolation and Identification of *Bacillus* Species From Soil and Evaluation of Their Antibacterial Properties. **Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection**, v. 2, p. 23233, 2015.

AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; FILHO, A. B. **Manual de Fitopatologia** Vol. 1 Princípios e Conceitos. 5. ed. Ceres, v. 1, 2018.

ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Monografias autorizadas, 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/setorregulado/regularizacao/agrotoxicos/monografias/monografias-autorizadas/a/4141json-file-1>. Acesso em: 28/10/2022.

ARIOLE, C.; ABUBAKAR, A. Biodegradation of Atrazine by Bacteria Isolated from Lotic Water. **Journal of Applied Life Sciences International**, v. 2, p. 119–125, 2015.

- BAGHAPOUR, M. A.; NASSERI, S.; DERA KHSHAN, Z. Atrazine removal from aqueous solutions using submerged biological aerated filter. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 11, p.1-9, 2013.
- BARDULLAS, U.; GIORDANO, M.; RODRÍGUEZ, V. M. Chronic atrazine exposure causes disruption of the spontaneous locomotor activity and alters the striatal dopaminergic system of the male Sprague–Dawley rat. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 33, p. 263–272, 2011.
- BARROSO, A. A.; MURATA, A. T. Matologia: estudos sobre plantas daninhas Jaboticabal: Fábrica da Palavra, 547 p. 2021.
- BEHKI, R. M.; KHAN, S. U. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: N-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 34, p. 746–749, 1986.
- BELO, A. F. et al. Potencial de espécies vegetais na remediação de solo contaminado com sulfentrazone. **Planta daninha**, v. 29, p. 821-828, 2011.
- BENSON, H. J. **Microbiological applications: laboratory manual in general microbiology**. 8th ed. Boston: McGraw-Hill, 2002.
- BERGEY, D. H. **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9th ed ed. Baltimore Philadelphia Hong Kong: Williams & Wilkins, 1994.
- BHATT, P. et al. Modeling and simulation of atrazine biodegradation in bacteria and its effect in other living systems. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 40, p. 3285–3295, 2022.
- BILLET, L. et al. Complete Genome Sequences of Four Atrazine-Degrading Bacterial Strains, *Pseudomonas* sp. Strain ADPe, *Arthrobacter* sp. Strain TES, *Variovorax* sp. Strain 38R, and *Chelatobacter* sp. Strain SR38. **Microbiology Resource Announcements**, v. 10, p. e01080-20, 2021.
- CANEVAROLI, M. R. et al. Remoção de herbicida atrazina por meio de filtros de carvão ativado granular associados com microrganismos no tratamento de água para abastecimento. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, p. 263–272, 2021.
- CARBONERAS, B.; VILLASEÑOR, J.; FERNANDEZ-MORALES, F. J. Modelling aerobic biodegradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid by mixed-cultures. **Bioresource Technology**, v. 243, p. 1044–1050, 2017.

CARVALHO, F. T.; MORETTI, T. B.; SOUZA, P. A. Efeito do residual no solo de nicosulfuron isolado e em mistura com atrazine sobre culturas agrícolas subsequentes. **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 9, p. 26-34, 2010.

CHENG, X. et al. Characterization of Antagonistic *Bacillus methylotrophicus* Isolated From Rhizosphere and Its Biocontrol Effects on Maize Stalk Rot. **Phytopathology®**, v. 109, p. 571–581, 2019.

DARKOH, C. et al. A Rapid and Specific Method for the Detection of Indole in Complex Biological Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, p. 8093–8097, 2015.

DIAS, A. C. L. et al. Ocorrência de atrazina em águas no brasil e remoção no tratamento da água: revisão bibliográfica. **Revista Internacional de Ciências**, v. 8, p. 149–168, 2018.

DOUGLASS, J. F.; RADOSEVICH, M.; TUOVINEN, O. H. Mineralization of atrazine in the river water intake and sediments of a constructed flow-through wetland. **Ecological Engineering**, v. 72, p. 35–39, 2014.

EDERER, G. M.; CHU, J. H.; BLAZEVIC, D. J. Rapid test for urease and phenylalanine deaminase production. **Applied Microbiology**, v. 21, p. 545-545, 1971.

ELAHI; REHMAN. Comparative behavior of two gram positive Cr6+ resistant bacterial strains *Bacillus aerius* S1 and *Brevibacterium iodinum* S2 under hexavalent chromium stress. **Biotechnology Reports**, v. 21, p. e00307, 2019.

