



Tese de Doutorado

**BIORREMEDIAÇÃO DE HERBICIDAS EM ÁGUA DO CULTIVO DE ARROZ
IRRIGADO VISANDO MINIMIZAR O IMPACTO AMBIENTAL**

Rafael Roehrs

PPGQ

**Santa Maria, RS, Brasil
2008**

RAFAEL ROEHRS

**“BIORREMEDIAÇÃO DE HERBICIDAS EM ÁGUA DO CULTIVO DE ARROZ
IRRIGADO VISANDO MINIMIZAR O IMPACTO AMBIENTAL”**

TESE DE DOUTORADO

**UFSM
Santa Maria, RS, Brasil
2008**

**BIORREMEDIAÇÃO DE HERBICIDAS EM ÁGUA DO CULTIVO DE ARROZ
IRRIGADO VISANDO MINIMIZAR O IMPACTO AMBIENTAL**

por

Rafael Roehrs

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Química, Área de Concentração em Química Analítica, da Universidade Federal de Santa
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

DOUTOR EM QUÍMICA

PPGQ

Santa Maria – RS, Brasil

2008

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

BIORREMEDIAÇÃO DE HERBICIDAS EM ÁGUA DO CULTIVO DE ARROZ
IRRIGADO VISANDO MINIMIZAR O IMPACTO AMBIENTAL

Elaborado por
Rafael Roehrs

Como requisito parcial para a obtenção do grau de

Doutor em Química

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Renato Zanella
Orientador

Prof. Dr. Horacio Heinzen – UDELAR – Uruguai

Prof. Dr. Valeriano Antonio Corbellini – UNISC

Prof. Dr. Sérgio Luis de Oliveira Machado – UFSM

Prof^a Dr^a Martha Bohrer Adaime – UFSM

“In victory, be humble
In defeat, be strong
In all things, be fair”

Eternal Grand Master Haeng Ung Lee

A curiosidade é mais importante do que o conhecimento.

Albert Einstein

A preguiça é a mãe do progresso.

Se o homem não tivesse preguiça de caminhar, não teria inventado a roda.

Mario Quintana

Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina.

Somente os extremamente sábios e os extremamente estúpidos é que não mudam.

A essência do conhecimento consiste em aplicá-lo, uma vez possuído.

Confúcio

POEMINHA DO CONTRA

Todos estes que aí estão

Atravancando o meu caminho,

Eles passarão.

Eu passarinho!

Mario Quintana

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Renato Zanella, sou grato pela orientação, confiança durante essa jornada e pelo tempo despendido nos finais de tarde para me ensinar a trabalhar com HPLC e para corrigir e enviar meu projeto de doutorado ao CNPq.

Ao amigo e Professor Dr. Horácio Heinzen, fico honrado em tê-lo em minha banca examinadora da tese e em receber suas contribuições. Também agradeço pela amizade, pela acolhida em seu grupo de pesquisa e principalmente pela ajuda durante todo o tempo que estive em Montevideú. A ele e à Verônica, sua esposa, que tive como pais no Uruguai.

Ao Professor Dr. Valeriano Antonio Corbellini, agradeço por sua participação e contribuição no exame de qualificação e na defesa da tese. Esse trabalho só existe graças às suas aulas instigantes de microbiologia que me influenciaram a buscar o lado biológico da química.

Ao Professor Dr. Sérgio Luis de Oliveira Machado, agradeço por sua participação e contribuição no exame de qualificação e na defesa da tese. E por dispor de amostras de solo e água do campo experimental de cultivo de arroz para a seleção dos microrganismos para esta tese.

À Professora Dra. Martha Bohrer Adaime, agradeço pelas contribuições no exame de qualificação e na defesa da tese. Vim a conhecer melhor ela em uma semana em Montevideú em nossas caminhadas pela *Rambla* – e por isso sempre terá minha admiração.

Ao amigo e Professor Dr. René Vreuls da Free University (Amsterdam/Holanda) pela amizade e orientação, pela acolhida em seu grupo de pesquisa e ensinamentos.

Ao amigo e Professor Dr. André de Kok da VWA (Amsterdam/Holanda) pela amizade e auxílio durante todo tempo que permaneci na Holanda. Pelos passeios nos finais de semana e por tornar minha estadia na Holanda uma experiência que jamais será esquecida.

A minha grande amiga Ionara Pizzutti gostaria de agradecer por toda a ajuda durante este árduo período de doutorado e pelas aulas de química analítica, devido a elas tenho este título – sabes que jamais te esquecerei e que tens minha eterna amizade.

Ao amigo Renato Cezar, pela amizade e pelas conversas regadas a café da máquina do prédio 20.

Ao amigo Renato Moreira Rosa, pela amizade, conselhos e artigos durante todo o meu doutorado.

Aos amigos holandeses Dik Kamminga, Pim, Freek Ariese, Johannes, Hanzi, Niels e Linda pelas palavras amigas nos momentos difíceis, pelos *Borrel* durante a semana e pelas viagens com os colegas da ACAS.

Aos amigos uruguaios Gabriel, Andrés, Carlos Garcia, Álvaro, Sebastian, Mauricio, Pilar, El Osito e Eduardo, que tornaram minha estadia no Uruguai maravilhosa. A Gabriel pelos passeios às praias, a *El Pony Pisador*, a *La Fiesta de La X*, pelos cafés e por toda a ajuda na utilização do HPLC-DAD. A Carlos Garcia pela companhia no fantástico show de Deep Purple. A Álvaro Vasquez pelo *El Club Dumas* e pelas conversas matutinas sobre livros, cinema e sobre o cotidiano. A Andrés pela amizade, pelos mates durante os trabalhos e por me apresentar as bandas de rock uruguaio. Ao Eduardo Dellacassa, por sua amizade, preocupação e *bromas* durante todo o meu tempo em Montevideú. Aos meus amigos do *El Pony Pisador*, Rosana, Negra, Gustavo (tatchuela) e Patrícia, que mesmo me conhecendo a pouco tempo me fizeram sentir como sendo da família. Ao Ignacio (Nacho) filho de Negra, pelas brincadeiras e cinemas nos domingos.

À Margareth que é o meu grande e verdadeiro amor em minha, onde o significado da palavra grande se torna pequeno, agradeço a compreensão, o carinho, a força, as palavras de incentivo e o amor durante toda essa jornada. Muitas vezes estive ausente, mas meu coração sempre foi teu. Este título também é teu.

Aos meus pais e meu irmão, que durante todo este período compreenderam minha ausência em Natais e aniversários. Vocês são à base da minha vida.

Aos meus outros pais, Lucildo e Lurdes Drebes, e irmãos, Mauricio e Magali, pela amizade, incentivo, conselhos e por acreditarem em toda a minha capacidade.

Ao Amigo Sr. Éder Pereira pela amizade, pela compreensão da minha ausência nos treinos dos últimos meses e pelas dores em todos os músculos depois de treinos exaustivos para espalhar enquanto escrevia a tese. A cada aula novos músculos eram descobertos.

Aos amigos Sr. Navarro pela parceria nas viagens a Camboriú e Montevideú, e pela compreensão de minha ausência nas atividades do Taekwondo.

Aos colegas de Taekwondo, Sr. Mauricio, Srta. Thais, Srta. Tatiana, Sr. Kabzas (Major), Sr. Gustavo Bolzan, Sr. Favorino, Sr. Kauã pela amizade e companheirismo em treinos, viagens e campeonatos.

Aos amigos Ademir e Valéria do PPGQ pelas respostas as minhas perguntas, auxílios burocráticos, pelas músicas compartilhadas e, o mais importante, pelo tempo compartilhado.

A todos os professores da área de Química Analítica que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho e para ampliar meu conhecimento.

Aos colegas do LARP pela ajuda e pelos momentos de descontração durante a realização deste trabalho.

Aos amigos do CEPARC pela ajuda, amizade e pelos mates.

E a todos aqui não citados, que devem ser muitos, porém não esquecidos.

E a Deus, que me iluminou, abrindo minha mente e me mantendo lúcido durante toda a minha vida e por me cercar de pessoas que, por quererem meu bem, sempre estiveram dispostas a me ajudar.

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 Arroz	21
2.1.1 O consumo de água pela orizicultura	25
2.2 O uso de pesticidas na agricultura	26
2.2.1 Impacto ambiental dos pesticidas	28
2.2.2 Os pesticidas no cultivo de arroz	29
2.3 Biorremediação	34
2.3.1 Biorremediação microbiana	34
2.3.2 Fitorremediação	52
2.3.3 <i>Pistia stratiotes</i>	55
2.3.4 Vantagens e desvantagens	58
3 ESTRATÉGIAS	59
4 CAPÍTULO I	61
5 CAPÍTULO II	83
6 CAPÍTULO III	104
7 CAPÍTULO IV - Biodegradação dos resíduos contendo herbicidas gerados durante a execução do trabalho de doutorado (Divulgação Restrita)	120
8 DISCUSSÃO GERAL	131
9 CONCLUSÕES	140
10 SUGESTOES PARA TRABALHOS FUTUROS	142
11 APLICAÇÕES	143
12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	145

ÍNDICE DE TABELAS

- TABELA 1** – Herbicidas indicados para a cultura do arroz irrigado (AGROFIT, 2007; ANVISA, 2007; SOSBAI, 2007). 30
- TABELA 2** – Histórico dos tratamentos usados para a determinação da persistência de herbicidas e inseticidas na água de irrigação de lavoura de arroz. Local: Várzea do Departamento de Fitotecnia da UFSM. Santa Maria, RS. (2003-08) 31

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

FIGURA 1 – Participação de cada região brasileira na produção de arroz (IRGA, 2008).	22
FIGURA 2 – Regiões produtoras de arroz do Rio Grande do Sul (adaptado de IRGA, 2008).	23
FIGURA 3 – Participação de cada região produtora de arroz do Rio Grande do Sul na safra estadual de 2007/08 (IRGA, 2008).	23
FIGURA 4 – Custo relativo de cada operação na produção de um hectare de arroz no método convencional (EMBRAPA, 2008).	24
FIGURA 5 – Percentagem do consumo de pesticidas em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004 (SINDAG, 2004)	27
FIGURA 6 – Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (adaptado de Fuge e Werner, 1997).	40
FIGURA 7 – Rota de degradação microbiana do clomazona (adaptado de LIU <i>et al.</i> , 1996).	42
FIGURA 8 – Rota de degradação microbiana do 2,4-D (adaptado de SINGH <i>et al.</i> , 1999; LIPTHAY <i>et al.</i> , 2003).	43
FIGURA 9 – Possível rota de degradação de propanil e do 3,4-DCA em bactérias e fungos (adaptado de GIACOMAZZI E COCHET, 2004).	44
FIGURA 10 – Possível rota de degradação de bentazona em bactérias e fungos (modificado de WAGNER <i>et al.</i> , 2004).	45
FIGURA 11 – Possível rota de degradação de quincloraque em bactérias e fungos (modificado de LI <i>et al.</i> , 2008).	46
FIGURA 12 – Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou Ciclo de KREBS (PELCZAR <i>et al.</i> , 1996)	47
FIGURA 13 – Ilustração (A) e fotografia (B) das raízes e folhas de <i>P. stratiotes</i> .	56
FIGURA 14 – Infestação por <i>Pistia stratiotes</i> .	57

LISTA DE ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, herbicida
3,4-DCA	3,4-dicloro-anilina, principal metabólito do herbicida propanil
AGROFIT	Sistema de agrotóxicos Fitossanitários
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
GSH-Px	Glutathione Peroxidase
ha	Hectare
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IRGA	Instituto Rio Grandense do Arroz
SINDAG	Sindicato Nacional das Indústrias de Defensivos Agrícolas
SOD	Superóxido dismutase
SOSBAI	Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado
IDA	Ingestão Diária Aceitável
RSD	Desvio Padrão Relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i>
CoASH	Coenzima A
UV	Ultravioleta
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
pH	Potencial Hidrogênionico
TCA	Ciclo do Ácido Tricarboxílico ou ciclo de KREBS
RPM	Rotações por minuto
mg L ⁻¹	Micrograma por Litro
nm	Nanômetro
AIBA	2-amino-N-isopropil benzamida
TNT	Trinitrotolueno
LB	Luria Bertani
CFU	Unidade Formadora de Colônia, do inglês <i>Colony Formation Unit</i>
K _{oc}	Coefficiente de adsorção à matéria orgânica do solo, do inglês <i>soil organic carbon-water partitioning coefficient</i> .
pKa	Constante de ionização ácida
Pa	Pascal

RESUMO
TESE DE DOUTORADO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM
BIORREMEDIAÇÃO DE HERBICIDAS EM ÁGUA DO CULTIVO DE ARROZ
IRRIGADO VISANDO MINIMIZAR O IMPACTO AMBIENTAL

Autor: Rafael Roehrs

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, 22 de dezembro de 2008

A produção de arroz irrigado depende, em parte, da aplicação de pesticidas destacando-se os herbicidas que podem ser transportados para fontes de água gerando poluição e riscos ao meio ambiente e ao ser humano. O melhoramento genético, otimização das práticas de cultivo e o uso de pesticidas no controle das pragas são alternativas para o aumento da produtividade. O uso intensivo de pesticidas gera um impacto ambiental tornando a degradação natural dos pesticidas mais lenta.

Visando desenvolver um processo economicamente viável para biorremediação de águas utilizadas no cultivo de arroz irrigado, isolou-se uma linhagem bacteriana de amostras de solos com histórico de uso de pesticidas, e avaliou-se a influência exercida por diferentes condições na eficiência de degradação. O procedimento consiste em isolar um microrganismo proveniente do solo, utilizando incubação em meio seletivo para os herbicidas alvo. Após isolar e selecionar, através de ensaios de biodegradação, possíveis microrganismos com potencial de degradação, estes foram identificados pela Universidade de La Republica (Montevideo-Uruguai). A fim de acompanhar o potencial de degradação da *linhagem RR02*, foi utilizado um sistema HPLC-UV com fase estacionária Synergi Fusion RP-80, fase móvel acetonitrila:metanol:água (30:24:46, v/v; pH 3,0), vazão 0,8 mL min⁻¹ e detecção em 220 nm. Avaliou-se a influência da fase de crescimento, da temperatura de incubação e das condições de alta e baixa oxigenação do meio durante um período de 30 dias, utilizando meio de cultura mineral com os herbicidas.

Os resultados mostraram a capacidade de degradação pela *linhagem RR02* para todos os herbicidas estudados. Quando avaliou-se cada herbicida separadamente, foi obtida uma diminuição de 50 a 100% na concentração inicial. Entretanto numa mistura de herbicidas, a biodegradação foi bem menor, ou quase nula, considerando as condições sem aeração do meio. A aeração do meio pode melhorar a degradação dos herbicidas quando presentes em misturas. Os resultados pouco satisfatórios de degradação ocorreram com o microrganismo

em fase de crescimento estacionária, com pouca ou nenhuma degradação. Esta linhagem suporta doses de até 10 vezes a concentração aplicada na lavoura de arroz, apresentando uma degradação de 30 a 100% para a dose mais elevada em 28 dias. Quando esta linhagem é comparada com produtos comerciais os resultados obtidos foram semelhantes ou até superiores, pois foi usado um menor número de células da linhagem RR02 do que os fornecidos pelos produtos comerciais. Quando avaliado o efeito sinérgico de dois processos de biorremediação – a biorremediação microbiana e a fitorremediação – os resultados mostraram que a combinação destes produz melhores resultados do que cada um dos processos de remediação isolados.

O uso de microrganismos na biorremediação do meio-ambiente é eficiente e economicamente viável, uma vez que não é necessária a introdução de nenhum tipo de substância química com ação redutora ou oxidante, ou de equipamento que possa encarecer a produção de arroz. O impacto ambiental não pode ser desconsiderado, porém como são utilizados microrganismos provenientes do local de cultivo, o impacto é reduzido.

ABSTRACT

DOCTORATE THESIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA – UFSM

HERBICIDES BIOREMEDIATION IN IRRIGATED RICE FIELDS WATER

AIMING TO LESSEN THE ENVIRONMENTAL IMPACT

Author: Rafael Roehrs

Adviser: Prof. Dr. Renato zanella

Santa Maria, December 22, 2008

Irrigated rice production depends on the pesticides application, among other factors. Herbicides could be highlighted as the most used ones, which may be transported into natural water sources, generating pollution and risk to the environment and to the human beings' health. The genetic improvement along with cultivation techniques optimization and use of pesticides to control plagues are alternatives to increase rice productivity. However, the intensive use of pesticides generates a greater environmental impact, turning the natural pesticides degradation even slower.

In order to develop an economically viable process for irrigated rice fields water bioremediation, a bacterium strain from the soil with history of pesticides use has been isolated, being the influence of different conditions in degradation efficiency evaluated. The process consists in isolating a microorganism from the soil, utilizing selective medium incubation for the target herbicides. After isolating and selecting, through biodegradation assays, the possible microorganism with degradation potential, it was identified by the University de la Republica (Montevideo-Uruguay). Aiming to observe closely the degradation potential of strain RR02, it was utilized an HPLC-UV system with stationary phase Synergi Fusion RP-80, mobile phase acetonitrile:methanol:water (30:24:46, v/v; pH 3.0), flow rate of 0.8 mL min⁻¹ and detection in 220 nm. The influence of the growth phase, the incubation temperature and the conditions of high and low oxygenation of the medium during a 30-day period was assessed utilizing a mineral culture medium with the herbicides.

The results show that the strain RR02 has a good capability to degrade the studied herbicides. Since each herbicide has been separately evaluated, it was possible to notice a decrease between 50 and 100% in the initial concentration. During the herbicides mixture evaluation the biodegradation was lower, or almost null, considering the conditions without aeration of the medium. The medium aeration can improve the herbicides degradation when

they are in a mixture. The least satisfactory degradation results happened during the microorganism stationary growth phase, with little or no degradation at all. This strain supports up to 10 times the doses used in the rice farming, showing a decline from 30 to 100% for the highest dose in 28 days. When this strain is compared to commercial products, the results are similar or even higher, because it used a smaller number of cells of the strain RR02 than those provided by commercial products. The synergistic effect of two processes of bioremediation – the microbial bioremediation and phytoremediation – were assessed and displayed that the combination produces better results than each of the processes of remediation alone.

