

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

GABRIELA DIAS ALVES PINTO

CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO CLORPIRIFÓS POR
BACTÉRIAS LÁTICAS

Rio de Janeiro
2017

Gabriela Dias Alves Pinto

CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO CLORPIRIFÓS POR
BACTÉRIAS LÁTICAS

Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Alimentos e Nutrição

Orientadora: Maria Gabriela Bello Koblitz
Coorientadora: Izabela Miranda de Castro

Rio de Janeiro
2017

P659 Pinto, Gabriela Dias Alves
CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO CLORPIRIFÓS
POR BACTÉRIAS LÁTICAS / Gabriela Dias Alves Pinto. --
Rio de Janeiro, 2017.
60f

Orientador: Maria Gabriela Bello Koblitz.
Coorientador: Izabela Miranda de Castro.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do
Estado do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação
em Alimentos e Nutrição, 2017.

1. Bactérias ácido láticas. 2. Fosfatase. 3.
Pesticida. I. Koblitz, Maria Gabriela Bello,
orient. II. Castro, Izabela Miranda de, coorient.
III. Título.

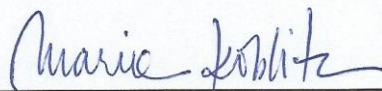
Gabriela Dias Alves Pinto

CAPACIDADE DE DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO CLORPIRIFÓS POR
BACTÉRIAS LÁTICAS

Dissertação de Mestrado – Programa de
Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da
Universidade Federal do Estado do Rio de
Janeiro apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Alimentos e Nutrição

Aprovado em 31/03/2017

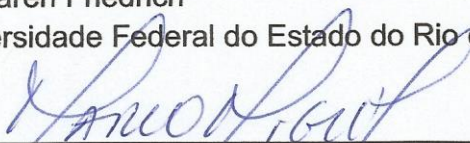
BANCA EXAMINADORA



Dr^a Maria Gabriela Bello Koblitz
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dr^a Karen Friedrich
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO



Dr. Marco Antônio de Lemos Miguel
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Profª Gabriela por toda ajuda, todo conhecimento e toda confiança durante todos esses anos. Sem ela não chegaria aqui

Agradeço imensamente ao Laboratório de Microbiologia de Alimentos (MAL) da UFRJ pelo acolhimento, ajuda e conhecimento.

Ao Antônio (MAL) por toda ajuda e suporte em todos os momentos

Ao Joel e Ticiane pela ajuda no processo, sempre.

Ao laboratório de Cromatografia da Embrapa.

A pesquisadora e coorientadora Izabela, pelo conhecimento e paciência

Ao Rodrigo por todo suporte e apoio sem o qual meu caminho seria mais longo e difícil

As minhas irmãs pelo exemplo e ajuda e apresentações de trabalhos

Meus afilhados pelo olhar tão amoroso e pureza nos momentos que mais precisava

Minha prima Gizélia pelo exemplo de força que sempre foi

Aos meus pais e avós, minha mãe com toda força

Ao meu filho, pelo amor incondicional, força e suporte, mesmo sem saber

RESUMO

Os agrotóxicos possuem efeitos adversos tanto no organismo de seres vivos como no meio ambiente podendo contaminar solos, águas e atingir organismos que inicialmente não seriam o seu alvo. Os resíduos dos agrotóxicos podem permanecer estáveis e causar contaminação, sendo necessária e urgente uma forma de eliminação desses resíduos. Agrotóxicos podem ser divididos de acordo, sobretudo, com sua estrutura química e forma de ação. Dentre essas classes, os organofosforados estão entre os mais utilizados atualmente. O clorpirifós é um agrotóxico organofosforado que inibe a ação de enzimas fundamentais para a manutenção do organismo, como por exemplo a acetilcolinesterase, podendo causar danos neurológicos. Algumas bactérias possuem a capacidade de degradar agrotóxicos organofosforados e acredita-se que essa capacidade se deva à produção da enzima fosfatase alcalina. As bactérias lácticas são utilizadas para a fermentação de alimentos e existem espécies com características probióticas sendo benéficas ao organismo e têm sido estudadas devido à sua capacidade de degradar organofosforados. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a capacidade de seis bactérias lácticas crescerem na presença do clorpirifós, avaliar a secreção de enzima fosfatase alcalina por essas bactérias e quantificar a degradação do pesticida por seis bactérias lácticas, entre elas *Enterococcus faecium* E86, *Lactococcus lactis* 11454, *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103, *Leuconostoc lactis* 19256, *Leuconostoc mesenteroides* 8293 e *Pediococcus pentosaceus* 43200. Com os resultados observamos que as linhagens testadas foram capazes de crescer na presença do agrotóxico, não havendo diferença de crescimento entre as bactérias nas amostras contaminadas com o pesticida quando comparadas com seus controles, sem o pesticida. Quanto à produção de fosfatase alcalina, não houve nenhuma bactéria que apresentasse maior secreção do que outras e os valores de atividade variaram de 0,0200 a 0,0226 U/mL/min, após 24 horas de incubação. Em relação à degradação do clorpirifós, todas as bactérias foram capazes de degradar de forma eficaz o agrotóxico, apresentando percentual de degradação mínimo de 80,3% para o *Lactobacillus rhamnosus*, após 24 horas de incubação. Com 48 horas de incubação, a linhagem de *Pediococcus pentosaceus* testada apresentou concentrações abaixo do limite de detecção, indicando possível degradação completa do agrotóxico. As seis linhagens de bactérias lácticas analisadas se mostraram capazes de resistir e crescer na presença do agrotóxico organofosforado além de degradar esse pesticida de forma rápida e eficaz mesmo em grande concentração do agrotóxico tornando tecnicamente viável sua aplicação para remoção de resíduos de clorpirifós.

Palavras chave: Bactérias ácido lácticas (BAL); Fosfatase; Pesticida

ABSTRACT

LACTIC ACID BACTERIA ABILITY TO DEGRADE THE PESTICIDE CHLORPYRIFOS.

The pesticides have adverse effects for the living organisms and environmental. They may remain for a long time in the environment and contaminate soils, waters and reach organisms that initially would not be their target. Pesticide residues can remain stable for a long time and so cause contamination, requiring urgently a form of disposal of such waste. Pesticides are divided into several classes depending, in particular, of their chemical structure and form of action. One of these classes, the organophosphates are among the most used currently. The chlorpyrifos is an organophosphate type that inhibits the action of the some enzymes necessary for the good functioning of body, like acetylcholinesterase and can causes neurological damage. Some bacteria have the ability to degrade certain types of organophosphates pesticides and it is believed that this ability is due to the production of phosphatase enzymes. Lactic acid bacteria are used for fermentation of various food and some species have probiotic characteristics being beneficial to the organism. They have recently been studied due to their ability to degrade organophosphate. The purpose of this study was to evaluate the ability of six lactic acid bacteria to grow in the presence of chlorpyrifos, evaluate the production of phosphatase enzymes by these bacteria and quantify pesticide degradation by six lactic acid bacteria, including *Enterococcus faecium* 86, *Lactococcus lactis* 11454, *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103, *Leuconostoc lactis* 19256, *Leuconostoc mesenteroides* 8293 and *Pediococcus pentosaceus* 43200. We observed that, in general, the lineages tested were able to grow in the presence of pesticides, as there was no difference in between bacteria growth in samples contaminated with the pesticide compared with their controls, without the pesticide. As for the production of phosphatase, activity values ranged from the 0.0200 0.0226 U/mL/min, after 24 hours of cultivation and there was no difference in secretion among the different lineages. Regarding the degradation of chlorpyrifos, all bacteria were able to effectively degrade the pesticide, showing percentage of degradation of a minimum of 80.3% for *Lactobacillus rhamnosus*, after 24 hours of incubation. After 48 hours of incubation, the *Pediococcus pentasaceus* strain tested had concentrations below the detection limit, possibly indicating complete degradation of the pesticide. The six strains of lactic acid bacteria tested were able to endure and grow in the presence of organophosphorus pesticide and degraded this pesticide quickly and effectively, even in high concentration, making it technically feasible their application for removal of chlorpyrifos waste.

Key-words: Lactic acid bacteria (LAB); Phosphatase; Pesticide

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Tetraetil pirofosfato	12
Figura 2. Fórmula geral dos organofosforados e seus principais produtos de degradação.....	13
Figura 3. Estrutura química do clorpirifós	14
Figura 4. Hidrólise do clorpirifós e seus subprodutos após hidrólise.....	19
Figura 5. Reação colorimétrica para determinação de fosfatase com a hidrólise do p-nitrofenil fosfato a p-nitrofenol.....	31
Figura 6. Crescimento das bactérias na presença do clorpirifós.....	36
Figura 7. Espectro de massas do clorpirifós com os íons específicos desse analíto gerados após a injeção do padrão em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas.....	42
Figura 8. Tempo de retenção do clorpirifós e injeção do meio de cultura sem o clorpirifós.....	43
Figura 9. Percentual de degradação do clorpirifós por bactérias lácticas.....	44

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 AGROTÓXICOS	10
1.1.1 Organofosforados.....	12
1.1.1.1 <i>Clorpirifós</i>	13
1.2 BIORREMEDIAÇÃO	16
1.2.1 Degradação enzimática	18
1.2.2 Bactérias lácticas	20
1.2.3 <i>Enterococcus faecium</i>	22
1.2.4 <i>Lactococcus lactis</i>	22
1.2.5 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	23
1.2.6 <i>Leuconostoc lactis</i> e <i>Leuconostoc mesenteroides</i>	24
1.2.7 <i>Pediococcus</i>	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 PADRÃO DO AGROTÓXICO E REAGENTES.....	27
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORPIRIFÓS.....	27
3.3 ATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS.....	27
3.4 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA.....	28
3.5 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DO CLORPIRIFÓS.....	29
3.5.1 Preparo do teste	29
3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA.....	30
3.6.1 Curva padrão de p-nitrofenol	30
3.6.2 Determinação da atividade enzimática.....	31
3.7 DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRO DE MASSAS.....	32
3.7.1 Extração do clorpirifós.....	32
3.7.2 Análise cromatográfica	33
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DO CLORPIRIFÓS	35
4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA.....	38

4.3 DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR CG-EM	41
5. CONCLUSÃO.....	46
REFERENCIAS	47
APÊNDICE A – Teste preliminar de tolerância ao clorpirifós na concentração de 750 mg/L	55
APÊNDICE B- Curva padrão de p-nitrofenol fosfato	55
APÊNDICE C- Curva padrão de clorpirifós	56
APÊNDICE D- Cromatograma da curva padrão de clorpirifós	56
APÊNDICE E- Cromatograma do <i>Enterococcus faecium</i> E86.....	57
APÊNDICE F- Cromatograma do <i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	57
APÊNDICE G- Cromatograma do <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	58
APÊNDICE H- Cromatograma do <i>Leuconostoc lactis</i> ATCC 19256.....	58
APÊNDICE I- Cromatograma do <i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293.....	59
APÊNDICE J- Cromatograma do <i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 43200.....	59
ANEXO A- Composição em g/L do Caldo Lactobacillus MRS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 AGROTÓXICOS

O Brasil é o segundo maior exportador de produtos agrícolas do mundo, sendo este um setor de extrema relevância para economia do país. Com o impulsionamento da produção houve o aumento das terras agrícolas e assim o uso de fertilizantes e de produtos químicos também foi intensificado (OECD-FAO, 2015). A área agrícola nacional cresceu 78% acompanhada de um aumento de 700% no uso de agrotóxicos nos últimos 40 anos (Spadotto e Gomes, 2017). Atualmente são consumidas 500 mil toneladas de produto ativo de agrotóxicos no Brasil (Ibama, 2016).

Os agrotóxicos, segundo a Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989, são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas, bem como de ambientes urbanos, hídricos e industriais (BRASIL, 1989). Em 2016 foram registrados 277 novos agroquímicos no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) tornando-se um recorde de registros, que anteriormente era de 203 em 2007, além de um aumento de 65% de novos produtos biológicos (MAPA, 2017). A lei nacional que dispõe sobre agrotóxicos não permite que sejam utilizados produtos para os quais não haja método de degradação do princípio ativo, que não se possa impedir a formação de resíduos que levem risco ao meio ambiente ou a saúde, para os quais não tenha antídoto ou tratamento, que apresentem característica teratogênica, carcinogênica ou mutagênica, que provoquem distúrbios hormonais ou que causem danos ao meio ambiente (BRASIL, 1989). O Ministério da Saúde (MS) distribui os agrotóxicos em 4 classes, de acordo com a toxicidade de cada um deles. Dentro dessa classificação, a Classe I corresponde aos produtos extremamente tóxicos e a classe IV corresponde aqueles pouco tóxicos (BRASIL, 1992). A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), o MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) e o MS (Ministério da Saúde) são responsáveis por reavaliar os registros dos agrotóxicos e seus componentes

quando surgirem informações que indiquem a necessidade da reavaliação. Atualmente são 97 agrotóxicos com uso banido no país (ANVISA, 2017).

Junto à vigilância sanitária de alguns estados do Brasil e laboratórios de saúde pública, a ANVISA criou em 2001 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA) para analisar e promover qualidade aos alimentos em relação ao uso de agrotóxicos e afins e prevenir quadros de intoxicações agudas ou crônicas devido à exposição a essas substâncias. A partir de estudos de resíduos em campos, a ANVISA determina o Limite Máximo de Resíduo (LMR) que é “quantidade máxima de resíduo de agrotóxico legalmente aceita no alimento, em decorrência da aplicação adequada numa fase específica, desde sua produção até o consumo, expressa em partes (em peso) do agrotóxico ou seus derivados por um milhão de partes de alimento (em peso) (ppm ou mg / kg)”. Com o LMR e a quantidade média per capita consumida de um alimento, calcula-se a Ingestão Diária Máxima Teórica (IDMT), que estima o máximo de agrotóxico no alimento que, teoricamente, um indivíduo ingere diariamente e serve para avaliar o impacto da ingestão desses produtos, definida pela equação: $\sum(\text{LMR} \times \text{consumo do alimento}) / \text{Peso corpóreo}$ (PARA, 2016) . A Ingestão Diária Aceitável (IDA) é calculada para cada ingrediente ativo do agrotóxico sendo a quantidade máxima que, ingerida diariamente durante toda a vida, parece não oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos atuais, sendo expressa em mg do agrotóxico por Kg de peso corpóreo (PARA, 2016). A IDA permite que haja resíduo de agrotóxicos de forma aceitável no ambiente e no organismo (Mesnage et al., 2014). O resíduo de agrotóxico é a substância ou mistura de substâncias que permanece remanescente ou existente nos alimentos ou no meio ambiente decorrente do uso ou da presença de agrotóxicos e afins, inclusive seus produtos de degradação ou metabólitos (PARA, 2016).

No último relatório elaborado pelo PARA (Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos), foram apresentados os resultados da presença de 232 agrotóxicos diferentes obtidos entre os anos de 2013 e 2015 em 25 alimentos de origem vegetal que estão dentre os mais consumidos pela população brasileira, de acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF). Do total de amostras, 80,3% foram consideradas satisfatórias, sendo que 42% não apresentaram resíduos dentre os agrotóxicos pesquisados e 38,3% apresentaram resíduos de agrotóxicos

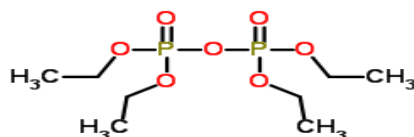
dentro do Limite Máximo de Resíduo (LMR) estabelecido pela Anvisa. As amostras insatisfatórias totalizaram 19,7%, sendo que 3% apresentaram concentração de resíduos acima do LMR e 18,3% apresentaram resíduos de agrotóxicos que não possuem o uso autorizados para a cultura analisada.

Os agrotóxicos podem ser classificados de acordo com a sua forma de ação, podendo ser inseticidas matando por contato ou ingestão, fungicidas, herbicidas agindo sobre ervas daninhas, acaricidas, nematicidas, moluscidas, raticidas e bactericidas (Duarte, 2005). Também podem ser classificados de acordo com a estrutura química, sendo organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides sintéticos e pesticidas inorgânicos ou ainda, produzidos com material natural chamados de biopesticidas (Odukkathil e Vasudevan, 2013).

1.1.1 Organofosforados

O primeiro agrotóxico organofosforado data de 1937 e ficou conhecido como tetraetil pirofosfato. Sua estrutura química pode ser observada na Figura 1.