FAN, X; SONG, F. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. **Journal of soils and sediments**, v. 14, p. 1727-1737, 2014.

FLOCH, C. et al. Indicators of pesticide contamination: Soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. **European Journal of Soil Biology**, v. 47, p. 256-263, 2011.

FREEMAN, J.; THANKI, D. Water contaminated with the herbicide atrazine. **Journal of Purdue Undergraduate Research**, v.1, p. 57–64, 2017

FURLAN, R. G. et al. Simulação do efeito residual da atrazine em cenoura. **Horticultura Brasileira**, v. 34, p. 584–587, 2016.

GARCIA, B. L. N. et al. Evaluation of Chromogenic Culture Media for Rapid Identification of Gram-Positive Bacteria Causing Mastitis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, p. 662201, 2021.

GERSHMAN, M.; O'MEARA, D. C.; CHUTE, H. L. USE OF A TETRAZOLIUM SALT FOR AN EASILY DISCERNIBLE SULFIDE-MOTILITY REACTION. **Journal of Bacteriology**, v. 78, p. 739–740, 1959.

GUZMÁN-MORENO, J. et al. *Bacillus megaterium* HgT21: a Promising Metal Multiresistant Plant Growth-Promoting Bacteria for Soil Bioremediation. **Microbiology Spectrum**, v. 10, p. e00656-22, 2022.

HAN, L. et al. H₂S responsive PEGylated poly (lipoic acid) with ciprofloxacin for targeted therapy of *Salmonella*. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 896–906, 2022.

HOLGUIN, G.; VAZQUEZ, P.; BASHAN, Y. The role of sediment microorganisms in the productivity, conservation, and rehabilitation of mangrove ecosystems: an overview. **Biology and fertility of soils**, v. 33, p. 265-278, 2001.

HUANG, H. et al. Effect of two organic amendments on atrazine degradation and microorganisms in soil. **Applied Soil Ecology**, v. 152, p. 103564, 2020.

ILESANMI, O. I. et al. Isolation, optimization and molecular characterization of lipase producing bacteria from contaminated soil. **Scientific African**, v. 8, p. e00279, 2020.

JABLONOWSKI, N. D. et al. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22years. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 7, p. 2126–2131, 2009.

JIANG, Z. et al. Enhanced biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. DNS10 during co-culture with a phosphorus solubilizing bacteria: *Enterobacter* sp. P1. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 172, p. 159–166, 2019.

KING, E. O.; WARD, M. K.; RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

KOLBECK, S. et al. Comparative Proteomics Reveals the Anaerobic Lifestyle of Meat-Spoiling *Pseudomonas* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, n.xx, p. 664061, 2021.

- KOMESLI, S. et al. Waste frying oil hydrolysis and lipase production by cold-adapted *Pseudomonas yamanorum* LP2 under non-sterile culture conditions. **Environmental Technology**, v. 42, p. 3245–3253, 2021.
- KOUKER, G.; JAEGER, K. E. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 211–213, 1987.
- KUEBUTORNYE, F. K. A.; ABARIKE, E. D.; LU, Y. A review on the application of *Bacillus* as probiotics in aquaculture. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 87, p. 820–828, 2019.
- MACCONKEY, A. Lactose-fermenting bacteria in faeces. **Epidemiology & Infection**, v. 5, p. 333-379, 1905.
- MACWILLIAMS, M. P. Citrate test protocol. **American Society for Microbiology Laboratory Protocols**. v. 3203, 2009.
- MAMANGKEY, J. et al. Isolation and enzyme bioprospection of bacteria associated to *Bruguiera cylindrica*, a mangrove plant of North Sumatra, Indonesia. **Biotechnology Reports**, v. 30, p. e00617, 2021.
- MANCUSO, M. A. C.; NEGRISOLI, E.; PERIM, L. Efeito residual de herbicidas no solo (“Carryover”). **Revista Brasileira de Herbicidas**, v. 10, p. 151-164, 2011.
- MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, L. P. Isolation and Characterization of a *Pseudomonas* sp. That Mineralizes the s-Triazine Herbicide Atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 1451–1457, 1995.
- MARIN-MORALES, M. A.; VENTURA- CAMARGO, B. DE C.; HOSHINA, M. M. **Toxicity of Herbicides: Impact on Aquatic and Soil Biota and Human Health**. [s.l.] IntechOpen, 2013.
- MATIAS, T. P. et al. Aspectos envolvidos na biodegradação da atrazina sob diferentes condições de oxirredução. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e59910817689-e59910817689, 2021b.
- MATIAS, T. P. et al. Os agrotóxicos mais vendidos no Brasil: Implicações em meio ambiente e saúde. **Research, Society and Development**, v. 10, p. e12110817082–e12110817082, 2021a.