The use of microorganisms in the environment bioremediation is efficient and economically viable, since it is not necessary the application of any type of chemicals or equipment that could multiply the cost of rice production. The environmental impact should not be ignored; however, the fact that the microorganisms used in the research are actually from the cultivation area considerably minimizes the impact.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente os pesticidas são uma necessidade para o aumento da produtividade e diminuição das perdas geradas por organismos indesejados. A produção de arroz de 1986 até 2004 cresceu aproximadamente 20%, enquanto, no mesmo período, a população teve um crescimento de 30% (IRGA, 2008). Existem várias técnicas para aumentar a produtividade agrícola, dentre elas destacam-se o melhoramento genético dos cultivares, desenvolvimento e otimização das técnicas de cultivo e o uso de pesticidas. No entanto, ao mesmo tempo em que os pesticidas podem aumentar a produtividade dos alimentos, eles podem gerar um gradativo problema ambiental. O uso indiscriminado de pesticidas resulta no excesso destes no meio ambiente, comprometendo assim a qualidade da água, e conseqüentemente a saúde pública, considerando que a grande maioria deles é tóxica (cancerígenos, mutagênicos, teratogênicos e mimetizadores de hormônios) podendo acumular-se no organismo de animais e do ser humano, além de estarem associados a muitas doenças.

Desta forma, é possível compreender o papel importante desempenhado pela biorremediação de solos e de recursos hídricos. A biorremediação, através da biodegradação dos poluentes por microrganismos, diminui o impacto ambiental de poluentes de uma forma consideravelmente mais lenta, porém com um custo muito mais baixo do que outras formas de remediação do meio ambiente. Todo impacto ambiental deve ser considerado, entretanto, como muitos dos organismos (linhagens proficientes em degradação de pesticidas ou outros compostos orgânicos) são nativos do próprio solo cultivado, este risco é bem inferior ao resultante da introdução de outras técnicas de remediação de poluentes.

Existe ainda um aspecto que precisa ser observado durante a utilização de microrganismos na biodegradação. Pode ocorrer o aparecimento do fenômeno denotado de “biodegradação acelerada” que, apesar de ser facilmente contornado, impediria o pesticida de atuar e cumprir o seu papel na proteção contra os organismos indesejados. A solução é bastante simples: realizar a rotação de cultura e/ou de pesticidas aplicados na área a ser cultivada.

Considerando o caráter imprescindível da água para a vida na terra, a importância do uso de pesticidas para atender a crescente demanda mundial por alimentos e a conseqüente possibilidade destes contaminarem o meio ambiente e o homem, os objetivos deste trabalho foram: (I) isolar microrganismos de amostras de solo com histórico de aplicação de pesticidas que apresentem capacidade de degradar herbicidas usados no cultivo de arroz irrigado; (II)

avaliar o potencial de degradação e a sua velocidade em diversas condições de crescimento e (III) desenvolver um método economicamente viável e de baixo impacto ambiental para ser aplicado em campos de cultivo ou em efluentes de indústrias de agrotóxicos, a fim de diminuir o impacto gerado pelos pesticidas no solo e nas águas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Arroz

O arroz (*Oryza sativa* L.) é uma planta da família das Poáceas que alimenta mais da metade da população humana no mundo (EMBRAPA, 2008). O arroz é um dos mais importantes grãos em termos de valor econômico. É alimento básico de 2,4 bilhões de pessoas e, segundo estimativas, até 2050, haverá uma demanda para atender o dobro desta população (BARBOSA, 2004). No Brasil, em 2004, o consumo de arroz era de aproximadamente 73 kg/habitante/ano, sendo a região nordeste a com menor consumo – apenas 49 kg/habitante/ano, e o sudeste responsável pelo maior consumo de arroz do Brasil, com 90 kg/habitante/ano (IRGA, 2008).

O arroz é terceiro maior cereal mais cultivado no mundo, sendo ultrapassado apenas pelo milho e o trigo. O Brasil está entre os dez principais produtores mundiais de arroz, com cerca de 11 milhões de toneladas para um consumo de 11,7 milhões de toneladas base casca em 2004. Esta produção é oriunda de dois sistemas de cultivo irrigado e de sequeiro (EMBRAPA, 2008). A região Sul é responsável por 60% da produção, o que equivale a sete milhões de toneladas, a segunda maior região produtora de arroz constitui o centro-oeste, com uma participação de 17%, ou dois milhões de toneladas. Poucas foram as regiões que apresentaram um aumento na produção ao longo do tempo; a região sul, que em 1994 era responsável por 48% da produção anual no Brasil, passou para 60% e a região centro-oeste passou de 14 para 17%. A região sudoeste apresentou a maior diminuição na produção – de 10% para apenas 2,8% da produção brasileira. As demais regiões apresentaram uma diminuição na produção, como pode ser observado na Figura 1 (IRGA, 2008).

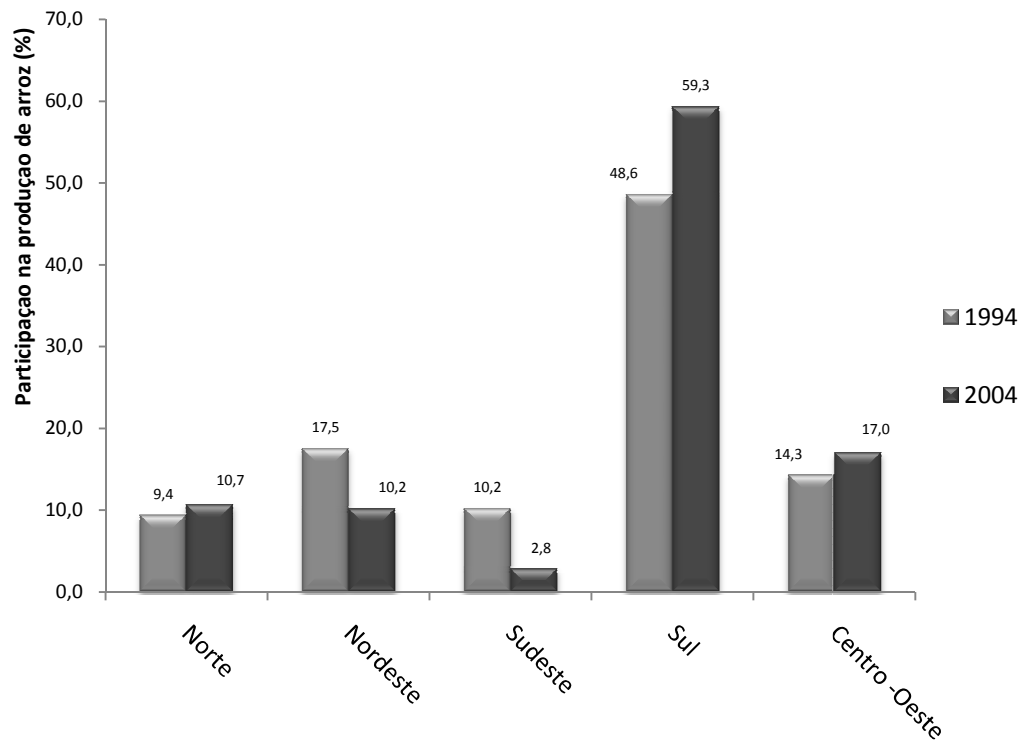


Figura 1 – Participação de cada região brasileira na produção de arroz (IRGA, 2008).

Dentro da região Sul, o estado que mais produz arroz é o Rio Grande do Sul, com uma produção de 1,2 milhões de toneladas nas safras de 2007/08. O Estado está dividido em seis regiões produtoras de arroz (Figura 2), com as regiões da Fronteira Oeste e da Campanha sendo responsáveis por 70% da produção estadual, respectivamente 570 e 215 mil toneladas de arroz na safra de 2007/08 (Figura 3). A região de Santa Maria produziu 20 mil toneladas de arroz das 124 mil toneladas produzidas pela região da Depressão Central (IRGA, 2008).



Figura 2 – Regiões produtoras de arroz do Rio Grande do Sul (adaptado de IRGA, 2008).

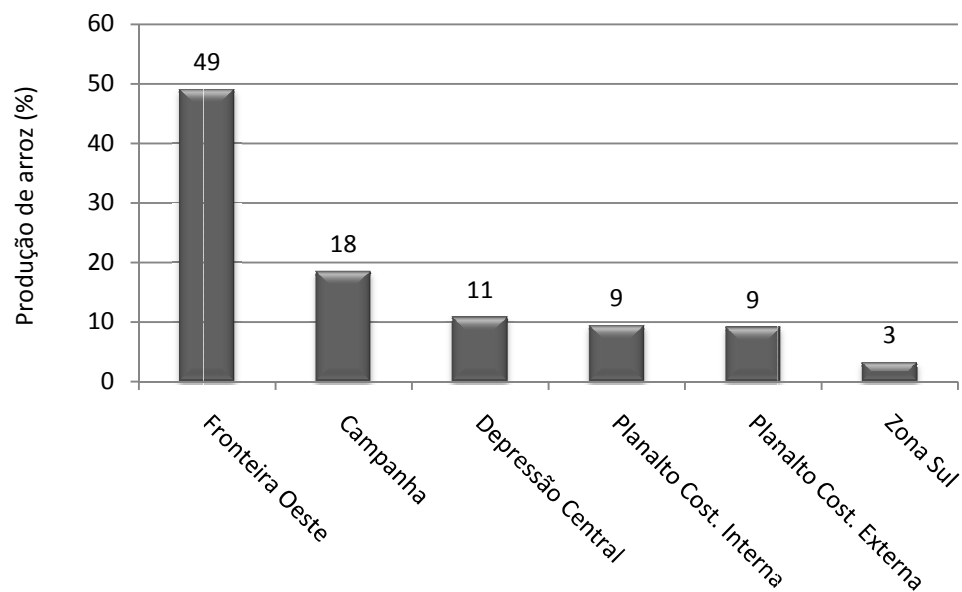


Figura 3 – Participação de cada região produtora de arroz do Rio Grande do Sul na safra estadual de 2007/08 (IRGA, 2008).

Cerca de 150 milhões de hectares de arroz são cultivados anualmente no mundo, produzindo 590 milhões de toneladas, sendo que mais de 75% desta produção é oriunda do sistema de cultivo irrigado (EMBRAPA, 2008).

O cultivo do arroz irrigado, por submersão do solo, necessita em torno de 2.000 L (2 m³) de água para produzir 1 kg de grãos com casca, estando entre as culturas mais exigentes em termos de recursos hídricos. Apesar desta alta exigência, a manutenção de uma lâmina de água sobre a superfície do solo traz uma série de vantagens para as plantas de arroz (EMBRAPA, 2008). A água necessária para a cultura do arroz irrigado deve ser captada das fontes (rios, lagos, barragens) de suprimento e conduzida até as fontes consumidoras (lavouras). Estes procedimentos assumem um papel importante, tanto para a garantia da produtividade, por meio de um correto manejo da água, quanto para a composição dos custos de produção (IRGA, 2007)

Conforme os dados da safra de 2002 para a produção de 6.000 kg de arroz por hectare o custo total estava em R\$ 1.700,00 para o cultivo de arroz irrigado convencional, com um custo benefício de R\$ 1,21 para cada R\$ 1,00 investido. O gasto com a irrigação e com o controle de plantas daninhas, pragas e doenças chega a 29% do custo de produção de um hectare (Figura 4), ou seja, R\$ 480. Os dados da safra de 2007 mostram que o custo com a irrigação e o controle de pragas foi de R\$ 440,00 por hectare, muito próximo ao gasto em 2002.

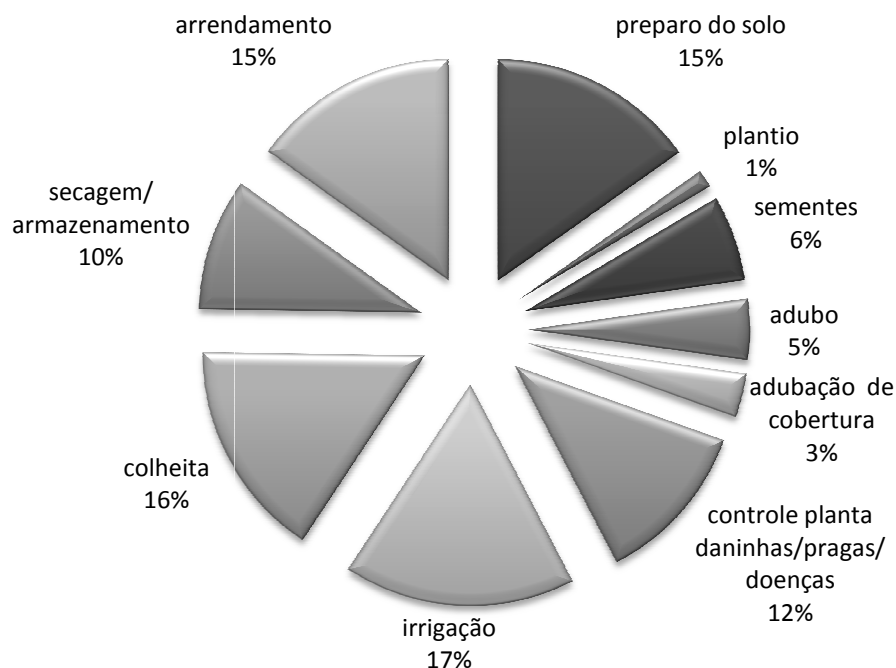


Figura 4 – Custo relativo de cada operação na produção de um hectare de arroz no método convencional (EMBRAPA, 2008).

O manejo de água na cultura do arroz irrigado compreende um conjunto de procedimentos, todos considerados importantes, seja do ponto de vista econômico, ou do crescimento e desenvolvimento das plantas. A captação e distribuição, a necessidade de água para irrigação, o período de submersão do solo, a altura da lâmina de água e a drenagem do solo, são aspectos importantes a serem considerados (EMBRAPA, 2008).

O cultivo de arroz pode ser realizado no sistema irrigado, cujas lavouras concentram-se em sua grande maioria no Sul do País, ou no sistema de terras altas (ou de sequeiro), que é mais utilizado no cerrado brasileiro. O cultivo de arroz irrigado pode ser realizado em quatro diferentes sistemas, os quais se diferenciam, basicamente, quanto à forma de preparo do solo, aos métodos de semeadura e ao manejo inicial da água e dividem-se em: sistema convencional, cultivo mínimo, plantio direto, pré-germinado, mix de pré-germinado e transplante de mudas. Atualmente, no RS predomina o sistema de cultivo mínimo (61,1% da área), seguido dos sistemas convencional (21,9%), pré-germinado + mix (11,3%) e plantio direto (5,7%) (OLIVEIRA, 2006). Já em Santa Catarina (SC), o sistema pré-germinado é a única forma de cultivo de arroz irrigado utilizado (SOSBAI, 2003). O sistema pré-germinado apresenta algumas vantagens em relação aos outros sistemas, dentre as quais se destacam: menor dependência das condições meteorológicas para implantação das lavouras e, em consequência, maior controle de espécies de plantas daninhas da família das poáceas (gramíneas), especialmente o arroz vermelho; e melhor aproveitamento da água das precipitações pluviais nas operações de preparo de solo e formação da lâmina de água, resultando em menor dependência de água dos mananciais durante o ciclo de desenvolvimento da planta (MACEDO *et al.*, 2007).

2.1.1 O consumo de água pela orizicultura

A irrigação da lavoura de arroz está intimamente relacionada ao sistema de cultivo adotado. O Rio Grande do Sul caracteriza-se pelo cultivo de grandes áreas de arroz, onde predomina amplamente o sistema de cultivo com taipas em nível. O irrigante coloca a água no ponto mais alto e a conduz por gravidade, mantendo uma lâmina de água através de taipas construídas com diferença de nível de 5 a 10 cm. O Estado de Santa Catarina caracteriza-se por pequenas áreas de cultivo, onde predomina amplamente o sistema de cultivo de quadros em nível. Este sistema tem se mostrado mais eficaz no manejo da água, tendo em vista a boa

distribuição da água e um maior planejamento no sistema de irrigação e drenagem (SOSBAI, 2007; EMBRAPA, 2008).

A quantidade de água exigida para o cultivo de arroz é o somatório da água necessária para saturar o solo, formar uma lâmina, compensar a evapotranspiração e repor as perdas por percolação vertical, as perdas laterais e dos canais de irrigação. Esta quantidade depende, principalmente, das condições climáticas, do manejo da cultura, das características físicas do solo, das dimensões e revestimento dos canais, da duração do ciclo da cultivar, da localização da fonte e da profundidade do lençol freático (SOSBAI, 2007; EMBRAPA, 2008).

Para suprir a necessidade de água durante o ciclo para os sistemas de cultivo convencional, cultivo mínimo e plantio direto, recomenda-se a utilização de vazões contínuas de até 1,5 litros por segundo por hectare, num período médio de irrigação de 80 a 100 dias. Solos com textura franco-arenosa ou arenosa e com maior gradiente de declividade necessitam de vazões maiores (SOSBAI, 2007; EMBRAPA, 2008).

No sistema de plantio com sementes pré-germinadas, o período de irrigação é proporcionalmente maior, iniciando-se já no preparo do solo. Apesar disto, normalmente um volume menor de água é utilizado durante o ciclo da cultura. Para o preparo do solo, aplica-se uma lâmina de água de 4 a 5 cm sobre a superfície, mais a lâmina necessária para saturar o solo. A quantidade de água para saturar o solo é em função da profundidade do lençol freático e/ou da camada impermeável, do teor de umidade e do espaço poroso do solo. Normalmente são necessários 1.000 a 2.000 m³ por hectare para esta fase (SOSBAI, 2007; EMBRAPA, 2008).

Outra fase crítica na demanda de água neste sistema ocorre por ocasião da reposição de água após a aplicação do herbicida pós-plantio do arroz. Nesta fase, a reposição deverá ser feita em um ou dois dias, sendo recomendável uma vazão mínima de 2 a 3 L s⁻¹ por hectare, o que sugere um escalonamento na aplicação do herbicida, para evitar falta de água na reposição da lâmina. Para a manutenção da lâmina, vazões em torno de 1 L ha⁻¹ são suficientes, tendo em vista a baixa percolação da água no solo, devido à formação da lama (SOSBAI, 2007; EMBRAPA, 2008).

2.2 O uso de pesticidas na agricultura

Desde o início de seu desenvolvimento, a produção agrícola está diretamente relacionada com a aplicação de substâncias químicas para controlar as pragas, que atacam os

produtos agrícolas, prejudicando as colheitas. O uso de compostos químicos no controle de pragas data do período clássico da Grécia e Roma. O mais antigo registro de uso de pesticidas é atribuído aos sumérios que, em 2500 a.C., utilizavam enxofre para combater insetos (BARBOSA, 2004).