Figura 1 - Tetraetil pirofosfato



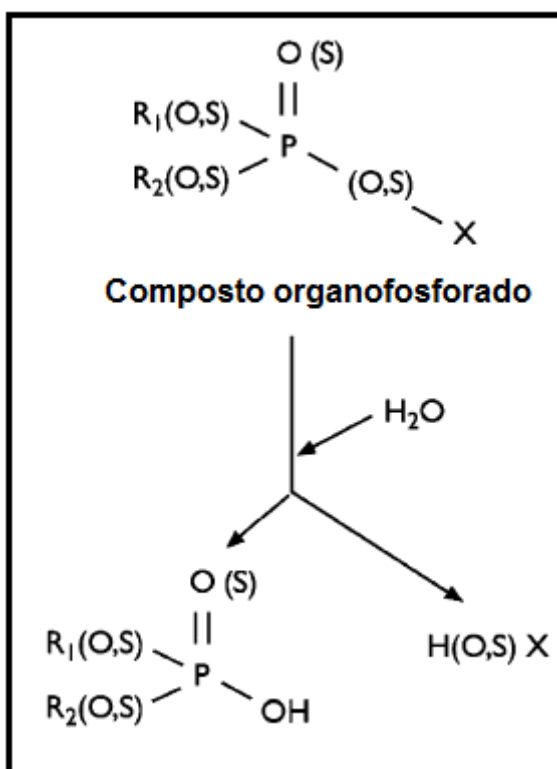
Fonte:chemspider, 2017

Desde então, outros organofosforados foram desenvolvidos e comercializados e há anos estão entre os mais utilizados para controle de pragas na agricultura e pragas domésticas (Singh e Walker, 2006). Independente do alvo, são amplamente utilizados em grandes áreas e responsáveis por contaminações ambientais do ar, água, ecossistemas terrestres e alterações dos ciclos biogeoquímicos, além de serem persistentes, móveis e atingirem organismos não-alvo (Fenner et al., 2013)

Os organofosforados, de maneira geral, possuem um átomo de fósforo (P) com uma ligação P=O ou P=S sendo ésteres de ácido fosfórico com combinações variadas de oxigênio, carbono, enxofre e nitrogênio (Gupta, 2006). Na Figura 2 podemos ver a fórmula química, comum a maior parte dos organofosforados onde, geralmente o grupo R1 é ligado a um fósforo e o grupo R2 ao oxigênio ou enxofre

(Singh e Walker, 2006). De acordo com os radicais e grupamento X que compoñham o agrotóxico, sua hidrólise dará origem a diferentes subprodutos, com características distintas.

Figura 2 - Fórmula geral dos organofosforados e seus principais produtos de degradação



Fonte: Modificado de Singh e Walker, 2006

Entre os organofosforados mais conhecidos temos o clorpirifós, parationa e metilparationa (Singh e Walker, 2006).

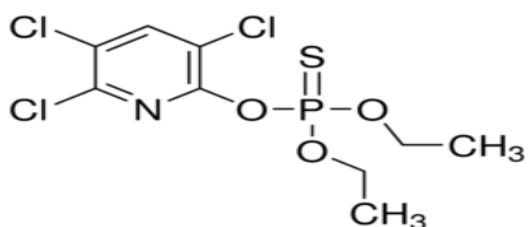
Em 2016, no relatório emitido pelo PARA, o grupo dos organofosforados foi detectado em 40% (4.824) das amostras analisadas sendo que destes, 36%(1.736) eram de maneira irregular. Dentre eles, o clorpirifós aparecia como o agrotóxico com maior índice de irregularidades, principalmente pelo seu uso em culturas não permitidas, como tomate (exceto tomate rasteiro para fins industriais) e cenoura.

1.1.1.1 Clorpirifós

O clorpirifós (CP) (O,O-dietil O-(3,5,6-tricloro-2-piridinil) fosforotioato) pertence ao grupo dos organofosforados sendo extensamente utilizado na agricultura. Possui

ação inseticida e acaricida, sendo considerado de amplo espectro (BRASIL, 2005). A estrutura química deste composto pode ser observada na Figura 3. Possui ligação P-O-C, como a maioria dos organofosforados e uma ligação P=S sendo classificado, dentro dos organofosforados, como fosforotioato, assim como parationa e fenantion, por exemplo. Sua meia vida pode passar de 200 dias, dependendo de fatores como o pH do meio em que se encontra e a temperatura, parâmetros que podem afetar a sua taxa de degradação (Singh, 2008; Singh et al., 2003; Singh, et al., 2004; Yang et al., 2005).

Figura 3: Estrutura química do clorpirifós



Fonte: Sigma-aldrich, 2016

A solubilidade do clorpirifós em água é baixa (2mg/L) mas é facilmente solubilizado em solventes orgânicos como acetona e acetonitrila (Singh e Walker, 2006). No Brasil, sua classificação toxicológica é classe II, altamente tóxico, a IDA (Ingestão Diária Aceitável) é de 0,01mg/Kg e seu uso está autorizado em algumas culturas e com aplicações específicas com variações no LMR, como podemos observar na Tabela 1 (BRASIL, 2005).

Tabela 1- Culturas permitidas, tipos de aplicação e Limite Máximo de Resíduo (LMR) para uso do clorpirifós

Culturas	Forma de aplicação	LMR(mg/Kg)
Algodão	Foliar	0,5
Banana	Localizada	0,01
Batata	Foliar	1,0
Batata	Solo	1,0
Café	Foliar	0,05

Cevada	Foliar	0,1
Citros	Foliar	2,0
Feijão	Foliar	0,1
Maçã	Foliar	1,0
Milho	Foliar	0,1
Milho	Solo	0,1
Pastagens	Foliar	2,0
Soja	Foliar	0,01
Sorgo	Foliar	0,01
Tomate (*)	Foliar	0,5
Trigo	Foliar	0,2

Fonte: Modificado de BRASIL, 2005

(*) Uso autorizado somente para tomate rasteiro, com fins industriais.

O uso do clorpirifós tem sido relacionado a danos neurológicos devido à sua ação sobre enzimas essenciais para a manutenção do metabolismo corporal, como por exemplo a acetilcolinesterase. A acetilcolina é um componente do sistema nervoso, que participa das transmissões de impulsos nervosos no cérebro, sistema esquelético e muscular. Para realizar sua função, precisa ser hidrolisada a colina e acetil-CoA pela enzima acetilcolinesterase. Os compostos organofosforados se ligam irreversivelmente ao sítio ativo da acetilcolinesterase, através de ligação covalente, o que impede que ela apresente atividade promovendo acúmulo de acetilcolina no sistema nervoso, levando à agitação, convulsão, problemas respiratórios e à indução do estresse oxidativo em humanos e outros animais (Singh, 2008; Ranjbar, Pasalar e Abdollahi, 2002). A exposição aos organofosforados além de inibir a ação de enzimas, pode levar à alterações intestinais em ratos e, em longos períodos de exposição à doses orais, pode ocasionar diarreia, sangramento de olhos e nariz e tremores em animais (Akhtar, Srivastava e Raizada, 2009; Zhao et al., 2016).

O uso frequente e intenso e a falta de degradação apropriada para esses produtos faz com que eles permaneçam no solo e no ambiente (Odukkathil e Vasudevan, 2013).

1.2 BIORREMEDIAÇÃO

As diversas tecnologias que visam tratar áreas contaminadas por agrotóxicos são de origem química, física ou biológica e tem alta eficiência na remoção dos contaminantes, porém com custo elevado e tempos variáveis para o tratamento. O tratamento ideal para remoção de contaminantes é aquele que não deixa intermediários (Diez, 2010). Em virtude desse acúmulo e da toxicidade para o organismo humano e para o meio ambiente, buscam-se alternativas para a degradação de pesticidas e, nesse contexto, a biorremediação é uma técnica considerada eficaz e de baixo custo. A biorremediação consiste em utilizar organismos vivos ou seus produtos para converter substâncias nocivas em substâncias que não sejam tóxicas (Singh, 2008; Yang et al., 2006).

Utilizar microrganismos na destoxificação e descontaminação das áreas expostas aos organofosforados tem sido uma alternativa considerada viável e ambientalmente aceita (Singh e Walker, 2006). O processo, geralmente, tem início com uma redução natural dos contaminantes causada pela microbiota nativa, sem qualquer influência humana. Em seguida pode-se estimular o desenvolvimento dessa microbiota através da adição de fontes de nutrientes e, por último, se adicionam outros microrganismos exógenos (Diez, 2010).

Os estudos e a busca por aprimoramento da degradação de pesticidas com o uso de microrganismos como alternativa para a eliminação dos resíduos demonstram ser este um método seguro e barato para tal função (Anwar et al., 2009; Chishti et al., 2013; Harishankar, Sasikala e Ramya, 2013; Pino e Peñuela, 2011; Singh et al., 2004).

Os microrganismos transformam as substâncias através de processos metabólicos ou enzimáticos baseados no crescimento e no cometabolismo. No crescimento, eles utilizam as substâncias como fonte de carbono e energia, resultando em completa degradação. No cometabolismo, há outros substratos utilizados como fonte primária de energia e carbono e ainda o metabolismo paralelo do composto orgânico contaminante (Joutey et al, 2013).

Estudos sobre a degradação de clorpirifós em solo, utilizando bactérias do próprio ambiente, tem mostrado a capacidade de ação e a efetividade do uso desses

microrganismos na biorremediação, assim como para a remoção de metais pesados que podem contaminar o ambiente (Anwar et al., 2009; Khosravi-Darani e Sohrabvandi, 2014; Pino e Peñuela, 2011; Singh et al., 2004; Yang et al., 2006; Zoghi, 2004).

A microbiota do solo exposto a pesticidas pode desenvolver a habilidade para degradá-los. Existem microrganismos com a capacidade de utilizar compostos organofosforados como fonte de carbono, nitrogênio ou fósforo (Pailan et al., 2016; Piño e Penuela, 2011; Anwar et al, 2009;). As bactérias do solo tendem a ser mais efetivas para degradar contaminantes, devido à necessidade de adaptação por fontes de alimentação e constantes mudanças das características do solo à que devem se adaptar (Singh e Walker, 2006; Wackett e Ellis, 2005). O uso intenso do clorpirifós pode modificar algumas características do solo como por exemplo o pH gerando a necessidade de adaptação dos microrganismos ali presente (Huang et al., 2016).

A degradação em solos e aquíferos, apenas com os microrganismos naturalmente presentes ali, pode não ser suficiente para a total degradação dos resíduos e completa mineralização dos contaminantes em moléculas pequenas e estáveis (Huang et al., 2016; Fantroussi e Agathos, 2005). Além disso, esses compostos geralmente apresentam baixa solubilidade e alta estabilidade estrutural, o que limita a sua degradação no solo através de processos naturais (Odukkathil e Vasudevan, 2013).

No solo e no ambiente aquático, a degradação de pesticidas pode ocorrer através de hidrólise ou ação microbiana e envolve fatores químicos, microbiológicos e influência de fatores bióticos e abióticos, como valores de pH, presença de matéria orgânica, microrganismos presentes e temperatura, além do acúmulo dos produtos de degradação do próprio agrotóxico (Huang et al., 2016; Harishankar, Sasikala e Ramya, 2012; Singh et al., 2004). A degradação de organofosforados *in vitro*, pode ser influenciada pelo pH, pela temperatura e concentração de compostos orgânicos. A suscetibilidade à degradação dos organofosforados é diferente dependendo de diversos fatores como: a concentração inicial do pesticida, a cepa da bactéria e outras culturas presentes no meio, podendo aumentar ou diminuir as taxas de degradação quando há mais de uma bactéria, por exemplo (Pino e Peñuela, 2011; Wang et al., 2016; Yang et al., 2005; Zhou e Zhao, 2014; Zhang et al., 2014;).

Quando o pH é alcalino, a degradação tende a ocorrer mais rapidamente, assim como em temperaturas entre 30 e 35°C (Anwar, et al., 2009; Hui, Ariffin e Tahir, 2010; Pino e Peñuela, 2011; Singh et al., 2003).

Isolar microrganismos capazes de degradar agrotóxicos é importante para que se possa determinar os mecanismos envolvidos no processo e entender a evolução e os genes das enzimas envolvidas para poder utilizá-los na biorremediação dos locais contaminados (Singh e Walker, 2006).

1.2.1 Degradação enzimática

A degradação microbiana parece ser mais efetiva quando comparada com a hidrólise química devido à produção de enzimas (Harishankar, Sasikala e Ramya, 2013). Cepas de *Pseudomonas putida* MB258 possuem a capacidade de degradar completamente o clorpirifós com 24 horas de incubação e essa degradação não se dá por adsorção e sim por biodegradação direta através da enzima laccase, confirmada pela presença de metabólitos remanescentes da degradação do clorpirifós, indicando a ação enzimática (Liu et al., 2016).

A degradação do clorpirifós pode ocorrer através da ação de fosfatases alcalinas (Thengodkar e Sivakami, 2010). As fosfatases alcalinas são produzidas naturalmente pelas bactérias para catalisar a hidrólise de compostos fosforados no ambiente visando utilizar o fosfato solúvel liberado como fonte de fósforo (Nashas, 2002).

Em 1946, Mazur propôs o que acredita-se ser o primeiro relato da capacidade enzimática de hidrolisar organofosforados. Isto ocorreu ao constatar que o diisopropilfluoro fosfato (DFP) era degradado, em tecidos humanos e de coelhos, por uma enzima presente no organismo, principalmente no fígado e nos rins (Mazur, 1946). Desde então, diversos trabalhos tem sido feitos para maiores esclarecimentos a respeito dessas enzimas e suas atividades (Wang et al., 2016; Yang et al., 2005; Zhou e Zhao, 2014). As primeiras hidrolases de organofosforados descritas foram de *Flavobacterium* ATCC 27551 e *Pseudomonas diminutae* e são expressas por bactérias e alguns fungos (Farnoosh et al., 2015).

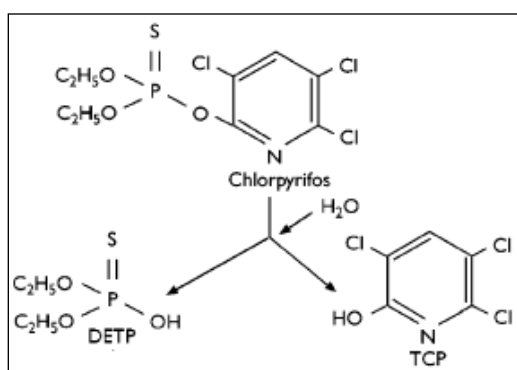
Inicialmente elas foram agrupadas em uma categoria geral chamada de hidrolases triesterfosfóricas e então subdividas em outros dois grupos. O primeiro,

chamado de hidrolase de organofosfato, com atividade sobre ligações P- ester e o segundo grupo, chamado de diisopropil-fluorofosfatase, com preferência por compostos organofosforados com ligação P-F e P-CN (Cheng e Defrank, 2000; IUBMB, 2016).

A produção de hidrolases de organofosforados pode ser induzida pela presença de compostos organofosforados no meio de crescimento/incubação ou ser secretada como parte constituinte do metabolismo de bactérias (Yang et al., 2005).

Acredita-se que a biodegradação de clorpirifós dê origem a dois subprodutos, o ácido dietilfosfórico (DETP) e o 3,5,6-tricloro-2- piridinol (TCP), como mostrado na Figura 4 (Pailan et al., 2016). Boa parte dos organofosforados utilizados atualmente possuem uma cadeia de dietilfosforotioato. Esse tipo de composto costuma ser hidrolisado na ligação fosfotriester, ligação alvo das enzimas fosfatases (Yang et al., 2005; Singh et al., 2004). Algumas bactérias são capazes de utilizar o DETP como fonte de carbono e fósforo (Yang et al., 2005).

Figura 4: Hidrólise do clorpirifós e seus subprodutos após hidrólise



Fonte: Modificado de Singh e Walker, 2003.

Cepas de bactérias e fungos podem sofrer adesão do clorpirifós sob a superfície celular e ter sua estrutura modificada devido à essa ligação (Huang et al., 2016; Wang et al., 2016). Mas, além de uma possível eliminação do clorpirifós de forma adsortiva, as bactérias também produzem enzimas que são capazes de clivar a ligação P-O-C e assim realizar a detoxificação desse pesticida (Wang et al., 2016).

Para realizar a biorremediação em alimentos, é importante que os microrganismos utilizados sejam apropriados para a redução dos resíduos, mas também sejam inócuos quando ingeridos, ou preferencialmente benéficos.

1.2.2 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (BL) foram inicialmente observadas por Orla-Jensen em 1919 que formou critérios, que são aceitos e utilizados até hoje, baseados na morfologia das células, modo de fermentação da glicose e temperatura preferencial para o crescimento (Wright e Axelsson, 2012). No geral, são bactérias gram-positivas, em forma de bastonetes ou cocos, catalase e oxidase negativas, não formadoras de esporos, aerotolerantes, com preferência por pH pouco ácido e que têm o ácido láctico como principal produto do seu metabolismo, podendo ser homoláticas ou heteroláticas (Bovo, Corassin e Oliveira, 2010; Nawaz et al., 2011; Makarova et al., 2006). Podem ser encontradas em vegetais, frutas, cereais e leites, porém estão associadas também as mucosas de animais, como o intestino (Makarova et al., 2006).