MCDEVITT, S. Methyl red and voges-proskauer test protocols. **American Society for Microbiology**, v. 8, 2009.

MORAES, R. F. Agrotóxicos no Brasil: padrão de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Texto para discussão, Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Brasília / Rio de Janeiro – IPEA, 2019.

OKURA, M. H.; RENDE, J. C. **Microbiologia: roteiros de aulas práticas**. 1. ed. Tecmedd, 2008.

PANDEY, A. et al. 16S rRNA gene sequencing and MALDI-TOF mass spectrometry based comparative assessment and bioprospection of psychrotolerant bacteria isolated from high altitudes under mountain ecosystem. **SN Applied Sciences**, v. 1, p. 1-12, 2019.

PPDB-PESTICIDE PROPERTIES DATABASE. A to Z Index. University of Hertfordshire. Disponível em: <https://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/atoz.htm#F>. Acesso em: 29 out. 2022.

PROCOP, G. W. et al. **Diagnóstico microbiológico | texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RAHMAN, M. M. et al. A brief review on pollution and ecotoxicologic effects on Sundarbans mangrove ecosystem in Bangladesh. **International Journal of Environmental Engineering**, v. 1, p. 369-383, 2009.

REIS, R. M. et al. Effects of weed management and plant arrangements on yield index of sweet sorghum. **Bioscience Journal**, v. 35, 2019.

RINGEL, M. T.; BRÜSER, T. The biosynthesis of pyoverdines. **Microbial Cell**, v. 5, p. 424–437, 2018.

ROJAS, G et al. Antimicrobial evaluation of certain plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of respiratory diseases. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 74, p. 97-101, 2001.

ROSA, A. H.; FRACETO, L. F.; MOSCHINI-CARLOS, V. **Meio ambiente e sustentabilidade**. Porto Alegre, RS, Brasil: Bookman, 2012.

SHARMA, A. et al. Nitrogen-dependent induction of atrazine degradation pathway in *Pseudomonas* sp. strain AKN5. **FEMS Microbiology Letters**, v. 366, p.277, 2019.

SHIELDS, P; CATHCART, L. Oxidase test protocol. **American Society for Microbiology**, p. 1-9, 2010.

SIERRA, G. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 23, p. 15–22, 1957.

SILVA, A. J. et al. Metabolic engineering of *E. coli* for pyocyanin production. **Metabolic Engineering**, v. 64, p. 15–25, 2021.

SILVA, L. F. V. et al. Efeito do biochar de resíduo do fruto do cafeeiro na sorção de atrazina no solo. **Magistra**, v. 31, p. 543-553, 2020.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245-261, 2016.

SINGH, S. et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, p. 211–237, 2018.

STERNISA, M.; CARGO, M.; SMOLE-MOZINA, S. Spoilage bacteria *pseudomonas* - production of hydrolytic enzymes and ability to grow at 5°C. **Acta Periodica Technologica**, p. 278–285, 2019.

SZEWCZYK, R. et al. Atrazine biodegradation by mycoinsecticide *Metarhizium robertsii*: Insights into its amino acids and lipids profile. **Journal of Environmental Management**, v. 262, p. 110 - 304, 2020.

SZTAJER, H.; MALISZEWSKA, I.; WIECZOREK, J. Production of exogenous lipases by bacteria, fungi, and actinomycetes. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 10, p. 492–497, 1988.

TOMASSONI, F. et al. Soil Bioremediation Technique. **ActaIguazu**, v. 3, p. 46–56, 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

VRYZAS, Z. et al. Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. **Water Research**, v. 43, p. 1–10, 2009.

WANG, H. et al. Two Potential Probiotic *Bacillus* with Proteolytic Activity to Dietary Protein from Adult Feces. **Biocontrol Science**, v. 26, p. 221–224, 2021.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Atrazine and Its Metabolites in Drinking water. Genebta: WHO, 15 p. 2011.

YANG, X. et al. Biodegradation of atrazine by the novel *Citricoccus* sp. strain TT3. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, p. 144–150, 2018.

ZHANG, J. et al. Biodegradation of Atrazine by the Novel *Klebsiella variicola* Strain FH-1. **BioMed Research International**, v. 2019, n.xx, p. 1–12, 2019.