Em 1998, o consumo no Brasil foi de aproximadamente 307 mil toneladas de produtos comerciais, formulados com cerca de 250 ingredientes ativos. No período de 1964 a 1998, a área com culturas agrícolas aumentou 78%, enquanto que o aumento no consumo de pesticidas foi de 700%, no mesmo período (SPADOTO *et al.*, 2004). Desde 1994, as vendas de pesticidas no Brasil vêm crescendo continuamente, ultrapassando os US\$ 2 bilhões, o que corresponde a 6% do mercado mundial (BARBOSA, 2004)

Estas substâncias têm sido mais usadas nas regiões sudeste (38,9% em 1998), sul (31,2%) e centro-oeste (22,8%), sendo que o Rio Grande do Sul utiliza 12% do total (SPADOTO *et al.*, 2004). A cultura de arroz irrigado está em 9º lugar dentre as culturas que mais utilizam pesticidas no Brasil, como mostra a Figura 5. Em nível mundial, as vendas de pesticidas por cultura são aproximadamente: hortaliças 23,6%, arroz 13%, milho 10,6%, soja 11,3%, algodão 9,6%, outros cereais 14,3% e outras culturas 17,6% (BARBOSA, 2004).

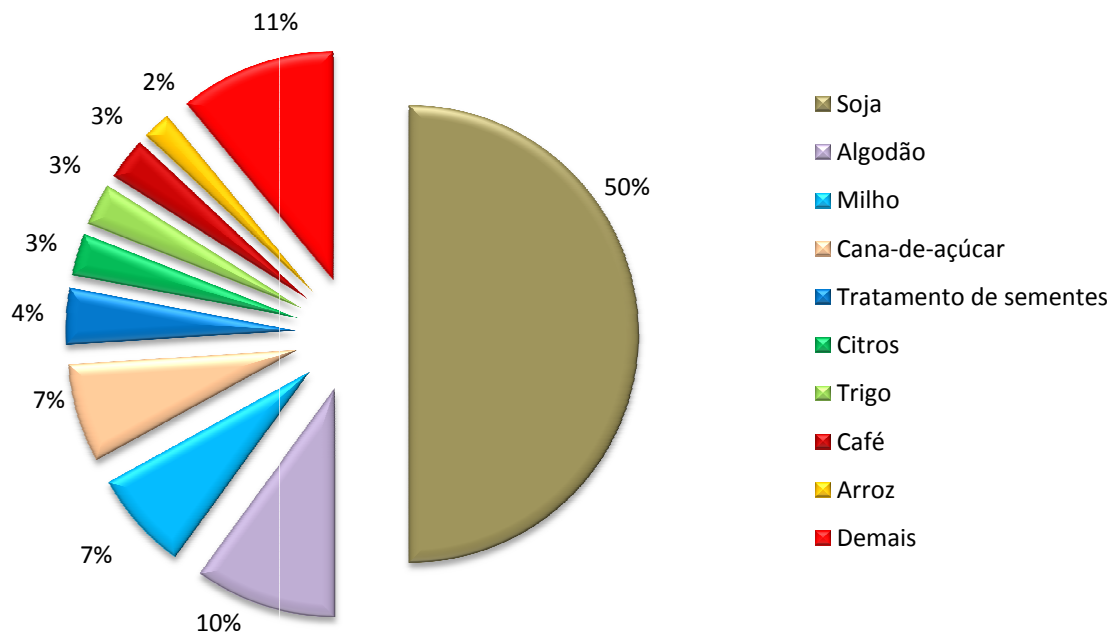


Figura 5 – Percentagem do consumo de pesticidas em algumas culturas agrícolas no Brasil, em 2004 (SINDAG, 2004)

O arroz irrigado, cultura de destaque do sul do Brasil, ocupa uma área de aproximadamente 1,3 milhões de hectares nos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, que fornecem quase 60% da produção nacional (CONAB, 2006). No sistema germinado, geralmente os insumos químicos são aplicados antecedendo a semeadura (adubos), via tratamentos das sementes (inseticidas) ou em pós-emergência (herbicidas, inseticidas e adubos), diretamente na lâmina de água; ou ainda, a lavoura é inundada após a aplicação, especialmente de herbicidas (NAKAGOME et al, 2006). Segundo SOSBAI (2005) são recomendados, no Brasil, para a cultura de arroz irrigado, 23 ingredientes ativos de herbicidas (comercializados isoladamente ou em mistura na forma de 37 produtos comerciais), 14 ingredientes ativos de inseticidas (25 produtos comerciais) e 25 ingredientes ativos de fungicidas (40 produtos comerciais).

2.2.1 Impacto ambiental dos pesticidas

Os efeitos ocasionados por um pesticida no meio ambiente dependem intrinsecamente da sua ecotoxicidade para organismos terrestres e aquáticos. Além disso, dependem diretamente das concentrações atingidas nos diferentes compartimentos ambientais (solo, água, planta e atmosfera) que, por sua vez, dependem do modo e das condições de aplicação, das propriedades físico-químicas, da quantidade ou dose usada, das condições ambientais e do comportamento e destino do pesticida no meio ambiente (SPADOTTO *et al.*, 2004; ROCHA *et al.*, 2004).

Os pesticidas podem alcançar os corpos de água diretamente, em aplicações para controle de plantas aquáticas e mosquitos; ou indiretamente, por meio da drenagem de terras agrícolas, permeação através do solo, em resíduos de produção de pesticidas e resíduos municipais (fungicidas e bactericidas) (BIZIUK *et al.*, 1996). Como estes compostos são aplicados no campo mediante pulverizadores, bombas e aviões, na forma de *spray*, a influência dos ventos não pode ser evitada, e eles são então dispersos no ambiente, podendo também atingir as águas superficiais.

O aumento de eficácia dos compostos é de grande importância, pois a quantidade de produtos químicos lançados no meio ambiente pode ser reduzida. O que não significa, necessariamente, que o impacto ambiental seja menor, pois se deve levar em conta também a ecotoxicidade destes compostos e o seu impacto em organismos não-alvo.

No entanto, o uso indiscriminado dos pesticidas tem feito com que sejam detectados resíduos destes no meio ambiente, em todos os compartimentos ambientais (ar, água e solo) e em todas as regiões geográficas, incluindo aquelas mais distantes de sua liberação original, como oceanos, desertos e zonas polares (BAIRD, 2002). Estima-se que aproximadamente 700 mil toneladas de pesticidas sejam lançadas, anualmente, no meio ambiente (BARBOSA, 2004).

Depois da aplicação de um pesticida, vários processos físicos, químicos, físico-químicos e biológicos determinam seu comportamento. O destino dos pesticidas no meio ambiente é governado por processos de retenção (sorção, absorção), de transformação (degradação química e biológica) e de transporte (deriva, volatilização, lixiviação e carreamento superficial), e por interações destes processos. Além da variedade de processos envolvidos na determinação do destino ambiental dos pesticidas, diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, podem afetar estes processos (SPADOTTO *et al.*, 2004).

2.2.2 Os pesticidas no cultivo de arroz

Atualmente existe no mercado um grande número de compostos para controle de plantas daninhas, insetos, fungos e outros organismos que prejudicam a produção das lavouras de arroz. Existe uma demanda crescente de novos produtos, com baixo impacto ambiental, capazes de controlar esses organismos, que cada vez são mais resistentes. Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas (I = rótulo vermelho, II = rótulo amarelo, III = rótulo azul e IV = rótulo verde). A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos; a II, os medianamente tóxicos, a III, os poucos tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos para os seres humanos (SANCHES *et al.*, 2003).

Na Tabela 1, estão relacionados os herbicidas indicados para a agricultura do arroz irrigado, registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), levando-se em consideração os produtos disponíveis no mercado e a suscetibilidade das diferentes espécies daninhas aos diversos ingredientes ativos.

Alguns herbicidas mais indicados e empregados na cultura de arroz no Estado do Rio Grande do Sul são demonstrados na Tabela 2, sendo bentazona, clomazona, quincloraque,

propanil e 2,4-D os mais empregados na cultura de arroz irrigado na Região Central do Estado, segundo informações do departamento de Fitotecnia da UFSM e do Instituto Rio Grandense do Arroz (IRGA, 2007).

Tabela 1 – Herbicidas indicados para a cultura do arroz irrigado (AGROFIT, 2007; ANVISA, 2007; SOSBAI, 2007).

Nome Comum	Grupo Químico	IDA (mg kg ⁻¹ pc)	Classe Toxicológica
2,4-D	Ácido ariloxialcanóico	1	I
Azinsulfuron	Sulfoniluréia	0,1	III
Bentazona	Benzotiadiazinona	0,1	III
Bispiribaque-sódico	Ácido pirimidiniloxibenzóico	0,01	III
Carfentrazona-etflica	Triazolona	0,03	IV
Cialofope-butílico	Ácido ariloxifenoxipropiônico	0,003	III
Ciclossulfamurom	Sulfoniluréia	0,03	III
Clomazona	Isoxazolidinona	0,04	III
Dibrometo de diquate	Bipiridilo	0,002	II
Dicloreto de paraquate	Bipiridilo	0,004	I
Etoxissulfuron	Sulfoniluréia	0,04	III
Glifosato	Glicina substituída	0,042	IV
Imazapique	Imidazolinona	0,5	II
Imazetapir	Imidazolinona	0,25	III
Metsulfuron-metílico	Sulfoniluréia	0,01	III
Molinato	Tiocarbamato	0,02	II
Oxadiazona	Oxadiazolona	0,005	III
Oxifluorfem	Éter difenílico	0,003	III
Pendimetalina	Dinitroanilina	0,1	III
Penoxulam	Sulfonanilida triazolopirimidina	0,05	III
Picloram	Ácido piridinocarboxílico	0,07	III
Pirazossulfuron-etflico	Sulfoniluréia	0,006	III
Propanil	Anilida	0,005	III
Quincloraque	Ácido quinolinocarboxilico	0,38	III
Sulfosato	Glician substituída	0,03	III
Tiobencarbe	Tiocarbamato	0,01	III
Triclopir-butolítico	Ácido piridiniloxialcanóico	0,05	III
Trifluralina	Dinitroanilina	0,02	III

IDA = Ingestão Diária Aceitável; pc = peso corporal

Tabela 2 – Histórico dos tratamentos usados para a determinação da persistência de herbicidas e inseticidas na água de irrigação de lavoura de arroz. Local: Várzea do Departamento de Fitotecnia da UFSM. Santa Maria, RS. (2003-08)

Herbicidas (Nome comum)	Produto Comercial (PC)	Concentração (g L ⁻¹ ou g kg ⁻¹)	Formulação Comercial	Doses ha ⁻¹		Concentração teórica na água (µg L ⁻¹)
				i.a./e.a. (g)	PC (kg ou L)	
Safra 2003/04						
Bentazona	Basagran 600	600	SL ¹	960	1,6	960
Clomazona	Gamit	500	CE ²	700	1,4	700
Propanil	Propanil Milenia	360	CE	3600	10,0	3600
Quincloraque	Facet PM	500	PM ³	700	1,4	700
2,4-D amina	Aminol 806	670 g e.a.	SL	200	0,298	200
Bispiribaque-sódio	Nominee 400 SC	400	SC ⁴	50	0,125	50
Safra 2004/05						
Bentazona	Basagran 600	600	SL	960	1,6	960
Clomazona	Gamit	500	EC	500	1,0	500
Propanil	Spada WG	600	WG ⁵	3600	6,0	3600
Quincloraque	Facet PM	500	PM	375	0,75	375
2,4-D amina	Aminol 806	670 g e.a.	SL	200	0,298	200
Pirazosulfuron-metil	Sirius 250 SC	250	SC	20	0,080	20
Bispiribaque-sódio	Nominee 400 SC	400	SC	50	0,125	50
Imazetapir	Vezir	100 g e.a.	SL	60	0,60	60
Imazetapir	Vezir	100 g e.a.	SL	120	1,20	120
Fipronil	Klap	200	SC	24	0,120	24
Fipronil	Klap	200	SC	48	0,240	48

Safrá 2005/06						
Bispiribaque-sódio	Nominee 400 SC	400	SC	50	0,125	50
Bispiribaque-sódio	Nominee 400 SC	400	SC	100	0,250	100
Imazetapir	Vezir	100 g e.a.	SA	100	1,00	100
Imazetapir	Vezir	100 g e.a.	SA	200	2,00	200
Pirazosulfuron-metil	Sirius 250 SC	250	SC	20	0,080	20
Pirazosulfuron-metil	Sirius 250 SC	250	SC	40	0,160	40
Imazetapir+ imazapique	Only	100 g e.a.(75 g e.a. + 25 g e.a.)	SL	75+ 25	1,00	75 e 25
Imazetapir+imazapique	Only	100 g e.a.(75 g e.a. + 25 g e.a.)	SL	150+ 50	2,00	150 e 50
M₅ (x) (5 herbicidas)						
Bentazona	Basagran 600	600	SL	960	1,60	960
Clomazona	Gamit CE	500	CE	500	1,0	500
Quincloraque	Facet PM	500	PM	375	0,75	375
Propanil	Stam 480	480	CE	3600	7,5	3600
2,4-D amina	U 46 D-Fluid 2,4-D	720 g e.a.	SL	200	0,278	200
M₅ (2x) (5 herbicidas)						
Bentazona	Basagran 600	600	SA	1920	3,2	1920
Clomazona	Gamit CE	500	CE	1000	2,0	1000
Quincloraque	Facet PM	500	PM	750	1,5	750
Propanil	Stam 480	480	CE	7200	15,0	7200
2,4-D amina	U 46 D-Fluid 2,4-D	720 g e.a.	SL	400	0,556	400

Safra 2006/07						
Imazetapir+ imazapique	Only	100 g e.a.(75 g e.a. + 25 g e.a.)	SL	75+ 25	1,0	75 e 25
Imazetapir	Vezir	100 g e.a.	SL	75	0,75	75
Imazapique	Plateau	700	WG	17,5	0,25	17,5
Clomazona	Gamit	500	CE	500	1,0	500
Quincloraque	Facet PM	375	PM	375	0,75	375
Carbofuran	Diafuran 50	50	GR ⁸	400	8,0	400
Fipronil	Standak	250	SC	37,5	0,15	37,5
Safra 2007/08						
Imazetapir+ imazapique	Only	100 g e.a.(75 g e.a. + 25 g e.a.)	SL	75+ 25	1,0	75 e 25
Bispiribaque-sódio	Nominee 400 SC	400	SC	50	0,125	50
Penoxsulan	Ricer	240	SC	48	0,200	48
Clomazona	Gamit EC	500	CE	600	1,2	600
Quincloraque	Facet PM	375	PM	375	0,75	375
Carbofuran	Diafuran 50	50	G	400	8,0	400
Fipronil	Standak	250	SC	37,5	0,15	37,5

i.a. – ingrediente ativo

e.a. – equivalente ácido

¹SL - Concentrado solúvel

²CE – Concentrado emulsionável

³PM – Pó molhável

⁴SC – Suspensão concentrada

⁵WG – Grânulos dispersíveis

⁶SA – Solução Aquosa

⁷GR – Granulado

PC – Produto Comercial

2.3 Biorremediação

Biorremediação é, por definição, o uso de organismos vivos, basicamente microrganismos, para degradar contaminantes ambientais em produtos menos tóxicos. Biotecnologia ambiental não é um campo novo, e compostagem e águas residuais são exemplos de biotecnologia ambiental (VIDALI, 2001). Devido ao fato da biorremediação parecer uma boa alternativa para as técnicas convencionais de recuperação do meio ambiente, as pesquisas nessa área tem aumentado, principalmente nos Estados Unidos (VIDALI, 2001).

Reciclagem dos elementos, orgânicos ou inorgânicos, é um fenômeno natural em virtude da sua incorporação nos ciclos biológicos e sua liberação através dos ciclos biogeoquímicos. Nas últimas décadas, a extensiva urbanização e a conseqüente industrialização para síntese e aplicação de químicos industriais, além da interferência humana, têm levado a uma mobilização massiva das reservas naturais, resultando em poluição ambiental (KULKARNI e CHAUDHARI, 2007)

2.3.1 Biorremediação microbiana

A técnica de biorremediação consiste no emprego de microrganismos, com ajuda de fatores ambientais, visando à degradação ou transformação de compostos tóxicos em produtos menos tóxicos que não agredirão o meio ambiente. A técnica de biorremediação de solo vem sendo usada há vários séculos em processos de compostagem de resíduos orgânicos, para produzir condicionadores de solo ou adubo. Desde a década de 1940 o processo de biorremediação, como técnica de degradação de contaminantes orgânicos, vem sendo usado na indústria de petróleo para tratar resíduos do processo de refino. O processo de biorremediação pode ser executado *ex situ* (i.e. *landfarming*¹, *biopile*², bio-reatores) ou *in situ*. No processo *ex situ* o material removido (solos escavados, efluentes ou sólidos) é tratado em sistema aberto ou fechado, utilizando microrganismos na degradação do contaminante. Uma das alternativas é a disposição do solo contaminado em células ou em áreas abertas para a dispersão de nutrientes e microrganismos, além da aeração do sistema. Os principais gastos com o sistema são: escavação e remoção do material contaminado, área para disposição do

¹ Solos contaminados são misturados com solos modificados com agentes quelantes, umectantes e nutrientes secundários, e então revolvidos.

² Também denominada de biocélulas ou biopilhas. É um processo que une a compostagem e o *landfarming* para a remediação de áreas contaminadas.

solo contaminado, análises químicas periódicas para avaliação do método, eficiência do método de oxigenação do sistema.

O processo *in situ* tem como objetivo criar um ambiente favorável ao crescimento e desenvolvimento de microrganismos capazes de degradar o contaminante no local. O processo envolve projeto e instalação de sistemas de suprimento de nutrientes, microrganismos (no caso da bioampliação) e oxigênio (para estimular processos aeróbios) ou nitrogênio (para processos anaeróbios) em sub-superfície (MURPHY *et al.*, 1999).