As formas de identificação atuais, sobretudo as baseadas em métodos moleculares, permitiram um grande aumento no número de gêneros classificados como bactérias lácticas (Wright e Axelsson, 2012). São 6 famílias e 40 gêneros, mas é considerado um grupo em rápida expansão. As famílias são *Aerococcaceae* com 7 gêneros, *Carnobacteriaceae* com 16 gêneros, *Enterococcaceae* com 7 gêneros, *Lactobacillaceae* com 3 gêneros, *Leuconostocaceae* com 4 gêneros e *Streptococcaceae* com 3 gêneros (Holzapfel e Wood, 2014). Podem ser utilizadas como cultura iniciadora em alimentos, que consiste em uma preparação microbiana, com grande quantidade de células, de pelo menos um microrganismo, que é adicionada a uma matéria-prima para a produção de um alimento fermentado, acelerando e direcionando esse processo fermentativo (Leroy e Vuyst, 2004). Geralmente são utilizadas para a fermentação de leites, carnes, vegetais, cereais e vinhos (Patrick, 2012). As bactérias lácticas utilizam açúcares como substrato para a fermentação e, durante esse processo, há alteração da textura, sabor, aroma e propriedades nutricionais devido à produção de ácidos, álcoois, compostos de aroma e exopolissacarídeos (Bovo, Corassin e Oliveira, 2010; Silva, 2000; Leroy e Vuyst, 2004).

As bactérias lácticas são importantes na biopreservação de alimentos. Elas podem aumentar a segurança de produtos fermentados tanto pela produção de

substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas; através da liberação de produtos do metabolismo; assim como pela prevenção do crescimento de outras bactérias, que podem ser patogênicas, através da competição do crescimento, aumentando a vida útil e a segurança dos produtos (Ahmadova et al., 2013; Stiles, 1996). As bactérias lácticas podem produzir apenas ácido láctico, sendo homoláticas ou ácido láctico e acético, diacetil e peróxido de hidrogênio, sendo heteroláticas (Stiles, 1996).

Existem bactérias lácticas com características probióticas, fornecendo benefícios para o equilíbrio intestinal e efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002; Monteagudo–Mera et al., 2012). Probiótico é qualquer microrganismo vivo que, quando administrado em quantidades apropriadas, confere benefício à saúde do hospedeiro (Organização mundial de gastroenterologia, 2011). Para serem caracterizadas como probióticas, os microrganismos precisam ter propriedades funcionais como produção de compostos antimicrobianos, adesão aos tecidos intestinais, além de possuir a capacidade de resistir às condições ácidas do estômago e ácidos biliares (Monteagudo–Mera et al., 2012). Atualmente no Brasil, são aprovados como probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *ramnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (Brasil, 2002). Na saúde humana, os probióticos tem a capacidade de ajudar em casos de doenças imunológicas como alergias, câncer e doenças inflamatórias intestinais como doenças de Chron e colite ulcerativa (Patrick, 2012). As bactérias do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacteria* são as mais utilizadas como probióticos em produtos comerciais (FAO/WHO, 2001).

Foi evidenciada a capacidade das bactérias lácticas se ligarem a metais pesados e micotoxinas. Corassin, Bovo e Oliveira (2013) avaliaram a capacidade de bactérias lácticas adsorverem aflatoxina M1 em leite UHT de forma rápida tornando possível a utilização em nível industrial para a retirada dessa aflatoxina de alimentos. Além disso, as bactérias lácticas começaram a ser objeto de estudos devido à capacidade de degradar pesticidas. Durante a fermentação de iogurte, há degradação de agrotóxicos pelas bactérias utilizadas para a fermentação do leite (Bo, Zhang e Zhao, 2011). A capacidade de degradação de agrotóxicos organofosforados por bactérias lácticas depende do pesticida utilizado além dos tipos

e concentrações das espécies de bactérias presentes no mesmo meio, por exemplo (Chishti et al., 2013). As bactérias lácticas podem utilizar o clorpirifós como fonte de energia, quando essa é a única disponível e, além disso, elas são capazes de clivar a ligação P-O-C do clorpirifós, liberando seus subprodutos e realizando a descontaminação do meio, uma vez que essa ligação é fundamental para a atividade do pesticida (Wang et al., 2016).

1.2.3 *Enterococcus faecium*

Os *Enterococcus* pertencem ao grupo de bactérias lácticas e são muito conhecidos pela produção de bacteriocinas (Gaaloul et al., 2015).

Alguns *Enterococcus* de origem alimentar tem sido utilizados em biotecnologia, tanto para a produção de bacteriocinas, como para fornecer características probióticas, sendo utilizados em produtos fermentados. Podem ocorrer em uma ampla gama de alimentos, tanto vegetais como animais, especialmente produtos fermentados, mas muitas vezes são encontrados em solos, água e vegetais e então podem contaminar alimentos crus, como leites, e se multiplicar ali durante a fermentação, podendo também contaminar o alimento durante o processamento (Giraffa, 2002).

Devido aos benefícios apresentados ao produto final, algumas cepas de *Enterococcus* têm sido utilizadas como cultura iniciadora na produção de alguns queijos (Giraffa, 2002). O *Enterococcus faecium* é um dos principais microrganismos encontrados em queijos e produtos cárneos fermentados (Gomes et al., 2008). A linhagem de *Enterococcus faecium* E86 foi isolada de alimentos e é uma cepa produtora de bacteriocina com atividade contra *Listeria monocytogenes* (Miguel, de Castro e Leite, 2008).

1.2.4 *Lactococcus lactis*

Lactococcus lactis é uma bactéria gram-positiva de grande importância, devido à produção de uma bacteriocina que tem seu uso aprovado na indústria de alimentos, conhecida como nisina (Jozala, 2005). Algumas cepas produzem

bacteriocinas com atividade contra bactérias do gênero *Enterococcus*, *Kocuris*, *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Estafilococcus* (Millette et al., 2007).

É um importante componente da microbiota intestinal, sendo utilizado como probiótico, devido aos seus efeitos benéficos (Stills, 1996). Tem seu habitat em fontes vegetais e animais, incluindo intestino e as sub-espécies *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *cremoris* são as mais encontradas em produtos lácteos (Wright, 2012).

Recentemente, Monteagudo-Mera et al. (2012) avaliaram a capacidade da linhagem *Lactococcus lactis* ATCC 11454 ser utilizada como probiótico, mostrando resultados positivos como: a tolerância a baixos valores de pH e boa atividade antimicrobiana, melhores do que a bactéria utilizada como controle positivo que é um probiótico já reconhecido (*Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103) (Monteagudo-Mera et al., 2012).

1.2.5 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus GG foi isolado e identificado em 1985 a partir de fezes humanas, por Gorbach e Goldin, após diversos testes com diferentes *Lactobacillus* buscando encontrar alguma espécie que atendesse aos requisitos para que pudessem trazer benefícios à saúde humana (Doron, Snyderman e Gorbach, 2005). Para se chegar à espécie que apresentasse todas as características desejadas, os critérios utilizados foram resistência ao ácido biliar, adesão às células epiteliais humanas, colonização no intestino humano, produção de substâncias antimicrobianas, bom crescimento e efeitos benéficos à saúde (Gorbach, 1996). Se diferencia do *Lactobacillus casei* subsp *rhamnosus* devido à incapacidade de fermentar a lactose (Doron, Snyderman e Gorbach, 2005). Atualmente, é uma das bactérias com características probióticas mais estudadas e documentadas do mundo (English e Dean, 2013).

Lactobacillus GG tem se mostrado eficiente no tratamento de diarreia causada por vírus e bactérias, se aderindo à parede do intestino, balanceando a microbiota e normalizando enzimas fecais e os níveis ácidos graxos de cadeia curta, além de ser uma cepa segura para o consumo humano, inclusive com consumo a longo prazo (English e Dean, 2013). Há relatos de melhora na função da barreira do

intestino e estado clínico de crianças com doença de Crohn, devido ao consumo de *Lactobacillus GG* como probiótico, além de ser uma bactéria com atividade contra *Streptococcus mutans* e ter capacidade de remover aflatoxina B1 do intestino de galinhas (El-Nezami et al., 2000; Guandalini et al., 2000; Gupta et al., 2000).

1.2.6 *Leuconostoc lactis* e *Leuconostoc mesenteroides*

As bactérias lácticas do gênero *Leuconostoc* tem forma de cocos, que crescem em cadeia alongadas. São resistentes à vancomicina e produtoras de dióxido de carbono durante a fermentação de glicose (Elliott e Facklam, 1993; Garvie, 1960). Fermentam alimentos como chucrute, pickles e produtos cárneos, produzem gás em alguns tipos de queijos, são responsáveis por compostos de aromas em produtos lácteos e são utilizadas também como culturas iniciadoras em produtos lácteos (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004).

Existem ao menos 11 espécies do gênero, incluindo *Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc lactis*, usados no processo de fermentação de diversos produtos como: produtos lácteos, cárneos, vegetais, frutas e cereais (Hemme e Foucaud-Scheunemann, 2004).

1.2.7 *Pediococcus*

Trata-se de um gênero de bactérias ácido lácticas, em forma de cocos esféricos formando tétrades ou pares (Sims, 1966; Zhang, Tong e Dong, 2005). Até 2005 haviam 7 espécies conhecidas, atualmente são reconhecidas 11 espécies diferentes (Zhang, Tong e Dong, 2005; Holzapfel e Wood, 2014). São bactérias catalase e oxidase negativas, com crescimento, preferencialmente na ausência de oxigênio porém com tolerância a ele e produção de ácido láctico como produto principal produto da fermentação de glicose, sendo esta homofermentativa, com temperatura ótima de crescimento entre 25-35°C (Holzapfel e Wood, 2014).

Algumas espécies são usadas como cultura iniciadora em grãos fermentados, pepinos, cereais e azeitonas. A espécie *Pediococcus pentosaceus* tem importante papel em muitos alimentos fermentados de origem africana, produtos preparados com sorgo, milho e painço, queijos, salsichas e alguns tipos de presuntos espanhóis,

melhorando a textura da carne e reduzindo o tempo do processo de maturação (Holzapfel e Wood, 2014). Atualmente, o gênero *Pediococcus* tem sido muito estudado devido à produção de bacteriocinas com capacidade de inibir o crescimento de *L. monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* e *Bacillus subtilis* (Borges, 2013; Jang et al., 2014) e alguns tipos de fungos (Mahdi, Shafiq e Ajja, 2014).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade de degradação *in vitro*, do clorpirifós por seis bactérias lácticas em meio de cultura de Man, Rogosa e Sharpe (MRS).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o crescimento de seis bactérias lácticas na presença do clorpirifós
- Avaliar e quantificar a secreção de fosfatases alcalinas pelas cepas, na presença do agrotóxico
- Avaliar e quantificar o grau de degradação do agrotóxico pelas bactérias lácticas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 PADRÃO DO AGROTÓXICO E REAGENTES

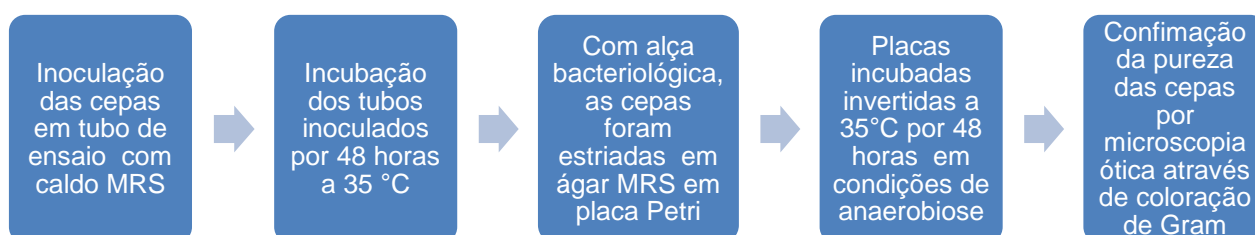
O meio de cultivo MRS (deMan, Rogosa e Sharpe) e o ágar bacteriológico foram obtidos da Acumedia (Neogen, Michigan, USA). Sua composição está descrita no anexo 1. O padrão analítico do agrotóxico utilizado neste estudo foi o clorpirifós etil, da série Pestanal[®], com grau de pureza de 99,3%, produzido pela Sigma-Aldrich Co. (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA).

3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO PADRÃO DE CLORPIRIFÓS

Inicialmente foi feita uma solução estoque de clorpirifós (Sigma-Aldrich Co, MO, EUA) com concentração de 1mg/L em acetona (Tedia Company Inc., Fairfield, OH, EUA). A solução foi esterilizada através de filtração à vácuo por membrana de PTFE (0,22 µm). Após a filtração, a solução foi armazenada em frasco âmbar a -18°C de onde foram retiradas as alíquotas adequadas correspondentes às concentrações desejadas para cada teste.

3.3 ATIVAÇÃO DAS CEPAS BACTERIANAS

Seis cepas de bactérias lácticas, *Enterococcus faecium* E86, *Lactococcus lactis* ATCC 11454 (American Type Culture Collection), *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103, *Leuconostoc lactis* ATCC 19256, *Leuconostoc mesenteroides* ATCC 8293 e *Pediococcus pentosaceus* ATCC 43200 foram obtidas do estoque de culturas do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). As cepas foram ativadas, conforme pode-se observar no fluxograma abaixo:



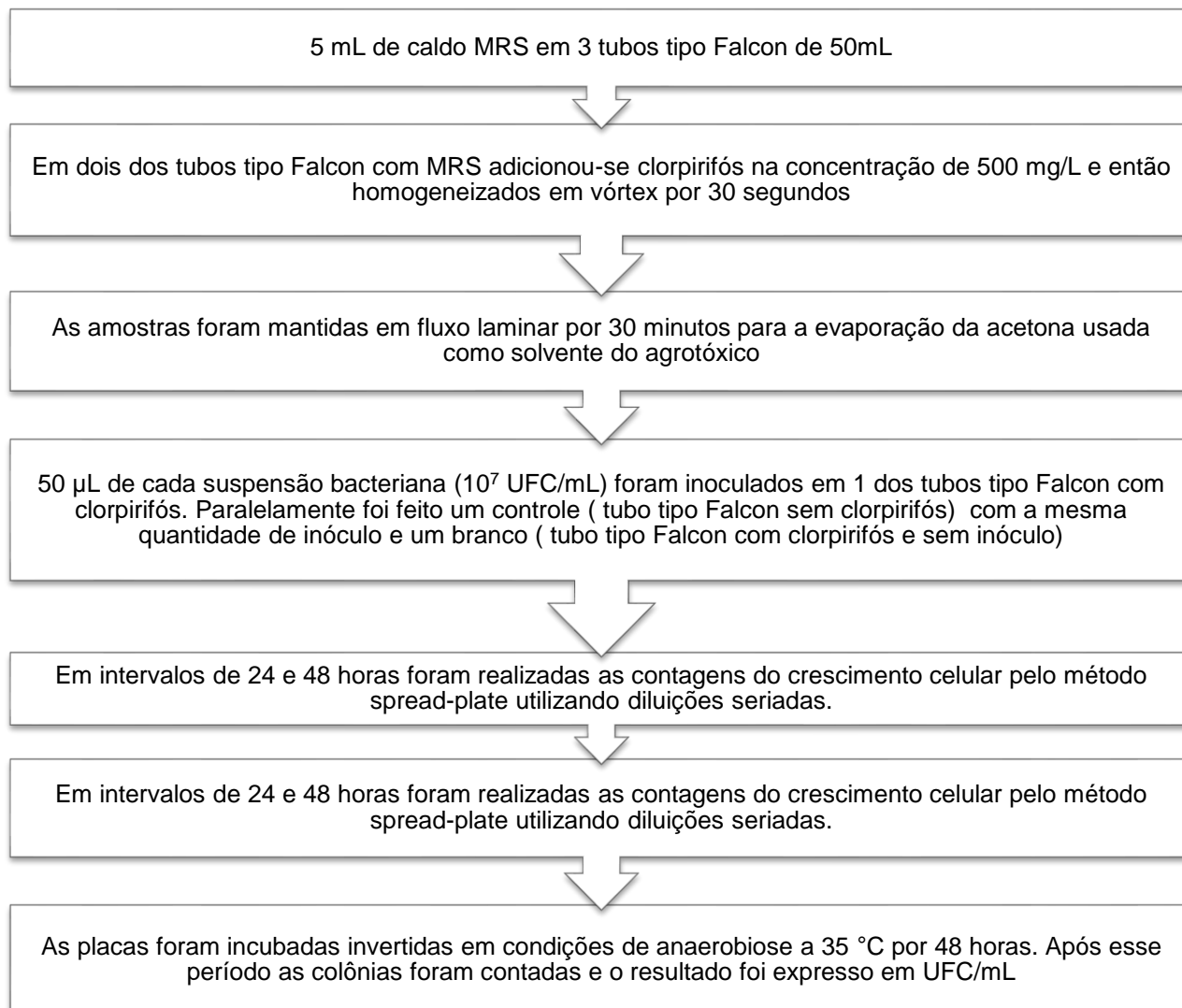
As bactérias foram ativadas em tubo de ensaio, previamente esterilizado em autoclave vertical a 121 °C por 15 minutos, com caldo MRS onde permaneceram incubadas por 48 horas a 35 °C. Em seguida, com o auxílio de alça bacteriológica, foram estriadas em placa Petri contendo ágar MRS para confirmação da pureza das cepas, e incubadas invertidas à 35°C, por 48 horas, em jarra de anaerobiose com 5% de CO₂ (método da vela). Após crescimento, a pureza foi confirmada por meio de microscopia ótica, com o uso de cristal violeta.