A água doce e do mar, solo e efluentes domésticos possuem grande quantidade e diversidade de comunidades microbianas que demonstram capacidade de degradar moléculas xenobióticas. Embora a capacidade de degradação de um organismo ou consórcio seja necessária, a sua mera existência não é o suficiente. Além disso, as condições devem auxiliar a degradação de modo a aumentar a eficiência do processo. Microrganismos podem ser isolados da maioria das condições ambientais, podendo se adaptar e crescer em temperaturas extremas, condições desérticas ou aquáticas, com oxigênio em excesso ou em condições de anaerobiose, ou na presença de compostos tóxicos (VIDALI, 2001).

Quando o tempo e as condições são favoráveis, mesmo que originalmente não exista nenhuma via metabólica, é possível degradar um composto orgânico sintético ou xenobiótico. Por outro lado, células bacterianas tendem a limitar a quantidade de códigos genéticos às necessidades presentes, mas a capacidade genética de certas bactérias é ampla e essa característica confere uma vantagem seletiva quando ocorrem mudanças nas condições ambientais, ou por conferir melhor velocidade de crescimento pela bactéria portadora, ou por transferir esse código genético às outras bactérias - através de plasmídeos³ (BARATHI e VASUDEVAN, 2001).

Segundo HÖHENER, HUNKELER & HESS (1998) existem, no mínimo, quatro vias diferentes que resultam em uma bactéria capaz de degradar um certo composto ou grupo de compostos em um determinado sítio:

1. A flora microbiana natural ser exposta à molécula xenobiótica por tempo suficiente, de forma a expressar mudanças nos genes capazes de codificarem enzimas para degradação de um composto. Esse tipo de evolução ocorre a todo o

³ Moléculas de DNA de fita dupla, auto-replicativas e menores que os cromossomos. Cromossomos são estruturas filamentosas contendo os genes e presentes no núcleo celular.

momento, mas é relativamente lenta. Como consequência, a comunidade microbiana passa a ter as vias degradativas, mas a degradação pode ser insuficiente devido ao número reduzido de células ou à baixa atividade;

2. A flora microbiana natural, que está adaptada às condições locais, é exposta a moléculas xenobióticas. Com o tempo, as bactérias trocam genes com capacidade degradativa com outras células bacterianas próximas. Assim, a transferência genética pode ser feita por conjugação⁴, transdução⁵ ou transformação⁶. Do ponto de vista da biorremediação, esse tipo de evolução é relativamente lento, mas pode ser melhorado;
3. Como o item 2, a flora microbiana natural pode ser “equipada” com a capacidade degradativa. Uma vez que o contaminante é conhecido, o grupo de genes pode ser introduzido. Se não houver nenhum gene natural, ele pode ser construído. As cepas de laboratório podem ser usadas como doadoras, tanto para transferir a capacidade para as cepas isoladas do sítio contaminado, ou por introdução de doadores no local e deixar a transferência ocorrer;
4. Uma bactéria capaz de degradar o contaminante é isolada do sítio contaminado. Contudo, a cepa precisa ser capaz de competir com a flora natural do sítio a ser remediado.

⁴ Processo de acasalamento caracterizado pela fusão temporária dos parceiros e transferência de genes; ocorre particularmente em organismos unicelulares.

⁵ Transferência de material genético de uma bactéria a outra por intermédio de um vírus.

⁶ Um tipo de transferência de material genético na qual uma célula receptora adquire um fragmento de DNA que está presente em forma livre no meio circundante.

Os microrganismos degradadores de pesticidas são encontrados no mundo microbiano, nos domínios *eubactérias*⁷, *archae*⁸, e *eukaria*⁹, tendo muitos tipos fisiológicos: aeróbio, anaeróbios (fermentativos, metanogênicos, redutores de enxofre), quimiolitotróficos¹⁰, e organismos fotossintéticos. Os resíduos de pesticidas podem ser mineralizados por um simples microrganismo ou por um conjunto de microrganismos. A biodegradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos, e conta com a versatilidade metabólica de bactérias e fungos (SILVA E FAY, 2004).

Muitas bactérias, algumas isoladas de lavouras de arroz, foram selecionadas pelo poder de degradar cloroanilinas, como *Comamonas testosteroni* (BOON *et al.*, 2000), *Pseudomonas acidovorans BN3.1* (BRUNSBACH AND REINEKE, 1993), *Proteus mirabilis* (CORREA E STEEN, 1995), *Aquaspirillum* e *Paracoccus denitrificans 3CA* (SUROVTSEVA *et al.*, 1996). Diferentes espécies de *Enterobacter* têm sido reportadas como detentoras de potencial de degradação de fosfatos, glifosato, tetranitrato de pentaeritriol e trinitrotolueno (SINGH *et al.*, 2004). Fungos e bactérias são citados como hábeis em degradar propanil e 3,4-DCA, a bactéria *Pseudomonas fluorescens* pode hidrolisar propanil a 3,4-DCA (ZABBLLOTOWICZ *et al.*, 2001; MARTINEZ, SILVA & MAYA., 2005). O maior grupo de bactérias responsáveis pela remoção de pesticidas foi isolado de amostras de água de um lago oligotrófico¹¹ e foram identificadas como gram negativas e classificadas como membros do gênero *Pseudomonas* (41%) e *Aeromonas* (31%) (LOPEZ *et al.*, 2005).

As rotas metabólicas de degradação podem variar de microrganismo para microrganismo; abaixo estão algumas rotas metabólicas para os herbicidas clomazona, 2,4-D, propanil, bentazona e quincloraque (Figura 7, 8, 9, 10 e 11). Para facilitar a compreensão da

⁷ Um dos dois principais grupos de bactérias (o outro é a arqueobactéria). As eubactérias possuem características fundamentais que são consideradas típicas da maioria das bactérias.

⁸ Grupo principal de bactérias que inclui as bactérias metanogênicas, halofílicas extremas e termoacidófilas, e que diverge de outros grupos de bactérias nos estágios evolucionários iniciais. Também chamada de archaeobacteria.

⁹ Células que apresentam núcleo verdadeiro delimitado por uma membrana nuclear e que contém os cromossomos, e que dividem por mitose. Células eucarióticas também contêm organelas limitadas por membrana, como mitocôndrias, cloroplastos, lisossomos e os complexos de Golgi. Plantas e animais, protozoários, fungos e algas (exceto algas azul-verde) são eucariontes.

¹⁰ Organismos que utilizam compostos inorgânicos como doadores de elétrons e necessitam de compostos químicos para a obtenção de energia.

¹¹ Condições em que o nível de nutrientes é baixo e o crescimento microbiano pequeno.

rota de degradação da clomazona por microrganismos, os metabolitos foram numerados de 2 a 13 com a clomazona sendo 1 (Figura 7). No trabalho de Liu *et al.* (1996), foram avaliadas as rotas de degradação em diferentes linhagens de *Absidia spp.* (2), *Aspergillus spp.* (6), *Bacillus spp.* (2), *Candida spp.* (2), *Corynebacterium spp.* (1), *Cunninghamella spp.* (4), *Curvularia spp.* (1), *Cylindrocarpon spp.* (1), *Helicostylum spp.* (1), *Mucor spp.* (2), *Mycobacterium spp.* (1), *Nocardia spp.* (3), *Pseudomonas spp.* (4), *Rhizopus spp.* (3), *Rhodococcus spp.* (2), *Sepedonium spp.* (1), *Streptomyces spp.* (4), e *Syncephalastrum spp.* (1). Análises quantitativas de HPLC mostram que os metabolitos 2, 3, 4, 9, e 10 são formados pela maioria dos microrganismos pela degradação do herbicida clomazona. Alguns poucos conseguem metabolizar clomazona e produzir como metabólitos os compostos 5, 8 e 13. E apenas uns cinco microrganismos conseguem produzir os metabólitos 6, 7 e 11 a partir da degradação da clomazona. Reações de transformações microbianas incluem hidroxilação do anel aromático formando os metabólitos 10, 11, 12 e 12a; hidroxilação do grupo benzil para formar o metabólito 8 e com uma subsequente dehidrogenação para formar a amida 9; hidroxilação na posição 5 para formar o metabolito 2, e subsequente dehidrogenação para formar 3; e uma hidroxilação do grupo metil para formar o composto 4. Os metabólitos 3',4'-catecol (12) e 3',6'-hidroquinona (12a), são provenientes de hidroxilações *orto* e *para* no metabólito 10 (LIU *et al.*, 1996). O metabolismo de degradação, suas enzimas e seus subprodutos para os herbicidas 2,4-D (Figura 8) e propanil (Figura 9) estão apresentados abaixo.

Para o herbicida propanil estão representadas duas possíveis rotas de degradação (Figura 9). Para ambas, a enzima chave é a aril acilamidase, que é responsável em transformar propanil em 3,4-DCA (3,4-dicloroanilina) (ENGELHARDT *et al.* 1973; GIACOMAZZI e COCCHET, 2004). Esta enzima não necessita de um íon metálico para sua atividade catalítica. É induzida por propanil e inibida por reagentes sulfidril e íons metálicos e por 3,4-DCA (ENGELHARDT *et al.* 1973). A degradação microbiana do herbicida propanil inicia com a transformação do herbicida em 3,4-DCA através da enzima aril acilamidase. Em metabolismo aeróbio, o 3,4-DCA é convertido em diclorocatecol e em cloroanilinas, estas são convertidas em clorocatecol (GIACOMAZZI e COCCHET, 2004). Estes metabólitos entram na via de degradação de compostos aromáticos (e-escola, 2009).

O herbicida bentazona é degradado principalmente pela hidroxilação do anel fenólico nas posições 6 e 8 para formar 6-OH-bentazona e 8-OH-bentazona (Figura 10). Estes metabólitos são difíceis de identificar porque ambos são metabolizados rapidamente. Dentro de 24 horas, bentazonas hidroxiladas são incorporadas como insolúveis, ligadas a ácidos húmicos e fúlvicos. Outro metabólito frequentemente formado é 2-amino-N-isopropil

benzamida (AIBA). AIBA pode ser hidrolisado a ácido antranílico, o qual é facilmente catabolizado por muitos microrganismos do solo ou usado na síntese de triptofano. Solos com histórico de aplicação de bentazona acima de oito anos exibem uma mineralização de bentazona de 5-6 vezes maior do que solos sem este histórico. Estes dados sugerem que a comunidade microbiana de solos que foram expostas repetidas vezes a bentazona adaptaram-se para mineralizar bentazona (WAGNER *et al.*, 1996, KIM *et al.*, 1998). FORNIER *et al.* (1993), demonstrou que o aumento de doses de 2,4-D aumenta a capacidade dos microrganismos de usar o herbicida como fonte de carbono, desse modo estimulando a rápida degradação de 2,4-D após a segunda aplicação. WAGNER *et al.* (1996) mostram que o metabólito da degradação de bentazona mais abundante encontrado no solo foi o metilbentazona. Este resultado sugere que a N-metilação é uma das etapas de biotransformação de bentazona. Devido ao nível de metilbentazona encontrado no solo aumentar durante o experimento, isso indica que este metabólito persiste mais do que os outros, como AIBA e as bentazonas hidroxiladas. N-metilação ocorre pela transferência de uma metila da S-adenosilmetionina catalisada por N-metiltransferase. Dois metabólitos da bentazona, AIBA e o ácido antranílico, provenientes da hidrólise das ligações N-S da estrutura tiadiazina, como também a 6 e 8-hidroxibentazonas foram encontradas no solo. O ácido antranílico e AIBA podem ser incorporados ao material húmico do solo, através de reações oxidativas. Semelhantemente, as hidroxibentazonas são rapidamente incorporadas à matéria orgânica do solo e desse modo não podendo mais ser extraídas. A presença destes metabólitos sugere que ambas as rotas de degradação de bentazona ocorrem, mas não é possível afirmar qual é a dominante (WAGNER *et al.*, 1996).

A maioria dos microrganismos, como levedura, podem crescer tanto em condições anaeróbias quanto aeróbias e, portanto, são expostas continuamente a Espécies Reativas de Oxigênio (ERRO) gerados como bioprodutos do metabolismo (Costa & Ferreira, 2001). A *S. cerevisiae* pertence ao grupo das leveduras anaeróbias facultativas. Isto significa que fermenta hexoses como a glicose e a frutose, independente da concentração de oxigênio. A glicose é a principal fonte de carbono da *S. cerevisiae*, uma preferência que é mediada por um complexo processo de repressão e ativação de genes e de proteínas, usualmente conhecido como repressão da glicose ou repressão catabólica (De Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Quando a concentração de glicose cai para menos de 0,2% no meio, há a desrepressão das enzimas que participam da biossíntese na mitocôndria e de outros genes necessários para o crescimento respiratório (De Winde *et al.*, 1997; Gancedo, 1998). Esse crescimento apresenta fases distintas do ponto de vista metabólico e cinético (figura 10). Após um breve período de

adaptação em meio rico (YPD – 2% glicose), chamado de fase lag, as células iniciam uma divisão celular a cada hora e meia (fase exponencial), com energia proveniente da fermentação da glicose. Ao diminuir a disponibilidade de glicose no meio, ocorre a desrepressão catabólica (transição diáuxica), na qual há uma parada transiente na divisão celular, enquanto as células são preparadas para o metabolismo respiratório. Após, ela reassume a divisão celular em um ritmo mais lento (uma divisão a cada três ou quatro horas), utilizando o etanol como fonte de carbono produzido durante a fermentação (fase pós-diáuxica). Quando todas as fontes de carbono forem exauridas, as células entram na fase estacionária na qual podem sobreviver por muito tempo na ausência de nutrientes (Pringle & Hartwell, 1982; Fuge & Werner, 1997).

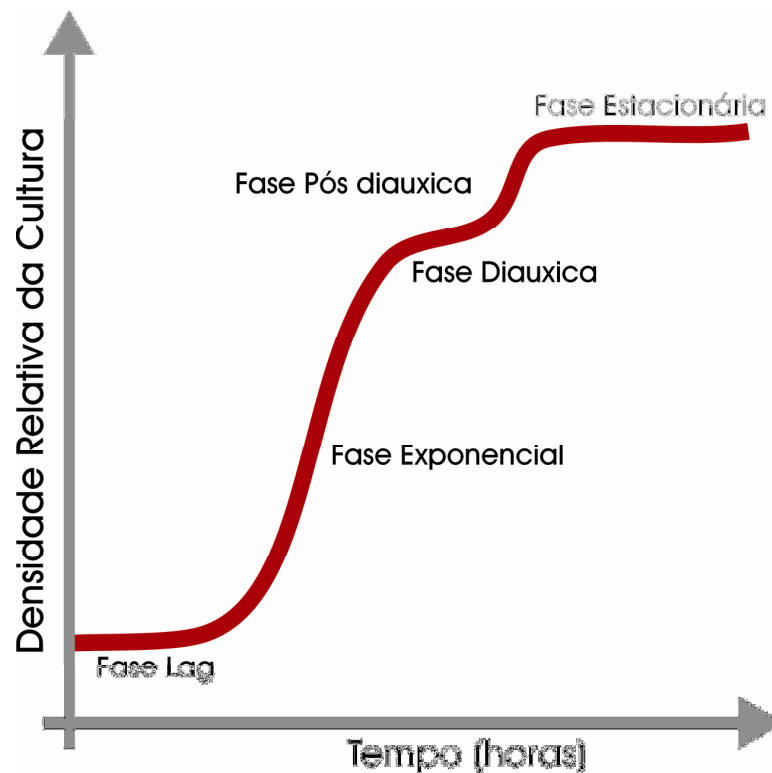


Figura 6 – Fases de crescimento de uma levedura selvagem quando iniciada em meio completo (adaptado de Fuge e Werner, 1997).

Muitos estudos sobre o quincloraque tem avaliado a toxicidade oxidativa induzida por este herbicida e a função das enzimas antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) e catalase na proteção dos microrganismos contra o estresse oxidativo. A linhagem de *Burkholderia cepacia* WZ1 quando exposta a quincloraque expressou algumas proteínas para contra-atacar o estresse e proteger a si mesma de danos. Quincloraque induziu a expressão de uma enzima da família das superóxido dismutases, a Mn-SOD. Da mesma forma, a linhagem

expressou várias proteínas para degradar este herbicida. A biotransformação do quincloraque (Figura 11) inicia com a sua transformação em 3,7-bicloreto de quinolina; e esta foi catalisada por uma dioxigenase, e então modificada para cloroftalato via reação com aminotransferase. Cloroftalato foi transformado em 3-clorocatecol através de ftalato dioxigenase redutase (PDR), ftalato dihidrofiol desidrogenase e 4,5-dihidroxi-ftalato descarboxilase. Finalmente, clorocatecol 1,2-dioxigenase (1,2-CCD) catalisou 3-clorocatecol em 2-cloro-cis-cis-muconato via uma rota *orto*. Após a descloração, os subseqüentes metabólitos foram dirigidos para o ciclo do TCA (LI *et al.*, 2008).