3.4 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Foi feita uma suspensão com equivalente a 10⁷ UFC/mL (Unidade Formadora de Colônia), em tubo de ensaio previamente esterilizado, com 5 mL de solução salina (0,85%), a partir das colônias ativadas em placa de Petri. Foram feitas diluições seriadas de cada suspensão, para possibilitar a contagem e confirmação da quantidade de microrganismos inoculada. Com o auxílio de alça bacteriológica estéril, as colônias com 48 horas de crescimento foram coletadas da placa de Petri e inoculadas na solução salina até turvação equivalente à 0,5 da escala McFarland, medida visualmente. A partir dessa suspensão, foram realizadas diluições seriadas em tubos de ensaio e 0,01 mL foi estriado em placa de Petri com ágar MRS até completa absorção com o auxílio de alça de Drigalski. As placas de Petri foram incubadas invertidas, a 35 °C, por 48 horas, em jarra de anaerobiose com 5% de CO₂. Após esse período, as colônias foram contadas e o resultado foi expresso em log₁₀ UFC/mL.

3.5 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DO CLORPIRIFÓS

3.5.1 Preparo do teste



Em tubo tipo Falcon de 50mL estéril, foram colocados 5 mL de caldo MRS previamente esterilizado sendo um tubo para cada bactéria. O meio de cultura foi adicionado de clorpirifós, para atingir concentração de 500 mg/L, com o auxílio de pipeta automática, e homogeneizado em vórtex, por 30 segundos. A mistura foi deixada em fluxo laminar por 30 minutos para evaporação da acetona usada como solvente do clorpirifós.

Cinquenta microlitros de cada suspensão bacteriana (10^7 UFC/mL) foram inoculados nos 5 mL de caldo MRS contendo clorpirifós, levando à um inóculo inicial de 10^5 UFC/mL. Paralelamente, foram realizados dois controles, um sem o clorpirifós

(meio de cultura com a suspensão bacteriana, chamado de Controle) e outro sem a suspensão bacteriana (meio de cultura com clorpirifós, chamado de Branco). As amostras foram incubadas a 35°C, por 48 horas.

A contagem para avaliação do crescimento foi feita em intervalos de 24 e 48 horas, pelo método *spread-plate*. Foram preparadas diluições seriadas de cada amostrane 0,01 mL de cada diluição foi espalhado uniformemente, com o auxílio de alça de Drigalski até ser completamente absorvido, em placa Petri com ágar MRS e posterior incubação invertida a 35 °C, por 48 em jarra de anaerobiose com 5% de CO₂. Após esse período, contou-se a quantidade de colônias e o resultado foi expresso em log₁₀ UFC/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Para avaliar se um tempo maior de exposição afetaria o crescimento de alguma das bactérias testadas em relação às outras, as análises foram feitas com 24 e 48 horas de incubação no meio de cultura.

3.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA

3.6.1 Curva padrão de p-nitrofenol

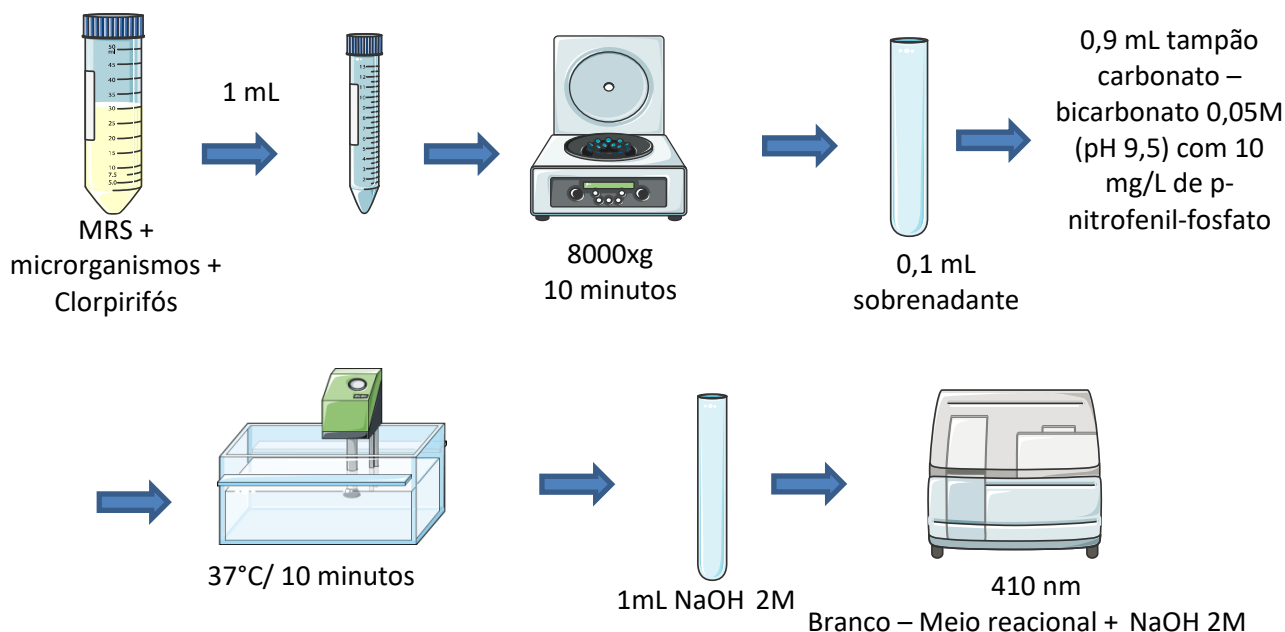
Foi feita uma curva analítica de regressão linear de 5 pontos com concentrações conhecidas de p-nitrofenol, como mostrado na Tabela 2.

O NaOH 2M foi utilizado como meio de paraliazar a reação e foi usado o mesmo volume para todas as amostras.

Tabela 2. Curva analítica de p-nitrofenol para quantificação de fosfatase alcalina nas amostras

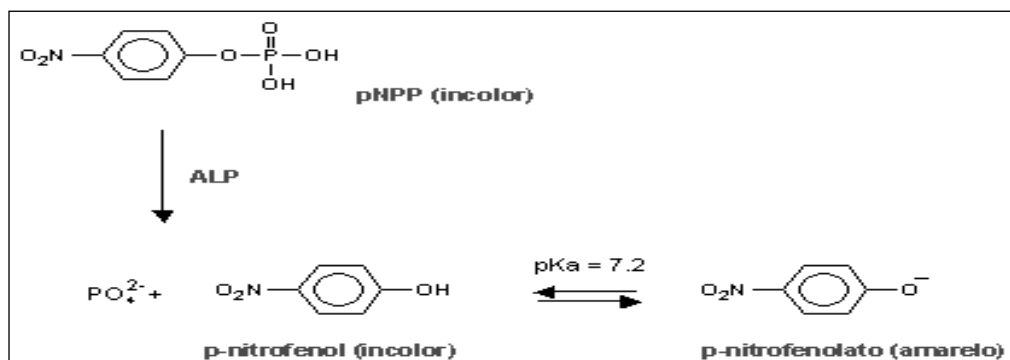
Número do tubo	Volume da solução de p-nitrofenol (µL)	Volume de tampão carbonato – bicarbonato (µL)	Concentração final de p-nitrofenol (µmol/mL)	Volume de NaOH 2M (µL)
1	30	970	0,0105	1000
2	55	945	0,01925	1000
3	80	920	0,028	1000
4	105	895	0,03675	1000
5	130	870	0,0455	1000

3.6.2 Determinação da atividade enzimática



Em intervalos de 24 e 48 horas, colheu-se, com auxílio de pipeta automática, 1 mL do meio MRS contaminado com clorpirifós de cada microrganismo, e transferiu-se para tubos tipo Falcon de 15 mL previamente esterilizados. As amostras foram centrifugadas a 8000 x g, por 10 minutos, em centrífuga de bancada (EXCELSA BABY II/206 R) para a separação das células dos microrganismos e o sobrenadante foi utilizado para determinar a atividade de fosfatases extracelulares. Em tubos de ensaio, adicionou-se de 0,1mL do sobrenadante e 0,9 mL de tampão carbonato- bicarbonato 0,05M (pH 9,5) contendo 10 mg/mL de p-nitrofenil-fosfato. Essa mistura foi incubada a 37°C, em banho-maria, por 10 minutos. O p-nitrofenil fosfato é hidrolisado a p-nitrofenol e a perda de próton leva à formação de p-nitrofenolato, com coloração amarela, como pode ser observado na Figura 5 (Thengodkar e Sivakami, 2010).

Figura 5: Reação colorimétrica para determinação de fosfatase com a hidrólise do p-nitrofenil fosfato a p-nitrofenol que em pH apropriado gera o composto de cor amarela p-nitrofenolato



Fonte: Bianconi, 2006

A reação foi realizada pela adição de 1 mL de NaOH 2M e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (SHIMADZU UV-200) a 410 nm, tendo como branco 1 mL de meio reacional com 1 mL de NaOH 2M. Utilizou-se como controle uma amostra com meio de cultura e suspensão de células bacterianas e outra apenas com o meio de cultura. O resultado foi expresso em unidades de atividade enzimática (U), e uma unidade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de p-nitrofenol por minuto a 37 °C.

3.7 DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTOMETRO DE MASSAS (CG-EM)

3.7.1 Extração do clorpirifós

Para a extração do clorpirifós do meio de cultura, foi utilizado o método descrito por Anastassiades e Lehotay (2003), conhecido como QuEChERS, com modificações, validado no Laboratório de Resíduos e Contaminantes da Embrapa, onde foi realizada a análise.

À uma alíquota de 1 mL da do meio de cultura, foram adicionados 10 mL de acetonitrila (J. T. Baker Solusorb – Avantor Performance Materials, Edo. Méx., México), em tubo tipo Falcon de 50 mL e homogeneizada em vórtex por 1 minuto. Foram então adicionados 4g de MgSO_4 e 1g de NaCl à solução, que foi novamente homogeneizada por 1 minuto em vórtex. Após homogeneização, a mistura foi centrifugada a 5000 xg por 15 minutos, em temperatura ambiente – 25 °C (Thermo

Scientific modelo Hereus). Após a centrifugação foi retirada uma alíquota de 1 mL do sobrenadante para um tubo tipo eppendorf de 2 mL contendo os seguintes sais de *clean up*: 150 mg de MgSO₄, 25 mg de PSA (amina primária secundária) e 25 mg de Bondesil-C18 (Agilent, CA, USA). A mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugada em microcentrífuga de bancada (NOVA NI/801) a 5000 xg, por 7 minutos. Uma alíquota de 400 µL do sobrenadante foi retirada e transferida para um *vial*. Após diluição com 400 µL de acetato de etila, a solução foi totalmente seca sob nitrogênio e ressuspensa com 800 µL de acetato de etila para posterior análise no sistema cromatografia gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM).

3.7.2 Análise cromatográfica

A quantificação de clorpirifós foi realizada em um sistema de cromatografia gasosa de alta resolução (Agilent modelo 7890^a) acoplado a um detector seletivo de massas (Agilent 5975C).

A coluna cromatográfica usada foi a HP-5 (J&W Scientific 0,25µm; 0,25 mm x 30 m); o gás carreador foi o hélio, com fluxo de 1,15 mL/min e velocidade linear de 30 cm/s. A injeção foi em *splitless* com tempo de abertura da válvula de 0,8 min e a temperatura do injetor foi de 250°C, com volume de injeção de 1,8µL. A programação da temperatura do forno iniciou-se em 50°C até 130°C a 25°C/min, permanecendo por 1 minuto e depois a 5°C/min até 275°C, permanecendo por 11 minutos.

Para a detecção seletiva do clorpirifós, o espectrômetro de massas foi usado em modo SIM (*Single Ion Monitoring*), ou seja, foram monitorados apenas os íons de $m/z = 197$ e $m/z = 315$ previamente selecionados através análises no sistema CG-EM com a injeção do padrão de clorpirifós em modo *scan*. Foi usada uma faixa de varredura de $m/z = 80$ a 400. Conforme os íons obtidos pela fragmentação do clorpirifós, foram selecionados os de $m/z = 197$ e $m/z = 315$ específicos deste analito, para serem usados na quantificação dos resíduos de clorpirifós.

A quantificação do pesticida no meio de cultura foi feita por padronização externa, comparando a área dos picos das amostras com as do padrão expressas na curva analítica do clorpirifós. Esta curva de calibração foi estabelecida através das análises no sistema cromatográfico em cinco níveis de concentração do padrão

de clorpirifós, em triplicata. Este procedimento gerou uma linha de tendência linear e equação da reta, sendo possível o cálculo da quantidade do agrotóxico nas amostra.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

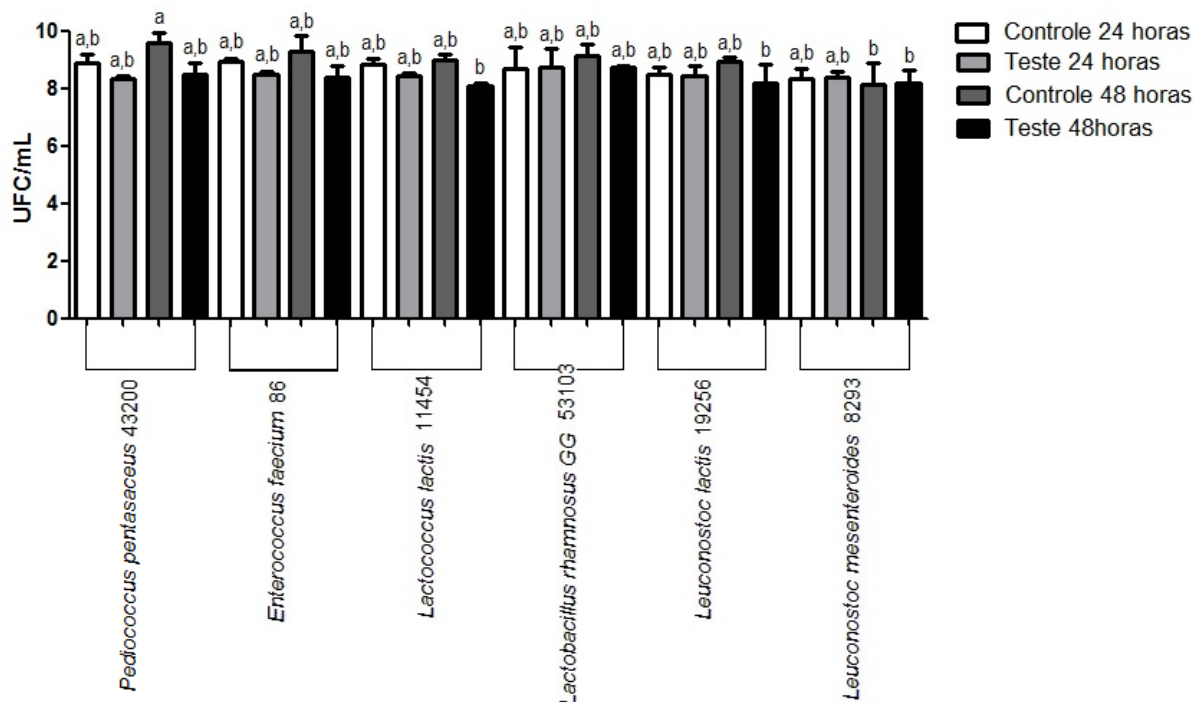
Todos os experimentos foram realizados em triplicata. As análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad prisma (5.0) utilizando ANOVA e pós – teste de Tuckey, com resultados obtidos em média \pm desvio padrão, e significância de 95% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS NA PRESENÇA DO CLORPIRIFÓS

Nesse experimento foi possível verificar a capacidade de sobrevivência e crescimento das bactérias quando expostas ao agrotóxico, servindo como uma avaliação preliminar do comportamento desses microrganismos na presença do pesticida. É de extrema importância que as bactérias utilizadas para as análises posteriores tenham essa capacidade de crescimento e multiplicação visto que isso aumenta a chance delas terem a habilidade de degradar o pesticida durante o seu desenvolvimento. O crescimento das bactérias no meio de cultura (teste) foi comparado com um meio sem o pesticida (controle), como pode ser visto na Figura 6.

Figura 6: Crescimento das bactérias na presença do agrotóxico



Crescimento das cepas analisadas com 24 e 48 horas de incubação do meio de cultura na ausência (controle) e na presença (teste) do clorpirifós. Letras diferentes sobre as barras representam diferença estatística ($p < 0,05$).

A linhagem de *Pediococcus pentasaceus* na amostra controle com 48 horas de incubação apresentou $9,56 \pm 0,39$ Unidades Formadoras de Colônia (UFC) / mL e quando comparado com a de *Leuconostoc mesenteroides*, amostra controle com o mesmo tempo de incubação ($8,11 \pm 0,78$ UFC/mL) e com as amostras teste do *Leuconostoc lactis* ($8,18 \pm 0,66$ UFC/mL) e *Lactococcus lactis* ($8,09 \pm 0,06$ UFC/mL) com 48 horas de incubação, foi significativamente maior ($p < 0,05$). Porém, entre as amostras teste, nenhuma bactéria cresceu significativamente mais do que as outras (Figura 6).

Sabendo que o metabolismo, velocidade de crescimento e desenvolvimento das bactérias é diferente, não haver diferença entre a amostra teste e controle de cada bactéria é o principal nessa análise. Quando se comparou cada bactéria com o seu respectivo controle, nenhuma apresentou diferença estatística. Sendo assim, todas tiveram crescimento semelhante no meio com e sem o clorpirifós. Além disso, 48 horas de incubação não pareceu favorecer o crescimento de nenhuma das bactérias testadas, não havendo diferença significativa ($p < 0,05$) para as amostras com 24 e 48 horas de incubação para cada microrganismo.

Algumas cepas de bactérias podem se adaptar à presença dos organofosforados, em tempos distintos e de formas diferentes, e crescer, mesmo na presença destes compostos, sem apresentar maiores danos (Singh, 2008). Singh et al (2003) avaliaram a capacidade de degradação das bactérias do solo sobre o clorpirifós e mostraram que há uma fase lag, e após a adaptação se inicia a degradação. A fase lag é o período no qual há adaptação das bactérias a determinado ambiente a que são expostas no qual pode não haver multiplicação celular onde há síntese de novas enzimas e pode ter duração variada, a depender das condições de crescimento e inóculo (UFF, 2017). Após esse período de latência, inicia-se o crescimento acelerado se multiplicando com divisões sucessivas e grande atividade metabólica e logo após a multiplicação cessa por ter algum fator determinante limitado (Rani et al., 2008; SENAI, 2000). Akbar e Sultan (2016) não observaram fase lag de *Achromobacter xylosoxidans* e *Ochrobactrum* sp. quando estavam expostas ao clorpirifós. O mesmo aconteceu no presente trabalho para todas as bactérias, que cresceram como seus controles logo nas primeiras 24 horas de incubação, sugerindo rápida ou nenhuma fase de adaptação à presença do

pesticida no meio de cultivo. Além disso produto não impediu ou dificultou a multiplicação celular das bactérias testadas.

Cho et al. (2009) avaliaram o crescimento de bactérias láticas em Kimchi (produto de origem asiática baseado na fermentação de vegetais por bactérias láticas) e constataram não haver diferença na quantidade de bactérias que cresciam no produto com e sem o clorpirifós até o quarto dia, onde o produto com o agrotóxico começava a apresentar uma queda na sua população bacteriana.

Não é incomum que alguns tipos de bactérias sejam capazes de resistir e crescer na presença do clorpirifós (Akbar e Sultan, 2016; Silambarasan e Abraham, 2014; Wang et al., 2016). A toxicidade desse organofosforado se dá através da inibição da enzima acetilcolinesterase impedindo a hidrólise da acetilcolina e gerando transtornos neurológicos. Esse mecanismo não faz parte do metabolismo de bactérias, portanto, esse organofosforado não causa problemas adversos para o crescimento desses microrganismos (Singh, 2008). Acredita-se que, em determinada concentração de clorpirifós as bactérias parem de crescer devido a modificações estruturais provavelmente causadas por esse composto (Wang et al., 2016).

Na avaliação da resistência à toxicidade de alguns microrganismos ao clorpirifós, Harishankar, Sasikala e Ramya (2013) mostraram que, a maioria dos microrganismos testados toleram concentrações de até 1400 mg/L do produto. Bo, Zhang e Zhao (2010) mostraram a capacidade de cultura iniciadora de iogurte de resistir a sete tipos de pesticidas organofosforados e assim crescerem na presença deles sem alterar a fermentação. Rani et al. (2008) avaliaram que, em concentrações entre 50 – 200 mg/L durante 24 horas, houve estímulo do crescimento de *P. stuartii* MS09 em meio de cultura mas, em concentrações superiores a 300 mg/L, houve redução da contagem de células bacterianas expostas ao clorpirifós. Wang et al. (2016) determinaram que, apesar da melhor taxa de degradação do clorpirifós ocorrer em concentração de 20 mg/L, as bactérias se adaptaram muito bem a concentrações até 500 mg/L, inclusive produzindo maior massa celular nessa concentração. Sendo assim, podemos ver que a concentração do clorpirifós pode influenciar o crescimento de algumas bactérias e outras não. Além disso, a maior tolerância ao pesticida pode variar de acordo com a bactéria, não havendo um padrão de resistência mesmo dentre as bactérias láticas provavelmente devido a

diferenças no metabolismo do clorpirifós e seus produtos por cada espécie/linhagem.

Esses resultados da literatura condizem com os resultados encontrados no presente trabalho, onde as bactérias cresceram por pelo menos 48 horas na presença do pesticida sem diferença significativa em relação ao controle em concentração de 500 mg/L de clorpirifós.

4.2 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE FOSFATASE ALCALINA

Para verificar se havia produção de fosfatase alcalina pelas bactérias lácticas analisadas e se essa produção era maior quando elas estavam expostas ao clorpirifós, a atividade de fosfatase alcalina no meio de cultura com e sem o clorpirifós foi avaliada baseado na hidrólise do p - nitrofenil fosfato. A atividade foi estimada com base em uma curva analítica de regressão linear, com concentrações conhecidas de p-nitrofenol (produto da reação de hidrólise), que apresentou um R^2 de 0,991 e equação da reta $y = 8,3771x - 0,0214$ como pode ser visto no apêndice A. A partir dela, foi possível calcular a atividade de enzima liberada na amostra analisada conforme pode ser visto na Tabela 3.

Tabela 3. Atividade de fosfatase alcalina secretada por cada bactéria na presença do clorpirifós

Microrganismo	Controle 24 horas de incubação (U)	Teste 24 horas de incubação (U)	Controle 48 horas de incubação (U)	Teste 48 horas de incubação (U)
<i>Enterococcus faecium</i> E 86	0,0231±0,0008 ^a	0,0203±0,0024 ^{a,b,c}	0,0163±0,0005 ^{a,b,c}	0,0151±0,0005 ^{b,c}
<i>Lactococcus lactis</i> ATCC 11454	0,0229±0,0022 ^a	0,0226±0,0014 ^a	0,0211±0,0035 ^{a,b}	0,0175±0,0026 ^{a,b,c}
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ATCC 53103	0,0200±0,0013 ^{a,b,c}	0,0165±0,0054 ^{a,b,c}	0,0148±0,0052 ^{b,c}	0,0131±0,0057 ^c
<i>Leuconostoc lactis</i> ATCC 19256	0,0205±0,0021 ^{a,b,c}	0,0202±0,0019 ^{a,b,c}	0,0179±0,0015 ^{a,b,c}	0,0199±0,0004 ^{a,b,c}
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ATCC 8293	0,0217±0,0003 ^{a,b}	0,0221±0,0006 ^a	0,0167±0,0004 ^{a,b,c}	0,0169±0,0001 ^{a,b,c}
<i>Pediococcus pentasaceus</i> ATCC 43200	0,0196±0,0010 ^{a,b,c}	0,0219±0,0005 ^a	0,0193±0,0008 ^{a,b,c}	0,0197±0,0011 ^{a,b,c}

Amostras com 24 e 48 horas de incubação do meio de cultura na ausência (Controle) e na presença (Teste) do clorpirifós. U representa a quantidade de enzima por mL liberada por minuto com média ± desvio padrão (DP). Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Nenhuma bactéria apresentou produção de fosfatase maior na amostra com adição de clorpirifós quando comparada com o seu próprio controle. Além disso, não houve diferença estatística ($p < 0,05$) de atividade da enzima entre as amostras teste ou entre as amostras controle quando comparadas entre os microrganismos.

Após 48 horas de incubação, a amostra de *Lactobacillus rhamnosus* apresentou produção de fosfatase menor na amostra teste quando comparado ao controle do *Lactococcus lactis* ($p > 0,05$), mas ainda assim, nenhuma bactéria teve maior produção de fosfatase na amostra teste comparada com o seu próprio controle. A produção de fosfatase alcalina foi estatisticamente semelhante entre todas as cepas testadas quando comparamos apenas as amostras com o clorpirifós ou apenas as amostras controle entre si. Também não houve diferença significativa na secreção da enzima de 24 horas para 48 horas para nenhuma bactéria testada, não havendo maior atividade em um tempo maior de incubação.

Zhou e Zhao (2014) avaliaram a produção de fosfatase alcalina por 5 bactérias lácticas e duas culturas para produção de iogurte cultivadas em leite desnatado em um período de 24 horas de incubação onde os valores variaram de 0,081 U/mL a 0,175U/mL e a bactéria com maior produção de fosfatase foi a que apresentou maior degradação de pesticidas organofosforados. Zhang et al. (2014) também avaliaram a produção de fosfatase por bactérias lácticas cultivadas em leite desnatado e suas concentrações variaram de 0,266U/mL a 0,357 U/mL, além disso, obtiveram uma correlação positiva entre a produção de fosfatase e a degradação de organofosforados ($r = 0,724$), sendo a bactéria *Lactobacillus brevis* a que apresentou maior poder de degradação e maior produção de fosfatase.

No presente estudo, as bactérias lácticas apresentaram quantidade bem inferior de fosfatase alcalina quando comparado com o trabalho de Zhou e Zhao (2014), onde o *Lactobacillus rhamnosus*, por exemplo, teve produção de 0,116 U/mL e no presente trabalho o mesmo microrganismo apresentou $0,0165 \pm 0,0054$ U/mL. Porém, o estudo de Zhou e Zhao (2014) bem como o de Zhang et al. (2014) que apresentaram valores de produção de fosfatase alcalina mais elevados, avaliam a produção dessas enzimas em meios lácteos como leite e iogurte. O leite possui fosfatase naturalmente e na metodologia desses trabalhos, não há qualquer indicação de que esse controle tenha sido feito.

Harishankar Sasikala e Ramya (2013) avaliaram a produção extracelular de fosfatases por três tipos de bactérias intestinais e encontraram 0,0068 U/mL, 0,00461 U/mL e 0,0032 U/mL para *L. fermentum*, *L. lactis* e *E. coli*, respectivamente, expostas a concentração de 100 mg/L de clorpirifós, resultados abaixo dos encontrados no presente estudo, onde a bactéria com menor secreção de fosfatase foi o *Lactobacillus rhamnosus* que produziu $0,0165 \pm 0,0054$ U/mL.

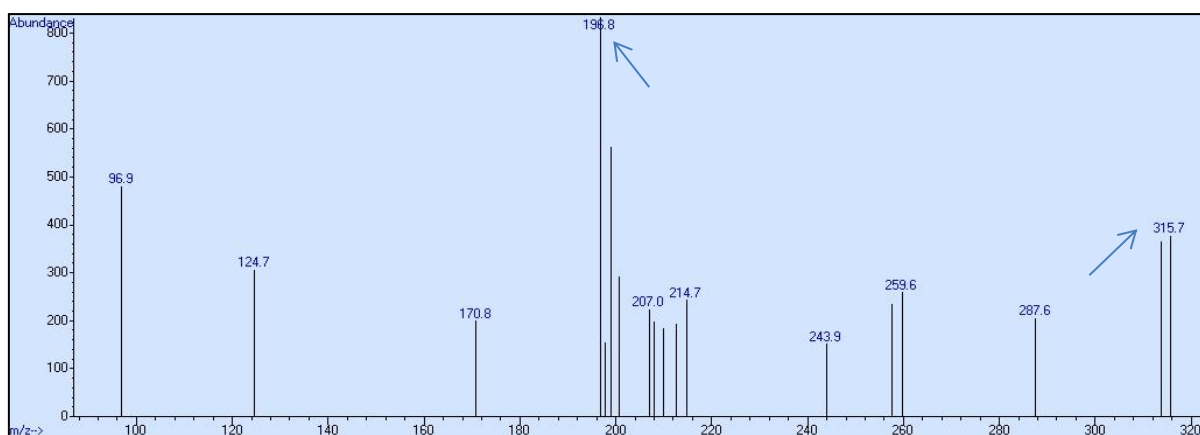
Não houve diferença entre a quantidade de fosfatase alcalina produzida pelas bactérias nas amostras controle e teste, ou seja sem e com a exposição ao organofosforado, respectivamente. As enzimas podem ser constitutivas, sendo produzidas independente do meio de cultivo não havendo necessidade da exposição à substâncias fosfatadas para serem secretadas (Couri e Damaso, 2016). Sendo assim, acredita-se que essas bactérias sejam capazes de produzir fosfatase sem que haja necessidade da presença de substâncias fosfatadas no meio a que estão expostas. Yang et al. (2005) concluíram que, *A. faecalis*, isolado de solo

contaminado com o pesticida, produzia enzimas induzidas pela presença do clorpirifós mas também haviam enzimas constitutivas capazes de degradar o 3,5,6-tricloro-2- piridinol (TCP), subproduto da degradação do clorpirifós.

4.3 DETERMINAÇÃO DE CLORPIRIFÓS POR CG-EM

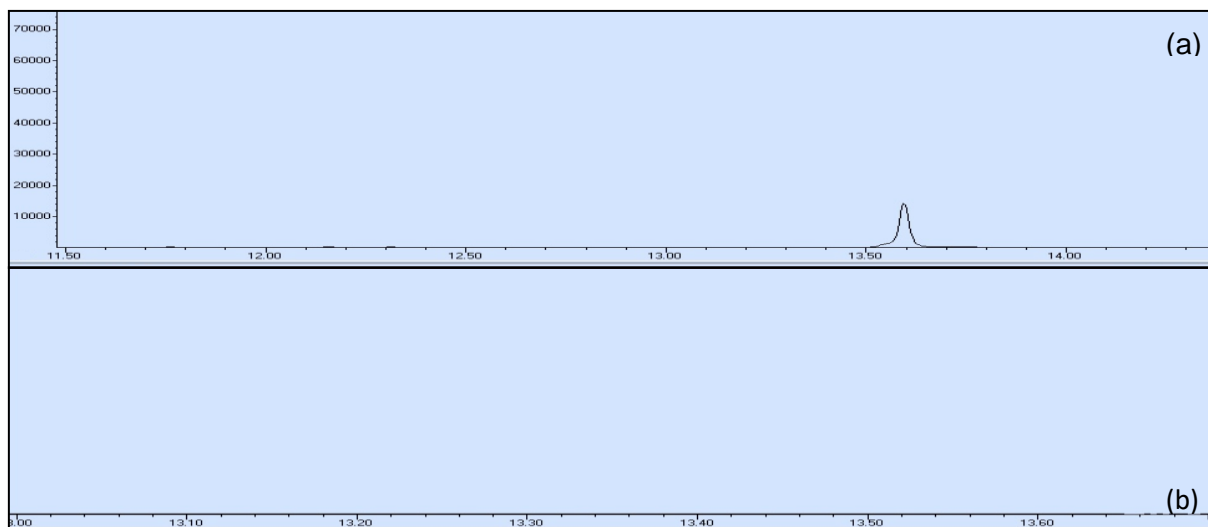
Para determinar a concentração de clorpirifós residual presente na amostra, selecionou – se os íons m/z 197 e m/z 315 específicos deste analíto, como podemos observar no espectro de massas abaixo obtido com a injeção do padrão de clorpirifós no equipamento (Figura 7).

Figura 7: Espectro de massas do clorpirifós com os íons específicos desse analito gerados após a injeção do padrão em cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrometro de massas



O tempo de retenção do clorpirifós foi confirmado através da injeção do padrão com eluição no tempo 13,6 minutos, como pode ser observado na Figura 8^a. Como controle, foi utilizado o meio de cultura MRS, sem inoculação de microrganismo e sem contaminação com clorpirifós (Figura 8b), confirmando ausência de pico no tempo de retenção do pesticida. Cabe ressaltar que ambos os cromatogramas estão na mesma escala e que não existe nenhum pico da amostra no mesmo tempo de retenção do padrão de clorpirifós – 13,6 min.