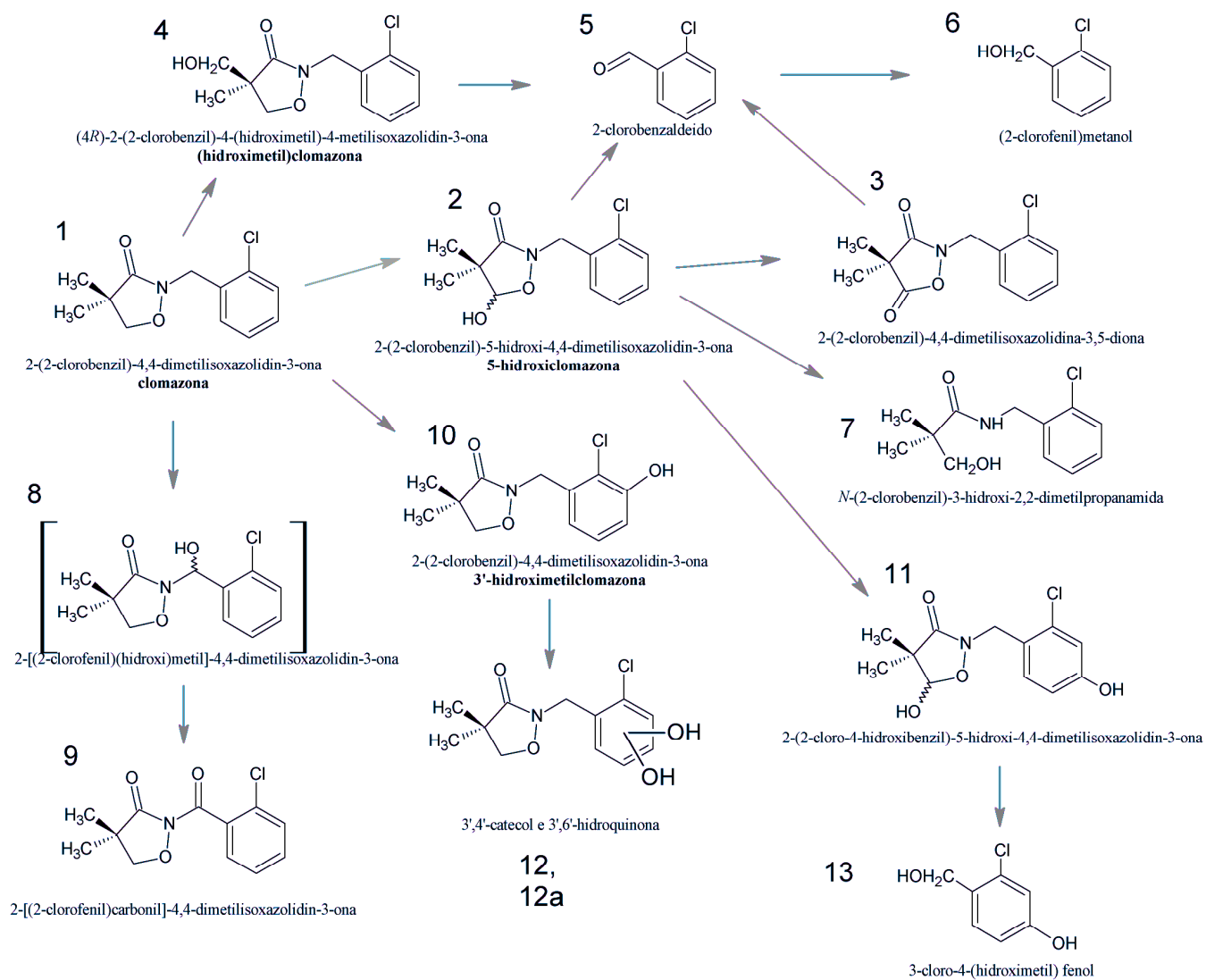


Figura 7 - Rota de degradação microbiana do clomazona (adaptado de LIU *et al.*, 1996).

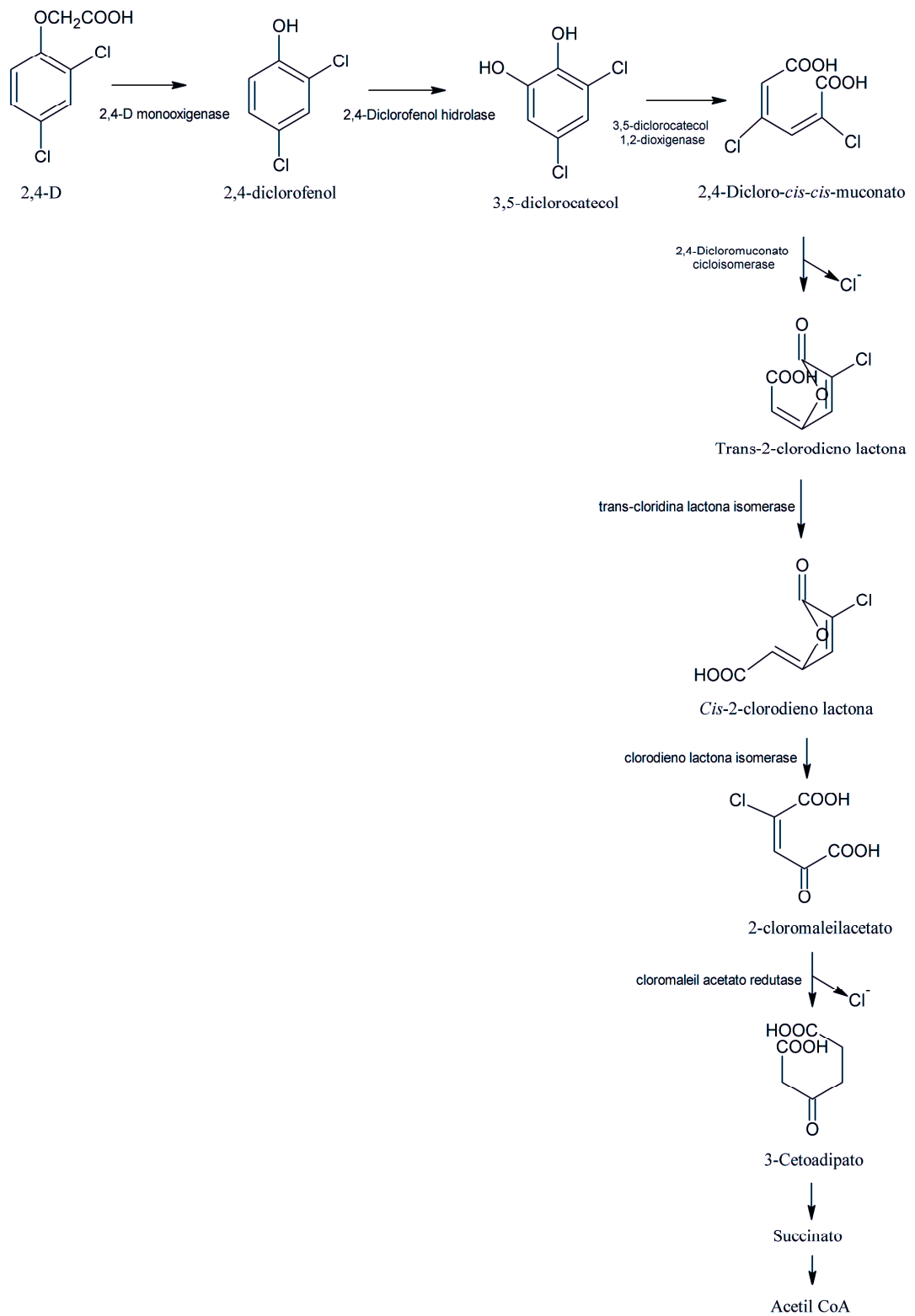


Figura 8 – Rota de degradação microbiana do 2,4-D (adaptado de SINGH *et al*, 1999; LIPTHAY *et al.*, 2003).

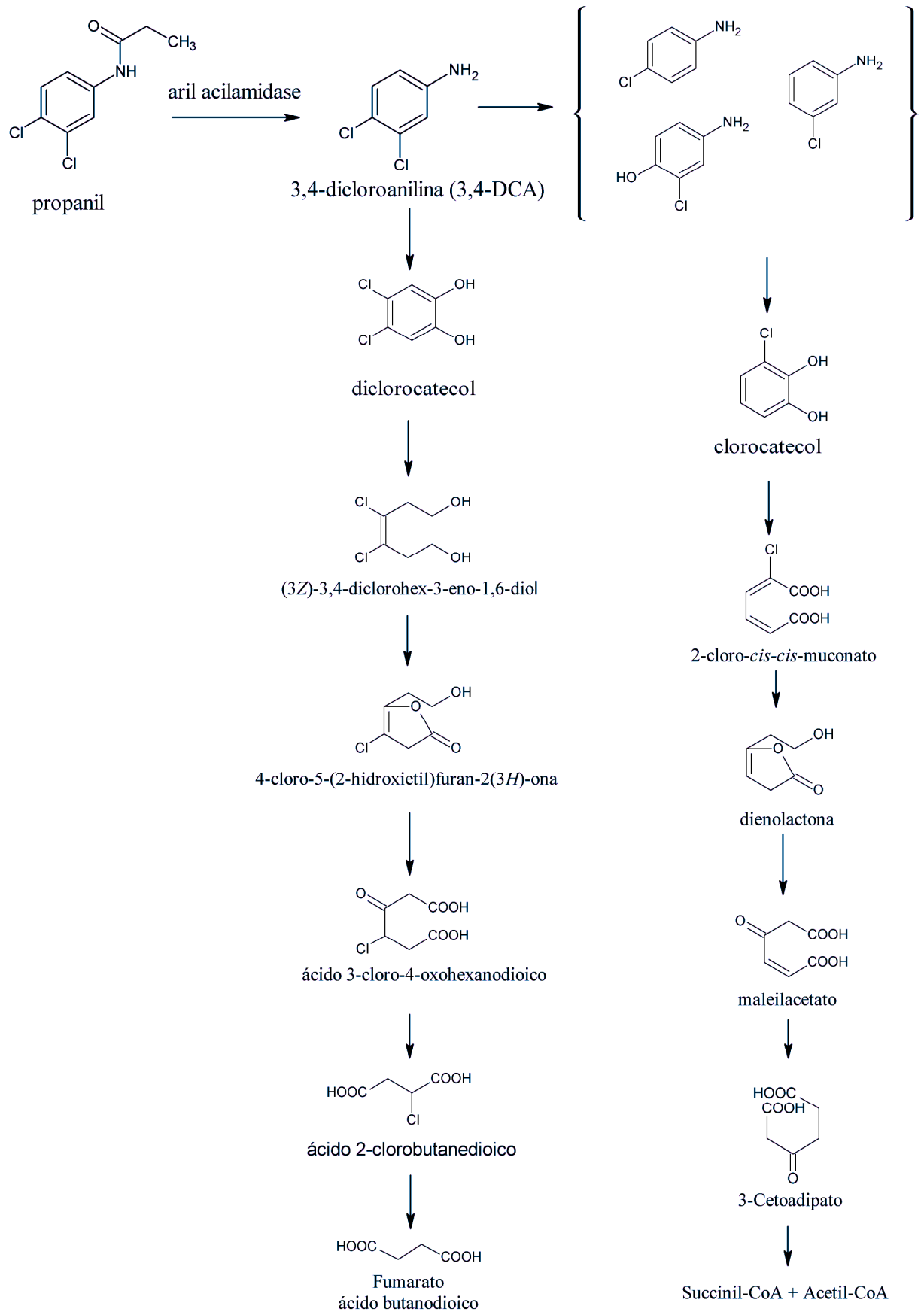


Figura 9 – Possível rota de degradação de propanil e do 3,4-DCA em bactérias e fungos (adaptado de GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

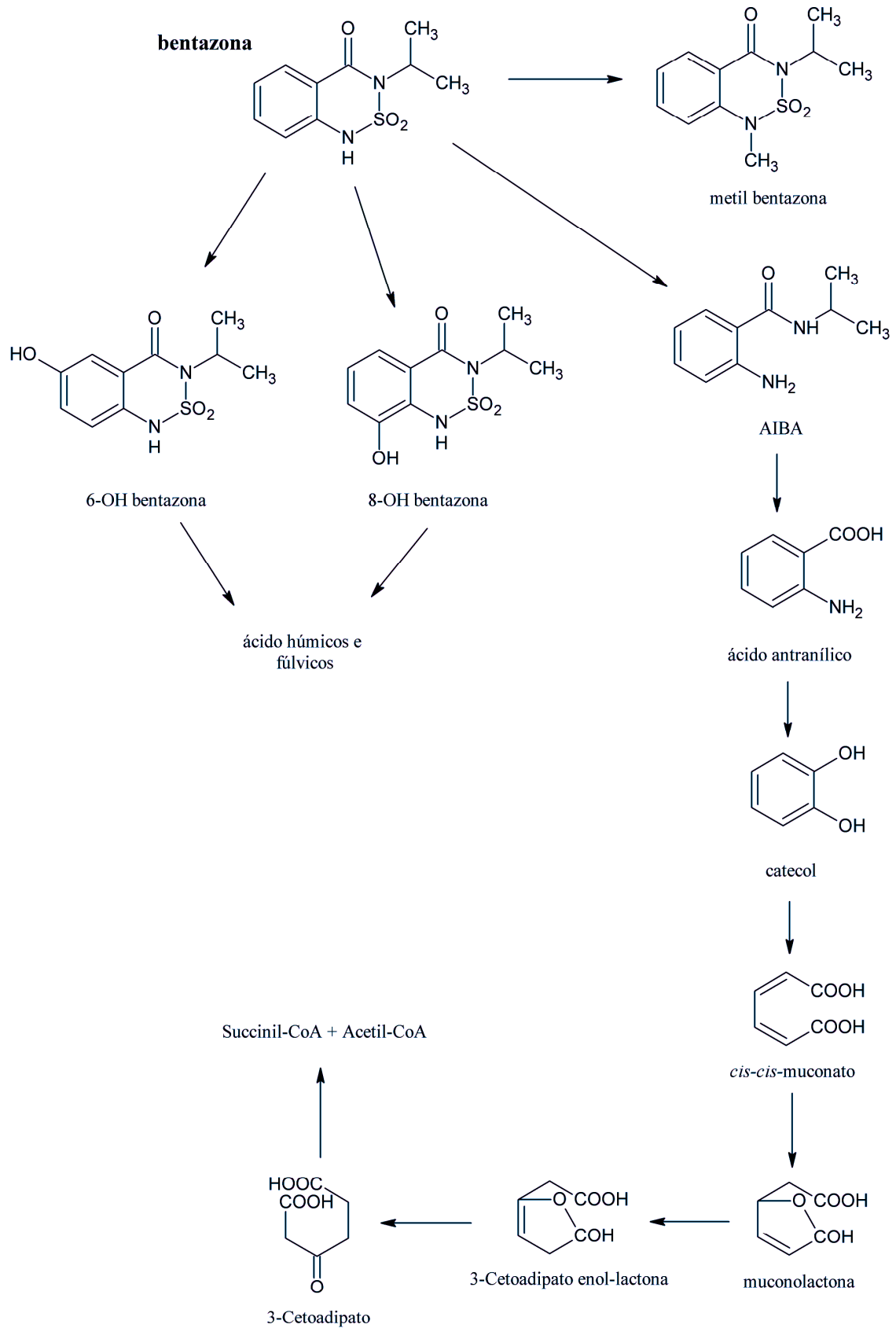


Figura 10 – Possível rota de degradação de bentazona em bactérias e fungos (adaptado de WAGNER *et al.*, 2004).

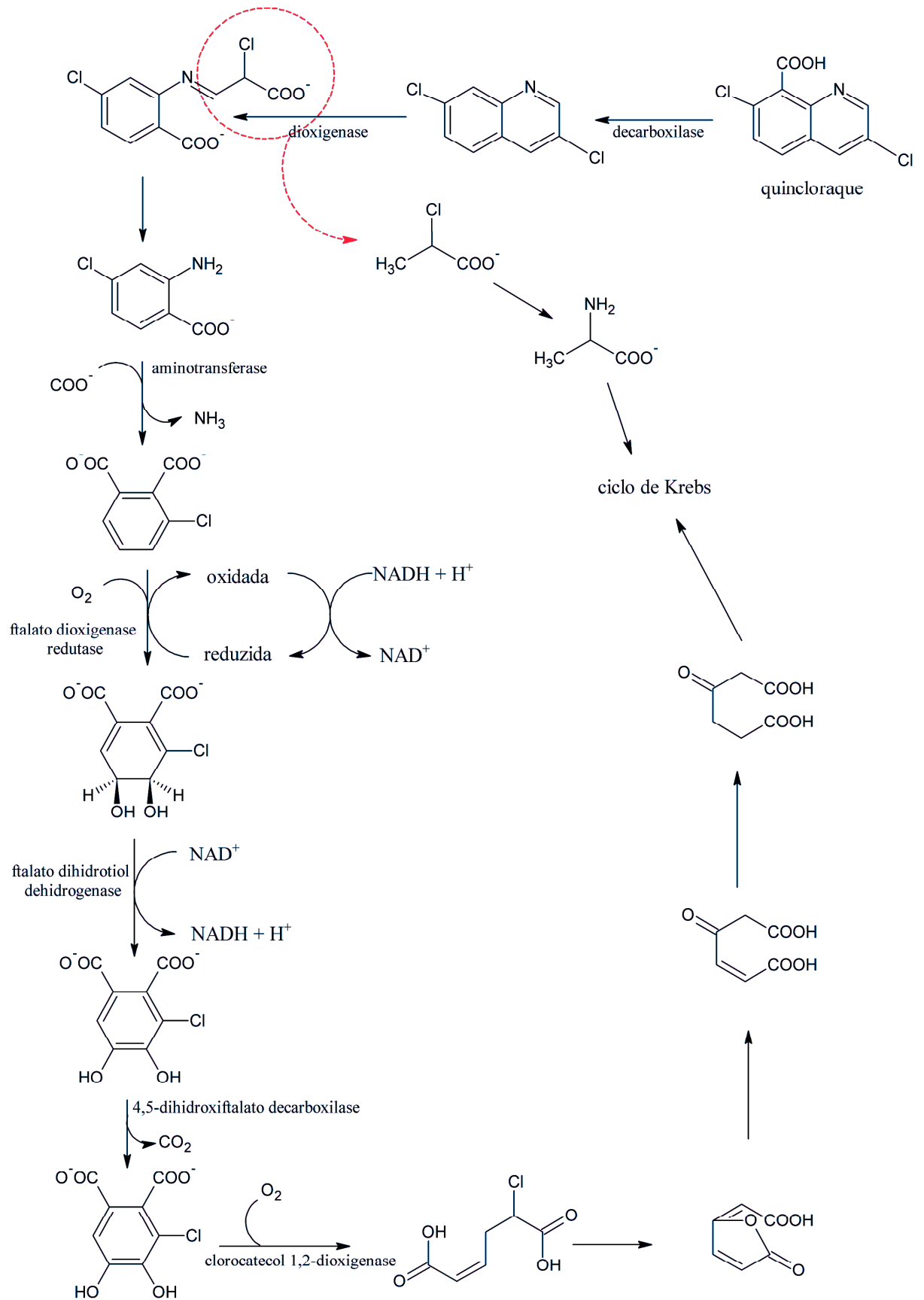


Figura 11 – Possível rota de degradação de quincloraque em bactérias e fungos (modificado de LI *et al.*, 2008).

A via do ácido 3-acetoadipico é a via geral para o metabolismo de compostos aromáticos, tendo como produtos resultantes a acetil-CoA e o ácido succínico, os quais entram facilmente no ciclo do ácido tricarboxílico (TCA¹²) (Figura 12).