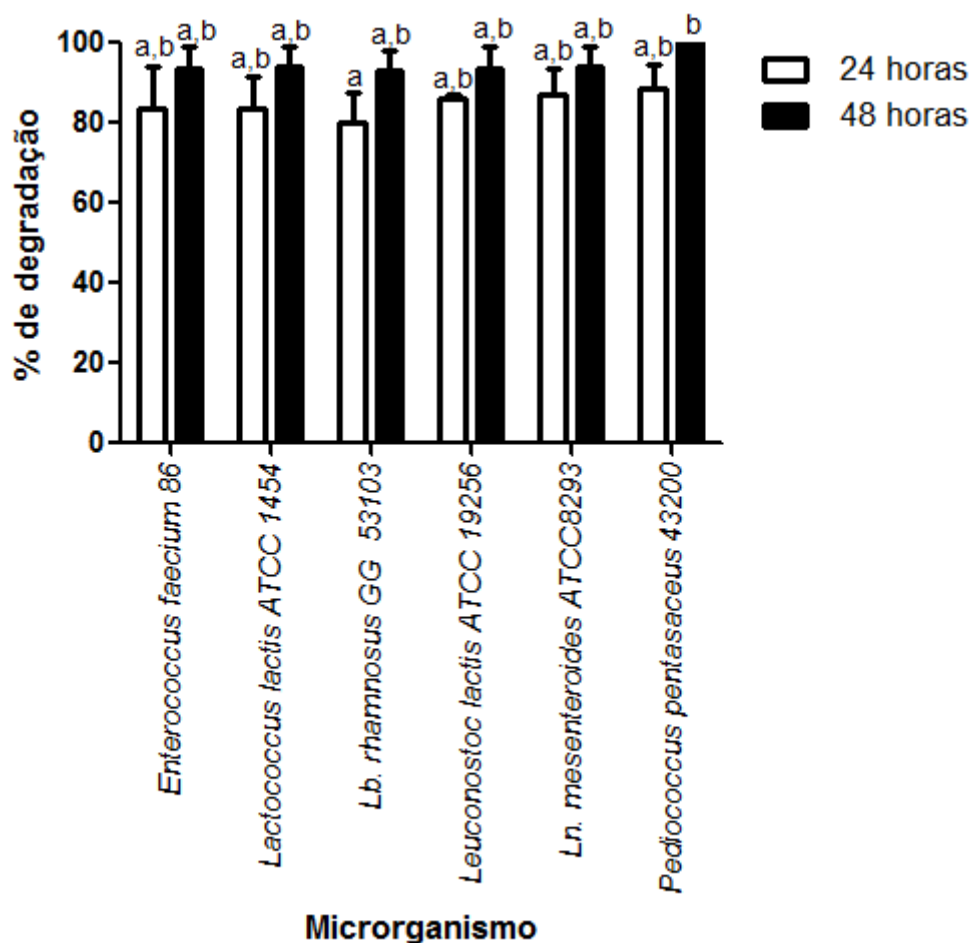
Figura 8: Tempo de retenção do clorpirifós (a) e injeção do meio de cultura sem o clorpirifós, amostra controle (b)



Para determinar as concentrações de clorpirifós, foi feita uma curva padrão de regressão analítica, com concentrações conhecidas de clorpirifós, que apresentou R^2 de 0,9795 e equação da reta $y = 673458x + 32183$, com nível de detecção mínimo de 0,0178 $\mu\text{g/mL}$ e máximo de 2,1335 $\mu\text{g/mL}$ de clorpirifós, que pode ser vista no apêndice C. A partir dela foi possível calcular as quantidades do pesticida em cada amostra para cada microrganismo.

Os percentuais de degradação das amostras teste podem ser observados na Figura 9.

Figura 9: Percentual de degradação do clorpirifós por bactérias lácticas



Amostras com 24 e 48 horas de incubação do meio de cultura. Letras diferentes representam diferença estatística ($p < 0,05$).

Nenhuma amostra controle teve pico detectado no mesmo tempo de retenção do clorpirifós.

Quando comparamos entre as bactérias, podemos observar na Figura 8 que apenas o *Lactobacillus rhamnosus* após 24 horas de incubação apresentou degradação menor que o *Pediococcus* após 48 horas de incubação. Porém, essa comparando ambos com o mesmo tempo de incubação da amostra, esta diferença observa-se mais diferença estatística ($p < 0,05$). O *Pediococcus pentasaceus* não teve pico detectado para a amostra após 48 horas, sugerindo degradação total, ou próxima a isso com valores residuais de clorpirifós muito pequenos na amostra, sendo indetectável. Porém, de forma geral, o tempo de incubação não pareceu

aumentar a degradação de forma significativa ($p > 0,05$), sendo que 24 horas de incubação apresentou uma excelente degradação (superior a 80%) para todas as espécies.

Zhang et al. (2014) avaliaram 5 organofosforados diferentes constatando que o clorpirifós era um dos mais instáveis quando exposto à degradação por bactérias láticas. Zhao e Wang (2012) comprovaram a capacidade de degradação dos microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *L. plantarum* e *L. paracasei* de 7 pesticidas organofosforados diferentes durante 24 horas de incubação, em leite desnatado, com redução de 20,9 a 46,9% dependendo do microrganismo e pesticida analisado. Zhou e Zhao (2014) trabalharam com bactérias láticas e 9 pesticidas organofosforados. Para o clorpirifós, *Lactobacillus casei* degradou apenas 7% do pesticida. Cho et al. (2009) trabalharam com Kimchi com 30 mg/L de clorpirifós e obtiveram total degradação após 9 dias de incubação pelas bactérias láticas presentes no produto durante a fermentação, mas após 3 dias já havia apenas 5 mg/L de resíduo. No mesmo trabalho também foi avaliada a degradação em meio de cultura e, após 3 dias, com 100 mg/L de clorpirifós, 61% havia sido degradado por um conjunto de 4 bactérias láticas.

Com bactérias do solo, Yang et al (2005) isolaram e caracterizam uma bactéria capaz de degradar 93% de clorpirifós com 48 horas de incubação na concentração de 10^7 UFC/mL. No mesmo estudo, os pesquisadores avaliaram a influência da concentração de clorpirifós na degradação comprovando que ela ocorreu mais rápido em concentrações maiores comparando de 10 a 500 mg/L do pesticida. Acredita-se que esse fator pode ter influenciado a alta capacidade de degradação demonstrada no presente trabalho já que foi utilizada uma concentração de 500 mg/L de clorpirifós para os testes. Essa variação da degradação, de acordo com a concentração do produto, foi confirmada por Anwar et al (2009) que tiveram a degradação aumentada com maiores concentrações iniciais do clorpirifós na amostra usando *B. pumilus*. Em concentrações mais altas (500 e 1000 mg/L) a degradação também foi maior (88 e 89%), porém com mais tempo de incubação (7 e 10 dias, respectivamente).

Os trabalhos encontrados atualmente na literatura, que utilizam bactérias láticas para a degradação dos pesticidas não apresentaram degradação tão eficaz quanto o presente trabalho que chegou a mais de 90% de degradação em 48 horas.

O *Pediococcus* pode ter degradado completamente o clorpirifós na amostra, além disso, apesar de não haver diferença estatística, foi o microrganismo com maior produção de fosfatase e apresentou um ótimo crescimento quando exposto ao clorpirifós. Porém, como todos demonstraram capacidade semelhante na degradação do pesticida, a utilização de qualquer uma das seis bactérias lácticas para a remoção de resíduos parece ser viável e eficaz necessitando mais estudos para avaliar a influência das concentrações de clorpirifós e possíveis interferências de outras substâncias presentes em diferentes matrizes.

Devido à estrutura semelhante dos organofosforados, acredita-se que elas possam degradar outros tipos de pesticidas dessa classe devido à sua ação sobre a ligação fosfotriéster (Yang et al., 2005; Singh et al., 2004). Algumas bactérias lácticas são utilizadas na produção de alimentos, portanto a sua ingestão é segura para o consumo humano e muitas vezes benéficas auxiliando o equilíbrio intestinal e podendo trazer benefícios a saúde de quem as consome (English e Dean, 2013; El-Nezami et al., 2000; Guandalini et al., 2000; Gupta et al., 2000).

5 Conclusão

Com os resultados obtidos, podemos concluir que as seis bactérias lácticas analisadas são capazes de resistir e crescer sem diferença em relação ao controle, na presença do clorpirifós e ainda são capazes de degradar esse pesticida de forma rápida e eficaz e em grandes concentrações do agrotóxico. Apesar de não haver diferença estatística significativa, o *Pediococcus pentasaceus* não teve resíduo detectado após 48 horas de incubação a 35° C sugerindo possível degradação total do clorpirifós no meio de cultura.

Quando comparamos com dados da literatura, podemos constatar que as bactérias analisadas neste estudo possuem capacidade de degradação do clorpirifós maior do que a maioria, sendo mais eficaz e necessitando de menos tempo de exposição ao agrotóxico tornando a sua aplicação para a descontaminação e biorremediação tecnicamente viável. Deve-se investigar ainda se outras matrizes com diferentes componentes podem afetar essa degradação e se quantidades menores do pesticida também serão degradadas de forma eficaz e rápida.

Apesar das enzimas serem produzidas de forma constitutiva, elas ainda podem ser as responsáveis pela degradação do clorpirifós, porém sua secreção não depende da presença do clorpirifós no meio. Mais estudos devem ser realizados a fim de investigar o mecanismo pelo qual as bactérias podem degradar esse pesticida.

Referências

AHMADOVA, A. et al. Evaluation of antimicrobial activity, probiotic properties and safety of wild strain *Enterococcus faecium* AQ71 isolated from Azerbaijani Motal cheese. **Food Control**, v. 30, n.2, p. 631-641, 2013.

AKHTAR, N.; SRIVASTAVA, M.K.; RAIZADA, R.B. Assessment of chlorpyrifos toxicity on certain organs in rat, *Rattus norvegicus*. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, n. 6, p. 1047-1053, 2009.

AKBAR,S.; SULTAN,S. Soil bacteria showing a potential of chlorpyrifosdegradation and plant growth enhancement. **Brazilian journal of microbiology**, v. 86, 2016.

ANASTASSIADES,M.; LEHOTAY,S. Fast and Easy Multiredue Method Employng Acetonitrile Extraction/Partition and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce”. **Journal of AOAC Internetal**, v. 86, n. 2, p. 412-417, 2003.

ANVISA. **Listas de ingredientes ativos com uso autorizado e banidos no Brasil**. 2017. Disponível em:< http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/consulta-publica-sobre-avaliacao-toxicologi-1/219201?p_p_auth=2UrUAtH7&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3D2UrUAtH7%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-3%26p_p_col_count%3D3> Acesso em: 03 de março de 2017.

ANWAR, S. et al. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 1, p. 400-405, 2009.

BIANCONI, M.L. **Fosfatase alcalina**. Instituto de bioquímica Médica – IBqM. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro, 2006. Disponível em: < <http://www2.bioqmed.ufrj.br/enzimas/fosfatase.htm>> Acesso em: 10 de fev de 2017.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 11 julho 1989. Disponível em:< <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/agrotoxicos/arquivos/lei-no-7-802-89.pdf/view>> .

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2 de 7 de janeiro de 2002. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 2002. Disponível em:< <http://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=Mjl1Mw%2C%2C>>

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Consulta pública nº 47 de 7 de junho de 2005. **Diário Oficial da União**, 2005. Disponível em: < <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B10618-1-0%5D.PDF>>

BO, L.Y.; ZHANG, Y.H.; ZHAO, X.H. Degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in milk during yoghurt processing. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 73, n.3, p.353-362, 2011.

BORGES, S. et al. Evaluation of characteristics of *Pediococcus* spp. to be used as a vaginal probiotic. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, n 2, p.527-538, 2013.

BOVO, F.; CORASSIN, C.H.; OLIVEIRA, C.A.F. Descontaminação de aflatoxinas em alimentos por bactérias ácido-láticas. **Ciênc. Biol. Saúde**, n.12, v.2, p. 15-21, 2010.

CHEMSPIDER. **Tetraethyl pyrophosphate**. Disponível em:<<http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7585.html>> Acesso em: 10 de abril de 2017.

CHENG, T.C.; DEFRANK, J.J. Hydrolysis of Organophosphorus Compounds by Bacterial Phosphatases. **Enzymes in Action**, v.33, n.1, p. 243-261, 2000.

CHISTHI, Z. et al. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. **Journal of Environmental Management**, v. 114, p. 372-380, 2013.

CHO, K.M. et al. Biodegradation of chlorpyrifos by Lactic Acid bacteria during Kimchi fermentation. **J. Agric. Food Chem**, v.57, n.5, p. 1882-1889, 2009.

CORASSIN, C.H.; BOVO, F.; OLIVEIRA, C.A.F. Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M1 in UHT skim milk. **Food Control**, v.31, p. 80-83, 2013.

COURI, S.; DAMASO, M.C.T. **Enzimáticos**. Agência Embrapa de informação e tecnologia. Disponível em:<http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/tecnologia_de_alimentos/arvore/CONT000fid5sgif02wyiv80z4s473v6o7sud.html> Acesso em: 01 dez 2016.

DIEZ, M.V.C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **J. soil. sci. plant. nutr.**, v.10, n.3, p.244 – 267, 2010.

DORON, S.; SNYDMAN, D.R.; GORBACH, S.L. *Lactobacillus GG*: Bacteriology and Clinical Applications. **Gastroenterol Clin North Am**, n. 34, v.3, p. 483-498, 2005.

DUARTE, M. de L.R. **Normas sobre uso de agrotóxicos**. EMBRAPA, 2005. Disponível em:<<https://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Pimenta/PimenteiradoReino/paginas/uso.htm>> Acesso em 16 de junho de 2016.

ELLIOT, J.A.; FACKLAM, R.R. Identification of *Leuconostoc* spp. by analysis of soluble whole-cell protein patterns. **Journal of clinical microbiology**, v. 31, n.5, p. 1030-1033, 1993.

EL-NEZAMI, H.; et al. Ability of *Lactobacillus* and *Propionibacterium* Strains to Remove Aflatoxin B1 from the Chicken Duodenum. **Journal of Food Protection**, v. 63, n. 4, p. 549-552, 2000

EMBRAPA- Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Seminário discute problemas na produção de sementes orgânicas**. 2016. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/web/portal/busca-de-noticias/-/noticia/10379267/seminario-discute-problemas-na-producao-de-sementes-organicas>>

ENGLISH,J.; DEAN,W. Breakthrough Probiotic Clinically Proven to Support Gastrointestinal Health. **Nutrition review**, 2013. Disponível em:< <https://nutritionreview.org/2013/04/lactobacillus-gg/>> Acesso em: 10 de fev de 2017.

FANTROUSSI,A.E.; AGATHOS, S.N. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p.268–275, 2005.

FAO/WHO. **Probiotics in food: Health and nutritional properties and guidelines for evaluation**. FAO food and nutrition paper, Cordoba, Argentina, 2001.

FARNOOSH, G. et al. Enzymatic Degradation of Organophosphate Compounds: Evaluation of High-level Production, Solubility and Stability. **Journal of Applied Biotechnology Reports**, v.2, n. 4, p. 339-344, 2015.

FENNER, K. et al. Evaluating Pesticide Degradation in the Environment: Blind Spots and Emerging Opportunities. **Sciencemag**, v. 341, 2013.

GAALOU, N. et al. Isolation and characterization of large spectrum and multiple bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain from raw bovine milk. **J Appl Microbiol.**, v.118, n.2, p. 343 – 355, 2015.

GARVIE,E.I. The genus *Leuconostoc* and its nomenclature. **J. of Dairy Research**, v. 27, n.2, p. 283-292, 1960.

GIRAFFA,G. **Enterococci** from foods . **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26,n.2, p.163-171, 2002.

GOMES,B.C. et al. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. **Food Microbiology**, v. 25,n.5 ,p. 668-675,2008.

GORBACH,S.L. The Discovery of *Lactobacillus GG*. **Nutrition Today Supplement**. v.31, n.6, 1996.

GUANDALINI,S. et al. *Lactobacillus GG* administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. **Journal of Pediatric Gastroenterol Nutr.**, v.30, n.1, p. 54-60, 2000.

GUPTA, R.C. Toxicology of Organophosphate e Carbamate Compounds. **Elsevier:** USA, 2006. 781p.

GUPTA, P. et al. Is lactobacillus GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. **J Pediatr Gastroenterol Nutr.**, v. 31, n. 4, p. 453-457, 2000.

HARISHANKAR, M.K.; SASIKALA, C.; RAMYA, M. Efficiency of the intestinal bacteria in the degradation of the toxic pesticide, chlorpyrifos. **3 Biotech**, v. 3, p. 137-142, 2013.

HEMME, D.; FOUCAUD-SCHEUNEMANN. *Leuconostoc*, characteristics, use in dairy technology and prospects in functional foods. **International Dairy Journal**, v.14, n.6, p. 467–494, 2004.

HUANG, C.; CHEN, X.; LI, J.; WU, F.; YANG, W.; ZHANG, J. Responses of Fungi Community Structure to the Presence of Pesticide Chlorpyrifos in the Soil Planting Brassica Juncea (L.) Czerniak. *Water, Air, & Soil Pollution*, v. 227, n. 60, p.

HUI, T.J.; ARIFFIN, M.M.; TAHIR, N.M. Hydrolysis of chlorpyrifos in aqueous solutions at different temperatures and pH. **The Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 14, n.2, p. 50-55, 2010.

HOLZAPFEL, W.H.; WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria – Biodiversity and taxonomy. Wiley Blackwell: UK, 2014.

IUBMB -International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Hydrolase Nomenclature**, 2016. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/EC3/>>.

Ibama. **Consumo de agrotóxicos e afins** . Disponível em: http://ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2014/grafico_historico_comercializacao_2000_2014.pdf. Acesso em 03 de março de 2017.

JANG, S. et al. Identification of an anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable. **Food Control**, v. 43, p. 42 – 48, 2014.

JOUTEY, N.T. et al. **Biodegradation: Involved Microorganisms and Genetically Engineered Microorganisms**. Biodegradation – Life of science, 2013. Disponível em: < <http://www.intechopen.com/books/biodegradation-life-of-science/biodegradation-involved-microorganisms-and-genetically-engineered-microorganisms>> Acesso em: 15 dez de 2016.

JOZALA, A.F. **Produção de nisina por *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 utilizando meio sintético e leite desnatado, com ou sem suplementação,**

como meio de cultivo. 2005. 93f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímico – Farmacêutico) - Faculdade de ciências farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LEROY,F.; VUYST,L.D.Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n.2, p. 67-78, 2004.