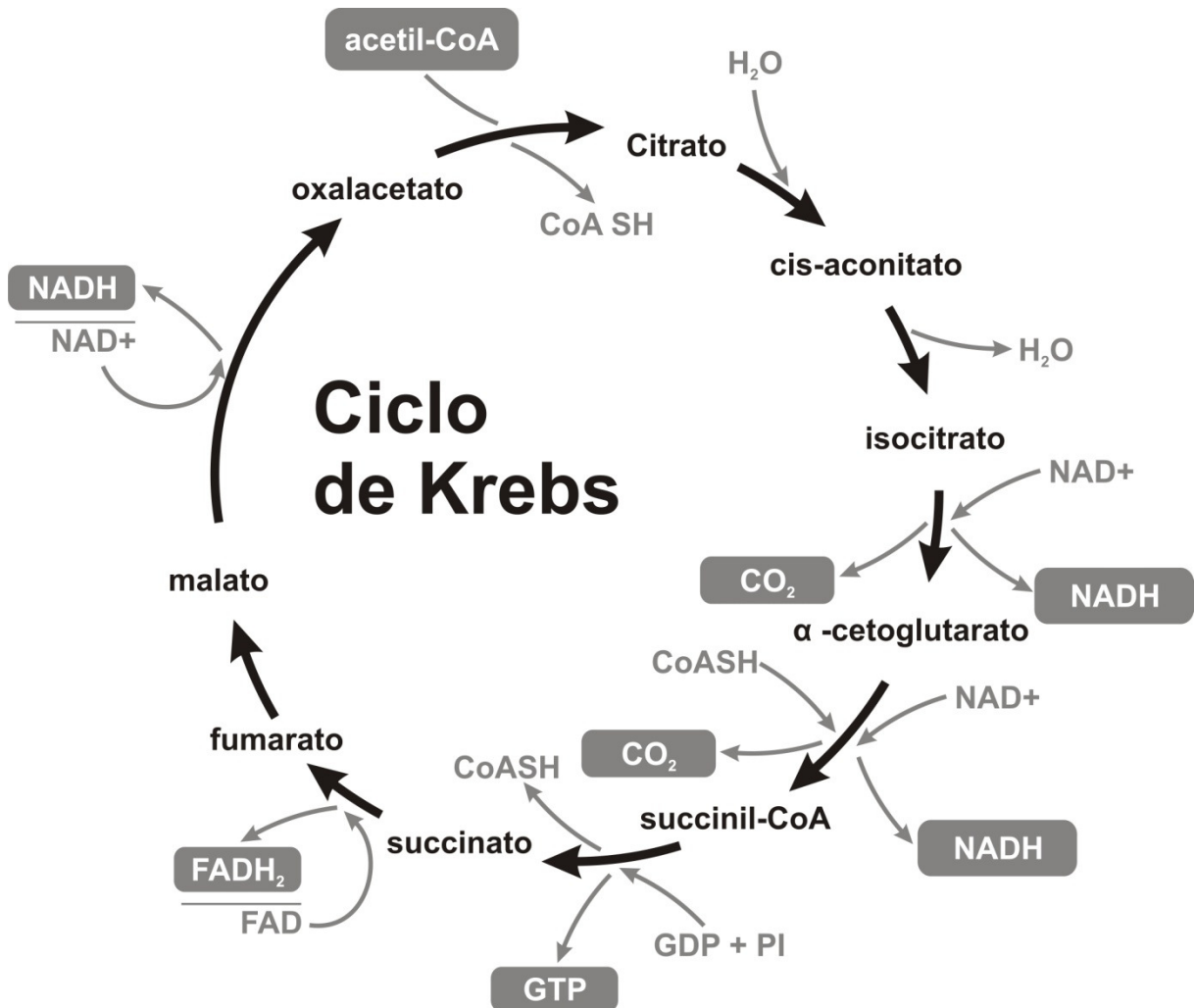


Figura 12 – Ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) ou Ciclo de KREBS (PELCZAR *et al.*, 1996)

Nesse processo o composto é transformado em catecol e ácido protocatecico (SILVA e FAY, 2004). Em geral, as vias metabólicas bacterianas de degradação aeróbica de hidrocarbonetos e compostos aromáticos, como os herbicidas clomazona e propanil, podem ser divididas em três partes. Primeira, o substrato aromático é transformado num metabólito di-hidroxiaromático (tipicamente um catecol). Tal é conseguido através da introdução de grupos hidroxila por mono ou di-oxigenases. A segunda fase consiste na abertura do anel do

¹² Ciclo do ácido tricarboxílico, também conhecido como ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs.

catecol por di-oxigenases. Estas enzimas catalisam a adição de oxigênio molecular ao anel, quebrando uma das ligações carbono-carbono. A quebra do anel pode ocorrer em duas posições distintas: entre os grupos hidroxila (quebra intradiol ou *orto*) ou adjacente a um dos grupos hidroxila (quebra extradiol ou *meta*). As di-oxigenases que fazem a adição intradiol são enzimas cujo cofactor é Fe^{3+} e produzem ácido *cis*, *cis*-mucónico (ou um derivado deste), e as di-oxigenases que fazem a adição extradiol, que são enzimas dependentes de Fe^{2+} , produzem o semialdeído 2-hidroxi-mucónico (ou um derivado). As enzimas catecol 1,2-di-oxigenases e catecol 2,3-di-oxigenases são exemplos típicos de desidrogenases intradiol e extradiol, respectivamente. Na terceira e última fase do catabolismo dos hidrocarbonetos aromáticos, o produto resultante da abertura do anel é convertido em intermediários do metabolismo central (acetil-CoA, oxalato e piruvato, por exemplo) (e-escola, 2009).

No catabolismo aeróbico, as rotas mais periféricas de degradação envolvem reações de oxigenação executadas por monooxigenases e/ou dioxigenases de hidroxilação que geram compostos dihidroxiaromáticos (catecol, protocatecolate, gentisato, hidroquinona e hidroxiquinol). Estes compostos intermediários são os substratos de enzimas de quebra de anel que usam o oxigênio molecular para abrir o anel aromático entre dois grupos hidroxil (clivagem *orto*, catalisada por intradiol dioxigenases) ou próximo de um dos dois grupos hidroxil (clivagem *meta*, catalisada por extradiol dioxigenases) (DIAZ, 2004).

O ideal é que as estratégias de biorremediação sejam estruturadas baseadas no conhecimento dos microrganismos presentes no ambiente poluído, em suas habilidades metabólicas, e como eles respondem às mudanças nas condições ambientais. Para aumentar a eficiência metabólica de um microrganismo com fins para uma aplicação ambiental particular, modificações devem ser feitas em dois diferentes níveis: (1) manipulação de rotas catabólicas específicas, e (2) manipulação de células hospedeiras. Buscando aperfeiçoar a taxa de remoção do poluente e ampliar a faixa de substratos de uma rota catabólica, a manipulação de enzimas chaves para ambas as rotas e mecanismo de regulação que controlam a expressão dos genes catabólicos serão necessários. A combinação racional de rotas catabólicas pode permitir a completa metabolização do xenobiótico, como pode ser mostrado com o desenvolvimento de uma bactéria capaz de mineralizar bifenilas policloradas, e pode prevenir a formação de produtos finais ou metabólitos tóxicos por evitar que o poluente fosse pela rota errada. A combinação em uma única linhagem bacteriana de diferentes habilidades de degradação com traços genéticos que fornecem vantagens seletivas em sítios alvos é uma estratégia promissora para biorremediação *in situ*. Entretanto, nem sempre é possível combinar em um único organismo todos os recursos necessários para resolver um problema ambiental, como no caso

de remoção de misturas complexas em esgotos. Sob essas circunstâncias, uma estratégia conveniente é a produção de um consórcio sintrófico¹³ no qual os membros são especializados em certas etapas biodegradativas ou na degradação de certos poluentes. Interações entre plantas e micróbios é também uma alternativa praticável para a remoção de compostos tóxicos de ambientes poluídos (rizorremediação). Estratégias de biorremediação envolvendo plantas que expressam genes bacterianos para a imobilização de metais pesados ou TNT (trinitrotolueno) são atualmente tecnologias verdes cujo benefício é de grande interesse público e científico (DIAZ, 2004).

Os microrganismos do solo têm uma função importante na atenuação dos efeitos ambientais dos compostos orgânicos, uma vez que podem adaptar-se à presença desses compostos potencialmente tóxicos e sobreviver por meio de sua degradação, ou seja, utilizar essas moléculas como nutrientes e energia. A transformação dos pesticidas por microrganismos, na qual deriva algum benefício nutricional do processo, usando a molécula orgânica como fonte de carbono e energia, ou outro nutriente, é chamado de metabolismo. O metabolismo, freqüentemente resulta na completa mineralização de um agrotóxico, isto é, em sua conversão para dióxido de carbono, água e íons inorgânicos. Esta via metabólica consiste em uma série de reações sequenciais de transformação, cujo propósito é a conversão do pesticida em moléculas que possam ser processadas pelo metabolismo intermediário ou central, servindo então como precursores para a biossíntese dos constituintes celulares (JANKE e FRITSCHÉ, 1985). O critério essencial do processo descrito acima exige que o resultado do metabolismo seja um material passível de entrar no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA). Coletivamente, microrganismos possuem a maior diversidade enzimática encontrada no planeta e metabolizam milhões de compostos orgânicos para capturar energia para crescer. O uso de microrganismos tem aumentado nos sistemas a fim de biodegradar compostos xenobióticos tóxicos – uma aplicação comumente conhecida como biorremediação (ALEXANDER, 1994; LAWRENCE e ELLIS, 1999). Adicionalmente, a estrutura química do composto (tamanho da molécula, presença ou ausência de certos substituintes), a disponibilidade de microrganismos, o tipo de ambiente (aeróbico ou anaeróbico), e os níveis de nutrientes, luz, pH e temperaturas influenciam fortemente na taxa de transformação/assimilação do composto químico. (CORREA e STEEN, 1995; KULKARNI e CHAUDHARI, 2007).

¹³ Fenômeno em que uma espécie vive dos produtos de outra espécie.

A maioria dos microrganismos no solo está localizada na fina camada de água que circunda as partículas do solo, e nesta escala ocorrem rápidas e significantes modificações no potencial redox por causa da respiração microbiana e a limitação na difusão de gases. Essas modificações refletem na distribuição e na atividade das bactérias aeróbias degradadoras de pesticidas, como, por exemplo, em solos muito úmidos, como em cultura de arroz irrigado; a taxa de difusão do oxigênio atmosférico dentro do solo é limitada, e a transformação anaeróbia de pesticidas torna-se importante. Em escala de campo, a degradação dos pesticidas é ótima em temperatura mesofílica¹⁴ e ocorre lentamente (ou não ocorre) em temperaturas mais baixas ou muito altas (TOPP *et al.*, 1997). A taxa de crescimento microbiano também está relacionada, em parte, à concentração e à diversidade do substrato. A concentração é um parâmetro importante na determinação da velocidade da biodegradação. A cinética de degradação de muitos pesticidas aproxima-se da equação de primeira ordem, isto é, a taxa de degradação decresce na proporção da concentração residual do pesticida (SILVA e FAY, 2004).

Diferentes técnicas de biorremediação podem ser empregadas dependendo do grau de saturação e de oxigenação da área. Técnicas *in situ* de remediação são aquelas que aplicadas no solo ou na água produzem o mínimo de impacto. Técnicas *ex situ* são aquelas que para serem aplicadas no solo ou em recursos hídricos necessitam que a área contaminada seja removida por escavação (solo) ou por bombeamento (água). As técnicas de bioampliação envolvem a adição de microrganismos proficientes na degradação de poluentes.

As técnicas de biorremediação *in situ* são as opções mais desejáveis devido ao baixo custo e ao menor impacto ambiental, uma vez que eliminam a escavação e o transporte dos contaminantes. As principais técnicas de biorremediação *in situ* são:

Bioventilação – o tratamento *in situ* mais comum e envolve a suplementação de ar e nutrientes no solo contaminado para estimular a flora endógena. A bioventilação emprega baixos fluxos de ar e fornece somente a quantidade de oxigênio necessária para a biodegradação evitando a volatilização e liberação do contaminante na atmosfera (VIDALI, 2001; SILVA e FAY, 2004).

Biodegradação *in situ* – envolve a suplementação de oxigênio e nutrientes pela circulação de soluções aquosas através do solo para estimular a flora natural a degradar os poluentes orgânicos. Esta técnica pode ser usada em solo e águas subterrâneas. Geralmente

¹⁴ Faixa moderada de temperatura (entre 25 e 40 °C).

esta técnica inclui condições como a infiltração de água contendo os nutrientes e oxigênio ou outro receptor de elétrons para tratamento de águas subterrâneas (VIDALI, 2001).

Biosparging – consiste em injetar ar sob pressão abaixo da água mineral para aumentar a concentração de oxigênio na água subterrânea e aumentar a taxa de degradação biológica da flora nativa (VIDALI, 2001).

Bioampliação – envolve frequentemente a adição de microrganismos endógenos e exógenos na área contaminada. Dois fatores são limitantes no uso da adição de culturas microbianas na área de tratamento: 1) são raras as culturas exógenas que competem suficientemente bem com a população endógena e são capazes de se desenvolver e sustentar eficientemente um nível populacional e 2) a maioria dos solos com um longo tempo de exposição a efluentes biodegradáveis tem microrganismos endógenos que são eficientes em degradar os contaminantes se a área a ser tratada for bem conduzida (VIDALI, 2001; SILVA e FAY, 2004). O sucesso na aplicação da bioampliação é dependente da identificação e isolamento de linhagens microbianas apropriadas, e de sua subsequente sobrevivência e atividade, uma vez inseridas no habitat alvo. Esta técnica envolve linhagens extraídas de amostras de locais poluídos, sendo o crescimento com o contaminante como fonte única de carbono ou nitrogênio, o que resulta na seleção de uma linhagem que expressa a habilidade de degradação requerida.

A introdução de microrganismos não nativos ou de nutrientes para ampliar a flora nativa *in situ* poderia ser considerada impactante. Como a taxa de degradação decresce na proporção da concentração residual do pesticida, também o número de células viáveis decresce. Entretanto os microrganismos apresentam formas de sobrevivência na falta de fonte de carbono, uma delas é o estado de dormência. A limitação de carbono, nitrogênio ou fósforo leva o microrganismo de um estado de reprodução para um estado de sobrevivência. Este estado é muito resistente a agentes estressantes como temperatura, pesticidas, antibióticos e corantes. A concentração de água intracelular diminui e o metabolismo diminui a quase zero permanecendo as células viáveis até o momento em que encontrar condições favoráveis para o crescimento. O estado de dormência tem uma carga de energia baixa e contém baixas concentrações de nucleosídeos trifosfatados, como a Acetil-CoA (ROSZAK e COLWELL, 1987, THOPSON *et al.*, 2005).

As técnicas de biorremediação *ex situ* envolvem a escavação ou remoção do solo contaminado do terreno. Entre as técnicas mais usadas estão:

Landfarming – é uma técnica simples na qual o solo contaminado e escavado é espalhado sobre uma célula de confinamento podendo ser adicionados nutrientes inorgânicos

(N, P, K). O solo é periodicamente revolvido com arado para aumentar a aeração e facilitar o contato dos resíduos com as bactérias, até os poluentes serem totalmente degradados. Devido à possibilidade de lixiviação dos contaminantes, as células de tratamento devem ser construídas de modo a proteger o solo superficial e as águas subterrâneas. (VIDALI, 2001; SILVA e FAY, 2004).

Compostagem – é uma técnica que envolve combinar solo contaminado com material orgânico não tóxico como esterco, fertilizante ou dejetos agrícolas. A presença desta matéria orgânica serve de suporte para o desenvolvimento de uma população microbiana rica e de elevação da temperatura que é característico da compostagem (VIDALI, 2001; SILVA e FAY, 2004).

Biopilhas – ou biocélula é um híbrido de compostagem e *landfarming*. Esta tecnologia envolve o amontoamento dos solos contaminados em pilhas (ou "células") e estímulo da atividade microbiana aeróbica dentro do solo através da aeração e/ou adição de sais minerais, nutrientes, e umidade. A maior atividade microbiana resulta na degradação dos componentes de produtos petrolíferos absorvidos através da respiração microbiana. *Biopiles* são semelhantes aos *landfarms*, ambas são acima do solo, são sistemas que utilizam oxigênio, geralmente a partir de ar, para estimular o crescimento e a reprodução de bactérias aeróbias, que, por sua vez, degradam os contaminantes adsorvidos ao solo. Embora *landfarms* sejam aeradas por aração, *biopiles* são aeradas na maioria das vezes, forçando o ar para dentro das células por injeção através de encanamentos perfurados (VIDALI, 2001; EPA, 2009).

Biorreatores – reatores de lodo ou reatores aquosos são usados para tratamentos *ex situ* de solo e águas contaminados bombeados do local contaminado. Esse material é misturado mecanicamente no reator, recebendo nutrientes e ar ou oxigênio para manter o conteúdo sob condições aeróbias. O solo tratado então é transferido de volta à área original ou a outro local. Esse tipo de biorreator é ideal para tratamento de solos com alto teor de argila, devido à dificuldade de tratamento *in situ* de solos com baixa permeabilidade (VIDALI, 2001; SILVA e FAY, 2004).

2.3.2 Fitorremediação

No mercado americano de remediação, a fitorremediação responde por 0,5% do mercado total e a biorremediação responde por apenas 2%. A fitorremediação ganhou popularidade com agências governamentais e indústrias na última década, e o seu comércio

envolve a descontaminação de 80% de compostos orgânicos e de 20% de inorgânicos, tendendo a se tornar a tecnologia de escolha para projetos de remediação em países em desenvolvimento, devido ao custo e a facilidade de sua implementação (PILON-SMITS, 2007).

Fitorremediação consiste no uso de plantas e seus associados (microbiota) para limpeza de ambientes poluídos. Nessa tecnologia são empregados processos naturais pelos quais as plantas e a flora microbiana, presente na rizosfera¹⁵, degradam e seqüestram poluentes orgânicos e inorgânicos. Em geral, para utilizar plantas como fitorremediadores, elas necessitam de crescimento rápido, elevada produção de biomassa, competitividade, vigor e tolerância à poluição (LAMEGO e VIDAL, 2007). Nos sistemas comerciais *wetlands* utilizados para tratamento de esgoto doméstico e outros tipos de águas residuais, as plantas são cultivadas em tanques e absorvem sólidos suspensos, metais e patógenos, também promovem abrigo para crescimento de microrganismos. Todo tipo de planta pode ser usado para biorremediação desde hortaliças até árvores. Plantas aquáticas funcionam bem para remediação orgânica, devido à presença de níveis elevados de enzimas de degradação orgânica (PILON-SMITS, 2005). Somente compostos orgânicos podem ser fitorremediados por degradação, os elementos inorgânicos não podem ser degradados, mas podem ser estabilizados ou removidos e estocados.