LIU, J. ET AL. Complete biodegradation of chlorpyrifos by engineered *Pseudomonas putida* cells expressing surface-immobilized laccases. **Chemosphere**, v. 157, np. 200-207, 2016.

MAHID,L.; SHAFIQ, A.S.; AJJA, H.A. Effects of Crude and Purified Bacteriocin of *Pediococcus pentosaceus* on the Growth and Zearalenone Production by *Fusarium graminearum*. **International Journal of Current Engineering and Technology**, v.4, n.1, 2014

MAPA. **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.** Mapa altera registros de agrotóxicos destinados às pragas do trigo e da cevada. Disponível em < <http://www.agricultura.gov.br/noticias/mapa-altera-registros-de-agrotoxicos-destinados-as-pragas-do-trigo-e-da-cevada>> Acesso em: 21 fev 2017.

MAKAROVAA, K. et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 42, 2006. Disponível em: < <http://www.pnas.org/content/103/42/15611.full>> Acesso em: 20 de jan de 2017.

MAZUR, A. An enzyme in animal tissues capable of hydrolyzing the phosphorus–fluorine bond of alkyl fluorophosphates. **J Biol Chem**, v.164, p.271–289, 1946.

MESNAGE, R.; et al. Major pesticides are more toxic to human cells than their declared active principles. **BioMed Research International**, v. 2014, 8p., 2014.

MIGUEL, M.A.L.; de CASTRO, A.C.D.; LEITE, S.F.G. Inhibition of vancomycin and high-level aminoglycoside-resistant *Enterococci* strains and *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* E86. **Current Microbiology**, v. 57, p. 429-436, 2008.

MILLETTE, M. et al. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n.1, p. 274-282, 2007.

MONTEAGUDO-MERA, A.; et al. *In vitro* evaluation of physiological probiotic properties of different lactic acid bacteria strains of dairy and human origin. **Journal of functional foods**. v. 4, n.2,p. 531-54, 2012.

NASHAS, E. Microrganismos do solo produtores de fosfatases em diferentes sistemas agrícolas. **Bragantina**, v. 61, n. 3, 2002.

NAWAZ, K.; et al. Review- Eco-friendly role of biodegradation against agricultural pesticides hazards. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 3, p. 177-183, 2011.

ODUKKATHIL, G.; VASUDEVAN, N. Toxicity and bioremediation of pesticides in agricultural soil. **Rev Environ Sci Biotechnol**, v. 1, p. 421-444, 2013.

OECD/FAO. 2015. 144f. **OECD-FAO Agricultural Outlook 2015**, OECD Publishing, Paris, 2015. Disponível em: < 10.1787/agr_outlook-2015-em>. Acesso em: 03 jun 2016.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA. Diretrizes mundias da organização mundial de gastroenterologia. Probióticos e prebióticos. Disponível em: < <http://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-portuguese-2011.pdf>> Acesso em: 15 de abril de 2017.

PAILAN, S. et al. Evidence of biodegradation of chlorpyrifos by a newly isolated heavy metal-tolerant bacterium *Acinetobacter* sp. strain MemCl4. **Environmental Earth Sciences**, v. 75, n. 1019, 2016.

PARA – Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos.

Brasília, 2016. 246p. Disponível em: <

<http://portal.anvisa.gov.br/documents/219201/2782895/Relat%C3%B3rio+PARA+Vers%C3%A3o+Final/1230de7d-306d-4249-a62c-a68708fab153>>

PATRICK, O.M. Lactic acid bacteria in Health and Disease. **Rwanda Journal of Health Sciences**. v. 1, n.1, 2012.

PINO, N.; PEÑUELA, G. Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 65, p. 827-831, 2011.

RANI, M.S.; et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacterium from agricultural soil and its growth. **African Journal of Microbiology Research**, v. 2, p. 26-31, 2008.

RANJBAR, A.; PASALAR, P.; ABDOLLAHI, M. Induction of oxidative stress and acetylcholinesterase inhibition in organophosphorus pesticide manufacturing workers. **Hum Exp Toxicol**, v.21, n.4, p. 179-182, 2002.

SENAI. **Elementos de apoio para o sistema APPCC**. 2ed. Brasília, 2000. 361 p.

SIGMA-ALDRICH. **Chlorpyrifos**. Disponível em:<
<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/chlorpyrifos35059292188211?lang=pt®ion=BR>> Acesso em: 25 ago 2016.

SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Efficacy of *Ganoderma* sp. JAS4 in bioremediation of chlorpyrifos and its hydrolyzing metabolite TCP from agricultural soil. **Journal of Basic Microbiology**, v. 54, p. 44-55, 2014.

SILVA, J. Tópicos da Tecnologia de Alimento. São Paulo: **Livraria Varela**, 2000, p.64.

SIMS, W. The isolation of pediococci from human saliva . **Archives of Oral Biology**, v. 11, n. 10, p. 967 – 972, 1996.

SINGH, B.K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. **Nature reviews**, v. 7, 2008.

SINGH, B.K.; et al. Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. **Applied and environmental microbiology**, v. 69, n. 9, p. 5198-5206, 2003.

SINGH, B.K. et al. Biodegradation of Chlorpyrifos by *Enterobacter* Strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated Soils. **Applied and environmental microbiology**, v. 70, n. 8, p.4855- 4863, 2004.

SINGH, B.K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 30, p. 428 – 471, 2006.

SPADOTTO, C.A.; GOMES, M.A.F. **Agrotóxicos no Brasil**. Agência Embrapa de Informação e Tecnologia. Disponível em <
http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/agricultura_e_meio_ambiente/arvore/CONTAG01_40_210200792814.html> Acesso em 21 fev 2017.

STILES, M.E. Biopreservation by lactic acid bacteria. Kluwer **Academic Publishers**, v. 70, p.331-345, 1996.

THENGODKAR, R.R.M.; SIVAKAMI, S. Degradation of Chlorpyrifos by an alkaline phosphatase from the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Biodegradation**, v. 21, p. 637-644, 2010.

UFF – Universidade Federal Fluminense. Departamento de Tecnologia Farmacêutica. **Enzimologia e tecnologia das fermentações**. Disponível em:<
http://www.uff.br/enzimo/index.php?option=com_content&view=article&id=10%3Afaselag&catid=1&Itemid=7> Acesso em: 15 de julho de 2016.

WACKETT, L.P.; ELLIS, L.B.M. Biodegradation of Organic Pollutants. **Encyclopedia of life sciences**, 2005.

WANG, L.; et al. Chlorpyrifos exposure in farmers and urban adults: Metabolic characteristic, exposure estimation, and potential effect of oxidative damage. **Environmental Research**, v. 149, p. 164-170, 2016.

WRIGHT, A.T. Genus *Lactococcus*. In: In: LAHTINEM, S. et al. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Flórida: Taylor & Francis Group, 2012. p. 63-76.

WRIGHT, A.T.; AXELSSON, L. Lactic Acid Bacteria: An Introduction. In: LAHTINEM, S. et al. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Flórida: Taylor & Francis Group, 2012. p.2-16.

YANG, C. et al. Cloning of *mpd* gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 265, p. 118-125, 2006.

YANG, L. et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol degrading bacterium. **Federation of European Microbiological Societies**, v. 251, p. 67-73, 2005.

ZHANG, B.; TONG, H.; DONG, X. *Pediococcus cellicola* sp. nov., a novel lactic acid coccus isolated from a distilled-spirit-fermenting cellar. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.55, p 2167–2170, 2005.

ZHANG, Y.H. et al. Enhanced degradation of five organophosphorus pesticides in skimmed milk by lactic acid bacteria and its potential relationship with phosphatase production. **Food Chemistry**, v. 164, p. 173 – 178, 2014.

ZHAO, X.; WANG, J. A brief study on the degradation kinetics of seven organophosphorus pesticides in skimmed milk cultured with *Lactobacillus* spp. at 42 °C. **Food Chemistry**, v.13, p.300–304, 2012.

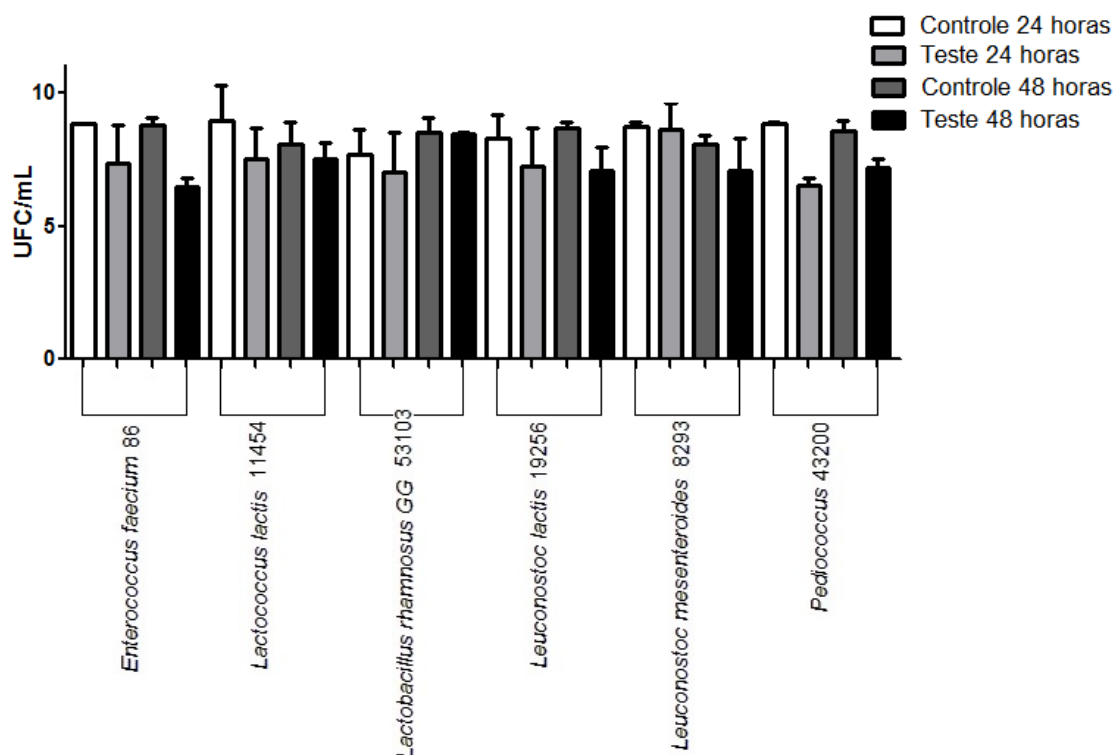
ZHAO, Y.; et al. Effects of chlorpyrifos on the gut microbiome and urine metabolome in mouse (*Mus musculus*). **Chemosphere**, v. 153, p. 287-293, 2016.

ZHOU, X.; ZHAO, X. Susceptibility of nine organophosphorus pesticides in skimmed milk towards inoculated lactic acid bacteria and yogurt starters. **J Sci Food Agric**, v.95, p. 260–266, 2014.

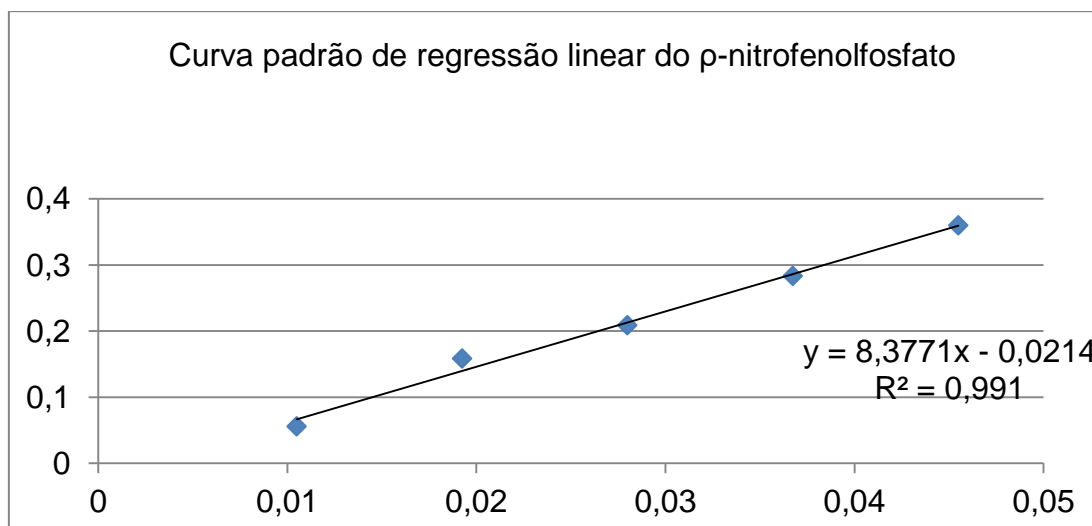
ZOGHI, A.; Khosravi-Darani, K.; Sohrabvandib, S. Surface Binding of Toxins and Heavy Metals by Probiotics. **Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 84-98, 2014.

APÊNDICE A - Teste Preliminar com concentração de clorpirifós de 750mg/L

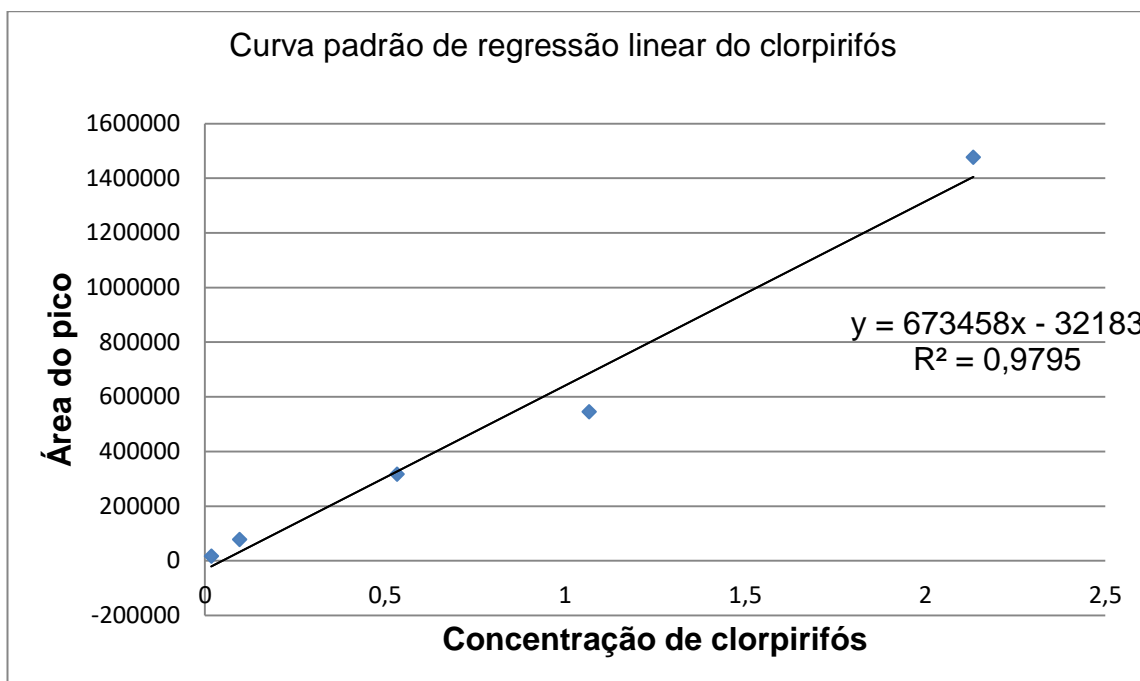
Figura 10. Teste preliminar de tolerância ao clorpirifós na concentração de 750 mg/L.