Existem cinco tipos de fitorremediação baseados nos processos fisiológicos das plantas: fitoestabilização, fitovolatização, fitodegradação, fitoestimulação e fitoextração.

A fitoestabilização consiste no uso de plantas com o propósito de estabilizar os poluentes no solo, prevenindo perdas por erosão ou lixiviação. Estudos demonstram que a associação de plantas e microrganismos, como fungos micorrizas, pode ter um efeito significativo na absorção de urânio pelas plantas (LAMEGO e VIDAL, 2007).

A fitovolatização é o processo no qual, após a absorção e incorporação no tecido da planta, os poluentes podem deixá-la na forma volátil. Culturas como arroz, brócolis, couves, e algumas outras plantas são capazes de volatilizar selênio (PILON-SMITS, 2005). Como a volatilização remove completamente o poluente do local na forma de gás, sem a necessidade de realizar a colheita da planta, a fitovolatização mostra-se como tecnologia bem atrativa.

Na fitodegradação, as plantas podem degradar poluentes orgânicos diretamente por suas próprias atividades enzimáticas. Esse tipo de processo é ideal para poluentes orgânicos

¹⁵ Região do solo submetida à influencia das raízes dos vegetais e caracterizada por ser uma zona de intensa atividade microbiana.

que são móveis nas plantas (como herbicidas, trinitrotolueno e tricloroetileno) e envolve a ação de complexos enzimáticos nas plantas, como glutatona e citocromo P-450 monooxigenases. A fitodegradação geralmente está associada a plantas, mas pode ser resultado de microrganismos endofíticos (BARAC *et al.*, 2004; LAMEGO e VIDAL, 2007).

A degradação de poluentes orgânicos por microrganismos na rizosfera, estimulada pelas plantas, compreende o processo de fitoestimulação. Esse processo tem sido útil para a limpeza de ambientes contaminados por compostos orgânicos hidrofóbicos que não podem ser absorvidos pela planta, mas podem ser degradados por microrganismos como bifenilas e outros hidrocarbonetos de petróleo (KAIMI *et al.*, 2006 apud LAMEGO e VIDAL, 2007).

A fitoextração utiliza plantas hiper-acumuladoras que extraem os contaminantes do solo ou da água e acumulam nos seus tecidos. As plantas hiper-acumuladoras são capazes de acumular um ou mais elementos inorgânicos em níveis até cem vezes maiores que outras espécies, crescendo sob as mesmas condições. Para a técnica de fitoextração, fica clara a necessidade de colheita posterior da planta, contendo o poluente acumulado em seus tecidos, podendo o material colhido ser utilizado para propósitos não-alimentares. O processo de fitoextração é muito utilizado para remoção de metais pesados, neste caso quando a maior parte dos metais estiver localizada na parte aérea, a colheita pode ser realizada por métodos convencionais de agricultura. É necessário que a colheita seja feita antes que as folhas caiam, ou a planta morra para evitar que os metais retornem ao solo. Para solos contendo metais como níquel, zinco ou cobre, o valor do metal extraído pode incentivar a fitorremediação. O volume ou o peso de biomassa pode ser reduzido por processos térmicos, químicos ou microbianos. A redução via queima da biomassa pode ser uma alternativa utilizada para gerar energia, onde as cinzas podem ser tratadas como minério, do qual pode ainda ser extraída a contaminação metálica (quando as cinzas forem ricas em apenas um ou dois metais) (GRATÃO *et al.*, 2005). Tem sido demonstrados hiper-acumuladores para As, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Se, e Zn. Estes elementos são tipicamente hiper-acumulados acima de 0,1-1% do peso seco, mesmo quando a concentração externa é baixa (PILON-SMITS, 2005).

O uso de plantas aquáticas na fitorremediação justifica-se pela intensa absorção de nutrientes e pelo seu rápido crescimento, além da facilidade de retirá-las de lagoas e pela possibilidade de aproveitamento de sua biomassa. As plantas aquáticas podem ser utilizadas para uso animal ou humano; sua utilização para consumo deve ser cautelosa, devido aos níveis de poluentes acumulados. Existem sistemas de fitorremediação baseados em

macrófitas¹⁶ aquáticas flutuantes (enraizadas ou livres), submersas e emergentes. Todas as macrófitas exercem importante papel na remoção de substâncias dissolvidas, assimilando e incorporando-as a sua biomassa, porém a espécie *Eichhornia crassipes*, o aguapé, tem sido a hidrófita mais estudada para o tratamento de água com plantas (DINARDI *et al.*, 2003).

2.3.3 *Pistia stratiotes*

Pistia stratiotes (Figura 13) é uma erva invasiva de água corrente que é encontrada através dos trópicos e subtropicais. É uma planta flutuante livre que é capaz de formar densos tapetes sobre a superfície dos lagos, lagoas, rios e outras massas de água. *Pistia stratiotes* é uma planta popular de lagos de jardim e é frequentemente espalhada pelo despejo de aquário ou lagos de plantas ornamentais. Fragmentos, ou a planta inteira, podem ser transmitidos através de barcos ou equipamento de pesca a partir de uma área infestada para um corpo de água limpa (Global Invasive Species Database, 2009).

Nome científico: *Pistia stratiotes*

Família: *Araceae*

Nomes populares: alface d'água, repolhinho d'água, erva de santa Luzia, mureré e flor d'água.

Ocorrência: Lagos, cursos hídricos, charcos e banhados.

Espécies similares: *Eichhornia crassipes* (aguapé)

Descrição

P. stratiotes é uma planta aquática flutuante livre e perene de águas paradas. Ela é uma *stoloniferous*¹⁷, forma colônias, e tem rosetas de até 15 cm de diâmetro e com raízes emplumadas (Figura 13A). As folhas são verde-claras e com textura aveludada/peluda com muitas veias proeminentes longitudinais (Figure 13B).

¹⁶ São formas macroscópicas de vegetação aquática. Incluem macroalgas, pteridófitas (samambaias e musgos) adaptados para a vida aquática e angiospermas.

¹⁷ Plantas que apresentam estolho. Em botânica, chama-se estolho a um caule rastejante com as características típicas dum caule erecto, que promove a reprodução vegetativa da planta, podendo criar raízes e caules erectos nos nós. Em muitas espécies de gramíneas, como a grama, esta é a forma como a planta consegue colonizar uma grande porção de solo disponível.



Figura 13 – Ilustração (A) e fotografia (B) das raízes e folhas de *P. stratiotes*.

Descrição do habitat

Para *P. stratiotes* sobreviver, ela exige um habitat úmido e temperado. É geralmente encontrado em lagos e rios, porém, pode sobreviver na lama. *P. stratiotes* pode suportar temperaturas extremas de 15 a 35 °C. A melhor faixa de temperaturas para o crescimento da planta é de 22 a 30 °C. *P. stratiotes* prefere águas ligeiramente ácidas (6,5 – 7,2 pH) e moderada dureza (5 -20 KH) (Global Invasive Species Database, 2009).

Impacto ambiental

P. stratiotes pode provocar um grave impacto sobre o ambiente e a economia das zonas infestadas. O denso tapete criado por ligado das rosetas promove a maioria dos problemas encontrados com a alface d'água (Figura 14). Estes tapetes podem ter um efeito econômico negativo, bloqueando hidrovias, aumentando assim a dificuldade de navegação e prejudicando os esforços do controle de inundação. Tapetes de *P. stratiotes* também pode

perturbar os ecossistemas naturais. Eles podem levar a uma menor concentração de oxigênio nas águas e sedimentos devido ao bloqueio da interface ar-água e respiração da raiz. Os tapetes extremamente espessos de *P. stratiotes* podem impedir a luz solar de alcançar águas superficiais. O efeito cumulativo destas características negativas da planta é a perda de biodiversidade nos habitats invadidos. Os tapetes de *P. stratiotes* também podem servir como um lugar para a reprodução de mosquitos (Global Invasive Species Database, 2009).



Figura 14. Infestação por *Pistia stratiotes* ou alface d'água .

Usos

P. stratiotes é uma planta ornamental popular, utilizada em tanques e aquários. Há descrição de usos medicinais das folhas.

Distribuição geográfica

Pistia stratiotes é provavelmente nativo da América do Sul, mas agora é encontrada por todos os trópicos e subtropicais.

2.3.4 Vantagens e desvantagens

Existem vários mitos no uso de processos de biorremediação para degradação e remoção de contaminantes ambientais. Como qualquer método de “limpeza” do meio ambiente, o método possui vantagens e desvantagens.

A maior vantagem da biorremediação é ser um processo natural. A população microbiana aumenta com a presença do composto contaminante e diminui após a degradação do contaminante. Os resíduos da degradação geralmente são menos tóxicos e incluem CO₂, H₂O e biomassa celular. Teoricamente, a biorremediação pode ser usada para a completa destruição de uma grande variedade de contaminantes. Muitos compostos que são considerados tóxicos podem ser transformados em produtos de menor toxicidade. O processo de biorremediação, transferindo contaminantes de um meio ambiente para outro, por exemplo, do solo para a água ou ar, pode permitir a completa destruição do poluente alvo. Por ser um processo que pode ser utilizado *in situ*; elimina a necessidade do transporte do material contaminado ou do contaminante para outros locais para tratamento. A biorremediação pode ser menos onerosa do que outras tecnologias de limpeza de áreas contaminadas ou de resíduos tóxicos (VIDALI, 2001).

Como desvantagem desse método, pode ser citada a necessidade de o composto ser biodegradável – nem todos os compostos são suscetíveis a rápida e completa degradação. Existem casos em que os produtos da biodegradação podem ser mais tóxicos ou mais persistentes do que o composto inicial. Processos biológicos são muitas vezes altamente específicos. Um importante grupo de fatores para o sucesso do processo consiste na presença de população microbiana metabolicamente capaz de degradar o substrato alvo, em condições de crescimento favoráveis no ambiente, e na disponibilidade e quantidade apropriadas de nutrientes e contaminantes. Não é fácil extrapolar dados de ensaios em escala piloto para escala real. Outro ponto negativo do processo de biorremediação é a necessidade de um tempo maior para a degradação do contaminante do que outras opções de tratamento, como escavação e remoção do solo contaminado ou incineração (VIDALI, 2001).

3 ESTRATÉGIAS

DIVULGAÇÃO RESTRITA

4 CAPITULO I

DIVULGAÇÃO RESTRITA

Manuscrito a ser submetido a J. APPL. MICROBIOL.

5 CAPÍTULO II

DIVULGAÇÃO RESTRITA

Manuscrito a ser submetido à Chemosphere

6 CAPITULO III

DIVULGAÇÃO RESTRITA

Manuscrito a ser submetido à Química Nova

7 CAPITULO IV

BIODEGRADAÇÃO DOS RESÍDUOS CONTENDO HERBICIDAS GERADOS DURANTE A EXECUÇÃO DO TRABALHO DE DOUTORADO

DIVULGAÇÃO RESTRITA

Manuscrito a ser submetido à Environmental Science & Technology

8 DISCUSSÃO GERAL

DIVULGAÇÃO RESTRITA

9 CONCLUSÕES

A biorremediação é uma tecnologia interdisciplinar que envolve microbiologia, engenharia, ecologia, geologia e química. A linhagem bacteriana RR02 isolada de solo de cultivo de arroz, com tratamento prévio dos herbicidas bentazona, clomazona, propanil, quincloraque e 2,4-D provou ser eficiente na degradação destes pesticidas e do metabólito 3,4-DCA. Ela está apta a consumir todos os herbicidas isoladamente além de vários pesticidas simultaneamente em uma mistura – estes, no entanto, com uma taxa de degradação inferior. A aeração é uma peça chave para a biodegradação de misturas de herbicidas que, por estarem misturados, ampliam o espectro de atuação, porém inibem ou impedem que ocorra a biodegradação natural deles pelo meio ambiente.

Esta linhagem, devido ao seu maior potencial de degradação de herbicidas ser na fase de crescimento exponencial, é uma excelente candidata para o processo de bioampliação, no qual a biorremediação ocorre através da inoculação de linhagens proficientes na degradação de contaminantes ambientais ou de formulações enzimáticas.

Os resultados obtidos nos experimentos, com a aeração do sistema na presença de propanil, permitem concluir que somente a aeração do sistema já é suficiente para eliminar o propanil do meio ambiente em menos de 14 dias, sem a presença de seu metabolito 3,4-DCA quando tratado com a linhagem RR02.

Outro fator importante é que a presença de um pesticida pode inibir a biorremediação dos outros pesticidas aplicados simultaneamente ou já presentes no solo ou nos recursos hídricos. Essa falta de ação pode ser devido a inibição de uma enzima chave do metabolismo ou por produzir algum metabólito tóxico ou que tenha uma ação inibitória em enzimas chaves do metabolismo de xenobióticos.

O tempo necessário para a degradação dos herbicidas do estudo, quando misturados, é de 28 dias, o que é excelente para evitar a biodegradação acelerada – fato que impediria o pesticida de exercer sua função de proteção contra possíveis pragas, plantas daninhas ou insetos. Em escala laboratorial, o período de biodegradação foi de 28 dias, entretanto no meio ambiente a velocidade de degradação pode ser mais rápida devido a outros fatores de degradação como luz solar, precipitação pluvial e temperatura, microrganismos nativos. Este aumento na velocidade de degradação nos permite aplicar a linhagem alguns dias antes da

colheita, e não alguns meses, além de permitir o preparo do solo para receber outras culturas que possam ser sensíveis a esses herbicidas em um menor tempo.

Os herbicidas usados na cultura de arroz irrigado têm um efeito prejudicial para a vida aquática, pois a drenagem da água da lavoura das culturas de arroz coincide com a época de reprodução dos peixes. Então, todo sistema de cultivo de arroz que libera água para o meio ambiente precisa ser monitorado com relação a concentração de pesticidas, e planos de gerenciamento, de manejo da cultura de arroz irrigado e de desempenho para proteger a vida aquática precisam ser desenvolvidos e implementados. O método de biorremediação desenvolvido pode ser utilizado tanto em campo de cultivo de arroz irrigado ou de outra cultura, quanto em indústrias de síntese de pesticidas. É um método economicamente viável, uma vez que não é necessária a introdução de nenhuma forma de energia ou substância química, além de seu baixo impacto ambiental, pois os microrganismos são nativos do solo de cultivo de arroz.

10 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliar a biodegradação de outros pesticidas do mesmo grupo químico dos herbicidas estudados por ação da linhagem bacteriana RR02.
- Determinar se a produção de inóculos para um pesticida específico, com uma exposição previa a um único pesticida, pode modificar o potencial de degradação deste pesticida ou de uma mistura de pesticidas em solução. Produzir inóculos específicos, expondo as células aos pesticidas isoladamente ou numa mistura, e aplicá-los numa solução contendo mistura de pesticidas e avaliar seu efeito na degradação dos pesticidas.
- Avaliar a participação de enzimas oxidativas e redutoras na biodegradação de diferentes herbicidas ou de pesticidas.
- Determinar, através de GC-MS ou LC-MS, os metabólitos da biodegradação dos herbicidas e outros pesticidas, usando inibidores.
- Determinar a presença ou não dos pesticidas intracelularmente nas células bacterianas e nas folhas, raízes, frutos e outras estruturas de armazenamento de substâncias de reserva das plantas.
- Utilizar a biotecnologia para determinar e isolar o(s) gene(s) envolvido(s) na degradação dos pesticidas. Utilizá-los para aumentar a eficiência da biodegradação de pesticidas.

11 APLICAÇÕES

Abaixo, discute-se as aplicações dos resultados obtidos neste trabalho.

Na indústria de produção de pesticidas

A indústria pode fornecer junto com a embalagem do pesticida a linhagem RR02, estabilizada em farelo de cereais ou mesmo liofilizada. Após o uso do pesticida, o agricultor poderá incubar na embalagem a linhagem e depois do tempo indicado retornar a embalagem para a empresa.

A indústria pode utilizar a linhagem RR02 em tanques de estabilização de efluentes da produção que contenham pesticidas. O custo para aplicar esse procedimento é baixo, uma vez que esta linhagem cresce perfeitamente em soluções aquosas contendo apenas os contaminantes. A indústria só teria o gasto da aeração, pois o sistema é permanente, ou seja, enquanto houver contaminante há viabilidade celular.

Na agroindústria

A linhagem RR02 pode minimizar a contaminação de recursos hídricos como rios, lagos ou córregos. O agricultor antes de liberar a água do cultivo de arroz pode aplicar a linhagem RR02, em forma de spray, na lavoura e após o tempo recomendado, liberar a água. O impacto ambiental gerado pela linhagem RR02 é mínimo, para não dizer nulo. Na natureza a competição com outros microrganismos e a oferta de fonte de energia regula a população dos microrganismos.

Também é possível utilizar a linhagem RR02 em solos contaminados, desde que estejam úmidos. A descontaminação de solos é importante, pois evita a contaminação dos recursos hídricos pela lixiviação do solo, permitindo assim que seja feito um rodízio de cultivo.

Em laboratórios

Para laboratórios que trabalhem com esses herbicidas, um sistema que consiste basicamente em um recipiente de 50 L ou mais, dependendo do volume de resíduos gerados, pode ser construído. O recipiente pode ser opaco e com uma bomba de aquário para promover a aeração do sistema. Os resíduos aquosos de pesticidas (padrões ou soluções comerciais) podem ser armazenados nesse recipiente. Após uma análise para determinar a concentração pode-se descartar o conteúdo do recipiente, tendo o cuidado de permanecer com a quinta parte da solução no frasco para continuar com o tratamento dos resíduos. Outro cuidado que deve ser tomado é não colocar solventes orgânicos.

12 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGROFIT. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/>. Acesso em: fevereiro, 2009.
- ALEXANDER, M. Cometabolism. In: Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 249–267, 1999.
- ANDRETA, C.W.S.; ROSA, R.M.; TONDO, E.C.; GAYLARDE, C.C.; HENRIQUES, J.A.P. Identification and molecular characterization of a bacillus subtilis IS13 strain involved in the biodegradation of 4,5,6-trichloroguaiacol. *Chemosphere*, 55, 631-639, 2004.
- ANVISA. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em janeiro, 2007.
- ARBELI, Z.; FUENTES, C.L. Accelerated biodegradation of pesticides: an overview of the phenomenon, its basis and possible solutions, and a discussion on the tropical dimension. *Crop Science* 26, 1773-1746, 2007
- BAIRD, C. Química Ambiental. Porto Alegre: Bookman, 2. ed. p. 313-400, 2002.
- BARAC, *et al.* Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants. *Nature Biotechnology*, London, v22, p583-588, 2004.
- BARATHI, S., VASUDEVAN, N. “Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil”, *Environmental International*, v. 26, pp. 413-416, 2001.
- BARBOSA, L.C.A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Viçosa: UFV. P 15-34, 2004.
- BIZIUK, M. *et al.* Occurrence and determination of pesticides in natural and treated waters. *Journal of Chromatography A*, v. 754, p. 103-123, 1996.

- BOON, N.; GORIS, J.; PAUL, V.; VERSTRAETE, W.; TOP, E. M. Bioaugmentation of activated sludge by an indigenous 3-chloroaniline-degrading *Comamonas testosterone* strain, *I2gfp*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, n. 7, p. 2906-2913, 2000.
- BORELA, M.; VARELA, Q.D. Antioxidantes enzimáticos. . In: Salvador, M.; Henriques, J.A.P. Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo. Canoas: ed. Ulbra, 2004.
- BRUNSBACH, F. R.; REINEKE, W. Degradation of chloroanilines in soil slurry by specialized organisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 40, p. 402-407, 1993.
- CABRERA, L'; COSTA, F.P.; PRIMEL, E.G. Estimativa de risco de contaminação por pesticidas na região sul de estado do RS. *Química Nova*. 31, 1982-1986, 2008.
- CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. Estimativas de Safras: 2005/2006. Disponível em:<www.conab.gov.br>. Acesso em: outubro, 2006.
- CORREA, I.E.; STEEN, W. Degradation of propanil by bacterial isolates and mixed populations from a pristine lake. *Chemosphere*, 30, 103-116, 1995.
- COSTA, V. & FERREIRA, P. M. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspec. Med.*, 22: 217-246, 2001.
- DAS, D., VEZIROGLU, T.N. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Energy* 26, 13–28, 2001.
- DE WINDE. J.H.; THEVELEIN J.M. & WINDERICK, J (1997) Adaptation to nutrient depletion in yeast. In: MAGER, W.H. (ED) *Yeast stress responses*. Springer-Verlag, Heidelberg, 7-52.
- DEJONGHE, W.; BERTELOT, E.; GORIS, J.; BOON, N.; CRUL, K.; MAERTENS, S.; HOFTE, M.; DE VOS, P.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Synergistic degradation of

linuron by a bacterial Consortium and isolation of a single linuron-degrading *Variovorax* strain.

DERUDI, M.; VENTURINI, G.; LOMBARDI, G. NANO, G.; ROTA, R. Biodegradation combined with ozone for the remediation of contaminated soils. *European Journal of soil Biology* 43, 297-303, 2007.

DIAZ, E. Bacterial degradation of aromatic pollutants: a paradigm of metabolic versatility. *International Microbiology* 7, 173-180, 2004.

DINARDI, A. L. *et al.* Fitorremediação. III Forum de estudos contábeis 2003.

DUA, M.; SINGH, A.; SETHUNATHAN, N.; JOHRI, A.K. BIOTECHNOLOGY AND BIOREMEDIATION: success and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol* 59, 143-152, 2002.

EERD, L.L.; HOAGLAND, R.E.; ZABLOTOWICZ, R.E.; HALL, J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed science* 51, 472-495, 2003.

E-escola. Disponível em: <<http://www.e-escola.pt/>>. Acesso em: 30.01.2009

EMBRAPA. Disponível em:

<<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Arroz/ArrozIrigadoBrasil/index.htm>>. Acesso 10.12.2008

ENGELHARDT, G.; WALLNÖFER, P.R.; PLAP, R. Purification and properties of an aryl acylamidase of *Bacillus sphaericus*, catalyzing the hydrolysis of various phenilamide herbicides and fungicides. *Applied Microbiology*, 709-718, 1973.

EPA. Environmental Protection Agency. Disponível em: <<http://www.epa.gov/swerust1/cat/biopiles.htm>>. Acesso em: 30.02.2009

- EPPERLEIN, N.; KETTNER, B.; BERGMULLER, W.; KRAMHOLLER, B.; SPEER, K. GC/MS-determination of 3,4-dicloroaniline as a metabolite of selected herbicides. 6th European pesticide residue workshop, 21.-25.05.2006, Corfu/ Greece.
- FORMAN, S.; NOVAK, J.; TYKVA, R.; KAS, J.; WIMMER, Z.; RUMML, T. Evaluation of toxicity of pesticides and their biodegradation products using human cells. *Chemosphere* 46, 209-217, 2002.
- FOURNIER, J.C.; CATROUX, C.; CHARNAY, M.P. Behavior of soil microflora in pesticide degradation. In *Fate and prediction of environmental chemicals in soils, plants, and aquatic systems*; Mansour, M., Ed. Lewis publishers: Ann Arbor, MI, 199-208, 1993.
- FUGE, E. K. & WERNER, M. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In: HOHMANN, S & MAYER, W. H. (Eds) Heidelberg: Springer-Verlag. *Yeast Stress Response*, 53-74, 1997.
- GANCEDO, J.M. Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62, 334-361, 1998
- GARCEZ, M et al., Radicais livres e espécies reativas. In: Salvador, M.; Henriques, J.A.P. *Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo*. Canoas: ed. Ulbra, 2004.
- GERHARD, K. E.; HUANG, X.D.; GLICK, B.R.; GREENBERG, B.M. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176, 20-30, 2009.
- GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. *Chemosphere* 56, 1021-1032, 2004.
- GLOBAL INVASIVE SPECIES DATABASE. Disponível em: <<http://www.issg.org/database/>> Acesso em: 20.01.2009
- GONÇALVEZ F.F. Tese de doutorado, Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2007.

- GRATÃO, P.L., ET AL. Phytoremediation: Green technology for the clean up of toxic metals in the environment. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, Vol. 17, p.53-64, 2005.
- GROUDEVA, V.I.; GROUDEV, S.N.; DOYCHEVA, A.S. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *Int. J. Miner. Process.* 62, 293-299, 2001.
- HÖHENER, P., HUNKELER, D., HESS, A., “Methodology for evaluation of engineered *in situ* biodegradation: lessons from a case study”, *Journal of Microbiological Methods*, v. 32, pp. 179-192, 1998.
- IWAMOTO, T.; NASU, M. Current biorremediation practice and perspective. *J. Bioscience and Bioengineering* 92, 1-8, 2001.
- IRGA. Disponível em <<http://www.irga.rs.gov.br/>>. Acessado em: 14.03.2008
- JANKE, D; FRITSCH, W. Nature and significance of microbial cometabolism of xenobiotics. *Journal of Basic Microbiology*, 23, 603-619, 1985.
- JANSSEN D.B., OPPENTOCHT J.E., POELARENDS, G. Microbial dehalogenation. *Curr Opin Biotechnol* 12:254–258, 2001.
- KARPOUZAS, D.G.; FOTOPOULOU, A.; MENKISSOGLU-SPIDOUDI, U.; SINGH, B.K. Non-specific biodegradation of the organophosphorus pesticides, cadusafos and ethoprophos, by two bacterial isolates. *FEMS Microbiology Ecology*. 53, 369-378, 2005.
- KE-BIN, L. *et al.* Degradation of herbicides atrazine and bentazone applied alone and in combination. *Pedosphere*, 18, 265-272, 2008.
- KIM, J.E.; WANG, C.J.; BOLLAG, J.M. Interaction of reactive and inert chemicals in the presence of oxidoreductase: Reaction of the herbicides bentazon and its metabolites with humic monomers. *Biodegradation*. 8, 387-392, 1998.

- KLUMPP, A.; BAUER, K.; FRANZ-GERSTEIN, C.; MENEZES, M. Variation of nutrient and metal concentration in aquatic macrophytes along the Rio Cachoeira in Bahia (Brazil). *Environmental International*. 28, 165-171, 2002.
- KOLTER, R. SIEGLE, D.A., TORMO, A. The Stationary phase of the bacterial life cycle. *Anna Rev. Microbiol.* 47, 855-74, 1993.
- KULKARNI, M. CHAUDHARI, A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: an overview. *J. Environmental management* 85, 496, 2007.
- KUMAR, P., SATYANARAYANA, T. Optimization of culture variables for improving glucoamylase production by alginate-entrapped *Thermomucor indicae-seudaticae* using statistical methods. *Bioresour. Technol.* 98, 1252–1259, 2007.
- LAMEGO, F.P.; VIDAL, R.A. Fitorremediação: plantas como agentes de despoluição. *Pesticidas: r. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*. Vol.17, p.9-18, 2007.
- LAWRENCE, P.W.; ELLIS, L.B.M. Predicting biodegradation. *Environmental Microbiology*., 119-124, 1999.
- LEVIN, D.B., PITT, L., LOVE, M. Biohydrogen production prospects and limitations to practical application. *Int. J. Hydrogen Energy* 29, 173–185, 2004.
- LI, Z.; SHAO, T.; MIN, H.; LU, Z.; XU, X. Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. *Soil biology & Biochemistry*, <doi: 10.1016/j.soilbio.2008.10.26>, 2008.
- LIPTHAY, J.R.; TUXEN, N.;JOHNSEN, K.; HANSEN, L.H.; ALBRECHTSEN, H.; BJERG, P.L.; AAMAND, J. In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 461-467, 2003.

- LIU, S.Y.; SHOCKEN, M.; ROSAZZA, J.P.N. Microbial transformations of clomazone. *J. Agric. Food Chem.* 44, 313-319, 1996.
- LOPEZ, L.; POZO, C.; RODELAS, B.; CALVO, C.; JUAREZ, B.; MARTINEZ-TOLEDO, M.V.; GONZALEZ-LOPEZ, J. Identification of bacteria isolated from oligotrophic lake with pesticide removal capacities. *Ecotoxicology* 14, 299-312, 2005.
- LORENZO, V. Systems biology approaches to bioremediation. *Current Opinion in Biotechnology.* 19, 1-11, 2008.
- LU, Z. *et al.* Catalase and superoxide dismutase activities in a *Stenotrophomonas maltophilia* WZ2 resistant to herbicide pollution. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72, 136-143, 2009.
- MACEDO, V.R.M. *et al.* Manejo da água e da adubação para maior sustentabilidade da lavoura de arroz pré-germinado no RS. Instituto Rio Grandense de Arroz, Boletim técnico 3, 2007.
- MALIK, A. Metal bioremediation through growing cells. *Environmental International.* 30, 261-278, 2004.
- MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; MAIA, A. H. N. Biodegradação do herbicida propanil por fungo isolado da rizosfera de arroz. *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 15,113-121, 2005.
- MURPHY, T.P., LAWSOM, A., KUMAGAU, M. "Review of emerging issues in sediment treatment", *Aquatic Ecosystem Health e Management*, v. 2, pp. 419- 434, 1999.
- NAKAGOME, F.K.; NOLDIN, J.A.; RESGALA Jr, C. Toxicidade aguda de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladóceros *Daphnia magna*. *Pesticidas: r. ecotoxicol. e meio ambiente.* Vol.16, p.2006.
- NATH, K., DAS, D. Improvement of fermentative hydrogen production: various approaches. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 65, 520–529, 2004.

- NAWAB, A.; ALEEM, A. MALIK, A. Determination of organochlorine pesticides in agricultural soil with special reference to γ -HCH degradation by *Pseudomonas* strains. *Bioresources Technology* 88, 41-46, 2003.
- OLIVEIRA, C. F. Censo da lavoura de arroz irrigado do Rio Grande do Sul – safra 2004/5. Porto Alegre: IRGA - Política Setorial, 2006. 122 p. Disponível em: <<http://www.irga.rs.gov.br>>. Acesso em: 16 jan 2007.
- PANDLEY, G.; JAIN, R. Bacterial chemotaxis toward environmental pollutants: role in bioremediation. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 5789-5795, 2002.
- PELCZAR, M. J. *Microbiologia: Conceitos e Aplicações*. São Paulo: MAKRON Books, 1996.
- PILON-SIMTS, E. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. v. 56, p.15-39, 2005.
- PRIMEL, E.G. Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria, Brasil, 2003.
- PRIMEL, E.G.; ZANELLA, R.; KURZ, M.H.; GONÇALVES, F.F.; MACHADO, S.D.; MARCHEZAN, E. *Quim. Nova*. 28, 605, 2005.
- PRIMEL, E.G; ZANELLA, R.; KURZ, M.H.S.; GONÇALVES, F.F.; MARTINS, M.L.; MACHADO, L.O.S.; MARCHEZAN, E. Risk assesment of surface water contamination by herbicide residues: monitoring of propanil degradation in irrigated rice field waters using HPLC-UV and confirmation by GC-MS. *J. Braz. Chem. Soc.*, 18, 585-589, 2007.
- PRINGLE, J.R. & HARTWELL, L.H. The *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. In: Strathern, J.N., Jones, E.W. & Broach, J.R. eds. *The molecular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae, life cycle and inheritance*. Cold Spring Hargbor, NY, 97-142, 1982.
- QIAO, C.-L.; YAN, Y.-CH.; SHANG, H.Y.; ZHOU, X.T.; ZHANG, Y. Biodegardation of

pesticides by immobilized recombinant *Escherichia coli*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 71, 370-374, 2003.

REKHA, S.N.; NAIK, R.P. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. Chemical health Safety 12-19, 2006.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. Introdução à Química Ambiental. Porto Alegre: Bookman, p. 44-47, 2004.

ROSZAK, D.B.; COLWELL, R.R. Survival strategies of bacteria in the natural environmental. Microbiological reviews 51, 365-379, 1987.

SANCHES et al. Pesticidas e seus respectivos riscos associados á contaminação da água. Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente. Vol.13, p.53-58, 2003.

SCHMIDT, S.K., ALEXANDER, M. Effects of dissolved organic carbon and second substrates on the biodegradation of organic compounds at low concentrations. Applied Environmental Microbiology 49, 822–827, 1985.

SEMPLE, K.T.; DOICK, K.J.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions processes and measurement. Environmental Pollution 150, 166-176, 2007.

SEMPLE, K.T.; DOICK, K.J.; WICK, L.Y.; HARMS, H. Microbial interactions with organic contaminants in soil: definitions processes and measurement. Environmental pollution 150, 166-176, 2007.

SILVA, C.M.M.S; FAY, E.F. Pesticidas & Ambiente. Brasilia, DF : Embrapa Informação Tecnológica, p. 145-192, 2004.

SINDAG. Vendas – Culturas – 2004 – US\$. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br>>
Acesso em: 16 jan 2007.

SINGH, B.K.; KUHAD, R.C.; SINGH, A.; LAL, R.; TRIPATHI, K.K. Biochemical and

molecular basis of pesticides degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology* 19, 197-225, 1999.

SINGH, B.K.; WALKER, A.; MORGAN, J.A.; WRIGHT, D.J. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter* StrainB-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl. Environm. Microbiol.* 70, 4855-4863, 2004.

SORENSEN, S.R.; BENDING, G. D.; JACOBSEN, C.S.; WALKER, A.; AAMAND, J. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. *FEMS Microbiology Ecology* 45, 1-11, 2003.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Balneário Camboriú: Elf Editora e Indústria Gráfica Ltda. 126 p, 2003.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Santa Maria, 159 p, 2005.

SOSBAI. Sociedade Sul-Brasileira de Arroz Irrigado. Arroz irrigado: Recomendações técnicas da pesquisa para o sul do Brasil. Pelotas: editora gráfica Gespi, 126 p, 2007.

SPADOTTO, C. A. *et al.* Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. 1ª ed. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente. 29 p, 2004.

SRIVASTAVA, S.; THAKUR, I.S.; Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality of *Aspergillus niger* for removal of hexavalent chromium in soil microcosm. *Soil Biology & Biochemistry.* 38, 1904-1911, 2006.

SUROVTSEVA, E. G.; IVOILOV, V. S.; VASILEVA, G. K.; BELYAEV, S. S. Degradation of chlorinated anilines by certain representatives of the genera *Aquaspirillum* and *Paracoccus*. *Microbiology*, v. 65, p.553-559, 1996.

TEXEIRA, S.C.G.; CANELA, M.C. Degradação do pesticida Padron por processos fotoquímicos utilizando a luz artificial e solar. *Química Nova.* 30, 1830-1834, 2007.

- THASSITOU, P.K.; ARVANITTOYANNIS, I.S. Bioremediation: a novel approach to food waste management. *Trends Food Science & Technology* 12, 185-196, 2001.
- TIXIER, C., SANCELME, P.; BONNEMOY, F.; CUER, A.; VESCHAMBRE, H. Degradation products of a phenilurea herbicides, diuron: ecotoxicity, and biotransformation. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1381-1389, 2001.
- TOPP, E. *et al.* Pesticides: microbial degradation and effects on microorganisms. In: ELSAS, J.D. van; TREVORS, J.T. (ed). *Modern Soil microbiology*. New Yourk: M. Dekker. P. 547-757, 1997.
- THOPSON, I.P.; GAST, C.J. VAN DER; CIRIC, L.; SINGER, A.C. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology* 7, 909-915, 2005.
- VIDALI, M. Bioremediation. An overview. *Pure App. Chem.* Vol 73, 1163 – 1172, 2001.
- ZABLOTOWICZ, R. M.; LOCKE, M. A.; HOAGLAND, R. E.; KNIGHT, S. S.; CASH, B. Fluorescent *Pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes: *in vitro* herbicide biotransformations. *Environmental Toxicology*, v.16, n.1, p.9-19, 2001.
- ZANELLA, R.; PRIMEL, E. G.; GONÇALVES, F.F.; Kurz, M.H.S.; Mistura, C. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic procedure for the determination of herbicide residues in surface and agriculture Waters. *J. Sep Sci.* 26, 935-938, 2003.
- WAGNER, S.C.; ZABLOTOWICZ, R. M.; GASTON, L.A.; LOCKE, M.A.; KINSELLA, J. Bentazon degradation in soil: Influence of tillage and history of bentazon application. *J. Agriculture Food and Chemistry.* 44, 1593-1598, 1996.
- WANG, S.; LIU, F.; JIN, S.; JIANG, S. Dissipation of propisocholor and residue analysis in rice, soil and water under field conditions. *Food Control* 18, 731-735, 2007.