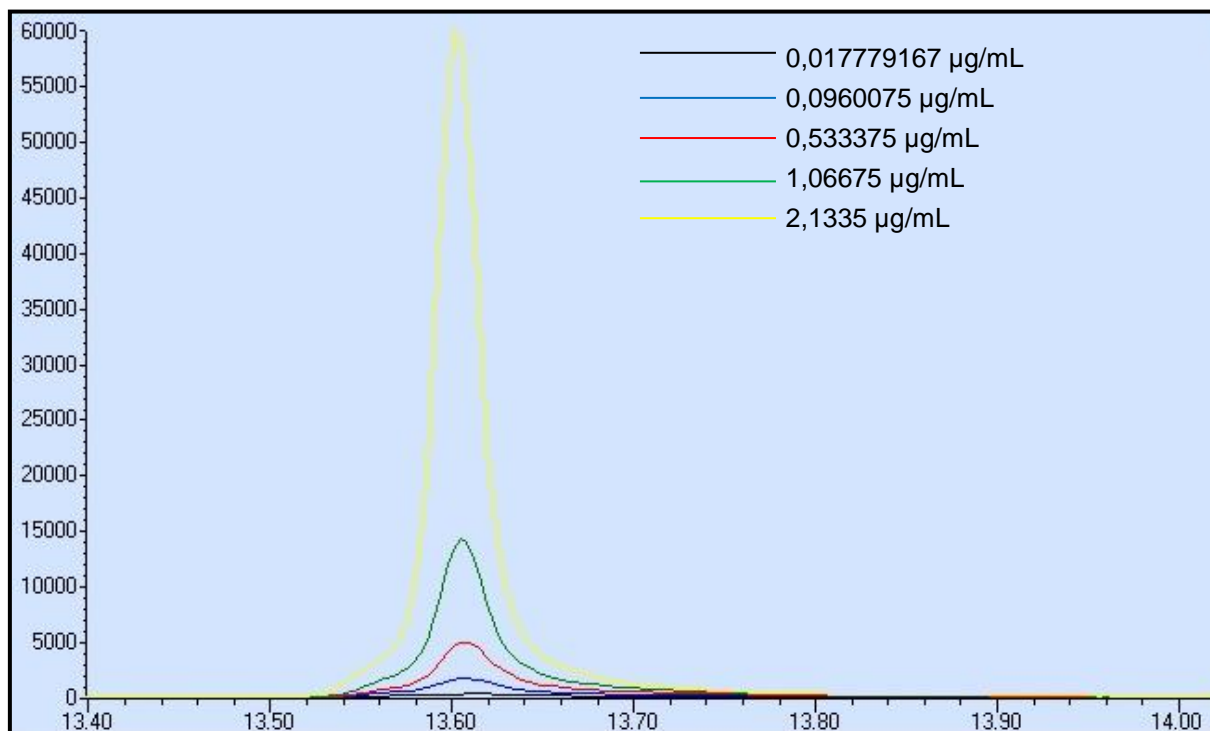
APÊNDICE B – Curva padrão de regressão linear de p-nitrofenol fosfato utilizada para cálculo da concentração de p-nitrofenol na amostra



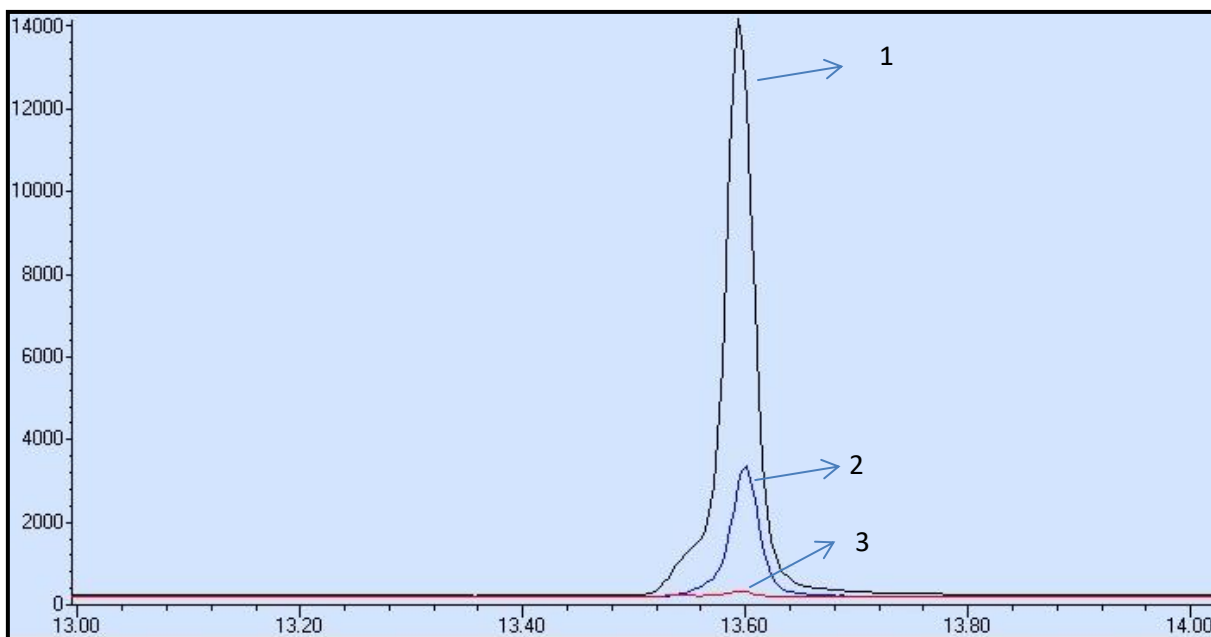
APÊNDICE C – CURVA PADRÃO DE REGRESSÃO LINEAR DE CLORPIRIFÓS UTILIZADA PARA CÁLCULO DE CLORPIRIFÓS NAS AMOSTRAS



APÊNDICE D- Cromatograma da curva padrão de clorpirifós

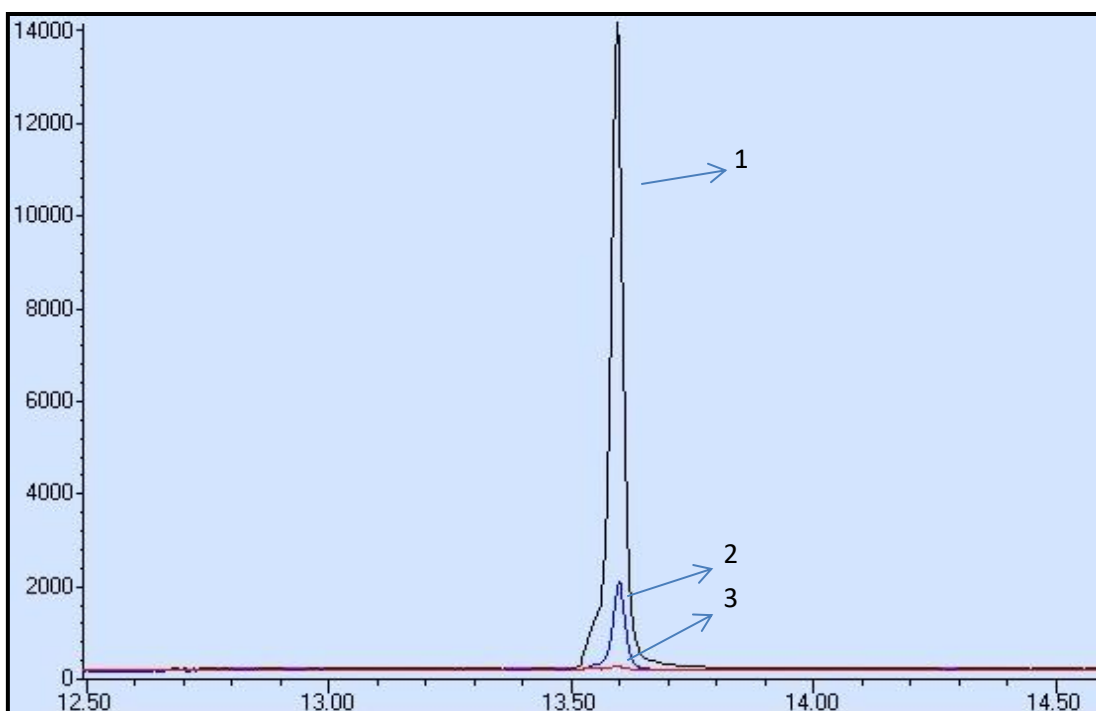


APÊNDICE E- Cromatograma do *Enterococcus faecium* E86



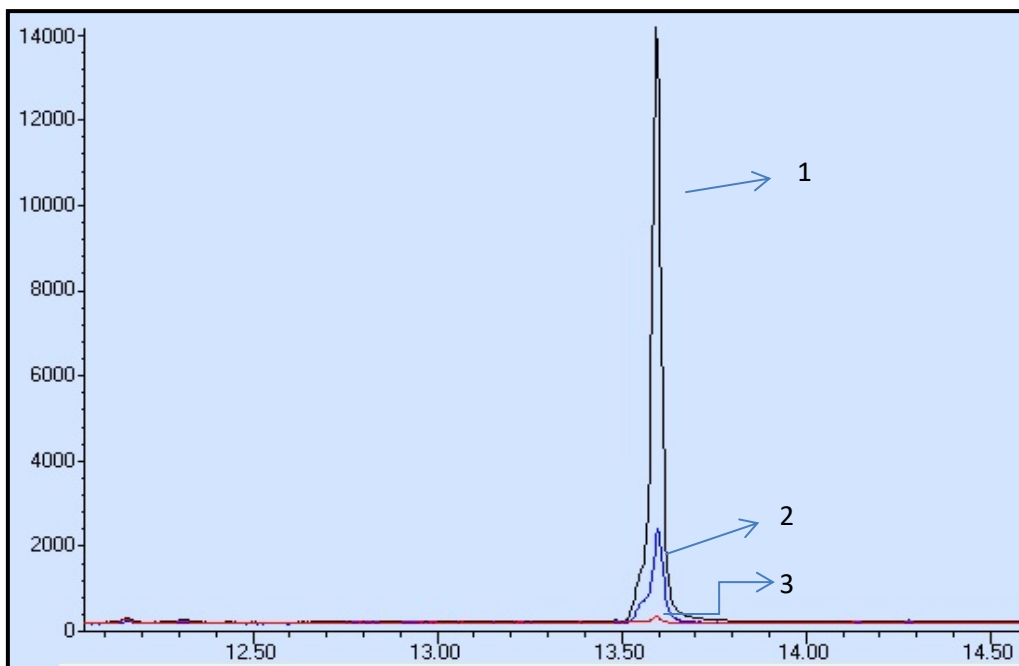
- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

APÊNDICE F – Cromatograma do *Lactococcus lactis* 11454



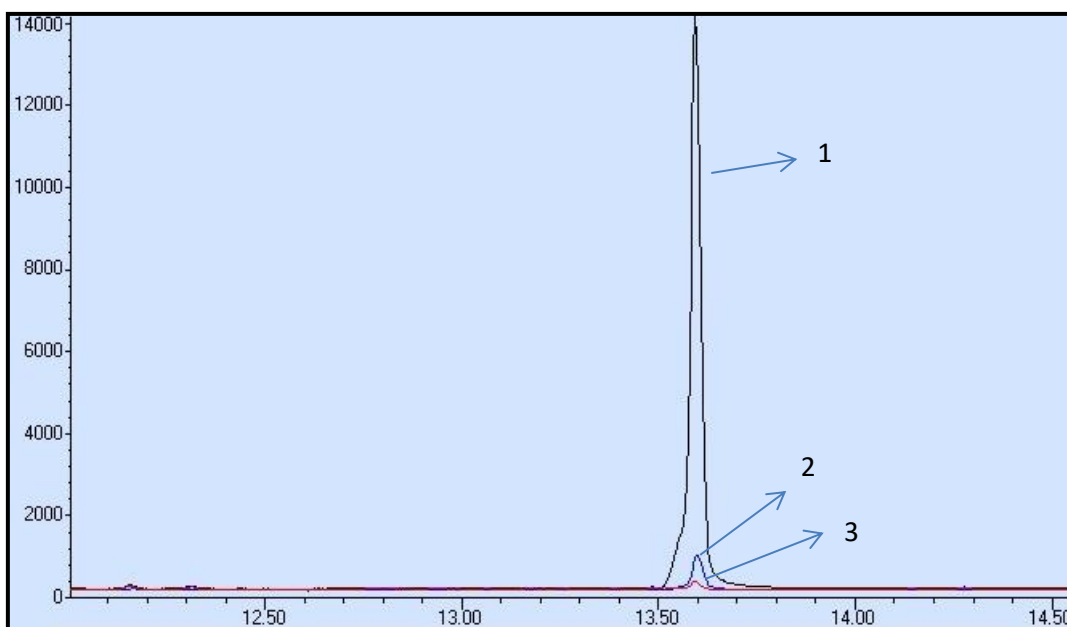
- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

APÊNDICE G- Cromatograma do *Lactobacillus rhamnosus* GG 53103



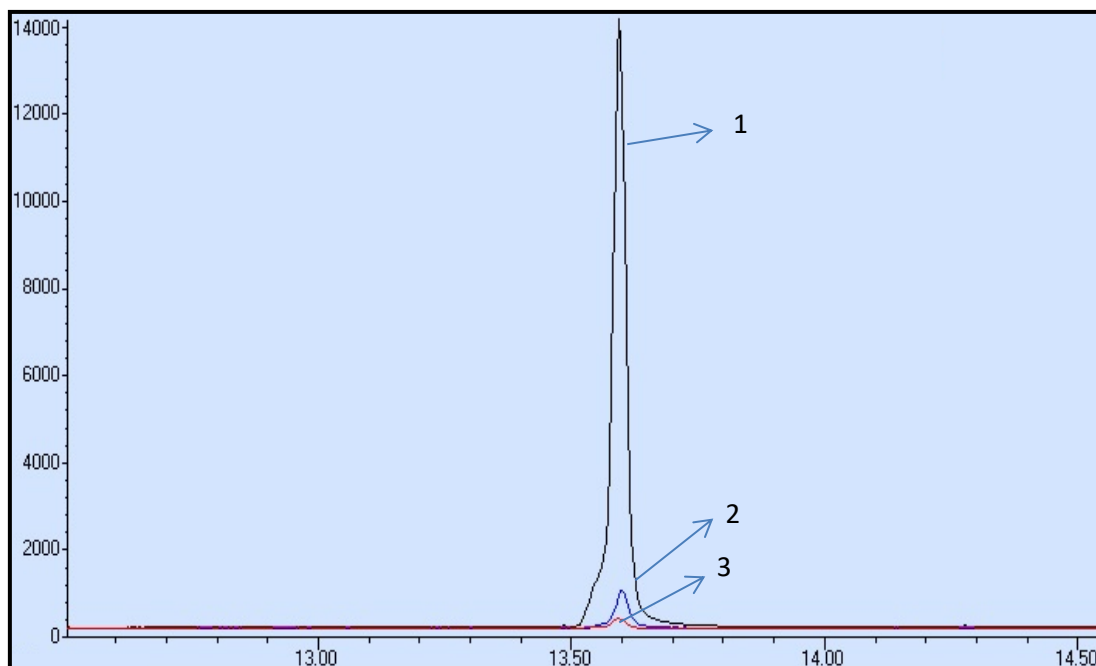
- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

APÊNDICE H- Cromatograma do *Leuconostoc lactis* 19256



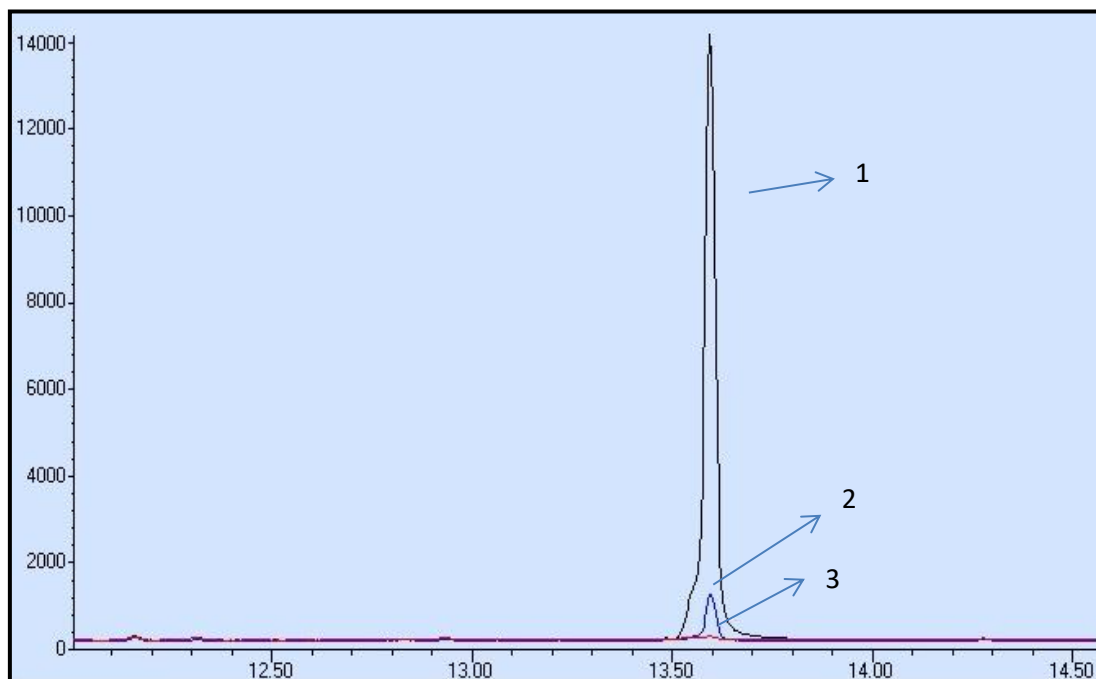
- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

APÊNDICE I – Cromatograma do *Leuconostoc mesenteroides* 8293



- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

APÊNDICE J – Cromatograma do *Pediococcus pentosaceus* 43200



- 1- Meio de cultura com clorpirifós, concentração inicial
- 2- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 24 horas de incubação
- 3- Meio de cultura com clorpirifós e inóculo com 48 horas de incubação

Anexo A – Composição em g/L do Caldo Lactobacillus MRS – ACUMEDIA

Peptona	10.00
Extrato de carne	10.00
Extrato de Levedura	5.00
Dextrose	20.00
Polisorbato 80	1.00
Citrato de amônia	2.00
Acetato de Sódio	5.00
Sulfato de Magnésio	0.10
Sulfato de Manganês	0.05
Fosfato dipotássio	2.00
pH final a 25°C	6,5 ± 0,2